(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 438 772**

(51) Int. CI.:

A61K 36/45 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)
A61K 36/18 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2008 E 08767056 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2155221**

(54) Título: **Un método para modificar materiales vegetales que contienen polifenoles y usos médicos de materiales que contienen plantas con polifenoles modificados**

(30) Prioridad:

08.06.2007 SE 0701440

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2014

(73) Titular/es:

PROBI AB (100.0%)
SÖLVEGATAN 41
223 70 LÜND, SE

(72) Inventor/es:

BERGGREN, ANNA;
ALENFALL, JAN;
NILSSON, MIKAEL;
BJÖRCK, INGER y
GRANFELDT, YVONNE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Un método para modificar materiales vegetales que contienen polifenoles y usos médicos de materiales que contienen plantas con polifenoles modificados

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un método para modificar uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles y a usos médicos novedosos de uno o más materiales vegetales diferentes que contienen polifenoles modificados.

Antecedentes técnicos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha predicho que 300 millones de personas (~ un 5% de la población actual) habrán desarrollado diabetes de tipo 2 en 2025. Esto significa que una cantidad considerable de la población sufrirá diferentes trastornos metabólicos, tales como el síndrome metabólico. La expresión “síndrome metabólico” ha sido objeto de debate, tanto en lo que se refiere a su definición como a su diagnóstico clínico. Aún representa un grupo alarmante de factores de riesgo metabólico que identifica individuos con un riesgo elevado de desarrollar diabetes de tipo 2 y una enfermedad cardiovascular.

En la actualidad existen tres criterios principales comúnmente aceptados por la Federación Internacional de Diabetes (IDF, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), y que son las medidas de la obesidad, dislipemia y resistencia a la insulina. Cada uno de estos factores de riesgo es un buen factor de pronóstico de la enfermedad cardiovascular. Sin embargo, se considera la resistencia a la insulina como un componente clave del síndrome metabólico ya que predice tanto la diabetes de tipo 2 como la enfermedad cardiovascular. La secreción de insulina es necesaria no solamente para mantener el metabolismo de la glucosa, sino también para controlar el metabolismo lipídico y el tono vascular. La resistencia a la insulina da como resultado una regulación imprecisa de las células beta para mantener la normoglucemia, lo que provoca una hiperinsulinemia, la cual a su vez agrava la resistencia a la insulina en los principales órganos y tejidos metabólicos, como el músculo, tejido adiposo e hígado y se desarrolla un círculo vicioso entre la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia. No se conoce totalmente la causa de la resistencia a la insulina y existen varias predisposiciones genéticas (herencia genética, polimorfismos), factores moleculares, tales como el estrés oxidativo, y diferentes marcadores de la inflamación que pueden interferir con la señalización de la insulina.

Por último, pero no por ello menos importante, está el gran impacto de las modificaciones intensivas del estilo de vida, las cuales, según se ha observado en los estudios de intervención, retrasan o previenen el desarrollo de la diabetes de tipo 2 en un 40-58%. La dieta en estos estudios de intervención tuvo como objetivo la reducción de peso mediante la reducción del aporte energético procedente de grasas, sobre todo procedente de grasas saturadas (reemplazadas parcialmente por grasas monoinsaturadas) y fue adicionalmente rica en fibra, grano entero, verduras y frutas. Las restricciones dietéticas estuvieron acompañadas de 30 min de actividad física diaria. Los beneficios fisiológicos de las modificaciones intensivas del estilo de vida son una disminución de la presión sanguínea y el peso corporal y una mejora en la sensibilidad a la insulina y en los lípidos sanguíneos. Esto afectará todo el espectro de componentes de riesgo y se ha observado que retrasa o previene el desarrollo de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico.

A la vista de lo anterior, no es sorprendente que se haya empleado un gran esfuerzo en el estudio de los mecanismos tras las enfermedades mencionadas anteriormente así como para encontrar nuevas maneras de prevenir, aliviar o tratar estas enfermedades.

Los alimentos que provocan respuestas a la insulina bajas se consideran favorables ya que unos niveles elevados de insulina (hiperinsulinemia) después de una comida constituyen factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades pertenecientes al síndrome metabólico (enfermedades cardiovasculares, diabetes de tipo 2 y obesidad). Por lo tanto, los alimentos que provocan niveles de insulina bajos en el cuerpo humano serían beneficiosos para los seres humanos en la parte del mundo industrializada donde los problemas con las enfermedades cardiovasculares tales como la diabetes de tipo 2, obesidad y el síndrome metabólico son cada vez más frecuentes.

