

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 106**

51 Int. Cl.:

A61K 36/05 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2013 PCT/EP2013/074105**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14090515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2013 E 13792678 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2931295**

54 Título: **Extracto de algas que comprende unos polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

11.12.2012 FR 1261909

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

04.03.2020

73 Titular/es:

**AMADEITE (100.0%)
ZA du Haut Bois
56580 Brehan, FR**

72 Inventor/es:

**DEMAIS, HERVÉ;
LE CHEVILLER, ISABELLE. y
BALUSSON, SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 746 106 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

Extracto de algas que comprende unos polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados y sus aplicaciones

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un extracto de algas que comprende unos polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados, para su utilización en unas aplicaciones terapéuticas y profilácticas.

[0002] Las especies de ulvas (Ulvales, Chlorophyta) son unas algas abundantes que se encuentran en la zona intercotidal o marismas. Colonizan los sustratos duros, ancladas por un disco de fijación, pero determinadas especies pueden asimismo dar lugar a unas formas vivas libres, a la deriva. Las ulvas son unas algas de crecimiento rápido y oportunistas en cuanto al espacio y a la absorción de los nutrientes. Su crecimiento en la columna de agua se observa particularmente en las aguas costeras eutrofizadas y en las lagunas donde *Ulva* sp prolifera en forma de «mareas verdes» (Fletcher, 1996). A menudo tiene como resultado una producción de masa y unas encalladuras masivas que producen unos gases nocivos cuando se acumulan (Morand et Briand, 1996). Hasta la actualidad, esta biomasa ha presentado un valor añadido muy bajo y los medios para utilizarla fuera del compuesto (Mazé et al. 1993, Cuomo et al. 1995), de la producción de metano (Briand et Morand, 1997), del consumo alimentario humano (Pérez, 1997) o como base de papel (Nicolucci et Monegato 1993) podrían permitir aprovechar sus propiedades específicas.

[0003] En la actualidad, la utilización de las algas verdes se basa esencialmente en unos usos que permiten abrir nuevas vías de eliminación para estas algas consideradas indeseables. Las vías de aplicación previstas se refieren a la producción de biogás (Briand & Morand 1997, Morand & Briand 1999, Morand et al., 2006), los biomateriales (bioplásticos) (Chiellini et al., 2008), bebederos biodegradables (Sassi et al., 2008), papeles y cartones para embalaje (Nicolucci & Monegato, 1993), nanocompuestos de carga (Demais et al., 2006a, 2006b), la nutrición animal: alimentos desintoxicantes para animales (Demais et al., 2006a), proteínas y factores de apetencia para la crianza de peces (DeBose et al., 2008, Kut Guroy et al., 2007) y la cosmética (agentes tensioactivos) (Ranson et al., 2008).

[0004] Las propiedades químicas y fisicoquímicas de los polisacáridos contenidos en estas algas hacen de éstas unos candidatos atractivos como nuevos polímeros funcionales y biológicamente activos en los ámbitos del consumo humano y animal, farmacéutico, químico, de la acuicultura y agrícolas (Robic A, et al. Carbohydrate Polymers 77 (2009) 206-216; Lahaye M Robic A, Biomacromolecules Vol 8 N.º 6, 2007).

[0005] Según uno de estos aspectos, la presente invención se refiere a un extracto de algas del orden de las ulvaes, en particular un extracto de algas verdes del tipo *Ulva*, que comprenden unos polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa. Para el uso según la reivindicación 1.

[0006] En particular, dichos polisacáridos del extracto de algas comprenden manosa y/o arabinosa. Más particularmente, dichos polisacáridos comprenden por lo menos 0,005 % de manosa y/o por lo menos 0,005 % de arabinosa, en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas, principalmente por lo menos 0,01 % de manosa y/o por lo menos 0,01 % de arabinosa. Incluso más particularmente, dichos polisacáridos comprenden manosa en una cantidad que varía del 0,01 al 0,20 % y arabinosa en una cantidad que varía del 0,01 al 0,5 % en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas, principalmente manosa en una cantidad que varía del 0,03 al 0,15 % y de arabinosa en una cantidad que varía del 0,01 al 0,2 %.

45 **[0007]** De forma particular, dichos polisacáridos comprenden, además:

- galactosa;
- glucosa;
- ramnosa;
- 50 - xilosa; y
- ácido glucurónico.

[0008] Más particularmente incluso, dichos polisacáridos comprenden:

- 55 - del 0,05 al 0,5 % de galactosa, principalmente del 0,1 al 0,4 %;
- del 0,005 al 0,05 % de glucosa, principalmente del 0,01 al 0,03 %;
- del 2 al 15 % de ramnosa, principalmente del 5 al 10 %;
- del 0,1 al 1 % de xilosa, principalmente del 0,3 al 0,7 %; y
- del 1 al 7 % de ácido glucurónico, principalmente del 1 al 5 %;

60 en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

[0009] De este modo, por ejemplo, se puede citar un extracto de algas según la invención que comprende:

- 65 - manosa;

- arabinosa;
- galactosa;
- glucosa;
- ramnosa;
- 5 - xilosa; y
- ácido glucurónico.

[0010] Se puede además más particularmente citar un extracto de algas según la invención que comprende:

- 10 - del 0,01 al 0,20 % de glucosa, principalmente del 0,03 al 0,15 %;
- del 0,01 al 0,5 % de arabinosa, principalmente del 0,01 al 0,2 %;
- del 0,05 al 0,5 % de galactosa, principalmente del 0,1 al 0,4 %;
- del 0,005 al 0,05 % de glucosa, principalmente del 0,01 al 0,03 %;
- del 2 al 15 % de ramnosa, principalmente del 5 al 10 %;
- 15 - del 0,1 al 1 % de xilosa, principalmente del 0,3 al 0,7 %; y
- del 1 al 7 % de ácido glucurónico, principalmente del 1 al 5 %;

en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

20 **[0011]** Se puede incluso más particularmente citar un extracto de algas según la invención que comprende:

- 0,09 % de manosa;
- 0,1 % de arabinosa;
- 0,3 % de galactosa;
- 25 - 0,02 % de glucosa;
- 8,1 % de ramnosa;
- 0,5 % de xilosa; y
- 2,6 % de ácido glucurónico;

30 en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.

[0012] Más particularmente, el extracto de algas contiene polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior a 40, 30, 20 o 15 kDa. Más particularmente incluso, los polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados del extracto de algas según la invención tiene un tamaño inferior a o igual a 15 kDa.

35 **[0013]** Un dalton (Da) es una unidad de masa definida como igual a una doceava parte de la masa de un átomo de carbono 12, masa que después se calculará a partir de una mezcla de varios isótopos (principalmente carbono 12 y carbono 13, que tienen 6 y 7 neutrones, respectivamente, además de los 6 protones de cualquier átomo de carbono). Un dalton es, con una precisión bastante buena, la masa de un átomo de hidrógeno, el valor exacto es 40 1,00794 uma (unidad de masa atómica). El kilodalton (kDa) es igual a 1000 Da.

[0014] En el contexto de la invención presente, las masas mencionadas en kDa se determinan por cualquier método utilizado habitualmente por la persona experta, en particular las masas de polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados de extractos de algas según la presente invención pueden ser discriminados por 45 ultrafiltración en las membranas permitiendo filtrar sólo las moléculas de tamaños predeterminados.

[0015] Por «algas verdes del tipo *Ulva*», entendemos las algas verdes agrupadas en el género *Ulva*, de la familia de las Ulvaceae, del orden de las ulvales. Se pueden citar principalmente las especies y las subespecies siguientes: *Ulva acanthophora*, *Ulva anandii*, *Ulva angusta*, *Ulva arasakii*, *Ulva armoricana*, *Ulva atroviridis*, *Ulva attenuata*, *Ulva beytensis*, *Ulva bifrons*, *Ulva brevistipitata*, *Ulva bulbosa*, *Ulva burmanica*, *Ulva byssoidea*, *Ulva californica*, *Ulva chaetomorphoides*, *Ulva clathrata*, *Ulva coccinea*, *Ulva compressa*, *Ulva conglobata*, *Ulva cornucopiae*, *Ulva cornuta*, *Ulva covelongensis*, *Ulva crassa*, *Ulva crassimembrana*, *Ulva curvata*, *Ulva dactylifera*, *Ulva denticulata*, *Ulva elegans*, *Ulva elminthoides*, *Ulva enteromorpha*, *Ulva erecta*, *Ulva expansa*, *Ulva fasciata*, *Ulva fenestrata*, *Ulva flexuosa*, *Ulva gelatinosa*, *Ulva geminoidea*, *Ulva gigantea*, *Ulva grandis*, *Ulva hendayensis*, 50 *Ulva hookeriana*, *Ulva hopkirkii*, *Ulva indica*, *Ulva intestinalis*, *Ulva intestinaloides*, *Ulva intricata*, *Ulva intybacea*, *Ulva javanica*, *Ulva kyllinii*, *Ulva lactuca*, *Ulva lactucaefolia*, *Ulva laetevirens*, *Ulva laingii*, *Ulva linearis*, *Ulva lingulata*, *Ulva linkiana*, *Ulva linza*, *Ulva lippii*, *Ulva litoralis*, *Ulva littorea*, *Ulva lobata*, *Ulva lubrica*, *Ulva marginata*, *Ulva micrococca*, *Ulva myriotrema*, *Ulva neapolitana*, *Ulva nematoidea*, *Ulva ohnoi*, *Ulva olivacea*, *Ulva olivaceum*, *Ulva pacifica*, *Ulva papenfussii*, *Ulva paradoxa*, *Ulva parva*, *Ulva parvula*, *Ulva patengensis*, *Ulva percursa*, *Ulva pertusa*, *Ulva phyllosa*, 55 *Ulva popenguinensis*, *Ulva porrifolia*, *Ulva procera*, *Ulva profunda*, *Ulva prolifera*, *Ulva pseudocurvata*, *Ulva pseudolinza*, *Ulva pulchra*, *Ulva purpurascens*, *Ulva quilonensis*, *Ulva radiata*, *Ulva ralfsii*, *Ulva ranunculata*, *Ulva reticulata*, *Ulva rhacodes*, *Ulva rigida*, *Ulva rotundata*, *Ulva rubens*, *Ulva saifullahii*, *Ulva scagelii*, *Ulva scandinavica*, *Ulva sericea*, *Ulva serrata*, *Ulva simplex*, *Ulva sorensenii*, *Ulva spinulosa*, *Ulva stenophylla*, *Ulva stipitata*, *Ulva sublittoralis*, *Ulva subulata*, *Ulva taeniata*, *Ulva tenera*, *Ulva tetragona*, *Ulva torta*, *Ulva tuberosa*, *Ulva umbilicata*, 60 *Ulva uncialis*, *Ulva uncinata*, *Ulva usneoides*, *Ulva utricularis*, *Ulva utriculosa*, *Ulva uvoides*, *Ulva ventricosa*.

[0016] Más particularmente, el extracto de algas es un extracto de algas de la especie *Ulva armoricana*.

[0017] Según un modo de realización, el extracto de algas comprende:

- 5
- del 10 al 50 % de carbono;
- del 1 al 10 % de hidrógeno;
- del 1 al 5 % de nitrógeno;
- del 20 al 50 % de oxígeno; y
10 - del 1 al 15 % de azufre;

en porcentaje en masa de la materia seca total del extracto de algas.

[0018] Más particularmente incluso, el extracto de algas comprende:

- 15
- de 15 al 30 % de carbono;
- del 3 al 6 % de hidrógeno;
- del 1 al 3 % de nitrógeno;
- del 25 al 40 % de oxígeno; y
20 - del 2,5 al 10 % de azufre;

en porcentaje en masa de la materia seca total del extracto de algas.

[0019] Los otros elementos químicos presentes en la materia seca del extracto están representados principalmente por los minerales (Ca, K, Na, Mg, Al, Cl, I, P, Fe, etc.).

[0020] Más particularmente, el extracto de algas según la invención se caracteriza por el espectro RMN ¹H presentado en la Figura 1.

30 **[0021]** Este espectro ¹H se registra a 298 K en un espectrómetro Bruker Avance 500 equipado con una sonda criogénica inversa 5 mm ¹H/¹³C/¹⁵N TCI. Antes del análisis, las muestras se disuelven en 99,97 % de átomo de D₂O. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm en comparación con el patrón externo (ácido trimetilsililpropiónico). No se ha realizado ninguna supresión de la señal de HOD.

35 **[0022]** Según otro de estos aspectos, la presente invención se refiere a un extracto de algas del orden de las ulvales para el uso según la reivindicación 12 susceptible de ser obtenida con un procedimiento de producción de un extracto de algas del orden de las ulvales, en particular un extracto de algas verdes del tipo *Ulva*, en el cual:

- a) las algas se lavan y se les quita la arena;
40 b) dichas algas se trituran;
c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
d) dicha fase líquida se clarifica;
e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra; y
f) el jugo de filtración obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca.

45 **[0023]** Según un modo de realización del procedimiento las algas se lavan en agua embotellada.

[0024] Se les puede quitar la arena usando cualquier medio a disposición del experto en la materia.

50 **[0025]** Dichas algas se trituran después principalmente mediante un triturador, como ejemplo un afinador o un cúter.

[0026] A continuación, la fase sólida del triturado, el marco, se separa de su fase líquida, el jugo, por prensado del triturado, por ejemplo, con la ayuda de una prensa de cinta o de platos, o por centrifugación.

