

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 342 141**

21 Número de solicitud: 200803761

51 Int. Cl.:

**A61K 36/736** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23L 1/212** (2006.01)

**A23L 2/04** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **30.12.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.07.2010**

71 Solicitante/s: **Universidad de Extremadura  
Campus Universitario - Avda. de Elvas, s/n  
06071 Badajoz, ES  
AGRUPACIÓN DE COOPERATIVAS VALLE DEL  
JERTE**

72 Inventor/es: **Rodríguez Moratinos, Ana Beatriz;  
Paredes Royano, Sergio Damián;  
Barriga Ibars, Carmen;  
Cubero Juárez, Javier;  
Garrido Álvarez, María;  
Terrón Sánchez, María Pilar;  
Fernández González, María del Carmen;  
Pariante Llanos, José Antonio;  
Hernández Méndez, Teresa;  
Lozano Ruiz, Mercedes y  
González Gómez, David**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **Composición nutracéutica contra trastornos del estado anímico y el insomnio.**

57 Resumen:

Composición nutracéutica contra trastornos del estado anímico y el insomnio.

La presente invención es un producto nutracéutico útil contra los trastornos del estado anímico y el insomnio cuya generación está basada en el descubrimiento de que algunas variedades de cerezas *Prunus avium*, presentan un alto contenido en triptófano, serotonina y melatonina.

ES 2 342 141 A1

## DESCRIPCIÓN

Composición nutracéutica contra trastornos del estado anímico y el insomnio.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en el campo de los alimentos nutracéuticos. Especialmente los alimentos nutracéuticos a base de cerezas, sus procedimientos de preparación y usos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los ritmos biológicos o circadianos se definen como variaciones regulares de una función biológica en el curso del tiempo (Berger, 2004). Todos los organismos presentan ritmos circadianos en la mayor parte de sus funciones fisiológicas, y entre ellas sobresalen el sueño, la función inmune, la secreción de melatonina y la producción y liberación de numerosos neurotransmisores (Duffy y Czeisler, 2002; Barriga y cols., 2004).

En nutrición, es conocido que la ingesta de determinados alimentos favorece el descanso nocturno mientras que el consumo de otros no propicia un buen descanso. Así, existen nutrientes que están relacionados con la vigilia y nutrientes relacionados con el sueño. Dentro del primer grupo se encuentran la vitamina B12 y las vitaminas antioxidantes. En individuos sanos, la vitamina B12 mejora la alerta y la concentración y reduce la fase de sueño durante el día (Mayer y cols., 1996). Las vitaminas antioxidantes pueden ejercer un efecto estimulante de la actividad diurna, por lo que se considera que actúan favoreciendo la instauración del ritmo circadiano sueño-vigilia. En el grupo de los nutrientes relacionados con el sueño, encontramos los triglicéridos de cadena media, el triptófano, y la melatonina.

La hormona melatonina, sintetizada principalmente en la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano vía serotonina, es uno de los factores clave en la función de sueño, de modo que al atardecer se inician cambios fisiológicos en el organismo que inducen la secreción de melatonina y el consiguiente descenso de la temperatura corporal (Dijk y Cajochen, 1997).

Los ciclos circadianos de sueño/vigilia están sujetos a un mecanismo de adaptación que controla la secreción de melatonina en función de la luz según las estaciones (Turek, 1985). El envejecimiento, sin embargo, provoca alteraciones de los ciclos sueño/vigilia de manera no controlada por dicho mecanismo de adaptación. Con la edad, los ciclos sueño/vigilia sufren alteraciones que tienen su origen en una disminución en la secreción de melatonina y que llevan a la desincronización, acortamiento del periodo oscilador, la aparición de un patrón ultradiano y, en última instancia, a la pérdida del ritmo circadiano (Copinschi y cols., 1999).

Actualmente se conoce que el descenso de los niveles nocturnos de melatonina durante el envejecimiento, afecta a la integridad de las estructuras circadianas y es un precursor de estados de enfermedad. La suplementación con melatonina, por tanto, ayudarla a prevenir procesos derivados del envejecimiento, tales como inmunodeficiencias asociadas con la edad o el crecimiento tumoral (Turek y cols., 2000).

Los precursores de la melatonina son, como se ha mencionado, el triptófano y la serotonina. Se ha constatado que la ingestión de alimentos ricos en triptófano induce somnolencia (Demisch y cols., 1987). Por ejemplo, leches y cereales infantiles enriquecidos con triptófano favorecen el sueño de los niños (Cubero y cols., 2006a,b,c; Cubero y cols., 2007a; Sánchez y cols., 2008a). Algunos alimentos ricos en triptófano son los lácteos (leche, queso, yogur, requesón); cereales (arroz, soja, trigo, cebada); pescado (bacalao), marisco (gambas); carnes (vacuno, pollo, porcino); legumbres y hortalizas (judías, lentejas, garbanzos, lechuga, tomates); frutos secos (almendras, nueces, cacahuetes, dátiles); huevos, plátanos (Mahan y Scott-Stump, 1998). No obstante, las dietas con exceso de triptófano pueden producir anomalías en el metabolismo de este aminoácido. Se estima que se deberían ingerir entre 25-60 mg de triptófano diarios ya que cantidades superiores a ésta pueden resultar perjudiciales para el organismo (Giles y cols, 2003; Mokady, 1990).

Cuando una dieta es rica en triptófano y carbohidratos se produce un efecto sinérgico por acción de la insulina que favorece su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Se sabe también que una dieta que favorezca la ingestión del triptófano o que facilite su paso a través de la barrera hematoencefálica, es recomendable en pacientes con tendencias depresivas (Campos, 1999).

En la glándula pineal, el triptófano se utiliza para la síntesis de serotonina y melatonina (Huether y cols., 1992). Los niveles de triptófano en el cerebro están regulados por la glándula pineal donde la enzima triptófano hidrolasa (TPH) transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano y este es descarboxilado por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADA) para producir serotonina. La serotonina se acumula en la glándula pineal durante el día pero sus niveles caen marcadamente durante la noche como consecuencia de su conversión a melatonina.

El neurotransmisor serotonina circula en las redes nerviosas que contrarrestan a las de la dopamina y noradrenalina.

Se sabe que la ingestión de serotonina ayuda a calmar emociones negativas de miedo, ansiedad, irascibilidad, tensión, agresividad, así como los trastornos del sueño y las actitudes obsesivo-compulsivas como la ingesta compulsiva.

siva de carbohidratos. El síndrome de deficiencia en serotonina se manifiesta con una amplia gama de alteraciones emocionales y del comportamiento que van desde el llamado síndrome premenstrual al suicidio.

Entre los alimentos ricos en serotonina se encuentran las ortigas, plátanos, tomates, ciruelas, aguacates, berenjenas, nueces, las piñas y los dátiles.

Durante la noche, la serotonina se transforma en melatonina por acción de 2 enzimas de la glándula pineal cuya actividad aumenta exponencialmente durante la noche. Inicialmente, la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), que muestra un incremento de actividad de 30 a 70 veces, transforma la serotonina en N-acetilserotonina. Después, la enzima hidroxil-indol-O-metiltransferasa (HIOMT), metila la N-acetilserotonina para producir N-acetil-5-metoxitriptamina, más comúnmente conocida como melatonina.

La síntesis y liberación pineal de melatonina a la circulación está bajo la influencia del ciclo luz/oscuridad (Liebmann y cols., 1997), ya que la luz deprime rápidamente la actividad de las enzimas pineales.

Además de la glándula pineal, otros tejidos y órganos tienen la capacidad de sintetizar melatonina. Entre ellos destacan la médula ósea y las células del sistema inmune, los tejidos gonadales y el sistema digestivo.