De acuerdo con la presente invención, se han descubierto nuevas maneras de tratar y prevenir este tipo de enfermedades.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona, en un aspecto, un método para modificar uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles, donde dicho método comprende:

a) mezclar al menos un material que contiene polifenoles con al menos un disolvente para proporcionar una mezcla;
b) calentar la mezcla para eliminar las especies bacterianas presentes para proporcionar una mezcla calentada;
c) añadir al menos una cepa de bacterias del ácido láctico que modifican polifenoles y opcionalmente al menos una fuente de proteínas, en un orden opcional o simultáneamente, a la mezcla calentada para proporcionar una mezcla de fermentación; y
d) someter la mezcla de fermentación a condiciones adecuadas para la fermentación de la mezcla de fermentación para proporcionar una mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados; y
a) opcionalmente eliminar la cepa de bacterias del ácido láctico que modifica polifenoles para proporcionar una mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados exenta de bacterias del ácido láctico vivas.

La presente invención proporciona, en un aspecto adicional, la utilización de una mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados que comprende bacterias del ácido láctico vivas o una mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados exenta de bacterias del ácido láctico vivas, para la producción de una composición para la prevención o tratamiento de la diabetes, el síndrome metabólicio y las enfermedades cardiovasculares.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las curvas de glucosa plasmática posprandial obtenidas tras la ingesta de diferentes bebidas de arándano por parte de individuos de ensayo respecto a una bebida de glucosa de referencia.

La Fig. 2 muestra las respuestas de insulina sérica tras la ingesta de diferentes productos de arándanos sometidos a diferentes procesos/aditivos en comparación con una referencia de glucosa.

La Fig. 3 muestra las respuestas de insulina tras la ingesta de diferentes productos de arándanos sometidos a diferentes procesos/aditivos en comparación con un control no tratado (B- no tratado). Tras 30 minutos la B-ferm da una respuesta de insulina significativamente menor en comparación con el control (B- no tratado) ($P<0.05$, ensayo de Dunnet con B- no tratado como control).

La Fig. 4 muestra las curvas de glucosa plasmática posprandial obtenidas tras la ingesta de una bebida de arándano fermentada con bacterias vivas y una bebida de arándano fermentada donde las bacterias se destruyen poco después por pasteurización.

La Fig. 5 muestra las respuestas de insulina tras la ingesta de una bebida de arándano fermentada con bacterias vivas y una bebida de arándano fermentada donde las bacterias se destruyen poco después por pasteurización.

La Fig. 6 muestra los contenidos de catequina, epicatequina, aglicona del dímero de proantocianidina, aglicona del trímero de proantocianidina, aglicona del tetrámero de proantocianidina, ácido 3,4-dihidrofenilpropiónico, ácido 3-fenilláctico, ácido protocatecuico y cianidin-3-galactósido/cianidin-3-glucósido en puré de escaramujo, arándano, piel de arándano y piel de arándano rojo antes y después de la fermentación.

La Fig. 7 muestra el contenido de catequina, epicatequina, procianidina B2, aglicona del trimero de proantocianidina, aglicona del tetrámero de proantocianidina, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido L-(-)-3-fenilláctico, ácido procatecuico y cianidin-3-galactósido/cianidin-3-glucósido en arándanos antes de la fermentación y después de la fermentación con *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, *Lactobacillus plantarum* 299v o *Pediococcus acidilactici*.

Descripción detallada de la invención

En una realización del método de la invención, la mezcla de dicho material vegetal que contiene polifenoles con dicho disolvente se obtiene homogeneizando. El disolvente es preferentemente agua, agua del grifo o agua destilada, pero podría ser otro disolvente acuoso potable tal como agua mineral, zumos, tales como zumos de frutas y zumos de verduras, leche y otras bebidas.

A fin de eliminar cualesquiera especies bacterianas tales como las bacterias y/o microorganismos presentes en la mezcla preparada con dicho material que contiene polifenoles y dicho disolvente, para prevenir cualquier crecimiento de estas, el calentamiento del paso b) tiene lugar a una temperatura de 60 ºC-100 ºC, preferentemente 80 ºC-100 ºC, más preferentemente 90 ºC-100 ºC, es decir, una temperatura suficiente para aniquilar bacterias y microorganismos, p. ej., pasteurización a 94 ºC durante 2 s o utilizando un autoclave convencional para eliminar las bacterias presentes. La fermentación tal y como se proporciona en el paso d) únicamente debería tener lugar para la

cepa de bacterias del ácido láctico específica tal y como se añade a la mezcla. Por lo tanto, es necesario eliminar cualesquiera otras especies bacterianas que puedan estar presentes en el paso de calentamiento b) antes de la fermentación. La temperatura del calentamiento y la duración del calentamiento se deciden teniendo en cuenta el resultado deseado, es decir, aniquilar cualesquiera bacterias y microorganismos presentes.

