



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1011245-6 B1



(22) Data do Depósito: 10/06/2010

(45) Data de Concessão: 24/03/2020

(54) Título: USO DE TRIGONELINA COMO UM ESTIMULANTE MUSCULAR.

(51) Int.Cl.: A61K 31/455; A23L 33/105; A23L 33/15; A23L 33/00; A61K 31/46; (...).

(52) CPC: A61K 31/455; A23L 33/105; A23L 33/15; A23L 33/40; A61K 31/46; (...).

(30) Prioridade Unionista: 11/06/2009 EP 09162470.0; 23/07/2009 EP 09166271.8.

(73) Titular(es): DSM IP ASSETS B.V..

(72) Inventor(es): KARIN KURATLI; ANGELIKA FRIEDEL; CHRISTOF WEHRLI; KARIN WERTZ; SWEN WOLFRAM; YING WANG-SCHMIDT.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010058124 de 10/06/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/142750 de 16/12/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 09/12/2011

(57) Resumo: NIACINA E/ OU TRIGONELINA COMO UM ESTIMULADOR MUSCULAR Esta invenção está relegionada ao uso de compostos de niacina e/ou trigonelina para aumentar o peso muscular durante períodos de atividade ou para inibir a perda muscular durante períodos de inatividades.

USO DE TRIGONELINA COMO UM ESTIMULANTE MUSCULAR

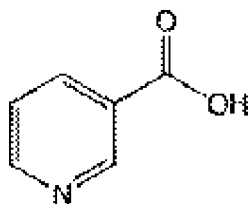
Campo da invenção

Esta invenção está relacionada ao uso de compostos de niacina e/ou trigonelina para aumentar o peso muscular durante períodos de atividade ou para inibir perda muscular durante períodos de inatividade.

Fundamento da invenção

Uma das maiores características do músculo esquelético é sua marcante capacidade de se adaptar a diferentes estímulos. Por toda a vida, o músculo esquelético está em permanente adaptação a alterações internas (envelhecimento/sarcopenia que resulta em perda muscular) ou alterações externas (atividade física resulta em hipertrofia muscular; enquanto lesão resulta em recuperação muscular; e descanso no leito resulta em atrofia muscular). Essas influências modificam as variáveis estruturais, bioquímicas e moleculares das diferentes fibras do músculo esquelético. Para a adaptação de miofibras, a ativação e a diferenciação miogênica de células satélites, as chamadas células-tronco do músculo esquelético, são necessárias. Depois de exercício físico, por exemplo, as células satélites se fundem com as miofibras alargadas ou em reparação.

Niacina, também conhecida como vitamina B3 ou ácido nicotínico, é uma vitamina hidrossolúvel que evita a doença por deficiência chamada pelagra. Ela é um composto orgânico com a fórmula molecular $C_6H_5NO_2$ como definido pela fórmula (I).



(I)

Ela é um derivado de piridina, com um grupo carboxil

(COOH) na posição 3. Outras formas de vitamina B3 incluem a amida correspondente, nicotinamida ("niacinamida"), em que o grupo carboxil foi substituído por um grupo carboxamida (CONH₂), bem como amidas mais complexas e uma variedade de ésteres. Os termos niacina, nicotinamida e vitamina B3 são usados de modo intercambiável para fazer referência a qualquer uma dessa família de moléculas, uma vez que elas possuem uma atividade bioquímica comum.

Trigonelina é um metabólito da niacina (vitamina B3) que é excretado na urina. Ela é formada pela adição de um grupo metil ao átomo de nitrogênio de niacina. Trigonelina é também encontrada no café, em que ela pode ajudar a prevenir cáries dentais ao evitar a aderência da bactéria *Streptococcus mutans* aos dentes.

US 2005/0226948 (Lee e cols.) revela um extrato de semente de Feno Grego que contém 4-hidroxiisoleucina e inúmeros outros compostos, que incluem niacina e trigonelina. Essas combinações são usadas para melhorar o transporte de glicose para as células musculares.

US2007/0105793 (Hendrix) revela uma composição útil para o tratamento de hiperlipidemia, hipercolésterolemia e hipergliceridemia que contém niacina e derivados.

US2007/0259861 (Krantz) revela composições que contêm um fármaco antiinflamatório não esteroidal (NSAID) em combinação com um mimético de prostaglandina (que pode incluir vários derivados de niacina). Essas combinações são usadas para alívio da dor e/ou inflamação.