Además de su papel en los ciclos sueño/vigilia, la melatonina es también un potente antioxidante endógeno (Terrón y cols., 2001; Cubero 2007b; Paredes y cols., 2007b,d) ya que actúa como secuestrador de radicales libres, estimula e incrementa la acción de enzimas antioxidantes y disminuye el daño mitocondrial ocasionado por los radicales libres reduciendo la pérdida de electrones en la membrana interna mitocondrial (Reiter y cols., 2003). Además, la melatonina potencia el efecto de otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Tan y cols., 2002; Guerrero y cols., 2007). De este modo, su eficacia es mucho mayor que si actuara de forma independiente, como ocurre con la mayoría de antioxidantes. Se ha descrito además que, sobre la piel, la melatonina es un protector eficaz contra la radiación ultravioleta (Shirazi et al., 2007 J. Radiat. Res. 48, 263-272).

Dado que el estrés oxidativo es un notable agravante de un alto porcentaje de las enfermedades de mayor impacto en la sociedad actual (enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y metabólicas), la medicina preventiva recomienda la ingestión de melatonina en la dieta para aumentar la capacidad de las células para combatir el daño oxidativo (Benot y cols., 1999; Terrón y cols., 2005a).

Los alimentos ricos en melatonina son los tomates (11,2 a los 50,6 ng/100 g), plátanos (46,6 ng/100 g), cerezas (13,5 ng/g), pepinos (8,6 ng/100 g), remolacha (0,2 ng/100 g), semillas como las pipas de girasol (29 ng/g), y algunas plantas medicinales (Dubbels y cols., 1995; Chen y cols., 2003; Reiter y cols., 2007).

De entre los alimentos de origen vegetal con riqueza en melatonina, las cerezas constituyen un caso especial, pues se ha observado que los antocianos presentes en las mismas poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo que unido a las propiedades cronobiológicas que posee la melatonina, sugiere que su consumo podría ser muy recomendable para la salud humana.

En nutrición se conocen varios tipos de cerezas provenientes de especies vegetales distintas. El género *Prunus*, perteneciente a la familia *Rosaceae*, presenta más de 100 especies, muchas de las cuales dan frutos muy valorados en la gastronomía. Entre ellos se encuentran las cerezas (*P. avium*, *P. cerasium*, *P. apétala*, *P. caroliniana*, *P. cerasoides*, *P. emarginata*, *P. fruticosa*, *P. glandulosa*, *P. Grayana*, *P. ilicifolia*, *P. incisa*, *P. laurocerasus*, *P. lusitanica*, *P. maaki*, *P. mahaleb*, *P. maximowiczii*, *P. nipponica*, *P. Gadus*, *P. pennsylvanica*, *P. prostata*, *P. pseudocerasus*, *P. pumila*, *P. serotina*, *P. serrulata*, *P. speciosa*, *P. subhirtella*, *P. tomentosa*, *P. virginiana*, *P. yedoensis*), las ciruelas (*P. doméstica*, *P. cerasifera*, *P. alleghaniensis*, *P. americana*, *P. angustifolia*, *P. geniculata*, *P. gracilis*, *P. hortelana*, *P. mandshurica*, *P. maritima*, *P. mexicana*, *P. munsoniana*, *P. nigra*, *P. rivularis*, *P. salicina*, *P. Simoni*, *P. subcordata*, *P. umbellata*), los albaricoques (*P. armeniaca*, *P. brigantina*, *P. fremontii*, *P. sibirica*), los melocotones y las nectarinas (*P. davidiana*, *P. persica*, *P. andersonii*), las almendras (*P. dulcis*, *P. fasciculata*, *P. jacquemontii*, *P. tenella*) etc.

Cada uno de los frutos de las distintas especies del género *Prunus* tienen cualidades nutricionales y gastronómicas diferentes. Por ejemplo, los frutos de la especie *P. doméstica* se utilizan para superar problemas de tránsito intestinal como el estreñimiento, debido a su alto contenido en fibra y poder laxante. Los frutos de la especie *P. cerasium*, sin embargo, son apreciados por su poder antioxidante y su contenido en melatonina. La especie *P. avium* y sus variedades es muy apreciada gastronómicamente y presenta propiedades antioxidantes pero no laxantes; su contenido en melatonina es desconocido. La especie *P. dulcis* es muy apreciada por sus propiedades hidratantes y regenerativas de la piel, el cabello y las uñas; no se le atribuyen, sin embargo, propiedades antioxidantes y tampoco se conoce su contenido en melatonina.

Muchas especies de *Prunus* dan cerezas. La cereza dulce (*P. avium*) se come fresca como cereza o como picota (sin pedúnculo) mientras que la cereza ácida (*P. cerasium*) no es apreciada fresca y se comercializa procesada, generalmente en confitura, conocida como guinda. La variedad de cereza ácida Montmorency, cultivada en Michigan, presenta un alto contenido en antioxidantes. Estudios pioneros realizados en EEUU por el Dr. Reiter revelaron que las cerezas Montmorency tenían elevados niveles de antocianinas, polifenoles y melatonina. Hay grandes diferencias entre las variedades de *P. cerasium* estudiadas, por ejemplo la cereza Montmorency tiene un contenido de melatonina

de 13,5 ng/g, mientras que la cereza Balaton, de la misma especie, solamente contiene 2 ng/g (*Burkhardt, S et al., J. Agric Food Chem*). Por lo tanto el posible contenido de melatonina en frutos de otras especies del género *prunus* es profundamente desconocido. Especies de familias taxonómicamente distantes como el tomate (*Solanum lycopersicum*) o la remolacha (*Solanum melongena*) dan frutos con alto contenido en melatonina; notablemente, el contenido en melatonina de estas dos especies del mismo género también es muy diferente. De nuevo, en un grupo tan distante como los monocotiledones encontramos un fruto rico en melatonina: El plátano (*Musa Spp.*). Se puede concluir, por lo tanto, que el contenido en melatonina de los frutos es impredecible.

En el mercado existen complementos nutracéuticos, a base de cerezas Montmorency, para el suplemento en antioxidantes y reguladores del sueño. Sin embargo, dada la acidez de la materia prima, estos alimentos nutracéuticos pueden provocar problemas digestivos a largo plazo, tienen alto contenido en azúcares y a veces se combinan con elementos adicionales como chocolate o han de tomarse en pastillas. Sería deseable, por tanto disponer de algún producto nutracéutico que fuera mejor aceptado por el sistema digestivo. Los inventores de la presente solicitud han descubierto que, sorprendentemente, algunas cerezas de la especie *P. Avium* poseen un alto contenido en triptófano, serotonina y melatonina. Por ello han desarrollado el producto nutracéutico que se describe a continuación para contribuir al campo de la técnica con un producto rico en triptófano, serotonina y melatonina que debido a su menor acidez no dañe el sistema digestivo debido a su ingestión durante periodos largos.

## 20 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Cromatografía representativa del contenido en triptófano de la variedad de cereza *P. avium* navalinda.

Figura 2: Cromatograma que refleja la cantidad de serotonina y melatonina presente en una muestra de cereza de la variedad Pico Negro.

## Breve descripción de la invención

La presente invención tiene como objeto proporcionar un producto nutracéutico rico en melatonina y bajo en acidez en forma de un producto universal, de posible uso generalizado para cualquier edad y tipo de población. En el sector agrícola del cultivo del cerezo, sería deseable dar salida a variedades que, siendo ricas en triptófano, serotonina y melatonina y otros compuestos relacionados, no tienen la mejor aceptación comercial como fruta fresca. Una ventaja de la presente invención es que, al estar basada en frutos de la especie *P. avium*, presenta mejores características organolépticas así como una mayor proporción de azúcares naturales. Por lo tanto, una realización de la presente invención es un producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina que comprende extracto de cerezas de variedades de la especie *Prunus avium* a elegir entre Ambrunés, Bourlat, Navalinda, Pico Negro, Pico Colorado, Pico limón, Van y mezclas de estas.

Sería conveniente, además, que la invención sea fácilmente asimilable por el sistema digestivo. Según esto, una realización de la presente invención es un extracto líquido, por ejemplo, un jugo concentrado de dichas variedades de cerezas.

Asimismo, es objeto de la presente invención proporcionar un producto nutracéutico sólido con propiedades organolépticas adecuadas para su ingestión solo o incorporado a otros alimentos. Por lo tanto, una realización de la presente invención es también un extracto sólido de variedades de cerezas de la especie *P. avium*. Por ejemplo, frutos deshuesados frescos, deshidratados o liofilizados, incluyendo un extracto seco en polvo.