55 **[0027]** Por «jugo», entendemos el jugo citoplasmático que incluye la estructura parietal de la doble estructura de las células de las algas.

[0028] La fase líquida obtenida se clarifica después, por ejemplo, con un clarificador a platos, o por centrifugación, decantación o filtración (por ejemplo, de bolsa o de placa).

[0029] Después, se ultra filtra el jugo.

65 **[0030]** Según la realización de un procedimiento la ultrafiltración se realiza en una membrana de menos de 50 kDa, principalmente en una membrana de 40, 30, 20 o 15 kDa. Más particularmente, la membrana será una

membrana de 15 kDa.

[0031] Esta membrana puede ser por ejemplo una membrana de cerámica o una membrana orgánica. Más particularmente, la membrana será una membrana de cerámica.

5

[0032] El jugo de filtración obtenido se puede concentrar después, por ejemplo, por osmosis inversa, evaporación o precipitación, después se seca por liofilización o atomización.

[0033] Opcionalmente, el extracto obtenido puede triturarse de nuevo después, con el fin de obtener un polvo homogéneo en términos de granulometría.

10

[0034] Según uno de estos aspectos, el procedimiento se desarrolla en parte a temperatura ambiente. Por temperatura ambiente, entendemos una temperatura comprendida entre 5 y 25 °C.

[0035] Según otro de estos aspectos, el procedimiento se desarrolla en parte a una temperatura comprendida entre 4 y 10 °C, esto con el fin de evitar los crecimientos microbianos.

15

[0036] El procedimiento difiere de la mayoría de los procedimientos descritos en la técnica anterior debido a la ausencia de una etapa que implique una precipitación del extracto de algas. Se diferencia asimismo de los procedimientos anteriores por la falta de uso de solventes, en particular orgánicos, lo que representa una ventaja importante desde el punto de vista ecológico.

20

[0037] Según uno de estos aspectos, la presente invención se refiere también a una composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 17 que comprende un extracto de algas como el que se ha descrito anteriormente, así como por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25

[0038] La presente invención se refiere a un extracto de algas como se ha descrito anteriormente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de trastornos neurológicos, de la depresión, de la ansiedad, para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en la prevención y/o el tratamiento de los dolores crónicos neuropáticos e inflamatorios, del dolor cutáneo (de la piel, de los tejidos subcutáneos y órganos asociados) o somático.

30

[0039] Por «trastornos neurológicos», entendemos las enfermedades del sistema nervioso, particularmente el cerebro. De entre estas enfermedades, se pueden citar principalmente las enfermedades del cerebro como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis en placas, la enfermedad de Alzheimer, las demencias, las migrañas, las cefaleas.

35

[0040] Por «depresión», entendemos un trastorno del humor caracterizado principalmente por un estado de pérdida de motivación o de impulso vital en un individuo, asociado o no a diferentes síntomas. Los síntomas más característicos es la pérdida de esperanza, de ganas, de estima de sí mismo. Pueden aparecer otros signos, como cansancio, tristeza, pensamientos negativos, pensamientos pesimistas, ideas suicidas, ansiedad o angustia y en algunos casos raros y extremos, alucinaciones.

40

[0041] Se encuentra el término depresión en las denominaciones «trastorno depresivo recurrente», «depresión nerviosa», «depresión clínica», «depresión unipolar», «episodio depresivo mayor y caracterizado» o incluso «síndrome depresivo». La denominación «las depresiones» define el conjunto de los tipos de depresión. Los términos «depresividad» o «sentimiento depresivo» también se usan. El lenguaje corriente menciona también la «depre», que presenta unos síntomas similares, aunque más atenuados.

45

[0042] Por «ansiedad», entendemos un estado psicológico y fisiológico caracterizado por unos componentes somáticos, emocionales, cognitivos y de comportamiento. En la ausencia o la presencia de un estrés psicológico, la ansiedad puede crear unos sentimientos de miedo de inquietud, de dificultad y de temor. La ansiedad se considera como una reacción normal es una situación estresante. Cuando la ansiedad se vuelve excesiva, se puede clasificar bajo la denominación de «trastorno de ansiedad».

50

55

[0043] Asimismo un extracto de algas se puede usar también en unas aplicaciones veterinarias, como por ejemplo para prevenir y/o tratar el estrés en los animales de cría o en los animales de compañía, para unas aplicaciones destinadas al ser humano, por ejemplo mediante el uso de complementos alimentarios para mejorar la salud sin efectos secundarios o de un medicamentos, para por ejemplo prevenir y/o tratar los trastornos asociados al estrés, a la ansiedad, a la depresión, así como agente que permite mejorar la memoria, principalmente para los estudiantes, para luchar contra el envejecimiento o incluso en el contexto de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

60

[0044] Los excipientes farmacéuticamente aceptables se seleccionan en función de la forma farmacéutica y la forma de administración deseada, en entre los excipientes habituales que son conocidos por el experto en la

65

materia.

5 **[0045]** En las composiciones farmacéuticas para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal, transdérmica o rectal, el extracto de algas, tal como se ha definido anteriormente, se puede administrar en dosis unitarias, mezclado con excipientes farmacéuticos clásicos, a animales y seres humanos para la prevención o el tratamiento de los trastornos mencionados.

10 **[0046]** Las formas de administración adecuadas incluyen formas orales como comprimidos, cápsulas blandas o duras, polvos, gránulos y soluciones o suspensiones orales, las formas de administración sublingual, bucal, intratraqueal, intraoculares, intranasales, por inhalación, las formas de administración tópicas, parenterales como transdérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, formas de administración rectal e implantes. Para la aplicación tópica, se pueden usar los compuestos según la invención en unas cremas, geles, pomadas o lociones.

15 **[0047]** Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, el ingrediente activo principal se puede mezclar con un vehículo farmacéutico, como gelatina, almidón, lactosa, estearato de magnesio, talco, goma arábiga o análogos.

20 **[0048]** Los comprimidos se pueden recubrir igualmente con sacarosa, un derivado celulósico, o con otras sustancias adecuadas o incluso se pueden tratar de modo que tengan una actividad prolongada o retardada y que liberen de forma continua una cantidad predeterminada del principio activo.

[0049] Una preparación en forma de cápsulas se puede obtener por ejemplo mezclando el ingrediente activo con un diluyente y vertiendo la mezcla obtenida en unas cápsulas blandas o duras.

25 **[0050]** Las composiciones farmacéuticas que contienen un extracto de algas conforme con la invención también pueden ser en forma líquida, por ejemplo, en forma de soluciones, emulsiones, suspensiones o jarabes, y en particular en una forma adecuada para la administración oral o intranasal, por ejemplo. Los soportes líquidos adecuados pueden ser, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos como glicerol o glicoles, así como sus mezclas, en proporciones variables, en agua.

30 **[0051]** Una preparación en forma de jarabe o elixir o para administración en forma de gotas puede contener también el ingrediente activo junto con un edulcorante, acalórico, por ejemplo, como el metilparabeno y el propilparabeno como antiséptico, así como un agente aromatizante y un colorante adecuado.

35 **[0052]** Los polvos o gránulos dispersables en agua pueden, por ejemplo, contener el ingrediente activo mezclado con agentes dispersantes o humectantes, o agentes de suspensión, como la polivinilpirrolidona, así como edulcorantes o correctores del sabor.

40 **[0053]** La dosis administrada al día puede alcanzar en humanos de 0,5 a 25 mg/kg, en una o varias tomas, en particular de 1,5 a 18 mg/kg, e incluso más particularmente de 3 a 15 mg/kg. La dosis administrada al día puede alcanzar en animales de 5 a 150 mg/kg, en una o varias tomas, en particular de 10 a 100 mg/kg, e incluso más particularmente de 20 a 80 mg/kg. En general, la dosis diaria del extracto de algas según la invención será la dosis eficaz más baja del extracto de algas capaz de producir un efecto terapéutico.

45 **[0054]** La «dosis eficaz» se refiere a cualquier cantidad de una composición que mejora uno o varios de los parámetros característicos de la enfermedad o del trastorno a tratar.

50 **[0055]** Pueden darse casos particulares donde las dosis más altas o más bajas son apropiadas; tales dosis no están fuera del alcance de esta invención. Según la práctica habitual, la dosis apropiada para cada paciente, humano o animal, es determinada por el médico o veterinario según la forma de administración, peso y respuesta del paciente.

[0056] Según otro de estos aspectos, un extracto de algas se puede utilizar para la prevención y/o el tratamiento de las patologías descritas anteriormente en una composición alimentaria.

55 **[0057]** Por «composición alimentaria», entendemos, por ejemplo, cualquier tipo de alimentos funcionales, productos alimenticios en forma de yogur o bebidas, principalmente lácteos, cualquier tipo de materia prima, aditivo o coadyuvante tecnológico, en forma de premezclas, medicinales o no, destinados a ser incorporados a los alimentos, cualquier tipo de alimento completo o suplemento, destinado al consumo humano o animal.

60 **[0058]** La presente invención se ilustrará en más detalle por las figuras y los ejemplos siguientes que no limitan su alcance.

65

FIGURAS

[0059]

Figura 1: Espectro RMN ¹H de un extracto de algas (EA) según la presente invención

Figura 2: Cromatograma obtenido con el extracto de algas según la invención separado en dos columnas shodex 802 y 803

Figura 3: Cromatograma obtenido después del análisis de derivados trimetilsililados de la muestra del extracto de algas según la invención por cromatografía en fase gaseosa. Con Ara: Arabinosa; Gal: Galactosa; Glc: Glucosa; Xyl: Xilosa; Man: Manosa; Rha: Ramnosa, GlcA: Ácido Glucurónico

Figura 4: Efectos del EA sobre el número de entradas en los brazos abiertos en el ensayo del laberinto en cruz elevado.

Figura 5: Efectos del EA sobre el tiempo pasado en los brazos abiertos en el ensayo del laberinto en cruz elevado

Figura 6: Efectos del EA sobre el número total de apoyos acumulados sobre las dos palancas en el ensayo de aprendizaje de la evitación de un estímulo luminoso aversivo

Figura 7: Efectos del EA sobre el número total de apoyos sobre las palancas activas (PA) e inactivas (PI) a los 5 minutos en el ensayo de aprendizaje del TESLA

Figura 8: Efectos del EA sobre el número total de apoyos sobre las palancas activas (PA) e inactivas (PI) a los 10 minutos en el ensayo de aprendizaje del TESLA

Figura 9: Efectos del EA sobre el número total de apoyos sobre las palancas activas (PA) e inactivas (PI) a los 15 minutos en el ensayo de aprendizaje del TESLA

Figura 10: Efectos del EA sobre el número total de apoyos sobre las palancas activas (PA) e inactivas (PI) a los 20 minutos en el ensayo de aprendizaje del TESLA

Figura 11: Efectos del EA sobre la duración de la inmovilidad (s) en el preensayo de desesperanza conductual a día 14 (s media 6 ESM)

Figura 12: Efectos del EA sobre la duración de la inmovilidad (s) en el ensayo de desesperanza conductual a día 15 (s media 6 ESM)

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de un extracto de algas

[0060] Una tonelada de algas del tipo *Ulva*, frescas y en bruto, se lavan en agua embotellada y se les quita la arena con la ayuda de una máquina para lavar las algas.

[0061] Salvo indicaciones contrarias, las etapas del procedimiento se realizan a temperatura ambiente.

[0062] Las algas (1 tonelada de algas escurridas al 8 % de materia seca) se trituran después en finas partículas mediante un afinador industrial (marca Inotec tipo «I175CDI-75D»). Por «finas partículas», entendemos unas partículas cuyo tamaño está comprendido entre 50 y 1000 nm, con dos poblaciones, la primera cuyos tamaños están comprendidos entre 50 y 200 nm, la segunda cuyos tamaños están comprendidos entre 600 y 1000 nm.

[0063] El triturado se prensa después mediante una prensa de cinta industrial de marca Flottweg tipo «B FRU 800 HK» a una velocidad de aproximadamente 1 tonelada/hora.

[0064] Esta etapa permite la separación de la fase sólida (marco) de la fase líquida (jugo). El rendimiento en jugo obtenido es del 75 %.

[0065] Los 750 kg de jugo bruto obtenidos se clarifican después mediante un clarificador a platos de la marca Flottweg tipo «AC 2000».

[0066] Se obtienen de este modo 710 kg de un jugo claro al 3,10 % de materia seca (del 95 al 98 % de rendimiento en masa) y una crema (del 2 al 5 % en masa).

[0067] Después, el jugo claro se ultrafiltra en una membrana de cerámica (Tami Industries) de 15 kDa.

[0068] Se obtiene de este modo un permeato y un retenido. El permeato se conserva hasta la obtención de 640 kg de jugo de filtración (91 % de rendimiento en volumen) al 2,2 % de materia seca.

[0069] El jugo de filtración (permeato) se seca después por liofilización después de concentración por evaporación.

[0070] La concentración se realiza en un evaporador de efecto simple (EVA 1000, Pignat) con los parámetros siguientes: recirculación forzada, velocidad de alimentación 10L/h, presión de vapor de 1 bar, presión de vacío de 0,3 bar y temperatura de evaporación de 90 °C.

[0071] Una primera concentración se realiza con una velocidad de agua evaporada de 8L/h y el °brix aumenta

del 5,5 (igual a una concentración de materia seca del 4,5 %) al 14,7.