Descrição da invenção

Foi constatado, de acordo com esta invenção, que a niacina, a trigonelina ou uma combinação de niacina e

trigonelina podem aumentar o peso muscular durante um período de treinamento, e podem reduzir a perda muscular durante os períodos de menor atividade ou imobilidade. Portanto, um aspecto desta invenção é o uso de niacina e/ou trigonelina, e/ou sais ou ésteres destes, na fabricação de um nutracêutico ou alimento para aumentar o peso muscular durante treinamento ou para reduzir a quantidade de perda muscular durante inatividade. Outro aspecto desta invenção é um método de aumento da massa muscular durante exercício que compreende a administração de uma quantidade eficaz de niacina e/ou trigonelina ou sais ou ésteres destes a um indivíduo que passa por treinamento, e observação de um aumento da massa muscular. Um aspecto adicional desta invenção é um método de redução da perda muscular de uma pessoa menor ativa ou imobilizada em risco de perda muscular por administração de niacina e/ou trigonelina ou sais ou ésteres destes, e retenção de músculo. Em modalidades preferidas, a niacina e/ou trigonelina ou sais ou ésteres desses é usada junto com um suprimento nutricional ótimo de proteína e vitaminas (que incluem especialmente Vitamina D e/ou seus metabólitos como 25-hidroxivitamina D3).

Breve descrição das figuras

A figura 1 mostra os resultados de efeitos de trigonelina *in vitro* sobre a formação de miotubo em células musculares de camundongo.

A figura 2 mostra o peso úmido do músculo gastrocnêmio em relação ao peso corporal (BW) de camundongos de controle e tratados (modelo de hipertrofia).

A figura 3 mostra resultados do peso úmido do músculo gastrocnêmio de modelo de suspensão de cauda em relação ao

BW para camundongos de controle e tratados.

A figura 4 mostra o peso úmido do músculo gastrocnêmio de depois de corrida em esteira ergométrica.

Como usado por toda a especificação e reivindicações,
5 as seguintes definições se aplicam:

O termo "nutracêutico" como aqui usado denota utilidade tanto no campo de aplicação nutricional quanto farmacêutico. Portanto, um "nutracêutico" de acordo com a presente invenção pode servir como suplementos para alimentos, rações e
10 bebidas, suplementos dietéticos e como formulações farmacêuticas que podem ser sólidas, como cápsulas ou comprimidos ou líquidas, como soluções ou suspensões.

"Niacina" refere-se a qualquer forma de niacina adequada para um nutracêutico, incluindo niacina,
15 niacianamida, sais ou ésteres destes, ou hidratos destes.

"Sal ou éster de niacina" refere-se a qualquer forma de sal ou éster de niacina que possa ser usada para formular niacina em uma forma nutraceuticamente aceitável, ou em um gênero produto alimentício. O sal ou éster deve ser um que
20 seja admissível para ingestão pela agência reguladora aplicável.

Exemplos de sais adequados de niacina incluem sulfato, sulfato de hidrogênio, cloreto, fosfato e citrato. Exemplos de ésteres adequados de niacina incluem o cloreto de metil
25 éster, e cloreto de etil éster.

"Trigonelina" refere-se a qualquer forma de trigonelina adequada para um nutracêutico, incluindo trigonelina, e hidrato de trigonelina de um sal ou éster de trigonelina.

"Sal ou éster de trigonelina" refere-se a qualquer forma
30 de sal ou éster de trigonelina que pode ser usada para

formular trigonelina em uma forma nutraceuticamente aceitável, ou em um gênero alimentício.

O sal ou éster deve ser um que seja admissível para ingestão pela agência reguladora aplicável. Exemplos de sais
5 adequados de trigonelina incluem sulfato, sulfato de hidrogênio, cloreto, fosfato e citrato. Exemplos de ésteres adequados de trigonelina incluem o cloreto de metil éster e cloreto de etil éster

“Prevenir” inclui a redução da severidade de sintomas
10 e/ou condições, redução do risco de desenvolvimento de um sintoma ou condição, aumento do tempo antes do desenvolvimento dos sintomas ou condições, intervenção precoce, bem como negação de um sintoma ou condição.

“Observação” pode ser feita pelo indivíduo que usa a
15 trigonelina ou niacina ou por outra pessoa. A observação pode ser feita por um período de tempo, e pode controlar a duração total da administração. Períodos de administração típicos podem ser de uma semana, um mês, três meses, seis meses ou outro período de tempo desejado.

20 A niacina pode ser encontrada em levedura, carne, aves, peixes vermelhos (por exemplo, atum, salmão), cereais (especialmente cereais fortificados), legumes e sementes. Leite, vegetais de folhas verdes e chá também fornecem alguma niacina. Em plantas, especialmente grãos de cereal maduros
25 como milho e trigo, a niacina pode ser ligada a moléculas de açúcar na forma de glicosídeos. Portanto, a niacina pode estar presente em um extrato de planta.