Con el fin de obtener un extracto líquido, otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de preparación de un producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina que comprende el deshuesado y reducción de la carne del fruto, la obtención del jugo limpio mediante separación de la pulpa y la concentración por medios físicos a una temperatura máxima de 4°C.

Igualmente, para obtener un producto nutracéutico sólido que sea rico en triptófano, serotonina y melatonina, es otro aspecto de la presente invención un procedimiento de preparación de un producto nutracéutico que comprende el deshuesado y trituración de la fruta, la adición de un antiapelmazante, la adición de un antioxidante, su congelación, liofilización y envasado impermeable en atmósfera inerte. Una realización alternativa comprende además un paso adicional de trituración tras el liofilizado para obtener el producto en polvo.

El producto producido por el anterior procedimiento contiene ventajosamente, altas concentraciones de triptófano, serotonina y melatonina. En consecuencia, una realización de la presente invención es un producto nutracéutico caracterizado por presentar entre 20-40° Brix, una concentración total de la suma de serotonina y melatonina de entre  $8 \times 10^{-2}$  a  $1,2 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$  y una concentración de triptófano de entre  $1,4 \times 10^4$  a  $1,7 \times 10^4$  microgramos.

Según lo expuesto, un aspecto de la presente invención comprende el uso del producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina en un método de tratamiento contra el insomnio, los desórdenes anímicos o en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de estos.

En nutrición, sería muy ventajoso disponer, a lo largo de todas las estaciones, de un producto alimenticio rico en melatonina que ayude a mejorar los ciclos del sueño y la vigilia. Por ello, otro aspecto de la presente invención comprende el uso del producto nutracéutico en la preparación de un alimento funcional, un producto dietético o un suplemento nutricional.

5 La utilización en cosmética del extracto de variedades de cerezas de la invención, aportarla un buen protector contra los efectos negativos de la radiación ultravioleta. Por ello, otro aspecto de la presente invención comprende el uso del producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina, que comprende extracto de cerezas de variedades de la especie *Prunus avium* a elegir entre Ambrunés, Bourlat, Navalinda, Pico Negro, Pico Colorado, Pico limón, Van y mezclas de estas en la preparación de una composición cosmética.

### Descripción detallada de la invención

15 La presente invención está fundamentada en el descubrimiento de que diferentes variedades de cerezas del Valle del Jerte presentan un alto contenido en triptófano, serotonina y melatonina. La ingestión 400 gramos frescos diarios de cerezas *Prunus avium*, resultó en sorprendentes mejoras del sueño de voluntarios maduros y ancianos, así como aumento de los niveles del metabolito de excreción de la melatonina (6-sulfatoximelatonina) en orina y de su capacidad antioxidante.

20 Dado que las propiedades del triptófano, la serotonina y la melatonina no se pierden en la fruta seca, y puesto que la cereza es un fruto disponible únicamente durante la estación estival, la invención aporta un nuevo producto, disponible en cualquier época del año, de ingesta fácil, sabor y textura agradables, que comprende un producto derivado de extractos de los frutos de *P. avium* que puede ser un jugo concentrado o un extracto seco.

25 De acuerdo con esto, una realización de la presente invención comprende un producto nutracéutico, rico en triptófano, serotonina y melatonina, que comprende extracto de variedades de cerezas de la especie *Prunus avium*.

Las cerezas utilizadas para la obtención de extractos pertenecen a las siguientes variedades:

- 30
- *Con pedúnculo*: Bourlat, Navalinda y Van.
  - *Picotas*: Ambrunés, Pico Limón, Pico Negro y Pico Colorado.

35 En la elaboración del producto nutracéutico de la presente invención, se utilizaron cerezas frescas que fueron proporcionadas por la Agrupación de Cooperativas "Valle del Jerte". En primer lugar, se llevó a cabo el deshuesado de una parte de las cerezas frescas para obtener un homogeneizado (triturado de pulpa y zumo sin hueso) que fue conservado a -28°C hasta el momento de su utilización; muestras que se emplearon para la determinación de la concentración de triptófano presente en las distintas variedades de cerezas estudiadas.

40 Por otro lado, se tomó fruta fresca y se la sometió a un proceso de liofilización, previa trituración y congelación a -80°C. Dicho liofilizado se utilizó para llevar a cabo la separación cromatográfica que serviría para la determinación cualitativa y valoración cuantitativa del contenido de melatonina y serotonina en las distintas variedades de cerezas estudiadas. Por último, otra parte de las distintas variedades de cerezas frescas fueron proporcionadas a los individuos voluntarios que participaron en el estudio, para poder de ese modo analizar los parámetros cronobiológicos de sueño así como valorar si su consumo contribuía a elevar los niveles de melatonina y antioxidantes en los sujetos participantes, mediante la cuantificación de 6-sulfatoximelatonina y capacidad antioxidante total en las orinas recogidas antes, durante y tras la ingesta de las cerezas. Estas cerezas fueron suministradas a los individuos inmediatamente tras su llegada (recogidas en el momento óptimo de maduración), para mantener las mejores condiciones nutricionales y funcionales del fruto.

45 La Tabla 1 muestra los valores de concentración de triptófano en cada una de las variedades de cerezas del Valle del Jerte estudiadas. Se observaron diferencias significativas entre unas variedades y otras, de modo que las variedades que presentaron menor concentración del aminoácido fueron Pico colorado y Pico negro, seguidas por Ambrunés, Bourlat, Pico limón y Van, con una concentración intermedia, siendo Navalinda la que mostró una concentración de triptófano significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) respecto a todas las demás variedades. Cada valor representa la media  $\pm$  la desviación estándar de seis determinaciones realizadas por triplicado y en partes por millón (ppm o mg/l) y ng/100 g de comestible, a, b, c: Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de triptófano de esas variedades. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las concentraciones de triptófano de esas variedades de cerezas. Dos letras en una misma variedad indican que no existen diferencias significativas entre la concentración de esa variedad y las del resto de variedades con cualquiera de las dos letras (Test de Tukey).

65

# ES 2 342 141 A1

TABLA 1

*Concentraciones de triptófano en distintas variedades de cerezas del Valle del Jerte*

Variedades	[Triptófano] (ppm)	[Triptófano] (mg/100g comestible)
Bourlat	61,41 ± 5,81	6,141 ± 0,581 <sup>b</sup>
Navalinda	82,64 ± 4,29	8,264 ± 0,429 <sup>c</sup>
Van	68,85 ± 3,28	6,885 ± 0,328 <sup>bc</sup>
Ambrunés	57,24 ± 7,11	5,724 ± 0,711 <sup>b</sup>
Pico limón	62,69 ± 5,61	6,269 ± 0,561 <sup>b</sup>
Pico negro	37,76 ± 2,43	3,776 ± 0,243 <sup>a</sup>
Pico colorado	36,53 ± 9,84	3,653 ± 0,984 <sup>a</sup>

Las Tablas 2 y 3 muestran respectivamente los valores de concentración de serotonina y melatonina en cada una de las variedades de cerezas del Valle el Jerte estudiadas.

Se observaron diferencias significativas entre unas variedades y otras, de modo que las variedades que presentaron menor concentración de serotonina fueron Pico negro, Van y Bourlat, seguidas, con una concentración intermedia, por Pico limón y Navalinda, y siendo Pico colorado y Ambrunés las que presentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) una mayor concentración de serotonina respecto a todas las demás variedades.

Por otro lado, y tal como se muestra en la Tabla 3, las variedades que mostraron una menor concentración de melatonina fueron Ambrunés, Pico limón, Van y Pico colorado; Pico negro presentó una concentración intermedia, y fue Bourlat la que mostró una concentración de melatonina significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) respecto a todas las demás variedades.