[0072] A continuación, esta solución se concentra una segunda vez con una velocidad de agua evaporada de 5-6 L/h y el °brix aumenta hasta 34. La concentración de materia seca de la solución se determina al 38,4 %.

5

[0073] A continuación, la liofilización se realiza con la ayuda de un equipo Bioblock scientific (modelo CHRIST alpha 1-4 LSC) a una temperatura de congelación de -80 °C que es igualmente la temperatura mínima a lo largo de esta etapa.

10 **[0074]** El polvo obtenido se tritura después con un triturador planetario MiniMill de la marca Philips. El producto se ha introducido en unos recipientes de trituración (10 g de producto en cada recipiente de trituración con 4 bolas de zirconita). El conjunto se pone en rotación durante 15 minutos a la velocidad 10.

[0075] De este modo se obtienen 14 kg de polvo de extracto de algas.

15

Ejemplo 2: Determinación del tamaño de los polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados de un extracto de algas por GPC (Gel Permeation Chromatography)

20 **[0076]** El extracto de algas preparado según el ejemplo 1 se ultrafiltra en una membrana 1000 Da y se disuelve a una concentración de 0,5 g/L en agua. Después se inyecta en dos columnas shodex 802 y 803 colocadas en serie (contexto de fraccionamiento de la columna 802: 4×10^3 Da y de la columna 803: $1,7 \times 10^5$ Da). El eluyente utilizado es el nitrato sódico 0,1 M con la azida de sodio al 0,2 % con una velocidad de 0,5 ml/min. La detección se ha realizado a través de refractómetro Wyatt y un detector de difusión de la luz 18 ángulos Wyatt. Los dn/dc se toman iguales a 0,150 mL/g.

25

[0077] El cromatograma detectado por el refractómetro se presenta en la figura 2.

[0078] Se obtiene un tamaño medio de los polisacáridos de un extracto de algas según la invención de 4,4 KDa.

30

Ejemplo 3: Determinación de la composición de un extracto de algas

35 **[0079]** El extracto de algas preparado según el ejemplo 1 se purifica por ultrafiltración frontal en unas células amicon funcionando bajo agitación. Se utiliza una membrana en celulosa regenerada de umbral de corte de 1000 Da. Una muestra de 572,1 mg de extracto de algas se disuelve en 150 ml de agua ultrapura milli-Q. Se utilizan cinco litros de agua para eliminar las moléculas de masa inferior a 1000 Da. El retentado se liofiliza. Se pesa 117 mg en una muestra. El rendimiento de la ultrafiltración es entonces de 20,5 % (p/p). Se han realizado los análisis siguientes en las muestras ultrafiltradas.

40 **[0080]** La proporción de los monosacáridos constituyentes de los polisacáridos del extracto de algas se determina según el método de Kamerling (Kamerling *et al.*, 1975) modificado por Montreuil (Montreuil *et al.*, 1986). La identificación y la dosificación de los monosacáridos necesitan hidrólisis por metanolisis del polímero de modo que sólo se obtienen unos monómeros. Los residuos glicosídicos se trimetilsililan después para hacer que serán volátiles. De este modo se han identificado y dosificados por cromatografía en fase acuosa en forma de
45 metilglicósidos otrimetilsililados.

[0081] Se utilizan los reactivos siguientes:

- Solución de metanol/HCl 3N (Supelco);
- 50 - Carbonato de plata;
- Mio-inositol;
- Piridina;
- Reactivo Sylon BFT (BSTFA +TMCS 99:1) (Supelco); y
- Diclorometano.

55

[0082] El modo operativo es el siguiente: 400 µg del extracto algas preparados como se ha mencionado anteriormente y 50 µg de mio-inositol; se colocan en un baño en seco en presencia de 500 µl de una mezcla de metanol/ácido clorhídrico 3N (Supelco) durante 4 horas a una temperatura de 100 °C. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, el metanosilato se neutraliza con la ayuda del carbonato de plata. Las muestras se centrifugan
60 15 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se evapora bajo un flujo de nitrógeno. Los compuestos se disuelven después en 80 µl de piridina y se incuban durante 25 minutos a 80 °C con 80 µl de sylon (BSTFA: TMCS, 99:1, Supelco). Después de la evaporación dulce de los reactivos en exceso bajo un flujo de nitrógeno, los metilglicósidos trimetilsililados se ponen en 500 µl de diclorometano y después se inyectan en cromatografía de fase acuosa (inyección en columna, detector FID: ionización de llama). El gas vector es el nitrógeno. La columna, del tipo HP-
65 5MS (30 m, 0,25 mm de diámetro interno), es apolar. El programa de ascenso de la temperatura es el siguiente: 120

°C mantenidos durante 1 minuto, después un gradiente de 1,5 °C/min hasta 180 °C, seguida de un gradiente de 2 °C/min hasta 200 °C.

5 **[0083]** Cada monosacárido es identificado por comparación de los tiempos de retención relativos en relación con el patrón interno, con los de los polisacáridos puros tratados en las mismas condiciones. Se calcula un coeficiente de respuesta para cada monosacárido en relación con el patrón interno con el fin de definir la proporción de cada monosacárido en el seno de los polisacáridos del extracto de algas.

10 **[0084]** Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1 siguiente y en la figura 3.

Tabla 1: Composición del extracto de algas obtenidas después del análisis de derivados trimetilsililados por cromatografía en fase acuosa, expresada en peso en relación con el peso total del extracto de algas con Ara: Arabinosa; Gal: Galactosa; Glc: Glucosa; Xyl: Xilosa; Man: Manosa; Rha: Ramnosa, GlcA: Ácido Glucurónico

Muestra	% en peso del ultrafiltrado	Rendimiento de la ultrafiltración	% en peso del extracto bruto
Ara	0,6	20,50 %	0,123
Gal	1,3	20,50 %	0,267
Glc	0,1	20,50 %	0,021
Xyl	2,45	20,50 %	0,502
Man	0,45	20,50 %	0,092
Rha	39,6	20,50 %	8,118
GlcA	12,9	20,50 %	2,645

15 **Ejemplo 4: Evaluación de los efectos del extracto de alga (EA) a través de una batería funcional de los ensayos y ensayos complementarios (openfield, laberinto en cruz elevado, ensayo de evitación de un estímulo luminoso aversivo)**

[0085] Se han evaluado los efectos de un extracto de alga (EA) administrado por vía oral a dosis de 20, 40 y 80 mg/kg durante 14 días en ratas macho Wistar adultas.

[0086] Los efectos del EA se han evaluado en unos grupos de 6 ratas en comparación con un lote control tratado con el vehículo (agua embotellada) a través de una batería funcional de ensayos (FOB). Se han realizado unos ensayos complementarios, el openfield, el laberinto en cruz elevado, el ensayo de evitación de un estímulo luminoso aversivo para completar la evaluación de los efectos del EA.

[0087] Las ratas utilizadas se han tratado según las normas éticas dictadas por le ASAB y el Consejo Canadiense para la protección de los animales.

30 **Materiales y métodos**

Animales

35 **[0088]** Se han utilizado veinticuatro (24) ratas macho Wistar Crl:WI (Han) (Charles River Laboratories, 69-St. Germain sur l'Arbresle, Francia), de 60 días de edad. A la recepción, las ratas se marcaron y se repartieron por grupos de 2 en las jaulas de policarbonato de tipo F (48 x 27 x 20 cm, U.A.R., 91 - Epinay-Sur-Orge, Francia). Los animales se han estabulado en un estabulario climatizado a una temperatura de 22 ± 2 °C y una higrometría de 50 ± 20 %. Las ratas disponían de nutrición estándar 2016 (Mucedola para Harlan, Milán, Italia) y de bebida *ad libitum* y se han sometido a un ciclo luz-oscuridad inversa de 12 horas (luz de 20 a 8 h).

40 **[0089]** Después de un periodo de familiarización de una semana a las condiciones de laboratorio, las ratas se pesan y se aleatorizan en 4 grupos de tratamientos (n = 6).

45 **[0090]** Con el fin de evitar las interferencias eventuales entre los diversos productos, las ratas de una misma jaula recibieron todo el mismo tratamiento. Las ratas de los diferentes grupos se manipularon todas de la misma manera y en las mismas condiciones.

Ensayo de la FOB

50 **[0091]** Se han utilizado los materiales siguientes en este ensayo:

- una jaula de observación transparente;
- un dispositivo de suspensión;
- un dispositivo de agarre;

5 - un openfield para la actividad locomotora y exploratoria;
- un aparato de estimulación auditiva que emite un estímulo sonoro estándar;
- un estilete para diversas estimulaciones táctiles;
- un termómetro digital.

10 **[0092]** El ensayo de la FOB se ha realizado a ciegas antes de la administración del producto (T0) y después de un periodo de 14 días de tratamiento (T14) por vía oral a las dosis de 20, 40 y 80 mg/Kg.

[0093] El ensayo ha presentado tres fases de observación:

15 - una fase de observación directa durante la cual el animal no era molestado;
- una fase de observación activa durante la cual el animal era manipulado;
- una fase dedicada a la evaluación de las reacciones de las conductas de los animales tras unos ensayos de reactividad.

20 **[0094]** Las variables registradas fueron las siguientes:

- Efectos conductuales: actividad locomotora espontánea, trastornos del comportamiento locomotor, reacción de huida al contacto, irritabilidad, conductas de agresividad y de freezing provocadas, somnolencia, micción y defecación, respuestas sensitivomotoras (colocación visual, pinzamiento de la pata, pinzamiento de la cola y
25 reacción a un estímulo sonoro).

- Efectos neurológicos: respuesta pupilar, reflejo palpebral, elevación pelviana, posición de la cola, tonicidad muscular de los miembros y del abdomen, ensayo de vuelco, ensayo de agarre, temblores y piloerección.

Efectos fisiológicos: salivación, lagrimeo, diarrea, temperatura rectal, ritmo cardíaco-respiratorio. - Mortalidad.

30

[0095] Los ensayos siguientes se han realizado después de las dos semanas de administración de los productos.

Ensayo del laberinto en cruz elevado (LCS)

35

[0096] El dispositivo experimental, en forma de cruz, se eleva a 80 cm por encima del suelo. Comprende cuatro brazos de 50 cm de largo y 15 cm de ancho. Dos brazos opuestos están cerrados por unas paredes de 40 cm de alto, las otras dos están abiertas sobre el vacío y, por ello, representan unos emplazamientos ansiogénicos. Al día 18, una hora después de la administración del tratamiento, el animal ha sido colocado en el centro de la cruz del dispositivo y ha podido acceder libremente a los cuatro brazos. La conducta del animal fue grabada con la ayuda de un sistema ANYMAZE durante 5 minutos. Las variables estudiadas en este ensayo eran el número de entradas en los brazos abiertos, así como el tiempo pasado en estos brazos abiertos. Un número bajo de entradas y un tiempo corto pasado en los brazos abiertos se consideran como índices de ansiedad (Lister, 1987).

40

Ensayo de evitación de un estímulo luminoso aversivo (TESLA)

[0097] Este modelo utiliza la aversión de la rata a un entorno fuertemente iluminado. La rata aprende a controlar su entorno luminoso aversivo en el contexto de un condicionamiento que funciona al apretar sobre una palanca activa para obtener unos periodos de oscuridad de 30 segundos como refuerzo positivo.

50

[0098] El dispositivo experimental consiste en una jaula aislada (50 x 40 x 37 cm), fuertemente iluminada y que comprende dos palancas: una activa que permite, cuando se acciona, obtener 30 segundos de oscuridad seguidos de la vuelta de la luz, mientras que la otra palanca es inactiva (no implica ningún refuerzo positivo). Las presiones sobre la palanca activa, durante el periodo de oscuridad, no proporcionan periodos de oscuridad adicionales. La rata se coloca en la jaula durante 20 minutos y el número de presiones sobre cada palanca se contabiliza a lo largo del experimento.

55

[0099] La batería de ensayos, compuesta por 4 dispositivos de condicionamiento, está completamente automatizada y pilotada por un ordenador. De este modo, ningún investigador está presente en la habitación durante el ensayo.

60

[0100] Después de 18 días de administración de los productos a ensayar, las ratas se han sometido a ensayos en el plano cognitivo para la adquisición de un aprendizaje en el contexto del condicionamiento que opera en el modelo del TESLA.

65

[0101] Las variables grabas fueron los números totales de presiones sobre las palancas activa (PA) e inactiva (PI) y los números de presiones sobre cada una de las palancas durante la fase de luz.

[0102] Los números de presiones activas o inactivas han permitido evaluar el nivel de actividad manipuladora a lo largo de la sesión del ensayo. La adquisición del aprendizaje (discriminación entre las dos palancas) se ha evaluado comparando el número de presiones sobre cada una de las dos palancas durante la fase de luz (PA frente a PI).

Producto

[0103] El producto es un EA (extracto de algas) en forma de polvo que presenta una fracción concentrada liofilizada y triturada de un extracto hidrosoluble de algas preparado según el ejemplo 1. El EA se diluye en agua embotellada y se administra por vía oral 60 minutos antes del ensayo de la FOB y de los ensayos de conducta complementarios con la ayuda de una sonda de alimentación forzada intragástrica.

Análisis estadístico

[0104] Se ha aplicado la prueba de Kruskal-Wallis, seguido, en el caso de heterogeneidad, por comparaciones con la ayuda de una prueba U de Mann-Whitney para comparar los grupos tratados con el grupo control.