A trigonelina pode ser encontrada em uma grande variedade de plantas como grãos de café verde e torrado,
30 *Trigonella foenum graecum* (feno grego, Leguminosa),

Schumanniphyton magnificum, (Rubiaceae) *Mappia foetida* e *Strophanthus spp.*, para indicar apenas algumas. Portanto, a trigonelina pode estar presente em um extrato de planta. Preferivelmente, quando do uso de um extrato de planta como
5 a fonte de niacina e/ou trigonelina, o extrato de planta contém pelo menos cerca de 20% por peso de niacina e/ou trigonelina.

Alternativamente, a niacina pode ser produzida sinteticamente a partir de 3-metilpiridina como descrito em
10 US5002641, enquanto a trigonelina pode ser feita sinteticamente a partir de ácido nicotínico. Um exemplo de uma síntese é DE 344030 (1921) "Betaines of the pyridine series" (Merck, E.).

Foi constatado que a niacina e/ou a trigonelina podem
15 estimular o peso de músculos quando usadas em combinação com exercício, e que elas podem retardar o surgimento de atrofia muscular quando o músculo não está sendo usado ou não está sendo usado incansavelmente.

É preferível que a niacina e/ou trigonelina ou seus
20 sais ou ésteres sejam usados como parte de uma dieta nutricionalmente completa, ou seja, usados junto com um suprimento adequado ou ótimo de proteína e/ou vitaminas. Preferivelmente, as vitaminas incluirão Vitamina D e/ou um metabólito da Vitamina D como 25-hidroxivitamina D3.
25 Combinações de niacina e/ou trigonelina e/ou um sal ou éster destas junto com proteína e/ou vitaminas são também uma parte desta invenção.

Uma vez que a niacina e/ou a trigonelina possuem aplicações em medicina veterinária bem como em medicina
30 humana, outro aspecto desta invenção é o uso de niacina e/ou

trigonelina para melhorar a saúde muscular em animais não humanos, particularmente cavalos, cães, camelos de corrida ou outros animais usados para corridas ou como animais de carga, ou outros animais usados por sua força. A niacina e/ou a trigonelina podem ser administradas a animais saudáveis, ou a animais feridos/doentes para acelerar sua convalescência.

A niacina e/ou a trigonelina como acima definido possuem estes benefícios específicos, sem introduzir calorias à dieta:

- ajuda a prevenir a perda muscular
- sustenta a função do músculo saudável junto com exercício
- ajuda a prevenir sarcopenia (redução de risco, reduz a severidade, retarda a progressão)
- ajuda a prevenir a perda muscular durante doença ou após cirurgia, assim contribuindo para uma convalescência mais rápida e estadias em hospital mais curtas.
- ajuda a prevenir debilidade em idosos, assim contribuindo para melhorar a mobilidade, qualidade de vida, e ajuda a adiar a perda da vida independente.
- ajuda a reter o desenvolvimento muscular quando circunstâncias evitam que uma pessoa se exercite
- sustenta um programa de exercícios eficiente
- sustenta a eficácia de programas de exercício de resistência como fisiculturismo ou levantamento de peso
- sustenta a recuperação de lesão muscular
- ajuda uma pessoa a reter o sucesso do exercício/efeitos do treinamento por mais tempo
- ajuda uma pessoa a manter a forma/condição de uma

pessoa por mais tempo

- ajuda uma pessoa a encontrar a força física que ela deseja

- ajuda a manter a força muscular

5 • melhora a composição corporal junto com exercícios

- sustenta o tônus corporal e modelagem do corpo

- promove a diferenciação de mioblasto

- promove a diferenciação do músculo

- promove o crescimento muscular

10 • promove a formação muscular

- promove a recuperação e reparação muscular

- promove hipertrofia muscular, quando combinada com exercício

Nós constatamos, surpreendentemente, que a niacina e/ou
 15 a trigonelina ajudam quando o músculo esquelético se adapta a estímulos como treinamento – carga muscular (hipertrofia) ou a retirada de carga (atrofia). Além disso, a niacina e/ou a trigonelina ajudam a fortalecer os efeitos do treinamento e previnem a perda muscular esquelética. Portanto, a niacina
 20 e/ou a trigonelina sustentam um programa de treinamento eficiente e promovem a hipertrofia muscular quando combinada com carga de exercício/muscular. Esses efeitos podem ser observados.