TABLA 2

*Concentraciones de serotonina en distintas variedades de cerezas del Valle del Jerte*

Variedades	[Serotonina] (ppb)	[Serotonina] (ng/100 g comestible)
Bourlat	0,126 ± 1,3 x 10 <sup>-4</sup>	12,6 ± 1,3 x 10 <sup>-2</sup> b
Navalinda	0,307 ± 0,9 x 10 <sup>-4</sup>	30,7 ± 0,9 x 10 <sup>-2</sup> cd
Van	0,106 ± 1,1 x 10 <sup>-4</sup>	10,6 ± 1,1 x 10 <sup>-2</sup> b
Ambrunés	0,376 ± 1,6 x 10 <sup>-4</sup>	37,6 ± 1,6 x 10 <sup>-2</sup> d
Pico limón	0,271 ± 1,1 x 10 <sup>-4</sup>	27,1 ± 1,1 x 10 <sup>-2</sup> c
Pico negro	0,028 ± 3,7 x 10 <sup>-4</sup>	2,8 ± 3,7 x 10 <sup>-2</sup> a
Pico colorado	0,366 ± 1,8 x 10 <sup>-4</sup>	36,6 ± 1,8 x 10 <sup>-2</sup> d

# ES 2 342 141 A1

TABLA 3

*Concentraciones de melatonina de cada una de las distintas variedades de cerezas del Valle del Jerte*

Variedades	[Melatonina] (ppb)	[Melatonina] (ng/100 g comestible)
Bourlat	$0,224 \pm 1,2 \times 10^{-4}$	$22,4 \pm 1,2 \times 10^{-2} \text{ d}$
Navalinda	$0,027 \pm 2,4 \times 10^{-4}$	$2,7 \pm 2,4 \times 10^{-2} \text{ b}$
Van	$0,014 \pm 0,9 \times 10^{-4}$	$1,4 \pm 0,9 \times 10^{-2} \text{ ab}$
Ambrunés	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0 \text{ a}$
Pico limón	$0,006 \pm 0,7 \times 10^{-4}$	$0,6 \pm 0,7 \times 10^{-2} \text{ a}$
Pico negro	$0,115 \pm 3,3 \times 10^{-4}$	$11,5 \pm 3,3 \times 10^{-2} \text{ d}$
Pico colorado	$0,048 \pm 2,2 \times 10^{-4}$	$4,8 \pm 2,2 \times 10^{-2} \text{ c}$

En individuos sanos, la ingesta de las variedades seleccionadas produjo un aumento estadísticamente significativo de los valores de Tiempo Real de Sueño tanto en individuos maduros como ancianos, con respecto a sus correspondientes valores basales y a los obtenidos un día después de la última toma de las variedades seleccionadas.

En ambos grupos de edad, la ingesta de las variedades seleccionadas provocó además una disminución estadísticamente significativa de los valores de Actividad Total, con respecto a sus correspondientes valores basales y a los obtenidos un día después de la última toma.

Asimismo, la ingesta de la mayoría de estas variedades, indujo un aumento estadísticamente significativo de los valores de Sueño Asumido en los individuos ancianos, con respecto a su correspondiente valor basal y al obtenido un día después de la última toma de las mismas. En individuos maduros, se observó un ligero aumento en los valores de Sueño Asumido con cualquiera de las variedades estudiadas. Por otro lado, se observó un ligero descenso de los valores de Latencia de Sueño y Número de Despertares tanto en los individuos maduros como ancianos, respecto a sus correspondientes valores basales. Igualmente, se produjo un aumento en los Minutos de Inmovilidad de individuos ancianos, con respecto a su correspondiente valor basal, siendo significativo con Ambrunés, Pico Negro y Pico Colorado. Finalmente, la Eficiencia de Sueño no se vio afectada de modo destacable por la ingesta de la mayoría de las variedades en ninguno de los dos grupos de edad estudiados.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

*Detección cualitativa y determinación cuantitativa de triptófano, serotonina y melatonina en distintas variedades de cerezas del Valle del Jerte*

Se valoraron y cuantificaron los niveles de aminoácido triptófano a partir de muestras trituradas y congeladas de las distintas variedades de cerezas del Jerte elegidas en este estudio. Para ello, el método analítico utilizado fue HPLC con detector fluorescente (Thermo® FL 3000), basándose los fundamentos técnicos-analíticos en el método empleado por Alegría y cols. (1996). Previamente al análisis cuantitativo, se procedió a la extracción del aminoácido. Para ello, se tomó 1 g de muestra de porción comestible (pulpa más piel sin hueso) recogida en criotubo previamente congelada a

## ES 2 342 141 A1

-28°C. A continuación, se adicionaron 0,5 g de Ba(OH)<sub>2</sub> para alcalinizar el medio de extracción. Además, se añadieron 0,5 ml de H<sub>2</sub>O para una mejor dilución y se utilizó un agitador de balanceo para mezclar los distintos componentes durante 10 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una hidrólisis térmica en estufa a 100°C durante 12 horas. Una vez finalizada, se centrifugó durante 15 minutos a 13.200 g y se separó el sobrenadante, puesto que es la fracción que contenía el triptófano. Seguidamente se filtró el sobrenadante con filtros Albet® de poro de 0,45 µm y se recogió 1 ml del filtrado que se conservó a -28°C hasta su análisis cromatográfico.

Para llevar a cabo el análisis, en primer lugar se ajustó cada muestra con acetato de Na/ácido acético a pH 5. Seguidamente, se inyectaron 20 µl de muestra en la columna cromatográfica que presentaba como fase estacionaria una composición de 88% H<sub>2</sub>O, 2% de acetonitrilo y 10% de metanol, y como fase móvil metanol puro. El tiempo de retención medio de la columna para el aminoácido triptófano fue de 7,9 ± 0,2 minutos. La columna cromatográfica estaba acoplada a un detector de fluorescencia para la cuantificación de los niveles de triptófano. La longitud de onda de excitación del aminoácido fue de 284 nm y la de emisión de 340 nm.

Los valores resultantes de los análisis de cada muestra se obtuvieron por triplicado en partes por millón (ppm) que equivalen a mg/l y, posteriormente, se expresaron como mg/100 g de producto comestible. Dichos análisis se realizaron mediante el software informático Cromquest®. La figura 1 muestra un ejemplo representativo de cromatograma que refleja la cantidad de triptófano presente en una muestra de cereza de la variedad Navalinda.

### 20 *Contenido de serotonina y melatonina por HPLC acoplado a un detector de masas (HPLC-MS)*

Se determinaron las cantidades de serotonina y melatonina presente en los liofilizados de cada una de las variedades de cerezas mediante HPLC-MS, ya que se ha comprobado que esta técnica es la más precisa para determinar la cantidad de serotonina y melatonina en plantas (Kolar y Machackova, 2005; Pape y Lüning, 2006). El método de extracción se basó en el propuesto por Burkhardt y cols. (2001), pero con modificaciones en cuanto a los volúmenes para optimizar la extracción de serotonina y melatonina hasta aproximadamente un 75%.

Se pesaron 2 gramos de muestra liofilizada y se les añadió 10 ml de tampón fosfato a pH 8; con ello se consiguió alcalinizar el medio de extracción para facilitar el posterior paso de los analitos de la fase acuosa al cloroformo. Seguidamente se homogenizó durante 1 minuto y se centrifugó a 15.320 g durante 10 minutos, se filtró el sobrenadante y se recogió en tubos Falcon. A continuación, se repitió el mismo proceso lavando el liofilizado con 5 ml de tampón fosfato.

A cada tubo Falcon se le añadieron 3 ml de cloroformo, el cual se utilizó para la extracción de los analitos de la matriz. Este disolvente es fácilmente evaporable de modo que no interfiere con la fase móvil y además permite preconcentrar los analitos.

Asimismo, se añadieron 50 µl de KOH 1M para alcalinizar aún más el medio de extracción y asegurar que todos los analitos pasasen a la fase clorofórmica.