[0105] La prueba de Wilcoxon se ha usado para las comparaciones de pares de medidas repetidas del FOB entre el T0 y el T14 en cada uno de los grupos y para la discriminación entre las dos palancas del TESLA con luz.

[0106] Los tratamientos estadísticos y gráficos se han realizado con la ayuda de programa Statview 5 (SAS Institute, Inc., USA).

RESULTADOS

Ensayo de la FOB

Comparaciones de los grupos tratados con el grupo vehículo en los FOB a T0 y T14

[0107] En la FOB al T0 antes de la administración del tratamiento, los resultados de todos los grupos de ratas estudiadas son homogéneos (Tabla 2, Tabla 3).

[0108] En los ensayos de la FOB a T14 (después de 14 días de administración de los tratamientos), la prueba de Kruskal-Wallis ha demostrado una homogeneidad en los resultados dentro de numerosas variables entre los diferentes grupos de tratamientos (Tabla 2).

[0109] Por el contrario, en determinadas variables estudiadas, el EA a determinadas dosis, ha mostrado unos efectos significativos en comparación con el vehículo (Tabla 3).

[0110] Las variables principales modificadas por la administración diaria del EA durante dos semanas son:

- La conducta de las ratas y su actividad sensitivo motora espontánea en la jaula de convivencia: las ratas tratadas a las 3 dosis son más activas y están más alertas,
- La conducta de las ratas en una jaula de observación: aquí igualmente, las ratas están más activas y más alertas a las 2 dosis más altas;
- Interés por un objeto presentado: a las 3 dosis, el EA parece tener un efecto estimulante sobre la curiosidad de las ratas y su interés por la novedad (aumento de la actividad exploradora, hedonismo, efecto antidepresivo),
- Las reacciones de huida de las ratas al acercamiento de un dedo o al tacto están significativamente disminuidas por el EA a las 3 dosis, lo que es debido a un efecto antiestrés/ansiolítico del EA.
- Las reacciones al pinzamiento de la cola y al pinzamiento de la pata están igualmente disminuidas de forma significativa a las 3 dosis. Estas disminuciones de reacción son debidas a un efecto antiestrés/ansiolítico del EA y/o un efecto analgésico.
- Las frecuencias cardíaca y respiratoria de las ratas parecen menos elevadas en las ratas tratadas con el EA a las 3 dosis, debido a un efecto antiestrés/ansiolítico del EA.
- La agitación, el nerviosismo y la irritabilidad de las ratas disminuyen significativamente bajo la administración del EA a las 2 dosis más altas, debido a un efecto calmante, antiestrés y/o antiagresividad.

ES 2 746 106 T3

Tabla 2: Estado de las variables antes (T0) y después de (T14) la administración del EA durante 14 días a las dosis de 20, 40 et 80 mg/kg, PO

Sesión de FOB	T0				T14			
	Vehículo	EA 20	EA 40	EA 80	Vehículo	EA 20	EA 40	EA 80
Latencia de desplazamiento en la arena	H(ddl3) = 5,14; P = 0,16				H(ddl3) = 4,10; P = 0,25			
Actividad locomotora (casos atravesados)	H(ddl3) = 3,06; P = 0,38				H(ddl3) = 2,43; P = 0,49			
Actividad locomotora (enderezamientos)	H(ddl3) = 4,91; P = 0,18				H(ddl3) = 2,96; P = 0,40			
Estado de vigilia o de somnolencia	H(ddl3) = 3,00; P = 0,39				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Casos atravesados sobre una rama abierta	H(ddl3) = 3,00; P = 0,39				H(ddl3) = 3,94; P = 0,27			
Reacción de vuelco	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Reacción de agarre	H(ddl3) = 1,1; P = 0,77				H(ddl3) = 2,09; P = 0,55			
Ensayo de suspensión	H(ddl3) = 3,15; P = 0,37				H(ddl3) = 1,89; P = 0,59			
Reacción de sobresalto a un estímulo sonoro	H(ddl3) = 4,26; P = 0,23				H(ddl3) = 2,13; P = 0,55			
Agresividad provocada	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Tonicidad muscular general	H(ddl3) = 3,34; P = 0,34				H(ddl3) = 6,39; P = 0,10			
Tonicidad muscular de los miembros	H(ddl3) = 4,60; P = 0,20				H(ddl3) = 3,29; P = 0,35			
Reacción de sustitución visual sobre la rama	H(ddl3) = 5,63; P = 0,13				H(ddl3) = 1,97; P = 0,58			
Gritos	H(ddl3) = 2,30; P = 0,51				H(ddl3) = 4,31; P = 0,23			
Defecación	H(ddl3) = 5,43; P = 0,14				H(ddl3) = 3,22; P = 0,36			
Micción	H(ddl3) = 6,27; P = 0,10				H(ddl3) = 2,30; P = 0,51			
Convulsiones	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Temblores	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Diarrea	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Exoftalmia	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Piloerección	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Salivación	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Lagrimo	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Reflejo palpebral	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Conductas extrañas	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Curvatura del tronco	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			
Elevación pelviana	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00				H(ddl3) = 0,00; P = 1,00			

(continuación)

Elevación de la cola	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00
Temperatura rectal	H(ddl3) = 0,17; P = 0,98	H(ddl3) = 3,67; P = 0,30
Mortalidad a las 24h	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00	H(ddl3) = 0,00; P = 1,00

Tabla 3: Estado de las variables antes (T0) y después de (T14) la administración del EA durante 14 días a las dosis de 20, 40 et 80 mg/kg, PO

Sesión de FOB	T0				T14			
	Vehículo	EA	EA	EA	Vehículo	EA	EA	EA
		20	40	80		20	40	80
Conducta de la rata en una jaula de convivencia	H(ddl3) = 5,15; P = 0,16				H(ddl3) = 19,97; P = 0,0002 (D1 ** - D2** - D3**)			
Conducta de la rata en una jaula de observación	H(ddl3) = 4,02; P = 0,26				H(ddl3) = 7,19; P = 0,066 (D2# - D3*)			
Actividad locomotora espontánea en una jaula de convivencia	H(ddl3) = 4,33; P = 0,23				H(ddl3) = 15,20; P = 0,008 (D1 ** - D2** - D3**)			
Interés por un objeto presentado (curiosidad)	H(ddl3) = 4,86; P = 0,18				H(ddl3) = 6,86; P = 0,08 (D1* - D2# - D3*)			
Reacción de huida al acercamiento de un dedo	H(ddl3) = 2,39; P = 0,50				H(ddl3) = 6,65; P = 0,08 (D1#- D2#- D3*)			
Reacción al pellizco de la cola	H(ddl3) = 5,50; P = 0,14				H(ddl3) = 15,07; P = 0,002 (D1 ** - D2** - D3**)			
Reacción al pellizco de una pata trasera	H(ddl3) = 4,13; P = 0,25				H(ddl3) = 9,63; P = 0,02 (D1** - D2# - D3#)			
Reacción de huida al tacto	H(ddl3) = 2,12; P = 0,55				H(ddl3) = 8,01; P = 0,045 (D1* - D2# - D3#)			
Frecuencia cardíaca y respiratoria	H(ddl3) = 4,60; P = 0,20				H(ddl3) = 10,78; P = 0,01 (D1# - D2** - D3**)			
Freezing provocado	H(ddl3) = 3,00; P = 0,39				H(ddl3) = 6,27; P = 0,09			
Tonicidad muscular del abdomen	H(ddl3) = 3,83; P = 0,28				H(ddl3) = 8,52; P = 0,04 (D2# - D3*)			
Agitación-nerviosismo-irritabilidad	H(ddl3) = 1,04; P = 0,79				H(ddl3) = 6,77; P = 0,08 (D2# - D3*)			
# P < 0,10; * P < 0,05 ; ** P < 0,01 (Prueba de Mann-Whitney: vs. Vehículo)								

5

Comparaciones de las diferentes variables repetidas entre las FOB a T0 y T14

[0111] La administración diaria del EA a determinadas dosis, durante 14 días, parece tener un efecto sobre determinadas variables estudiadas (Tabla 4);

10

- La conducta de las ratas y su actividad locomotora espontánea en la jaula de observación han aumentado de forma significativa con EA a las 3 dosis (efecto estimulante o efecto antiestrés),

15 - La latencia en el desplazamiento de las ratas control en la arena de observación aumenta y su actividad locomotora (casos atravesados) disminuye, mientras que las ratas tratadas con el EA estas variables se mantienen estables entre FOB T0 et T14 (efectos antiestrés y antidepresivo),

20 - El interés por un objeto presentado: a la dosis de 20 mg/kg, PO (per os), el EA estimula el interés de las ratas por un objeto estímulo que se le presenta (motivación a la exploración de la novedad, hedonismo: efectos antiestrés y antidepresivo),

ES 2 746 106 T3

- El número de casos atravesados sobre una rama abierta: en comparación con el vehículo, el EA no disminuye el número de casos atravesados sobre una rama abierta (efecto antiestrés),
- Las reacciones de huida al acercamiento de un dedo: el EA a las 3 dosis disminuye la reacción de huida al acercamiento del dedo del investigador (efecto antiestrés),
- La reacción al pellizco de la cola aumenta en la rata control, mientras que bajo 20 mg/Kg de EA disminuye (efecto antiestrés y/o efecto analgésico),
- 10 - La reacción al pellizco de una pata trasera disminuye bajo el EA a las 3 dosis (efecto antiestrés y/o efecto analgésico),
- La reacción de sobresalto a un estímulo sonoro disminuye significativamente a las dosis de EA de 40 y 80 mg/Kg (efecto calmante y antiestrés),
- 15 - Las frecuencias cardíaca y respiratoria disminuyen bajo EA a las dosis de 20 y 40 mg/Kg (efecto calmante y antiestrés),
- La agitación, el nerviosismo y la irritabilidad: a la dosis alta de 80 mg/kg, el EA muestra un efecto positivo sobre la agitación, el nerviosismo y la irritabilidad de las ratas (efecto calmante, antiestrés y/o anti-agresividad).
- 20

Tabla 4: Efectos del EA sobre la evolución de las variables entre las FOB a TO y T14 en cada grupo de tratamiento

Grupos	VEH		EA/20		EA/40		EA/80	
	T0	T14	T0	T14	T0	T14	T0	T14
Sesión de FOB ítems								
Conducta de la rata en una jaula de observación	ND		#	↗	*	↗	*	↗
Actividad locomotora espontánea en una jaula de observación	ND		*	↗	*	↗	*	↗
Latencia de desplazamiento en la arena	#	↗	ND		ND		ND	
Actividad locomotora (casos atravesados)	*	↗	ND		ND		ND	
Interés por un objeto presentado	ND		#	↗	ND		ND	
Casos atravesados sobre una rama abierta	*	↗	ND		ND		ND	
Reacción de huida al acercamiento de un dedo	ND		#	↗	*	↗	#	↗
Reacción al pellizco de la cola	#	↗	#	↗	ND		ND	
Reacción al pellizco de una pata trasera	ND		#	↗	#	↗	#	↗

(continuación)

Grupos	VEH		EA/20		EA/40		EA/80	
	T0	T14	T0	T14	T0	T14	T10	T14
Sesión de FOB ítems								
Ensayo de suspensión	*	↗	N.S.		*	↗	*	↗
Reacción de sobresalto a un estímulo sonoro		ND	ND		*	↗	*	↗
Frecuencia cardíaca y respiratoria		ND	#	↗	*	↗		ND
Tonicidad muscular del abdomen	#	↗	ND			ND		ND
Agitación-nervosismo-irritabilidad		ND	ND			ND	#	↗

- ND.: No significativa entre T0 y T14
 ↘ Disminuye entre T0 y T14
 5 ↗ Aumenta entre T0 y T14
 *: P < 0,05; #: P < 0,10 (tendencia)

Ensayo del laberinto en cruz elevado (LCS)

10 **[0112]** En el ensayo del laberinto en cruz elevado, después de 18 días de tratamiento diario, el EA a las dosis de 20, 40 y 80 mg/Kg, PO, aumenta significativamente el número de entradas (Tabla 5, Figura 4) así como el tiempo pasado (Tabla 6, Figura 5) de las ratas tratadas en los brazos abiertos, demostrando una actividad antiestrés del EA.

15 **Tabla 5:** Efectos del EA sobre el número de entradas en los brazos abiertos en el ensayo del laberinto en cruz elevado

Productos	Vehículo (n = 6)	EA 20 mg/Kg (n = 6)	EA 40 mg/Kg (n = 6)	EA 80 mg/Kg (n = 6)	Prueba de Kruskal-Wallis
Número de entradas en ramas abiertas Media (QI-QS)	1,5 (1,0-4,0)	4,0 (4,0-5,0)	5,0 (3,0-5,0)	4,5 (2,0-5,0)	H(ddl3) = 6,08 P = 0,108

Tabla 6: Efectos del EA sobre el tiempo pasado en los brazos abiertos en el ensayo del laberinto en cruz elevado

Productos	Vehículo (n = 6)	EA 20 mg/Kg (n = 6)	EA 40 mg/Kg (n = 6)	EA 80 mg/Kg (n = 6)	Prueba de Kruskal-Wallis
Tiempo pasado en ramas abiertas Media (QI-QS)	10,0 (7,0-29,0)	37,5 (32,0-50,0)	50,5 (38,0-66,0)	37,0 (17,0-45,0)	H(ddl3) = 7,76 P = 0,051

20 Ensayo de evitación de un estímulo luminoso aversivo (TESLA)

[0113] Después de 18 días de administración diaria del EA la prueba de Kruskal-Wallis ha demostrado que el número total de presiones acumuladas en las dos palancas (palanca activa + palanca inactiva) de las ratas de los diferentes grupos de tratamientos son homogéneos a 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos y 20 minutos (Figura 6).