Portanto, a niacina e/ou a trigonelina ajudam a prevenir
 25 sarcopenia, fraqueza em idosos, e perda muscular durante confinamento no leito devido à doença, cirurgia e longas internações hospitalares. Além disso, a niacina e/ou a trigonelina promovem a recuperação e reparação muscular.

Dosagens:

30 Embora as dosagens possam variar, a dosagem de niacina

ou trigonelina pode variar de pelo menos 5 mg por dia para um humano; preferivelmente de 5 a 5.000 mg/dia para um humano, mais preferivelmente de 10 a 3.000 mg/dia para um humano, e ainda mais preferivelmente de 50-500 mg/dia para um humano. As dosagens para animais são similares, e podem ser ajustadas, conseqüentemente, para o peso do animal.

No caso em que uma mistura de niacina e trigonelina é usada, a dosagem refere-se ao peso acumulado de niacina e trigonelina e a dosagem pode variar de pelo menos 5 mg por dia para um humano; preferivelmente de 5 a 5.000 mg/dia para um humano, mais preferivelmente de 10 a 3.000 mg/dia para um humano, e ainda mais preferivelmente de 50-500 mg/dia para um humano. As dosagens para animais são similares, e podem ser ajustadas, conseqüentemente, para o peso do animal.

De acordo com esta invenção, a niacina e/ou a trigonelina estão presentes em uma composição dietética, nutracêutica ou farmacêutica. As composições preferidas compreendem niacina e/ou trigonelina e um carreador dietético, nutracêutico ou farmacêutico adequado. Os produtos dietéticos ou nutracêuticos desta invenção podem estar em qualquer formato aceitável para o consumidor, incluindo alimentos e bebidas funcionais.

Exemplos de formatos nutricionais adequados incluem vários alimentos e bebidas, incluindo *shots*, barra de cereal ou outras barras, bebidas, bebidas ricas em proteína, suplementos, bebidas instantâneas, efervescentes e outros. Especialmente preferidos são os formatos que são adequados para nutrição em esportes, incluindo bebidas, pós de proteína, barras, suplementos e bebidas instantâneas.

Os exemplos não limitantes a seguir são apresentados

pata melhor ilustrar a invenção.

EXEMPLO 1

Modelo de célula muscular

Nós testamos primeiramente a influência de trigonelina
5 sobre a diferenciação de mioblasto *in vitro* com o uso de
células de mioblasto de camundongo C2C12 que são comumente
usadas para estudar a adaptação muscular.

As células C2C12 foram semeadas em placas de 96
cavidades de colágeno-I (1.600 células/cavidade) em meio de
10 crescimento (meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
suplementada com 10% FBS, 2 mM L-Glutamina, 1 mM piruvato,
50 IU/ml penicilina, 50 ug/ml estreptavidina) até elas
atingirem 100% de confluência, aproximadamente 3 dias. As
células foram então induzidas a se diferenciarem com o uso
15 de um meio de diferenciação (DMEM, 2%FBS, 2 mM L-Glutamina,
1 mM piruvato, 50 IU/ml penicilina, 50 ug/ml estreptavidina)
com DMSO (controle) ou 10 µg/ml trigonelina monoidrato por
24 horas. A concentração final de DMSO foi padronizada a
0,5% em todas as cavidades. As células foram cultivadas a
20 37°C, com 5% CO₂.

As células foram fixadas com solução a 3,7% de
formaldeído (37% formaldeído diluído em meio de crescimento,
filtrado de modo estéril antes do uso) por 10 minutos em
temperatura ambiente, e lavadas duas vezes com 1 x DPBS (1
25 x solução salina tamponada por fosfato de Dulbecco). Depois
da permeabilização com 0,1% TritonX-100 (diluído em 1 x DPBS)
por 2 minutos, as amostras foram bloqueadas com 1 x DPBS
mais 2% BSA por 1 hora. Para rotulagem de miócito, as células
foram rotuladas com 1:20 de anticorpo de cadeia pesada anti-
30 alfa-miosina (MF-20) por 1 hora. As amostras foram lavadas

com 1 x DPBS e rotuladas de modo fluorescente com anticorpo secundário (1:250 anticorpo secundário anticamundongo IgG Alexa 488 mais 1:2.000 Hoechst em 1 x DPBS) por 1 hora. Finalmente, as células foram lavadas duas vezes com 1 x DPBS e as placas foram seladas para imagem no leitor ArrayScan® HCS.