Posteriormente, los tubos se agitaron en vortex durante 2 minutos y se eliminó la parte superior resultante tras dicha agitación. A continuación, se pasó la fase clorofórmica a un tubo de vidrio, se lavó con 1 ml de cloroformo y se filtró el contenido utilizando para ello un filtro de 0,45 µm. El filtrado se recogió en otro tubo de vidrio y se evaporó con nitrógeno. Por último, se preconcentraron los analitos en un volumen de 200 µl y se disolvieron en la fase móvil. Para realizar la separación cromatográfica se partió de una elución en gradiente con una composición de fase móvil del 95% de fase acuosa (ácido fórmico al 0,45%) y 5% de fase orgánica (acetonitrilo). Del minuto 0 al 5 se utilizó una composición constante de fase móvil (95% de fase acuosa y 5% de acetonitrilo). A partir del minuto 5, se empleó un gradiente lineal hasta el 100% de acetonitrilo, alcanzándose esta composición en el minuto 16. La separación cromatográfica fue seguida de 15 minutos de reequilibrio.

La optimización de la separación cromatográfica se realizó con patrones de melatonina y serotonina, además se emplearon muestras de cerezas para tener en cuenta la heterogeneidad de la matriz. En estas condiciones, la elución de serotonina se produjo en el minuto 1,8 y la de melatonina en el minuto 11,5. Una vez finalizada la optimización del método, se inyectaron las muestras de las distintas variedades de cerezas en la columna de HPLC. Posteriormente, para llevar a cabo la detección de melatonina y serotonina se empleó un detector de masas en modo positivo y con los siguientes fragmentos de pesos moleculares:

233 (pico principal) y 174 para la melatonina.

177 (pico principal) y 160 para la serotonina.

Dado que la concentración de melatonina en cerezas está en el rango de µg/l, en primer lugar se estableció qué niveles mínimos de concentración pueden medirse con seguridad en nuestro método. Para ello, se elaboró una recta de calibrado con patrón entre 5 y 100 µg/l de melatonina, encontrándose una correlación entre concentración y área de pico (r<sup>2</sup> = 0,9988). El límite de detección calculado fue de 2,21 µg/l. Con respecto a la serotonina, se construyó la correspondiente recta de calibrado con patrón entre 5 y 100 µg/l, encontrándose nuevamente una buena correlación entre concentración y área de pico (r<sup>2</sup> = 0,9967). En este caso, el límite de detección calculado fue de 5,90 µg/l.



## ES 2 342 141 A1

Los valores resultantes de los análisis de cada muestra se obtuvieron por duplicado en  $\mu\text{g/l}$  y, posteriormente, se expresaron como  $\text{ng}/100\text{ g}$  de comestible. Dichos análisis se llevaron a cabo mediante el software informático Chem Station®. La figura 2 muestra un cromatograma representativo que refleja la cantidad de serotonina y melatonina presente en una muestra de cereza de la variedad Pico Negro.

5

### Ejemplo 2

#### *Procedimiento de producción del producto nutracéutico a base de variedades de cerezas P. Avium*

10

El producto liofilizado se prepara partiendo de cereza fresca o cereza ultracongelada. En cualquiera de los dos casos, los pasos a seguir son los siguientes:

15

- Deshuesado de la fruta
- Trituración
- Adición de maltodextrina (sustancia antiapelmazante) y ácido ascórbico a la papilla resultante tras la trituración. La formulación resultante de dicha mezcla es: 94 gramos de cereza, 5 gramos de maltodextrina y 1 gramo de ácido ascórbico.
- Congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$
- Liofilización
- Molido del liofilizado para obtener el producto en forma de polvo
- Envasado en envases de film, como barrera a la humedad, y con atmósfera inerte.

25

30

Este producto se administrará de forma que la cantidad consumida por dosis diaria (repartida en dos tomas), contenga el equivalente al menos a las cantidades de melatonina, serotonina y triptófano, presentes en 400 gramos de cereza fresca, o en su caso mayor concentración.

35

La concentración media de serotonina y melatonina por cada 100 gramos de producto liofilizado es de 350 y 60 nanogramos (ng), respectivamente. Además, la concentración media de triptófano por cada 100 gramos de producto liofilizado es de 78 miligramos (mg), alcanzándose.

40

La dosis diaria que se consuma de este producto deberá contener una suma total de melatonina y serotonina en un rango de  $8 \times 10^{-2}$  a  $1,2 \times 10^{-1}$  microgramos (en cantidad absoluta), así como una cantidad de triptófano entre  $1,4 \times 10^4$  -  $1,7 \times 10^4$  microgramos ( $\mu\text{g}$ ), para obtener al menos el mismo efecto fisiológico que 400 gramos diarios de cereza fresca. Por tanto, consumiendo 40 gramos diarios de producto liofilizado, repartidos en dos tomas, se aporta una cantidad de triptófano, serotonina y melatonina al menos semejante a la ingesta de 400 gramos diarios de cereza fresca.

45

### Ejemplo 3

#### *Ensayo en voluntarios sanos del efecto de la ingesta del producto liofilizado de cerezas sobre el reposo nocturno (parámetros cronobiológicos del sueño)*

50

Este estudio se ha llevado a cabo en individuos voluntarios sanos jóvenes (3 hombres y 3 mujeres de entre 18-25 años, n=6), maduros (3 hombres y 3 mujeres de entre 35-55 años, n=6) y ancianos (3 hombres y 3 mujeres de entre 65-85 años, n=6), bajo consentimiento, confidencialidad y autorización preceptivas (respetando los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del Consejo de Europa relativos a los derechos humanos y biomedicina, y la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos). *Tras ensayos con diferentes proporciones del producto liofilizado, y considerando además las características del producto, su disolución, volumen final a tomar, etc., sin afectar a las concentraciones de triptófano, serotonina y melatonina se ha elegido, hasta el momento, como más idónea la cantidad de producto liofilizado que a continuación se detalla.* Dichos individuos tomaron 28 gramos de producto liofilizado (lo que equivale en fruta fresca a 141 gramos), dos veces al día, en postre de comida y cena durante tres días. Asimismo, se realizó un estudio en condiciones control (antes de la ingesta del producto liofilizado) y un estudio post-ensayo (un día después de finalizar los tres días de ingesta).

60

### 3.1. Métodos

65

Para evaluar el efecto que producía la ingestión de cada una de las variedades de cerezas a estudiar, los individuos participantes en el estudio llevaron colocado durante todos los días que duró el estudio un activímetro de muñeca (Actiwatch®), el cual recogía los datos necesarios para el análisis del sueño. Aunque los registros se realizaron durante

## ES 2 342 141 A1

24 horas, los valores analizados en el presente estudio han sido los correspondientes al periodo comprendido entre el momento en que el paciente se acostaba y el momento en que se levantaba. Estos datos fueron tomados según el siguiente protocolo experimental:

- 5           - Tres días controles antes de la toma del liofilizado: Recogida de datos de sueño de cada una de las tres noches.
- Tres días ensayo (con ingesta de producto liofilizado de cerezas): Durante la toma del producto liofilizado se recogieron los registros de sueño de cada una de las tres noches.
- 10          - Post-ensayo (post-ingesta): Se recogió el registro de sueño de la noche siguiente a la última toma de producto liofilizado.

15          Tras la recogida de la actividad nocturna durante cada uno de los periodos de reposo y sueño nocturno, la información fue descargada en el ordenador para el posterior análisis de los parámetros de sueño-vigilia.

20          Son muchos los parámetros que se registraron durante el análisis a través del programa Sleep Analysis; sin embargo, se seleccionaron aquellos que ofrecían información más relevante acerca de la calidad del sueño, siendo éstos:

- *Eficiencia de sueño*: porcentaje de tiempo de sueño mientras el sujeto permanece en la cama.
- *Tiempo real del sueño*: equivalente al tiempo de sueño asumido menos el tiempo de vigilia; determinado por algoritmos.
- *Número despertares*: muestra el número de episodios de actividad elevada durante el periodo de sueño.
- *Actividad total*: pulsos totales de actividad durante el sueño.
- *Latencia de sueño*: tiempo que transcurre desde que el individuo se acuesta hasta el inicio del sueño.
- *Sueño asumido*: diferencia entre el final y el principio del sueño.
- *Minutos de inmovilidad*: número total de minutos en los que el sujeto tiene movilidad cero, que se asume como tiempo de sueño.

40          Una vez calculados todos estos parámetros para una noche, el procedimiento se repitió para cada día registrado.