[0114] En el ensayo de evitación de un estímulo luminoso aversivo, al final de los 5 primeros minutos del ensayo, después de 18 días de administración del EA las ratas tratadas con la dosis de 20 mg/Kg, PO tienden a discriminar la palanca activa de la palanca inactiva (Figura 7).

30 **[0115]** Al final del periodo de 10 minutos del ensayo, las ratas tratadas con el EA a dosis de 40 mg/Kg, PO discriminan significativamente la palanca activa de la palanca inactiva y los tratados con las dosis de 20 y 80 mg/Kg, PO tienden a realizar una discriminación entre las dos palancas. No es el caso de las ratas control que no muestran ninguna tendencia a la discriminación (Figura 8).

35 **[0116]** Al final del periodo de 15 minutos de ensayo, las ratas tratadas con el EA a las dosis de 20 y 40 mg/Kg, PO discriminan significativamente la palanca activa de la palanca inactiva. Las ratas tratadas a la dosis de 80 mg/Kg, PO ya no discriminan las dos palancas. Las ratas control todavía no muestran ninguna discriminación en este estadio del ensayo de aprendizaje (Figura 9).

40 **[0117]** Al final del periodo de 20 minutos de ensayo, las ratas tratadas con el EA a las dosis de 20 y 40 mg/Kg, PO discriminan siempre significativamente la palanca activa de la palanca inactiva. Las ratas tratadas a la dosis de 80 mg/Kg, PO, ya no muestran discriminación y las ratas control empiezan a mostrar un inicio de discriminación (Figura 10).

45 **[0118]** Estos resultados demuestran la eficacia del EA sobre la adquisición del aprendizaje, y principalmente a las dosis de 20 y 40 mg/Kg, PO.

Datos fisiológicos y de inocuidad

50 **[0119]** La administración de EA, sea cual sea la dosis, no ha demostrado influencia sobre el peso de las ratas tratadas a diario con las dosis 20, 40 o 80 mg/Kg, PO, ni sobre su ingesta alimentaria. No se ha detectado toxicidad

en los animales tratados con el EA a las dosis de 20, 40 et 80 mg/Kg/d PO, durante 21 días.

Conclusión

- 5 **[0120]** La administración de un extracto de algas según la presente invención pone de manifiesto, de este modo, unos efectos neurológicos del producto, principalmente en actividad antiestrés/ansiolítico, antidepresivo, analgésico, así como una actividad de adquisición precoz del aprendizaje y de la facilitación de la memoria.

Ejemplo 5: Evaluación de los efectos del extracto de algas (EA) a través del ensayo de desesperanza

10 conductual

[0121] Los efectos antidepresivos de un extracto de algas según la invención (EA) administrado por vía oral en tratamiento preventivo a 3 dosis (10, 20 y 40 mg/kg/d) fueron evaluados en ratas macho Wistar en el ensayo de desesperanza conductual (TDC).

15

[0122] El extracto se ha administrado diariamente en tratamiento semicrónico durante 14 días. Los efectos del EA se han evaluado en el TDC en unos grupos de 12 ratas en comparación con un lote control tratado con el vehículo (agua embotellada) y un lote referencia tratado como imipramina a la dosis de 10mg/kg/d.

- 20 **[0123]** Las ratas utilizadas se han tratado según las normas éticas dictadas por le ASAB y el Consejo Canadiense para la protección de los animales.

Materiales y métodos

25 Animales

[0124] Se han utilizado sesenta ratas macho Wistar Crl:WI (Han) (Charles River Laboratories, Francia), que pesan 200-225 g. A la recepción, las ratas se marcaron y se repartieron por grupos de 4 en las jaulas de policarbonato de tipo F (48 x 27 x 20 cm, U.A.R., 91 - Epinay-Sur-Orge, Francia). Los animales se han estabulado en un estabulario climatizado a una temperatura de 22 ± 2 °C y una humedad relativa del 50 ± 20 %. Las ratas disponían de nutrición estándar 2016 (Mucedola para Harlan, Milán, Italia) y de bebida *ad libitum* fueron sometidas a un ciclo luz-oscuridad inverso de 12 horas.

30

[0125] Después de un periodo de familiarización de una semana a las condiciones de laboratorio, las ratas se pesan y aleatorizan en función del peso en 5 grupos de tratamientos (n = 12/grupo).

35

[0126] Grupos de tratamientos:

- Grupo Control: tratamiento con agua embotellada (Véh),
- 40 - Grupo Imipramina: tratamiento con Imipramina a la dosis de 10 mg/kg/d (Imi),
- Grupo EA 10: tratamiento con el EA a la dosis de 10 mg/kg/d (EA, 10),
- Grupo EA 20: tratamiento con el EA a la dosis de 20 mg/kg/d (EA, 20),
- Grupo EA 40: tratamiento con el EA a la dosis de 40 mg/kg/d (EA, 40),

- 45 **[0127]** Con el fin de evitar las interferencias eventuales entre los diferentes tratamientos, las ratas de una misma jaula recibieron todo el mismo tratamiento. Las ratas de los diferentes grupos se manipularon todas de la misma manera y en las mismas condiciones.

Ensayo de desesperanza conductual (TDC).

50

[0128] Los dispositivos experimentales constan de unos cilindros de plexiglás de 50 cm de alto y de 20 de diámetros llenos de agua a una temperatura de 25 °C hasta una altura de 30 cm.

- 55 **[0129]** Después de 13 días de tratamiento diario con los productos a ensayar, las ratas se colocaron el D14 en los dispositivos durante un periodo de 15 minutos para evaluar el tiempo de inmovilidad de cada animal. Inmediatamente después de este primer ensayo, las ratas recibieron el tratamiento del día 14.

- 60 **[0130]** A D15 las ratas recibieron dos tratamientos: las primero 5 horas antes del ensayo y el segundo 1 hora antes del ensayo. Este procedimiento se utiliza habitualmente en la literatura para probar la eficacia de un producto contra la depresión. El ensayo se ha realizado en las mismas condiciones que el día anterior durante un periodo de 5 minutos.

- 65 **[0131]** La duración de la inmovilidad registrada durante los 5 primeros minutos de los dos ensayos (a D14 y D15) refleja la capacidad del animal para resignarse cuando se enfrenta a una situación del que no puede escaparse. Esta conducta de resignación se asimila a la depresión.

Producto

5 **[0132]** El producto EA (extracto de algas) en forma de polvo que representa una fracción concentrada liofilizada y triturada de un extracto hidrosoluble de algas preparadas según el ejemplo n.º 1. El extracto a ensayar se ha disuelto en agua embotellada y se ha administrado a las ratas por vía oral a una de las 3 dosis ensayadas durante 14 días sucesivos con un volumen de administración de 5 ml/kg. Se pesaron los animales cada dos o tres días con el fin de adaptar los tratamientos específicos a sus pesos. Las ingestas alimentaria e hídrica se midieron cada dos o tres días durante toda la duración del estudio.

10

[0133] Los animales del grupo de Referencia recibieron a diario 10 mg/kg/d de Imipramina hidrocloreuro (Sigma Aldrich) disuelta en agua embotellada con un volumen de administración de 5 ml/kg.

15 **[0134]** Los animales del grupo Vehículo recibieron a diario agua embotellada con un volumen de administración de 5 ml/kg.

Análisis estadístico

20 **[0135]** Se aplicó una prueba ANOVA en modo paramétrico, seguida, en el caso de heterogeneidad, de comparaciones con la ayuda de pruebas de T no pareadas para comparar los grupos tratados con los grupos Vehículo y el grupo Referencia.

25 **[0136]** Se utilizó una ANOVA pareada, seguida, en el caso de heterogeneidad, de comparaciones con la ayuda de pruebas de T pareada para las comparaciones de dos en dos de las mediciones repetidas del TDC en cada uno de los grupos.

30 **[0137]** Para las ingestas alimentaria e hídrica, se aplica un análisis en modo no paramétrico: una prueba de Kruskal-Wallis seguida, si fuera necesario por una prueba U de Mann Whitney para comparar los grupos de dos en dos.

[0138] Los tratamientos estadísticos y gráficos se han realizado con la ayuda del programa StatvieW 5 (SAS Institute, Inc., USA).

RESULTADOS

35

Ensayo de desesperanza conductual: Preensayo a D14

40 **[0139]** A D14, en el preensayo de desesperanza conductual, el ANOVA no ha demostrado heterogeneidad para el tiempo de inmovilidad de los animales de los diferentes grupos de tratamiento (Tabla 7; Figura 11). Este preensayo permite obtener la inducción de la resignación en los animales de los diferentes grupos de tratamiento.

Tabla 7: Efectos del EA sobre la duración de la inmovilidad (s) en el preensayo de desesperanza conductual a D14 (s media 6 ESM)

Productos	Vehículo (n = 12)	Imipramina 10 mg/kg (n = 12)	EA 10 mg/kg (n = 12)	EA 20 mg/kg (n = 12)	EA 40 mg/kg (n = 12)	ANOVA _(ddl=4)
Duración de la inmovilidad (s)	18,7 ± 3,6	16,3 ± 4,6	12,5 ± 3,8	9,8 ± 3,2	9,3 ± 1,8	F = 1,33 P = NS
NS: no significativo.						

45 **Ensayo de desesperanza conductual a D15**

[0140] A D15, en el ensayo de desesperanza conductual, el ANOVA ha demostrado heterogeneidad para el tiempo de inmovilidad de los animales de los diferentes grupos de tratamiento (Tabla 8).

50 **[0141]** La prueba t no pareada ha demostrado que los tiempos de inmovilidad de los animales tratados con imipramina, EA 20 y EA 40 fueron significativamente más cortos que los de los animales tratados con el vehículo (t=3,69, P=0,0013; t=2,20, P=0,039 y t=3,29, P=0,003, respectivamente).

55 **[0142]** La prueba t no pareada ha demostrado que los tiempos de inmovilidad de los animales tratados con EA 20 tienden a ser significativamente más largos que los de los animales tratados con imipramina (t=1,72, P=0,099) (Tabla 8; Figura 12).

Tabla 8: Efectos del EA sobre la duración de la inmovilidad (s) en el ensayo de desesperanza conductual a día 15 (s media 6 ESM)

Productos	Vehículo (n = 12)	Imipramina 10 mg/kg (n = 12)	EA 10 mg/kg (n = 12)	EA 20 mg/kg (n = 12)	EA 40 mg/kg (n = 12)	ANOVA _(ddl=4)
Duración de la inmovilidad (s)	14,4 ± 2,7	3,8 ± 1,0	12,0 ± 5,0	7,3 ± 1,8	4,9 ± 1,0	F = 2,76 P = 0,036
	Prueba T no pareada (frente a Vehículo)	t = 3,69 P = 0,0013	t = 0,42 NS	t = 2,20 P = 0,039	t = 3,29 P = 0,003	
	Prueba T no pareada (frente a Imipramina)		t = 1,60 P = NS	t = 1,72 T (P = 0,099)	t = 0,75 NS	
	Prueba T no pareada (frente a EA 10)			t = 0,98 NS	t = 1,38 NS	
	Prueba T no pareada (frente a EA 20)				t = 1,17 NS	
NS: no significativo.						

5 Comparación de los resultados de los ensayos a D14 y D15

[0143] La prueba t pareada ha demostrado que las duraciones de inmovilidad de las ratas tratadas con imipramina y EA40 han disminuido significativamente entre D14 y D15 (t=2,90, P=0,015 et t=2,42, P=0,034, respectivamente) (Tabla 9).

10

Tabla 9: Comparación de los resultados de los ensayos a D14 y D15(s, Media 6 ESM)

Productos	Vehículo (n = 12)	Imipramina 10 mg/kg (n = 12)	EA 10 mg/kg (n = 12)	EA 20 mg/kg (n = 12)	EA 40 mg/kg (n = 12)
Duración de la inmovilidad (s) A D 14	18,7 ± 3,6	16,3 ± 4,6	12,5 ± 3,8	9,8 ± 3,2	9,3 ± 1,8
Duración de la inmovilidad (s) A D15	14,4 ± 2,7	3,8 ± 1,0	12,0 ± 5,0	7,3 ± 1,8	4,9 ± 1,0
Prueba T no pareada					
t=	1,41	2,90	0,11	1,10	2,42
P=	NS	0,015	NS	NS	0,034
NS: no significativo.					

Evolución ponderal, ingesta alimentaria e hídrica

15 **[0144]** No se ha puesto de manifiesto ningún efecto del EA administrado en tres dosis, lo que implica la evolución ponderal y las ingestas alimentaria e hídrica de los animales.

Ensayo de desesperanza conductual

20 **[0145]** **A D14:** en el momento del ensayo de establecimiento de la resignación en los animales, aunque la duración de la inmovilidad de los animales tratados con el EA a las dosis de 20 y 40 mg/kg sean más cortas que las de los animales de los otros grupos, no se ha observado ninguna diferencia significativa entre las ratas tratadas con el vehículo, la imipramina y el EA administrado a las tres dosis ensayadas.