Para análise das imagens, miotubos rotulados com miosina foram quantificados no leitor ArrayScan HCS com o uso de "BioApplication Morphology Explorer.V2". Os miócitos foram selecionados com área de objeto maior que 500 e intensidade total do objetivo maior que 1.000. Os números de miócitos de amostras em triplicata são mostrados na figura 1. Foi observado que a trigonelina aumenta a diferenciação em mioblastos de camundongo C2C12 em 36%.

15 **EXEMPLO 2**

Efeitos *in Vivo*

Para confirmar nossos resultados *in vitro*, a trigonelina foi primeiramente testada em um modelo animal de hipertrofia para observar os efeitos durante a carga muscular. O músculo gastrocnêmio de um membro posterior dos animais foi removido para induzir hipertrofia compensatória nos músculos plantar e solear por múltiplos mecanismos. Esse modelo aumenta o peso muscular sob carga/treinamento muscular. Ele simula a condição humana de um ser humano médio que é fisicamente ativo ou um atleta para sustentar a função do músculo esquelético durante exercício.

Fêmeas de camundongos C57B1/6 foram entregues em um peso de 18-20 g e aclimatizadas às instalações por um período de uma semana. No início do estudo, os animais foram randomizados em dois grupos (10 animais por grupo).

Os animais foram anestesiados e o membro posterior esquerdo dos animais foi fixado. Uma pequena incisão foi feita através da pele sobre o músculo gastrocnêmio. O músculo gastrocnêmio completo e seus tendões foram expostos. Ambas as cabeças do músculo gastrocnêmio foram cuidadosamente dissecadas dos músculos subjacentes intactos e foi tomado cuidado para não romper os nervos e vasos. A pele foi fechada com um fio de seda e os animais foram devolvidos separadamente a suas gaiolas. Depois da recuperação da anestesia, os animais podiam se mover imediatamente sem problemas. Todos os animais receberam um analgésico. Os animais foram tratados por três semanas por ingesta forçada com cloridrato de trigonelina em uma dosagem diária de 300 mg/kg BW e o grupo de controle recebeu veículo.

Com o uso dessa técnica, nós identificamos e quantificamos peso muscular esquelético aumentado do músculo plantar e solear na perna operada (medição de pQCT) e no músculo gastrocnêmio, plantar e solear da perna não operada (medição de peso). A hipertrofia na perna operada é uma reação compensatória dos músculos restantes depois de o no músculo gastrocnêmio ter sido removido. A hipertrofia na perna não operada é devida a um efeito de treinamento especial, porque essa perna foi mais usada.

O peso úmido do músculo gastrocnêmio não operado (em relação ao peso corporal) aumentou em 7% no grupo que recebe trigonelina (figura 2).

Os pesos úmidos absoluto e relativo (comparado ao peso corporal dos animais) de todos os músculos analisados a partir da perna não operada foram aumentados.

Na perna operada, o peso total da perna e a área de

secção transversa do músculo, como avaliado com o uso de medição por tomografia computadorizada, foram também aumentados. Os dados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1

Parâmetros	Controle (n = 10)	Cloridrato de trigonelina 300 mg/kg/BW (n = 10)
Peso úmido do músculo gastrocnêmio (mg) (perna não operada)	98,5	99,3
Peso úmido do músculo plantar (mg) (perna não operada)	12,4	13
Peso úmido do músculo solear (mg) (perna não operada)	7,1	7,2
Peso úmido do músculo gastrocnêmio/ peso corporal (mg/g) (perna não operada)	4,44	4,57
Peso úmido do músculo plantar/ peso corporal (mg/g) (perna não operada)	0,56	0,60
Peso úmido do músculo solear/ peso corporal (mg/g) (perna não operada)	0,32	0,33
Peso do músculo gastrocnêmio- Plantar-Solear (perna total) / peso corporal (mg/g) (perna não operada)	5,32	5,50
Área total da secção transversa da perna (mm ²) – perna não operada	33,90	35,05
Área da secção transversa do músculo (mm ²) – perna não operada	26,27	32,15

Área total da secção transversa da perna (mm ²) – perna operada	25,40	26,79
Área da secção transversa do músculo (mm ²) – perna não operada	19,13	23,72

Esses resultados mostram que, sob condições de carga (depois de cirurgia do músculo gastrocnêmio - hipertrofia)/treinamento, o peso úmido do músculo esquelético aumentou nos animais.

5 Exemplo 3

Atrofia muscular

Para estender nossos resultados *in vitro* e *in vivo*, nós também nos interessamos no teste dos efeitos de trigonelina durante descarga do músculo esquelético (condições de atrofia). Portanto, nós conduzimos um segundo estudo *in vivo* em que os membros posteriores dos animais foram descarregados para induzir a atrofia do músculo esquelético.