### *Cuantificación de los niveles de 6-sulfatoximetatonina. (6-SMT) en orina*

45          La cuantificación de los niveles del metabolito de la melatonina 6-SMT, se realizó mediante kit comercial de ELISA (IBL). Se cuantificó en la primera orina de la mañana de individuos jóvenes, maduros y ancianos recogida antes de comenzar con la ingestión del producto liofilizado (orinas controles), en la primera orina de la mañana siguiente a los tres días de la ingestión del producto (orina ensayo) así como en la primera orina de la mañana un día después de finalizar cada ensayo (orina post-ensayo).

50          Tras la medida de los valores de absorbancia, los resultados fueron calculados a partir de la siguiente expresión:

$$\text{DO} / \text{DO max} = \frac{\text{densidad óptica muestra}}{\text{densidad óptica estándar cero}} \times 100$$

60          Finalmente, los valores obtenidos en la relación  $\text{DO}/\text{DO}_{\text{max}}$  de cada estándar se representaron frente al logaritmo de la concentración de 6-STM de cada muestra estándar, expresadas en ng/ml, obteniéndose una recta patrón, a partir de cuya ecuación pudo calcularse la concentración de 6-STM en las muestras problema.

65          Dado que el volumen de orina es distinto para cada individuo, se normalizaron los datos de las concentraciones de 6-SMT con las concentraciones de creatinina, expresándolos en ng 6-SMT/mg de creatinina.

*Determinación de los antioxidantes totales de la orina*

Este estudio se realizó mediante la utilización de un kit comercial para la determinación de los niveles de antioxidantes en orina (Cayman). Se cuantificó en las orinas de individuos jóvenes, maduros y ancianos antes de comenzar con la ingestión del producto, después de tres días de la ingestión del liofilizado, así como un día después de finalizar los ensayos, de igual forma que se ha indicado en el apartado anterior.

Los valores obtenidos de absorbancia en cada estándar se representaron frente al logaritmo de la concentración de Trolox de cada muestra estándar, expresadas en ng/ml, obteniéndose una recta patrón, a partir de cuya ecuación pudo calcularse la concentración de antioxidantes en las muestras problemas.

Finalmente, los resultados de la Capacidad Antioxidante Total (A) fueron calculados a partir de la siguiente expresión:

$$A \text{ (mM)} = \frac{\text{D.O. media muestras} - \text{punto corte eje y}}{\text{pendiente}} \times \text{dilución}$$

*3.2. Métodos de cálculo estadístico*

En relación con la metodología estadística se llevaron a cabo tres tipos de estudios:

1.- *Descriptivo*, calculando como valores representativos la media aritmética (X) y la desviación estándar (D.E.), según las fórmulas habituales, para el número de datos manejados. Todos los datos se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar del número de ensayos.

2.- *Test de hipótesis*, mediante el siguiente test no paramétrico: test ANOVA de dos vías por adición de rangos de Friedman (muestras apareadas) para comparaciones múltiples.

*3.3. Resultados**Análisis de los parámetros cronobiológicos de sueño*

Los *parámetros cronobiológicos* de sueño analizados tanto en individuos jóvenes como en maduros y ancianos se representan en la Tabla 4.

	ES	TRS (min)	D	ATN	LS (min)	SA (min)	I (min)
<b>Ancianos</b>	↑ 1,6%	↑ 18,2%	↓ 15,4%	↓ 11,9%	↓ 17%	↑ 22,5%	↑ 26,1%
<b>Maduros</b>	↑ 2,5%	↑ 10%	↓ 10,4%	↓ 9,5%	↓ 15,6%	↑ 13,7%	↑ 9,6%
<b>Jóvenes</b>	↑ 4,8%	↑ 12,3%	--	↓ 24,8%	--	↑ 10,2%	↑ 12,1%

EF: Eficiencia Sueño; TRS: Tiempo Real Sueño; D: Despertares;

ATN: Actividad total nocturna; LS: Latencia Sueño; SA: Sueño

asumido; I: Inmovilidad

Mediante flechas, se muestra el aumento o descenso de cada parámetro respecto a su valor basal (100%). Las casillas en blanco (--) indican que la ingesta del producto no afectó a dicho parámetro.

El consumo de 28 g de producto liofilizado (equivalente a 141 gramos de fruta fresca) dos veces al día (mediodía y noche) produjo tanto en individuos jóvenes como en maduros y ancianos efectos positivos sobre el sueño de los mismos, aumentando de manera general el Tiempo Real de Sueño, el Sueño Asumido y los Minutos de Inmovilidad, además de disminuir la Actividad Total nocturna. Asimismo, se observó una mejora en la Eficiencia del Sueño en todos los grupos de edad analizados. Por último, es destacable la disminución de la latencia de sueño y el Número de Despertares tanto en individuos maduros como ancianos, donde son más comunes las alteraciones del ciclo sueño-vigilia.

## ES 2 342 141 A1

Es importante resaltar que el efecto fisiológico que se consigue es al menos igual o incluso mejor (como es el caso del Tiempo Real de Sueño y de los Minutos de Inmovilidad) que el hallado tras la ingesta de 400 gramos al día de distintas variedades de cerezas del Valle del Jerte analizadas en nuestro anterior estudio.

5

*Cuantificación de los niveles de 6-sulfatoximelatonina en la orina de los individuos voluntarios sometidos al estudio*

La Tabla 5 muestra los valores de *concentración de 6-SMT* normalizados (ng 6-SMT/mg creatinina) en la orina de los individuos jóvenes, maduros y ancianos que realizaron el estudio. La tabla recoge los valores en condiciones basales, los obtenidos una vez finalizada la ingesta del producto liofilizado, así como los valores de un día después de la última ingesta del mismo (post-ensayo). Dicho estudio se realizó en orinas procedentes de individuos jóvenes, maduros y ancianos. Como puede apreciarse en dicha tabla, la ingesta del producto liofilizado mezcla de las variedades de *P. avium* que presentan más concentración de triptófano, serotonina y melatonina indujo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la concentración de 6-SMT en relación a sus correspondientes basales y post-ensayo. En este caso, los niveles de 6-SMT aumentan dos veces (jóvenes y maduros) y tres veces (ancianos) en relación a su correspondiente valor basal, lo que supone una ventaja con respecto a la ingesta de 400 gramos de cereza al día de cada una de las variedades de cerezas del Valle del Jerte analizadas en el estudio anterior, donde el aumento no llegó en ningún caso al doble del nivel basal.

20

TABLA 5

*Concentraciones de 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) en condiciones basales, al finalizar la ingesta del producto liofilizado, así como un día después de la última toma del producto en individuos jóvenes, maduros y ancianos*

25

<b>Niveles de 6-sulfatoximelatonina normalizados (ng 6-SMT/mg creatinina)</b>			
	<b>Jóvenes</b>	<b>Maduros</b>	<b>Ancianos</b>
<b>Basal</b>	404,6±34,1	62,3±5,7	95,6±7,8
<b>Cerezas</b>	871,9±23,2*	142,6±19,3*	279,2±8,3*
<b>Post-ensayo</b>	600,2±33,2	175,3±13,7	118,1±7,2

30

35

40

45

- Basal: muestras obtenidas antes de la ingesta del producto liofilizado.

50

- Cerezas: muestras obtenidas tras tres días de ingesta del producto liofilizado

- Post-ensayo: muestras obtenidas un día después de finalizar el estudio.

(\*) Significativamente mayor a su correspondiente Basal.

55

*Determinación de la capacidad antioxidante total de la orina de los individuos voluntarios que participaron en el estudio*

La Tabla 6 muestra los valores de la *capacidad antioxidante total* de la orina (mM) procedente de los individuos jóvenes, maduros y ancianos que participaron en el estudio tanto en condiciones basales como al final de la ingesta del producto liofilizado, así como un día después de la última ingesta (post-ensayo). Como puede apreciarse, la ingestión del producto liofilizado indujo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la concentración de antioxidantes totales en orina en relación a sus correspondientes basales y post-ensayo en cada uno de los grupos de edad estudiados. Los niveles de antioxidantes totales aumentan significativamente con efecto fisiológico similar al observado en nuestro estudio anterior tras la ingesta de fruta fresca.