25 **[0146]** **A D15:** el efecto antidepresivo del EA administrado a las dosis 20 y 40 mg/kg se pone en evidencia porque las duraciones de inmovilidad de los animales tratados a estas dosis eran significativamente más cortas que las de los animales tratados con el vehículo. El EA administrado a la dosis de 40 mg/kg ha permitido obtener una

duración de inmovilidad similar a las de los animales tratados con imipramina a 10 mg/kg. Se ha observado un efecto dosis dependiente en los animales tratados con el EA a las dosis de 10, 20 y 40 mg/kg.

- 5 **[0147]** **Comparación de las duraciones de inmovilidad a D14 y D15:** solo los animales tratados con imipramina a la dosis de 10 mg/kg y con el EA a la dosis de 40 mg/kg han disminuido significativamente sus duraciones de inmovilidad entre D14 y D15.

Conducta de los animales e inocuidad del extracto de algas

- 10 **[0148]** No se ha observado ningún comportamiento anómalo del conjunto de los animales a lo largo del experimento para el EA administrado a las dosis de 10, 20 y 40 mg/kg. No se ha detectado toxicidad en los animales tratados con el EA a las dosis de 10, 20 et 40 mg/Kg/d durante 14 días.

Conclusión

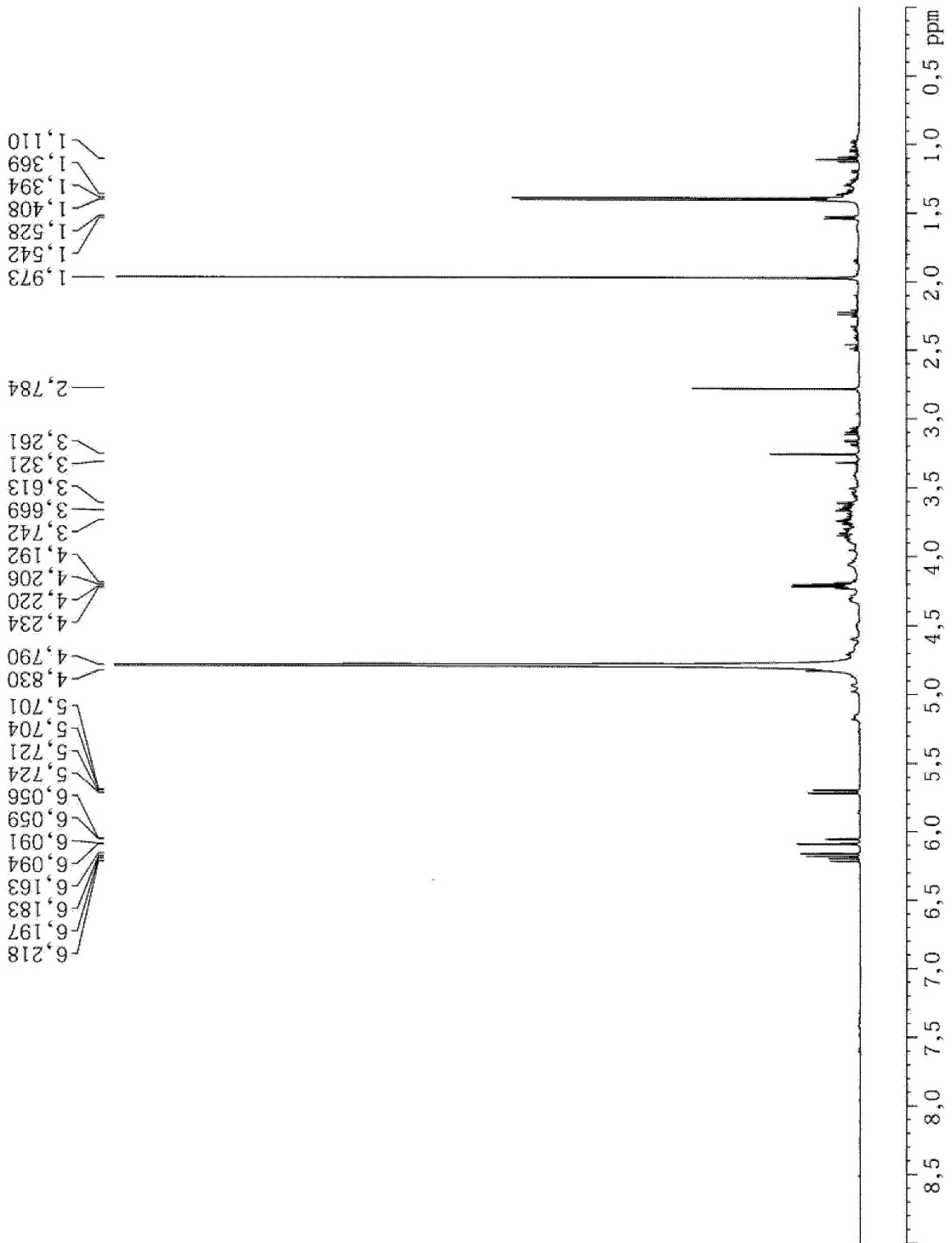
- 15 **[0149]** La administración de un extracto de algas según la presente invención evidencia, de este modo, un efecto antidepresivo del producto.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de algas del orden de las ulvales, en particular extracto de algas verdes del tipo *Ulva*, que comprende unos polisacáridos polianiónicos sulfatados y no sulfatados cuyo tamaño es inferior o igual a 50 kDa, para la utilización en un procedimiento que permite prevenir y/o tratar los trastornos neurológicos, la depresión, la ansiedad, los dolores neuropáticos e inflamatorios crónicos, el dolor cutáneo (de la piel, de los tejidos y órganos asociados) o somático.
2. Extracto de algas para el uso según la reivindicación 1, en un procedimiento que permite prevenir y/o tratar la depresión, la ansiedad, la enfermedad de Alzheimer, los dolores neuropáticos e inflamatorios crónicos, el dolor cutáneo o somático.
3. Extracto de algas para el uso según la reivindicación 1 o 2, donde dichos polisacáridos comprenden manosa y/o arabinosa.
4. Extracto de algas para el uso según la reivindicación 3, donde dichos polisacáridos comprenden por lo menos 0,005 % de manosa y/o por lo menos 0,005 % de arabinosa, en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.
5. Extracto de algas para el uso según la reivindicación 4, donde dichos polisacáridos comprenden manosa en una cantidad que varía del 0,01 al 0,20 % y arabinosa en una cantidad que varía del 0,01 al 0,5 % en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.
6. Extracto de algas para el uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, donde dichos polisacáridos comprenden, además:
- galactosa;
 - glucosa;
 - ramnosa;
 - xilosa; y
 - ácido glucurónico.
7. Extracto de algas para el uso según la reivindicación 6, donde dichos polisacáridos comprenden:
- del 0,05 al 0,5 % de galactosa;
 - del 0,005 al 0,05 % de carbono;
 - del 2 al 15 % de ramnosa;
 - del 0,1 al 1 % de xilosa; y
 - del 1 al 7 % de ácido glucurónico;
- en peso en relación con el peso de la materia seca total del extracto de algas.
8. Extracto de algas para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dichos polisacáridos tienen un tamaño inferior o igual a 15kDa.
9. Extracto de algas para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- del 10 al 50 % de carbono;
 - del 1 al 10 % de hidrógeno;
 - del 1 al 5 % de nitrógeno;
 - del 20 al 50 % de oxígeno; y
 - del 1 al 15 % de azufre;
- en porcentaje en masa de la materia seca total del extracto de algas.
10. Extracto de algas para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
- del 15 al 30 % de carbono;
 - del 3 al 6 % de hidrógeno;
 - del 1 al 3 % de nitrógeno;
 - del 25 al 40 % de oxígeno; y
 - del 2,5 al 10 % de azufre;
- en porcentaje en masa de la materia seca total del extracto de algas.

11. Extracto de algas para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** el espectro RMN ¹H en la Figura 1.
12. Extracto de algas del orden de las ulvales, en particular extracto de algas verdes del tipo *Ulva*, 5 susceptibles de ser obtenidas por el procedimiento donde:
- a) las algas se lavan y se les quita la arena;
 - b) dichas algas se trituran;
 - c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida;
 - 10 d) dicha fase líquida se clarifica;
 - e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra con una membrana de menos de 50 kDa; y
 - f) el jugo de filtración obtenido en la etapa e) se concentra y después se seca;
- para el uso en un procedimiento que permite prevenir y/o tratar los trastornos neurológicos, la depresión, la ansiedad, 15 los dolores neuropáticos e inflamatorios crónicos, el dolor cutáneo (de la piel, del tejido subcutáneo y órganos asociados) o somático.
13. Extracto de algas para su uso según la reivindicación 12, en un procedimiento que permite prevenir y/o tratar la depresión, la ansiedad, la enfermedad de Alzheimer, los dolores neuropáticos e inflamatorios crónicos, 20 el dolor cutáneo o somático.
14. Extracto de algas para el uso según la reivindicación 12 o 13 donde el jugo obtenido en la etapa d) de dicho procedimiento se ultrafiltra en una membrana de 15 kDa.
- 25 15. Extracto de algas para el uso según la reivindicación 12 a 14 donde la etapa c) de dicho procedimiento se realiza por prensado del triturado obtenido en la etapa b).
16. Extracto de algas para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 susceptible de ser 30 obtenido por el procedimiento donde:
- a) las algas se lavan con agua embotellada y se les quita la arena; y/o
 - b) dichas algas se trituran con un afinador; y/o
 - c) la fase sólida del triturado se separa de su fase líquida por prensado del triturado con una prensa a cinta; y/o
 - d) dicha fase líquida se clarifica con un clarificador a platos; y/o
 - 35 e) el jugo obtenido en la etapa d) se ultrafiltra con una membrana cerámica de 15 kDa; y/o
 - f) el jugo de filtración obtenido en la etapa e) se concentra por evaporación y después se seca por liofilización o atomización.
17. Composición farmacéutica que comprende un extracto de algas como se ha definido en una cualquiera 40 de las reivindicaciones 1 a 16 así como un excipiente farmacéuticamente aceptable, para el uso en un procedimiento que permite prevenir y/o tratar los trastornos neurológicos, la depresión, la ansiedad, los dolores neuropáticos e inflamatorios crónicos, el dolor cutáneo (de la piel, del tejido subcutáneo y órganos asociados) o somático.
18. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 17, en un procedimiento que permite 45 prevenir y/o tratar la depresión, la ansiedad, la enfermedad de Alzheimer, los dolores neuropáticos e inflamatorios crónicos, el dolor cutáneo o somático.