A suspensão da cauda leva a atrofia do músculo esquelético nos membros posteriores sem carga dos animais. Os resultados podem ser transferidos para a situação humana: sarcopenia (perda degenerativa de massa e força do músculo esquelético durante o processo de envelhecimento) ou imobilização do músculo esquelético (por exemplo, depois de confinamento prolongado no leito).

Fêmeas de camundongos C57B1/6 foram entregues com um peso de 18-20 g e aclimatizadas às instalações por um período de uma semana. No início do estudo, os animais foram randomizados em dois grupos (10 animais por grupo).

Depois disso, os grupos foram colocados em gaiolas especiais e os membros posteriores foram descarregados (suspensão pela cauda) por três semanas. Todos os camundongos

foram abrigados separadamente e tiveram acesso a alimento e água à vontade. Os animais foram tratados por três semanas por ingesta forçada com cloridrato de trigonelina em uma dosagem diária de 300 mg/kg/BW e o grupo controle recebeu 5 veículo.

Nós constatamos que o peso úmido do músculo gastrocnêmio (em relação ao peso corporal) aumentou em 9% (figura 3), um resultado estatisticamente significativo.

Nós também comparamos os outros dois músculos do membro 10 posterior operado (músculo plantar e músculo solear). Os resultados, apresentados na tabela 2 abaixo, mostram um aumento dos pesos úmidos dos músculos em animais tratados com cloridrato de trigonelina comparados aos animais de controle (peso muscular absoluto). Além disso, quando os 15 pesos musculares foram normalizados aos pesos corporais, os animais tratados com cloridrato de trigonelina demonstraram uma proporção aumentada de peso muscular/peso corporal (em relação ao peso muscular), ou seja, uma composição corporal aprimorada. O peso total para os músculos em uma perna foi 20 também significativamente aumentado quando tratados com cloridrato de trigonelina (perna total com relação ao peso corporal). As medições de tomografia computadorizada da área total e do músculo da perna confirmaram que o tratamento com cloridrato de trigonelina aumenta a massa do músculo 25 esquelético.

Tabela 2

Parâmetros	Controle (n = 10)	Cloridrato de trigonelina 300 mg/kg/BW (n = 10)
------------	----------------------	--

Peso úmido do músculo gastrocnêmio (mg)	78,13	86,01*
Peso úmido do músculo plantar (mg)	9,84	10,53
Peso úmido do músculo solear (mg)	4,29	4,62
Peso úmido do músculo gastrocnêmio/peso corporal (mg/g)	3,83	4,16 *
Peso úmido do músculo plantar/peso corporal (mg/g)	0,48	0,51 *
Peso úmido do músculo solear/peso corporal (mg/g)	0,21	0,22
Peso do músculo gastrocnêmio-Plantar-Solear (perna total) / peso corporal (mg/g)	4,52	4,89 *
Área total da secção transversa da perna (mm ²)	29,1	30,4
Área da secção transversa do músculo (mm ²)	26,6	27,8

* significante: $p < 0,05$

Os resultados mostram que sob descarga/atrofia da área total da secção transversa da perna do animal, o peso muscular aumenta; ou seja, mais da massa muscular é retida durante inatividade em animais suplementados com trigonelina versus controles.

Exemplo 4

Resistência

Para testar o efeito de trigonelina em animais não treinados, nós realizamos um teste de resistência máxima

depois de um período de tratamento de três semanas.

Fêmeas de camundongos C57B1/6 foram entregues com um peso de 18-20 g e aclimatizadas às instalações por um período de uma semana. No início do estudo, os animais foram randomizados em dois grupos (10 animais por grupo). Todos os camundongos foram abrigados separadamente e tiveram acesso a alimento e água à vontade. Os animais foram tratados por três semanas por ingesta forçada com cloridrato de trigonelina em uma dosagem diária de 300 mg/kg/BW e o grupo controle recebeu veículo.

Para aclimatização, os animais foram colocados na esteira por 5 minutos depois de duas semanas. O teste de resistência máxima foi realizado dois dias antes da secção dos animais.

Nós constatamos que o peso úmido do músculo gastrocnêmio foi igual em ambos os grupos (figura 4), assim como o peso úmido dos outros músculos avaliados (dados não mostrados). Além disso, a resistência de animais não treinados não foi influenciada por 3 semanas de suplementação com trigonelina.