65

TABLA 6

Capacidad antioxidante total de la orina en condiciones basales, al final de la ingesta del producto liofilizado así como un día después de la última toma del mismo (post-ensayo) en individuos jóvenes, maduros y ancianos

Capacidad antioxidante de orina (mM)			
	Jóvenes	Maduros	Ancianos
<b>Basal</b>	0,760±0,064	1,577±0,093	1,644±0,103
<b>Cerezas</b>	1,930±0,136*	2,422±0,130*	2,367±0,125*
<b>Post-ensayo</b>	0,977±0,061	1,564±0,094	2,115±0,100

- Basal: muestras obtenidas antes de la ingesta del producto liofilizado.

- Cerezas: muestras obtenidas tras tres días de ingesta del producto liofilizado

- Post-ensayo: muestras obtenidas un día después de finalizar el estudio.

(\*) Significativamente mayor a su correspondiente Basal.

### 3.4. Conclusión general

En vista de los resultados obtenidos, nuestro producto liofilizado de cerezas abre la posibilidad de profundizar sobre el papel de la melatonina en la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y el envejecimiento, y sobre el desarrollo de modelos para el análisis de fármacos con vistas al tratamiento de enfermedades de amplia repercusión social como diversas patologías infecciosas, enfermedades y procesos ligados al envejecimiento y a patologías de origen neurodegenerativo de gran incidencia actual como el Parkinson o el Alzheimer.

Así, éste producto podría servir para potenciar los tratamientos suplementados con triptófano, serotonina y/o melatonina como beneficiosos para prevenir algunos problemas asociados al envejecimiento así como distintos desórdenes muy frecuentes en la población joven y madura como son los problemas de depresión y de insomnio.

# ES 2 342 141 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina que comprende extracto de cerezas de variedades de *Prunus avium* a elegir entre Ambrunés, Bourlat, Navalinda, Pico Negro, Pico Colorado, Pico limón, Van y mezclas de estas.
2. Producto nutracéutico según las reivindicación 1 donde el extracto es un extracto líquido.
- 10 3. Producto nutracéutico según la reivindicación 2 que es un jugo concentrado.
4. Producto nutracéutico según las reivindicación 1 donde el extracto es un extracto seco.
- 15 5. Producto nutracéutico según la reivindicación 4 que comprende frutos deshuesados frescos, deshidratados, liofilizados y opcionalmente pulverizados.
- 20 6. Procedimiento de preparación de un producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina según las reivindicaciones 2 ó 3 que comprende:
- a. Deshuesado y reducción de la carne del fruto.
  - b. Obtención del jugo limpio mediante separación de la pulpa.
  - c. Concentración por medios físicos a una temperatura máxima de 4°C.
- 25 7. Proceso de preparación de un producto nutracéutico rico en melatonina según la reivindicación 5 que comprende:
- a. Deshuesado y trituración de la fruta
  - b. Adición de un antiapelmazante
  - c. Adición de un antioxidante
  - d. Congelación
  - e. Liofilización
  - f. Envasado impermeable en atmósfera inerte.
- 30 8. Proceso de preparación de un producto nutracéutico según la reivindicación 7 donde el proceso comprende además el molido del liofilizado para la obtención del producto en polvo.
- 35 9. Producto nutracéutico rico en melatonina que comprende el extracto de cerezas de la reivindicación 1, preparado según el procedimiento de la reivindicación 6 ó 7 y **caracterizado** por presentar entre 20-40° Brix, donde 40 g del producto contienen entre  $8 \times 10^{-2}$  y  $1,2 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g}$  totales de la suma de serotonina y melatonina y entre  $1,4 \times 10^4$  y  $1,7 \times 10^4$   $\mu\text{g}$  de triptófano.
- 40 10. Uso del producto nutracéutico según las reivindicaciones 1 a 5 en un método de tratamiento contra el insomnio, los desórdenes anímicos o en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de estos.
- 45 11. Uso del producto nutracéutico según las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un alimento funcional, un producto dietético o un suplemento nutricional.
- 50 12. Uso del producto nutracéutico según las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de una composición cosmética.
- 55
- 60
- 65

Figura 1

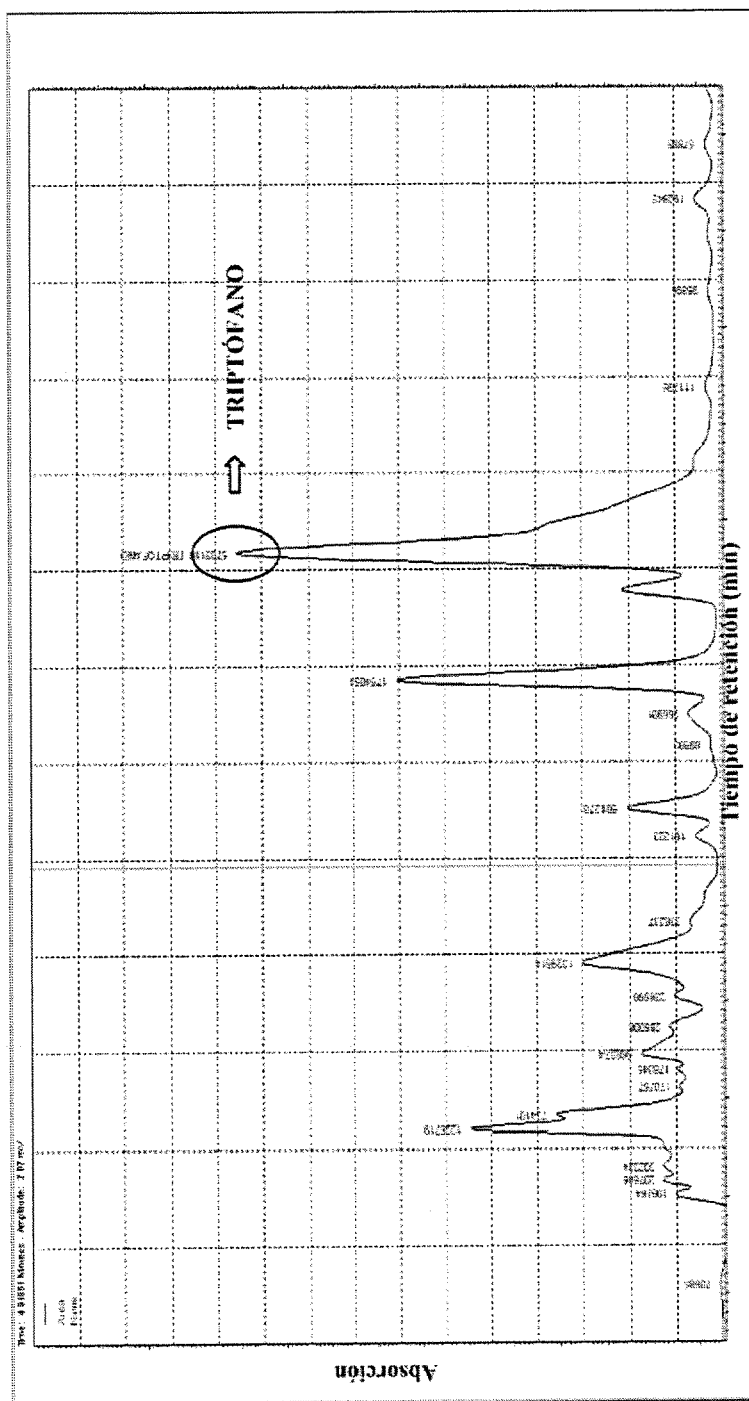
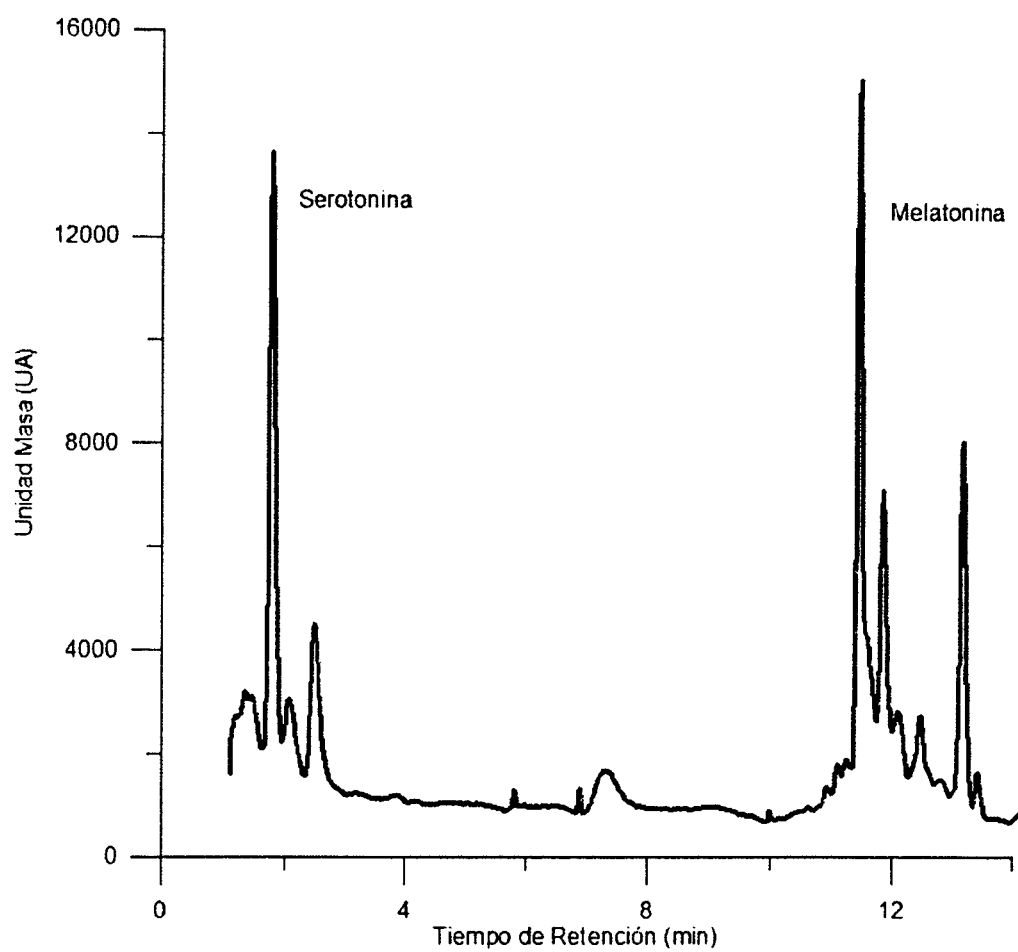