FIG.1



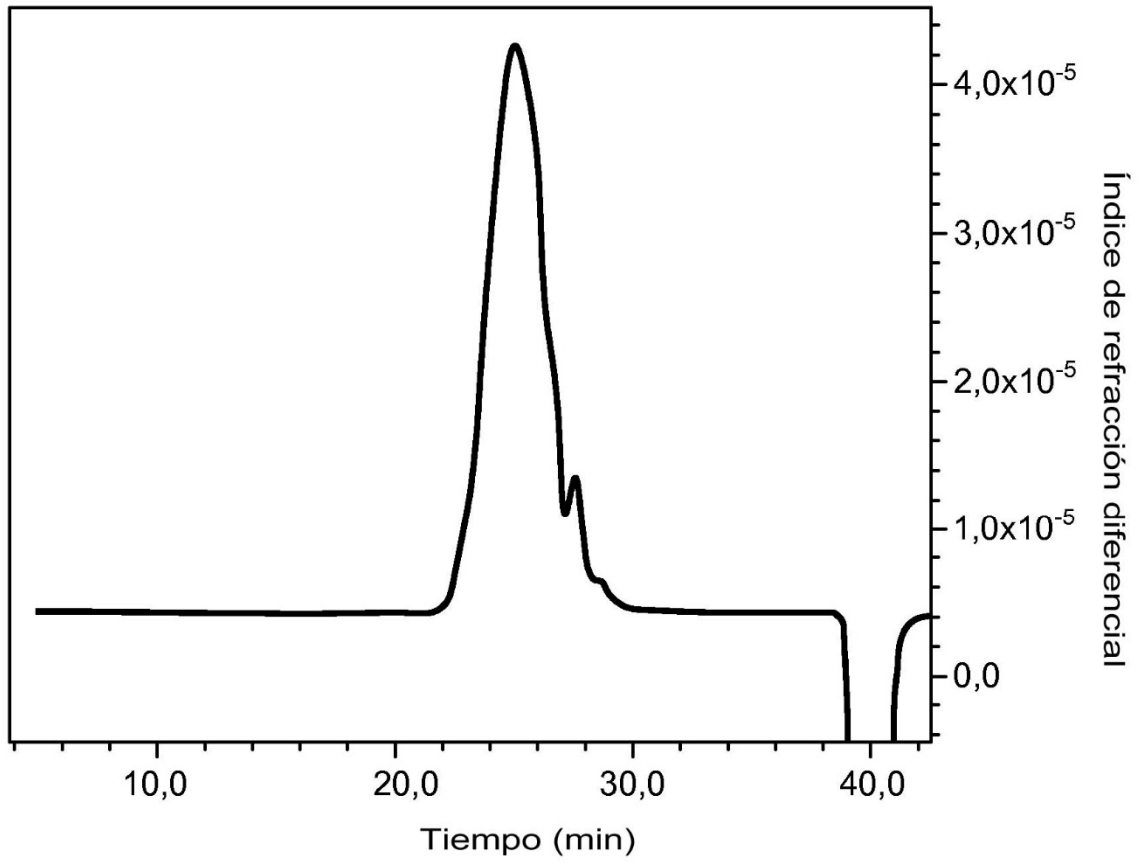
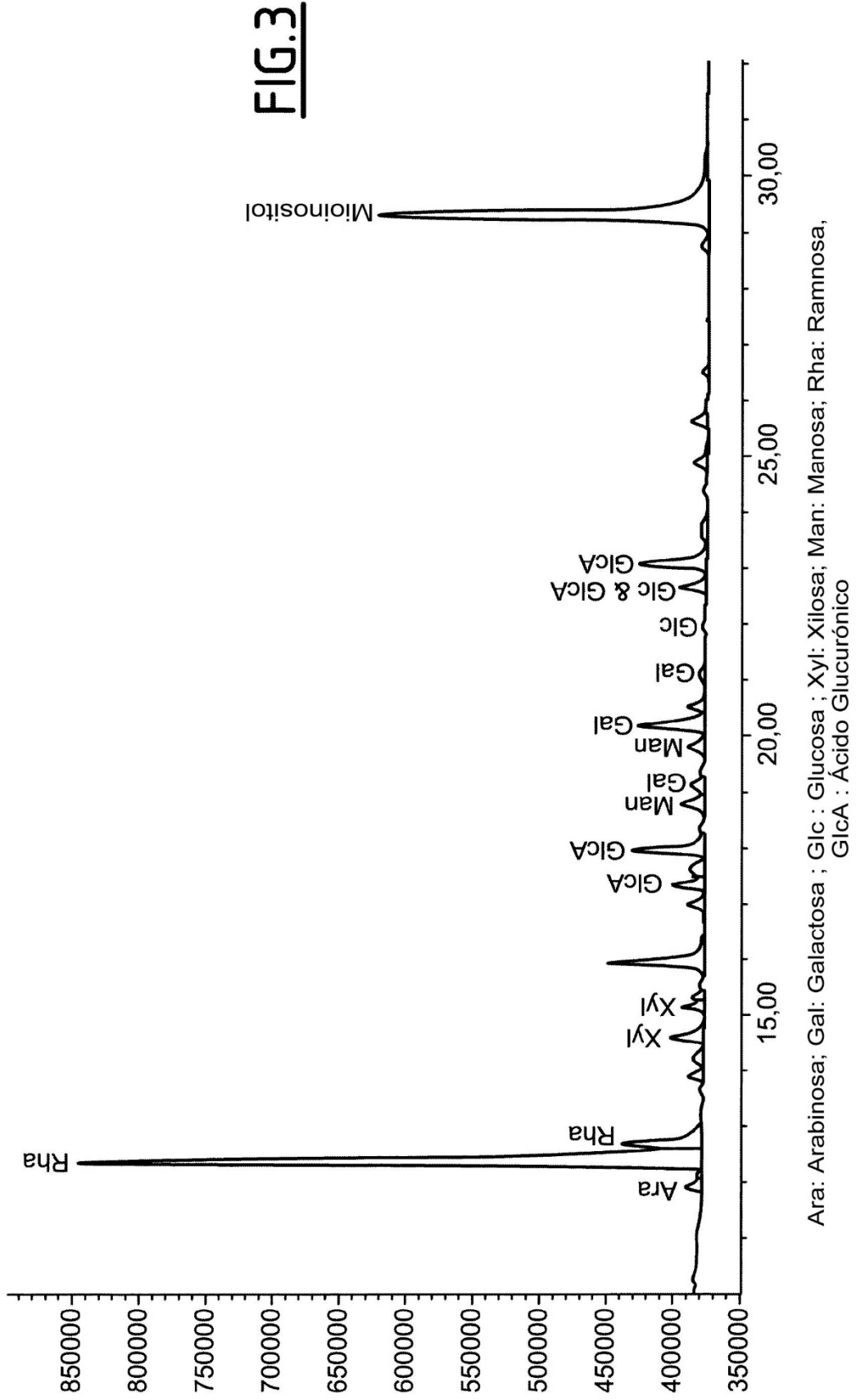
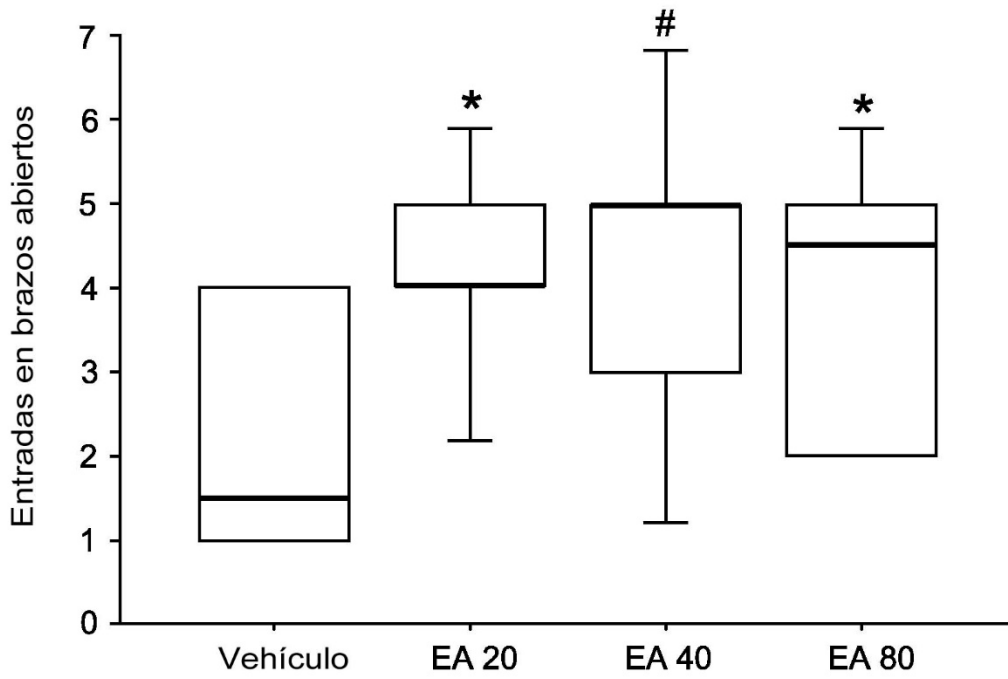


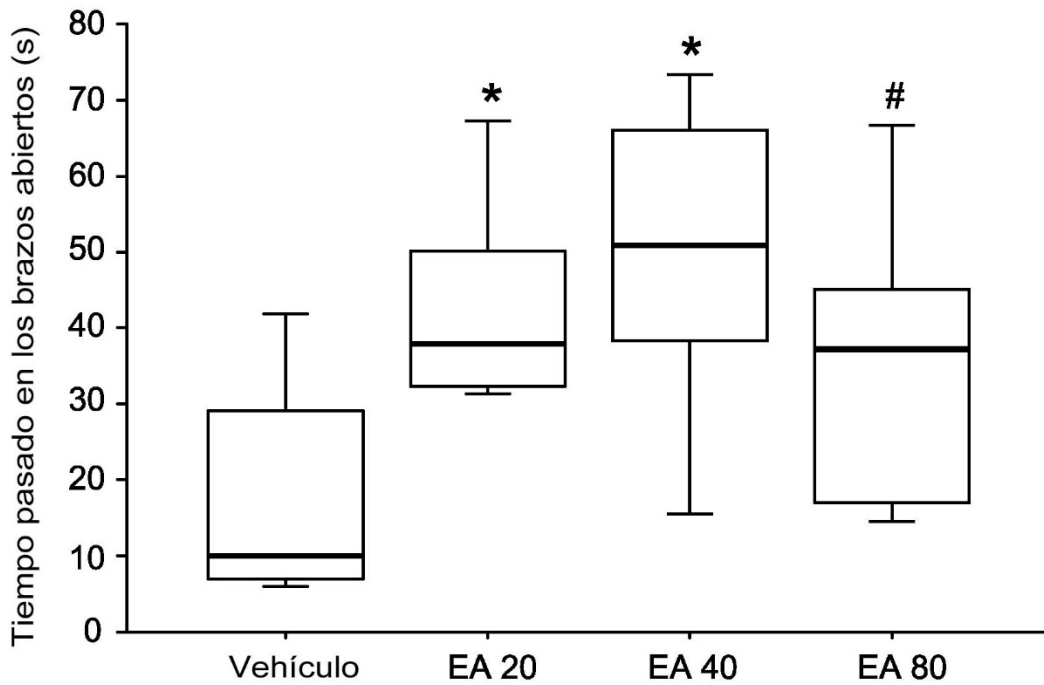
FIG.2





* $P < 0,05$; # $P < 0,10$ (tendencia). (Prueba de Mann-Whitney frente a Vehículo)

FIG.4



$P < 0,10$ (tendencia); * $P < 0,05$ (Prueba de Mann-Whitney: frente a Vehículo)

FIG.5

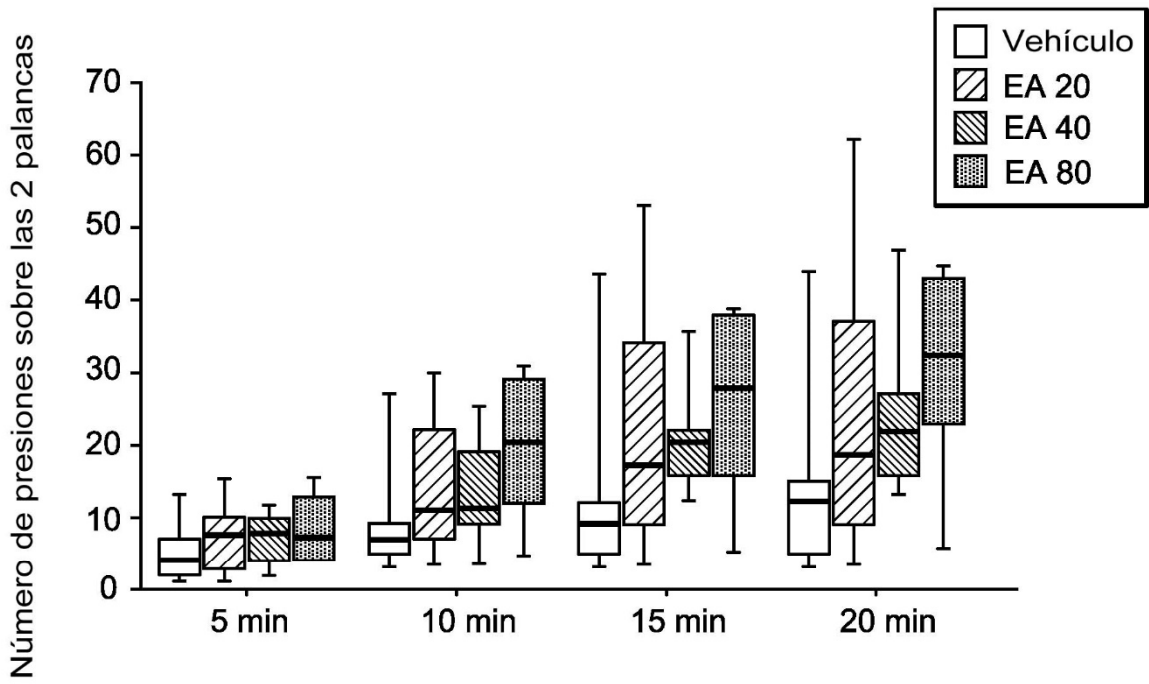
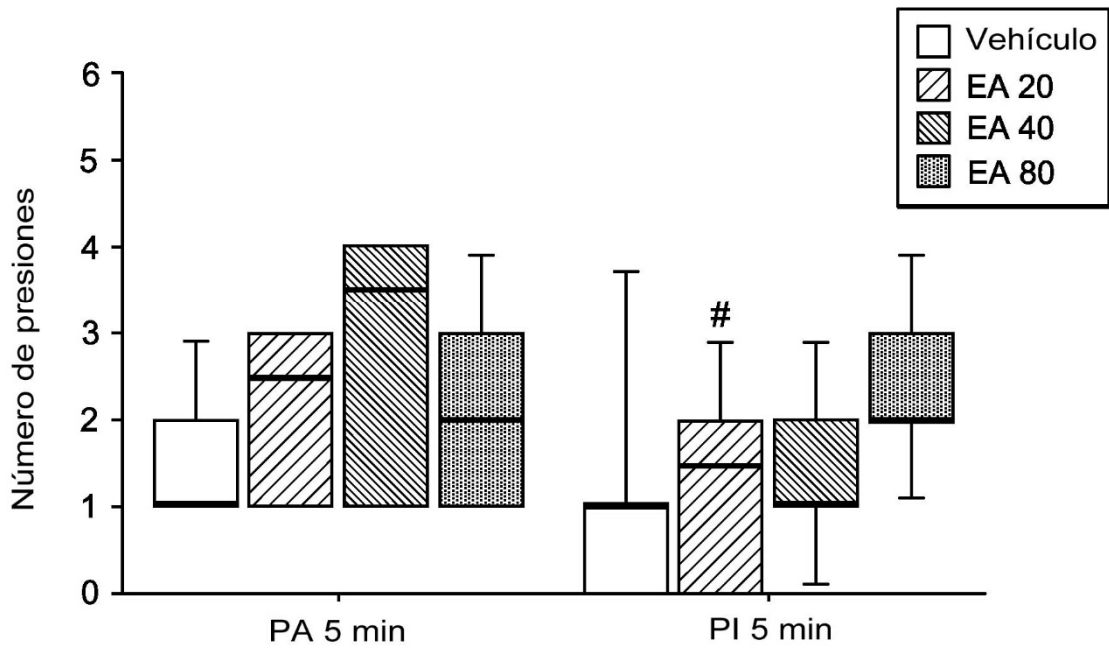


FIG.6



P < 0,10 (tendencia) (Prueba de Wilcoxon : PA frente a PI).