Parâmetros	Controle (n = 10)	Cloridrato de trigonelina 300 mg/kg/BW (n = 10)
Tempo de corrida médio (minutos)	39,00	38,70
Peso úmido do músculo gastrocnêmio (mg)	100,65	100,66
Peso úmido do músculo plantar (mg)	12,16	12,12
Peso úmido do músculo solear (mg)	6,28	6,29
Peso úmido do músculo gastrocnêmio/peso corporal (mg/g)	4,64	4,57

Peso úmido do músculo plantar/peso corporal (mg/g)	0,56	0,55
Peso úmido do músculo solear/peso corporal (mg/g)	0,29	0,29
Peso do músculo gastrocnêmio-Plantar-Solear (perna total) / peso corporal (mg/g)	5,49	5,41

Esses resultados mostram que a trigonelina não possui efeito sobre a resistência e massa do músculo esquelético em camundongos não treinados.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso trigonelina e/ou sais desta caracterizado por ser para a fabricação de um produto nutracêutico ou alimentício para aumentar a massa muscular em combinação com
5 exercício e/ou diminuir a quantidade de perda muscular durante momentos de menor atividade muscular.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser para uso humano.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1,
10 caracterizado por ser para uso de animal não humano.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o exercício é exercício de resistência como fisiculturismo ou levantamento de peso.

5. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações
15 1 a 4, caracterizado por também ser em combinação com vitaminas, especialmente Vitamina D ou um metabólito desta.

6. Método não terapêutico, caracterizado para o aumento da massa muscular em combinação com exercício, ou diminuição da quantidade de massa muscular perdida pelo tempo
20 de menor atividade muscular que compreende a administração de trigonelina e/ou sais desta, e observação do aumento dos músculos.

7. Método não terapêutico, de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que a trigonelina
25 e/ou sais desta são administrados a um humano.

8. Método não terapêutico, de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que a trigonelina e/ou sais desta são administrados a um animal não humano.

9. Método não terapêutico, de acordo com a
30 reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que a

administração é durante treinamento de resistência, fisiculturismo ou levantamento de peso.

10. Método não terapêutico, de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo fato de que a trigonelina e/ou sal desta é administrada em combinação com vitaminas.