Figura 2







OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 342 141

② N° de solicitud: 200803761

③ Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2008075797 A1 (LaPOINTE et al.) 27.03.2008, página 1, [0002],[0004],[0008]; página 2, [0014],[0015]; reivindicaciones 6,8,18,24,26,30.	1,10-12
Y		2-11
Y	US 2004037938 A1 (SMITH) 26.02.2004, página 1, [0001]-[0006]; página 2, [0008],[0009],[0011],[0012]; reivindicación 1.	1-3,6,9-11
Y	US 2006083846 A1 (SMITH) 20.04.2006, página 1, [0005]; reivindicaciones 11,17,19.	1,4,5,7,8
A	US 6676978 B1 (NAIR) 13.01.2004, columna 3, líneas 60-63; columna 4, líneas 21-26; columna 6, líneas 21-22.	1-8,11

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

14.04.2010

Examinador

Asha Sukhwani

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 36/736** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23L 1/212** (2006.01)

**A23L 2/04** (2006.01)

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

A61K, A23L

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, X-FULL, HCAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA, CROPU, PASCAL, SCISEARCH, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.04.2010

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1 - 12	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1 - 12	<b>NO</b>

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

#### Base de la Opinión:

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

#### Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina que comprende extracto de cerezas de distintas variedades de *Prunus avium* (reivindicación 1).

El extracto puede ser un extracto líquido como jugo concentrado (reivs. 2 y 3) que se prepara deshuesando, separando la pulpa para obtener el jugo y concentrándolo por medios físicos a una temperatura de 4 grados centígrados (reiv. 6)

O bien, el extracto es seco al que se llega con frutos deshuesados frescos, deshidratados, liofilizados y opcionalmente pulverizados (reivs. 4 y 5) y se prepara deshuesando y triturando la fruta, con adición de un antiapelmazante y un antioxidante, congelación, liofilización y envasado en atmósfera inerte (reiv. 7), El liofilizado se muele para la obtención del producto en polvo (reiv. 8).

El producto nutracéutico preparado según estos procesos presenta entre 20 - 40 Brix (reiv. 9) y se utiliza en el tratamiento del insomnio, desórdenes anímicos (reiv. 10), en la preparación de un alimento funcional, un producto dietético o un suplemento nutricional (reiv. 11) o en la preparación de una composición cosmética (reiv. 12).

**1. Documentos considerados:**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2008075797 A1	27-03-2008
D02	US 2004037938 A1	26-02-2004
D03	US 2006083846 A1	20-04-2006
D04	US 6676978 B1	13-01-2004

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

Los documentos D01 a D04 se refieren a productos derivados de cerezas, siendo los más relevantes el D01 y D02, que concretamente se refieren a productos nutracéuticos basados en cerezas de la especie *Prunus cerasus* (cereza ácida) y a los niveles de melatonina de esta especie.

D01 hace una mención a las cerezas dulces del género *Prunus avium* (página 2, [0014]) pero no mencionan las variedades enumeradas por el solicitante.

Por ello, se puede concluir que las reivindicaciones 1 - 12 son nuevas según el Artículo 6 LP 11/86.

**ACTIVIDAD INVENTIVA**

El objeto de obtener un producto nutracéutico rico en triptófano, serotonina y melatonina que comprende un extracto de cerezas de variedades de *Prunus avium*, pudiendo ser extracto líquido, jugo concentrado o extracto seco, y los procesos de obtención de unos y otros para ser utilizados en trastornos del sueño como alimento funcional, producto dietético o suplemento nutricional resulta evidente para el experto en la técnica a la vista de los documentos D01 a D03. En efecto,

\* D01 es el documento más relevante y se refiere a nutracéuticos que incorporan extracto de cerezas ácidas (*Prunus cerasus*) que poseen alto nivel de melatonina que influye en los ritmos circadianos del sueño en humanos (página 1, [0002], [0004], [0008]), se contempla en el documento la utilización de la cereza dulce *Prunus avium* (página 2, [0014], [0015]; reivindicaciones 6, 8, 24, 26, 30).

El experto en la técnica a la vista del documento D01 que divulga nutracéuticos con extracto de cerezas ácidas pero que también se puede preparar con *Prunus avium*, probaría en todas las variedades de esta especie hasta seleccionar las ricas en triptófano, serotonina y melatonina para su uso en tratamiento contra el insomnio, como suplemento nutricional y seleccionar las variedades reivindicadas en la invención, sin ningún esfuerzo inventivo. Hoy en día, también resulta evidente la utilización en cosmética. Por ello, se considera que las reivindicación de producto nutracéutico y de uso carecen de actividad inventiva (reivs 1, 10 - 12)..

Además, los documentos D02 y D03 divulgan los procesos de obtención reivindicados. En efecto,

\* D02 divulga el extracto líquido y el proceso de obtención (página 1, [0001] - [0006]; página 2, [0008], [0009], [0011], [0012]; reivindicación 1) y \* D03 se refiere al extracto seco y su obtención (página 1, [0005]; reivindicaciones 11, 17, 19), siendo las etapas de estos procesos de obtención las habituales en este sector de la técnica.

A la vista de estos documentos D01 - D03, para el experto en la materia también le resulta evidente la presentación del extracto en forma líquida, como jugo concentrado, o la presentación del extracto seco así como los procesos de preparación del extracto líquido o seco reivindicados en la solicitud en estudio (reivindicaciones 2 - 9).

Por ello, se puede concluir que las reivindicaciones 1 - 12 carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.