FIG.7

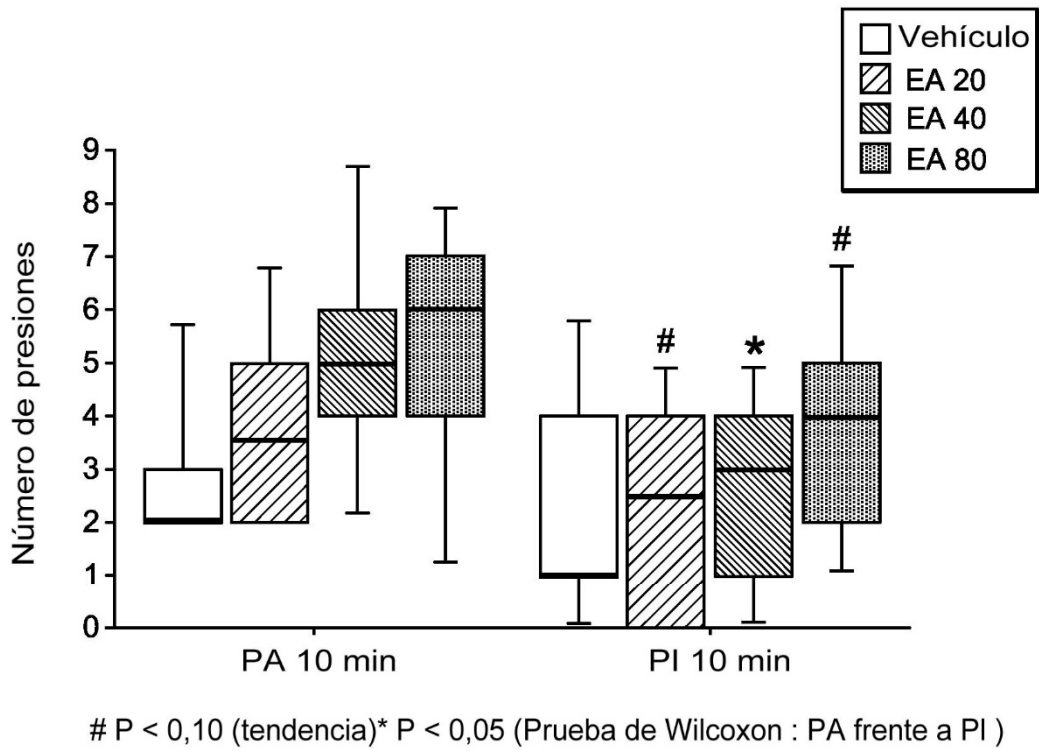


FIG.8

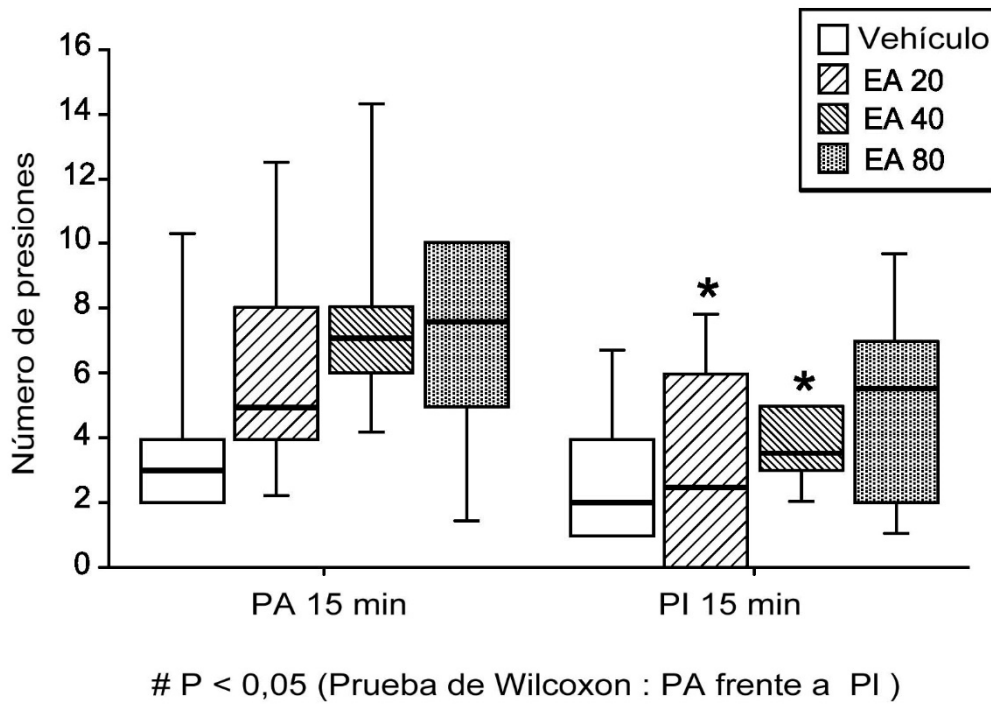


FIG.9

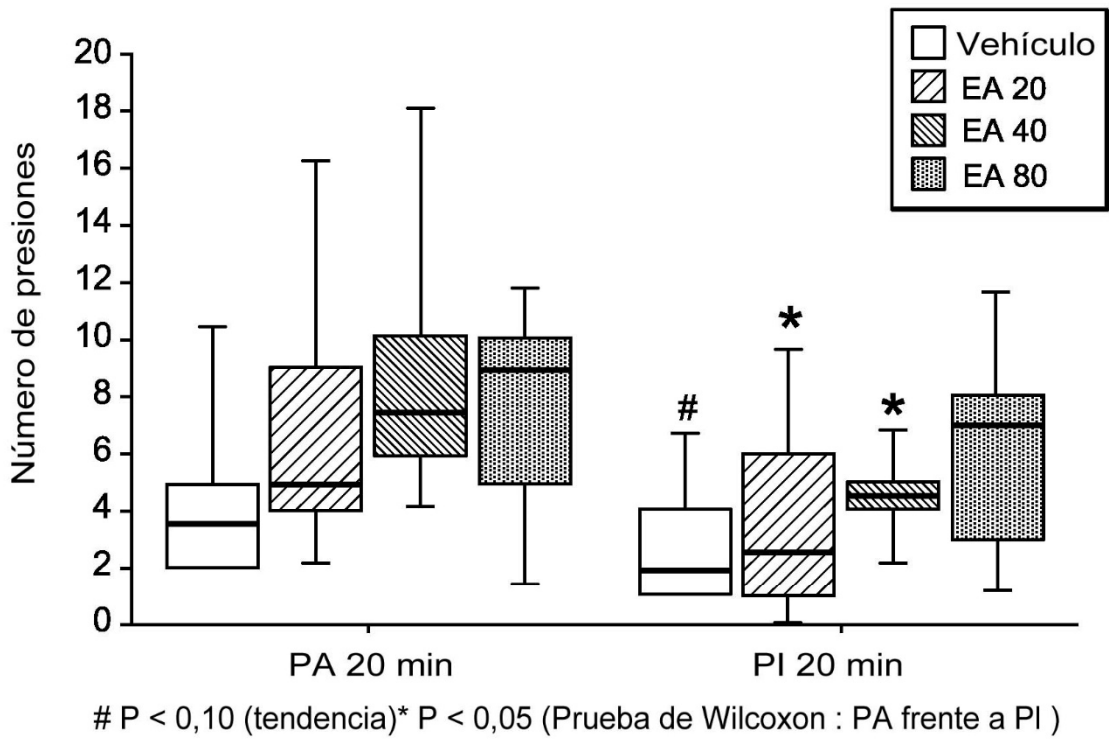


FIG.10

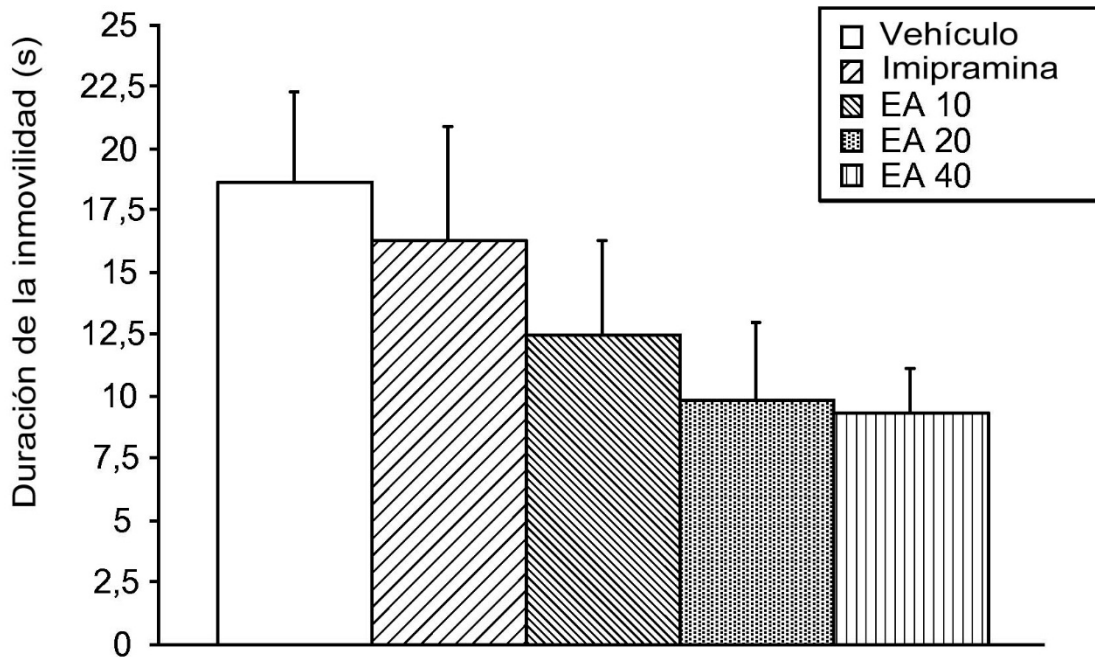
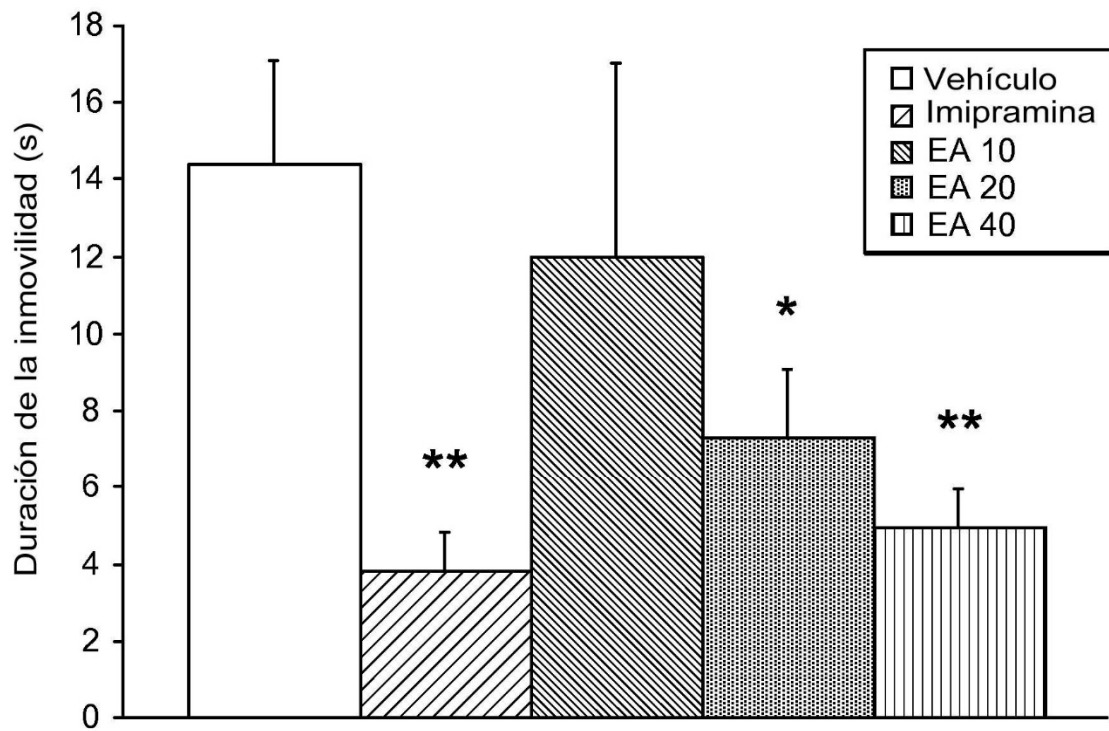


FIG.11



* P < 0,05 ; **P < 0,01 (Test-t no pareada frente Vehículo).

FIG.12