FIGURA 1

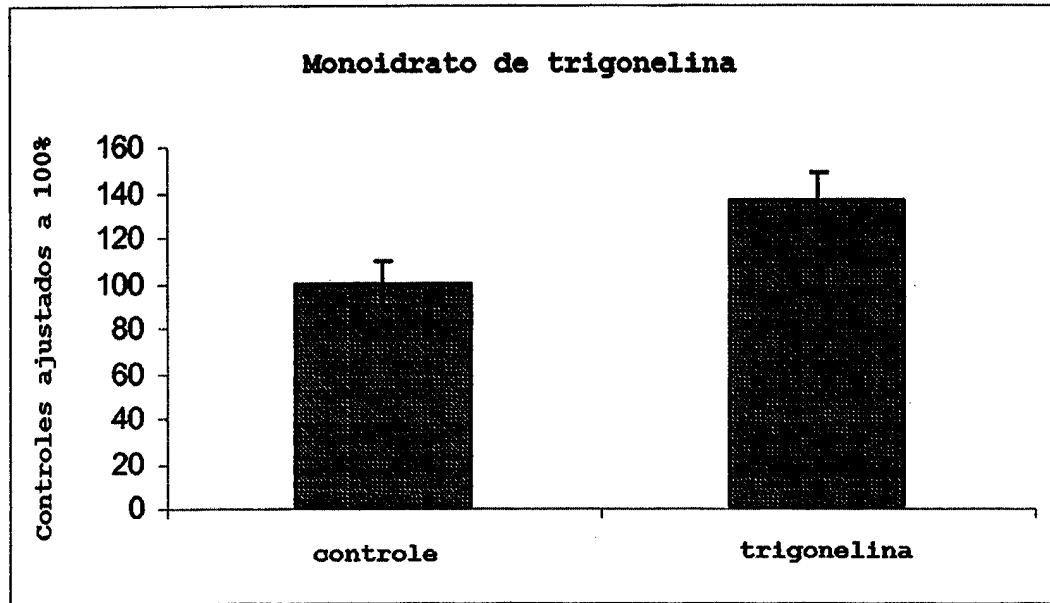


FIGURA 2

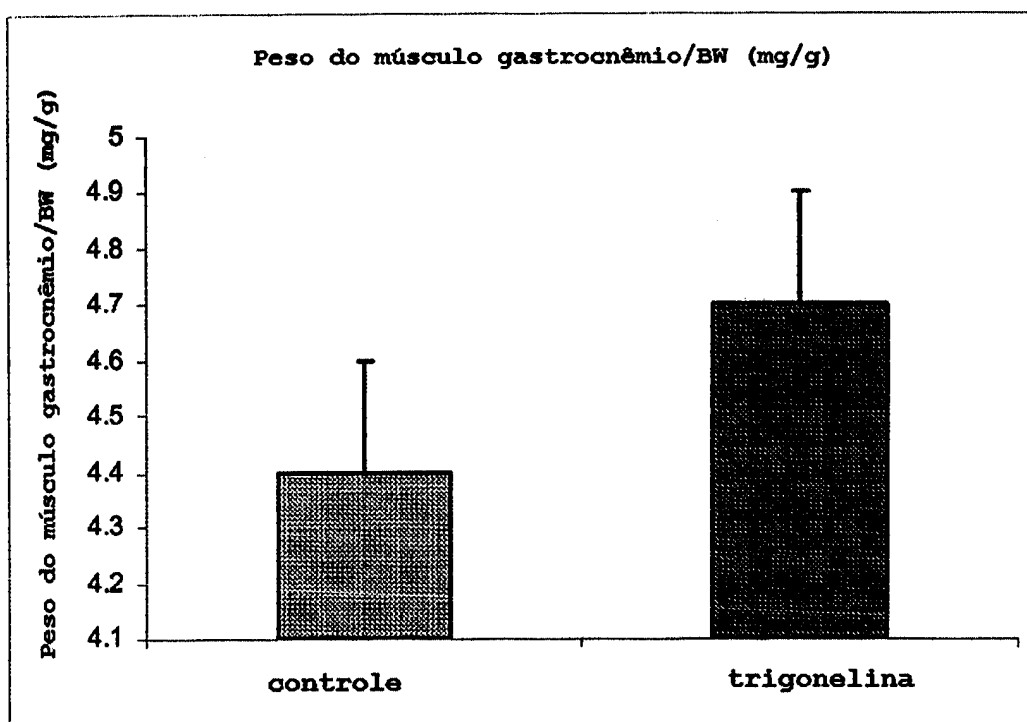
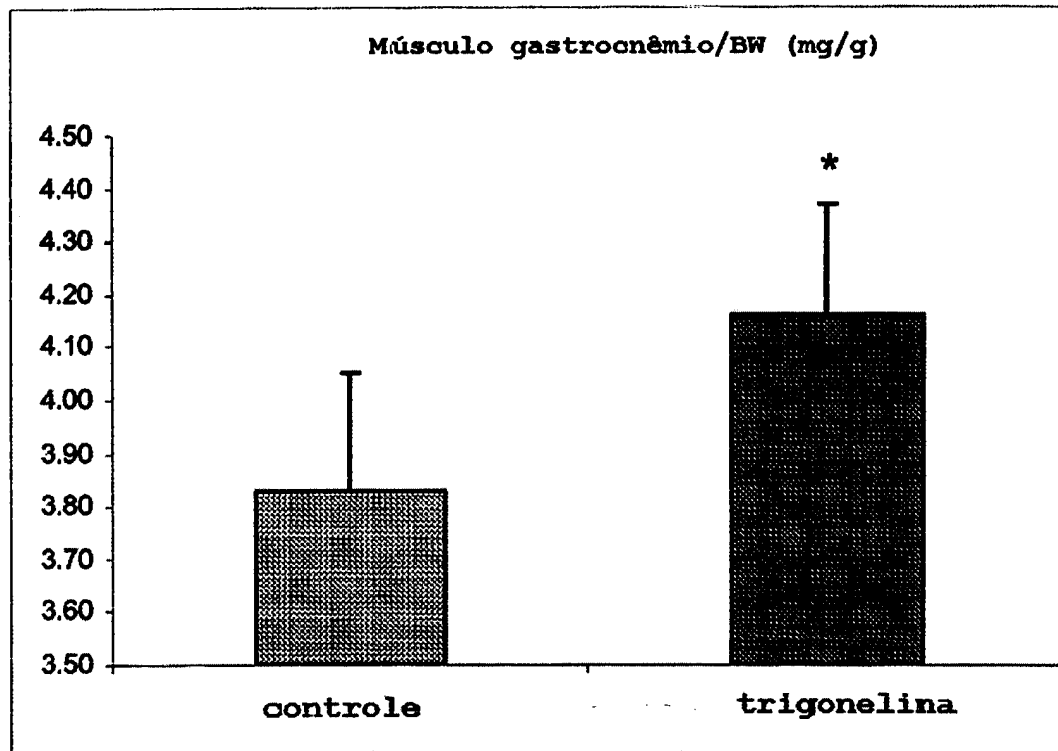


FIGURA 3



* significante: $p \leq 0.05$

FIGURA 4