Después del paso de calentamiento b), se puede ajustar el pH de la mezcla calentada hasta un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 4.5-9, preferentemente 5-7, p. ej., añadiendo KOH ya que el material que contiene polifenoles podría ser ácido. La razón de esto es que la cepa de bacterias del ácido láctico añadida crecerá bien en este intervalo de pH. Dicha cepa de bacterias del ácido láctico que modifican polifenoles se añade en una cantidad de aproximadamente 10^5-10^9 cfu/mL de mezcla. Preferentemente, la fermentación tiene lugar en presencia de al menos una fuente de proteínas, p. ej., una fuente de aminoácido, donde dicha fuente de proteínas se escoge a partir del grupo que comprende peptonas, triptonas (caldo de cultivo con leche), extractos de levaduras y combinaciones de estos. Otro ejemplo es un medio de cultivo con carne o harina de avena, el cual también comprende los componentes necesarios para las bacterias. También es posible que la fermentación tenga lugar sin la adición de una fuente de proteínas, es decir, en presencia de únicamente los componentes de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles añadidos, es decir, las proteínas y carbohidratos presentes en estos materiales vegetales. Dicha proteína se añade, o está presente, en una cantidad de 0.0001-0.1% en peso respecto a la mezcla total.

En una realización de la invención, dicha cepa de de bacterias del ácido láctico que modifican polifenoles se escoge a partir del grupo que comprende *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus* y géneros relacionados filogenéticamente. En otra realización de la invención dicha cepa de *Lactobacillus* que modifica polifenoles se escoge a partir del grupo que comprende *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillu pentosus* y *Lactobacillus argentoratensis*.

Preferentemente, el *Lactobacillus plantarum* se escoge a partir del grupo de cepas constituido por *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, la cual se depositó el 2 de julio de 1991 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, la cual se depositó el 16 de marzo de 1995 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM DSM 15313, y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, las cuales se depositaron el 27 de noviembre de 2002 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y a continuación se les dio los números de acceso mencionados anteriormente.

Después de la adición de la cepa específica de bacterias del ácido láctico las condiciones de la fermentación se encuentran a una temperatura de aproximadamente 30 ºC – 50 ºC, preferentemente aproximadamente 35 ºC – 45 ºC, en especial aproximadamente 37 ºC – 40 ºC, en un medio líquido a presión atmosférica. La fermentación normalmente se hace avanzar hasta que se alcanza un valor de pH < 5, preferentemente < 4. Si se hace fermentar un yogur, la fermentación se hace continuar hasta un pH < 4.6 – 4.7. La fermentación tiene lugar durante aproximadamente 10 – 30 horas, de manera preferente aproximadamente 15 – 25 horas, por ejemplo, aproximadamente 20 – 24 horas. La duración de la fermentación debería ser suficiente para proporcionar uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados beneficiosos.

Después de finalizar la fermentación, tiene lugar el paso opcional de eliminación f) de la cepa de bacterias del ácido láctico que modifican polifenoles por calentamiento, radiación ultravioleta, radiación gamma, presión, corriente eléctrica, descarga eléctrica, campos eléctricos pulsados, choque eléctrico o filtración estéril. Al eliminar la cepa de bacterias del ácido láctico será posible utilizar la mezcla obtenida de la mezcla vegetal que contiene polifenoles modificados exenta de bacterias del ácido láctico en cualquier composición que un individuo pueda tomar.

El material o los materiales vegetales que contienen polifenoles modificados por la fermentación de la cepa de bacterias del ácido láctico se eligen, por ejemplo, a partir del grupo compuesto por frutas, verduras, bayas, té, té verde, café, cacao, chocolate y corteza. Las frutas y las bayas se escogen, por ejemplo, a partir del grupo de arándanos, arándanos rojos, arándanos agrios, manzanas, plátanos, grosellas negras, fresas, frambuesas, escaramujos, uvas, cítricos, aronia, membrillo japonés, endrinas, escaramujo y baya de saúco, aceitunas, alcaparras y otras frutas ricas en polifenoles. La corteza que se escoge preferentemente es la de la canela. Las verduras se escogen, por ejemplo, a partir de las judías. El aspecto importante en vista del o los materiales vegetales que contienen polifenoles elegidos es que el o los materiales vegetales que contienen polifenoles que se han de usar deben verse afectados por la fermentación con la cepa de bacterias del ácido láctico y proporcionar un material vegetal que contiene polifenoles modificados.

En el presente contexto, la frase “materiales vegetales que contienen polifenoles modificados” se refiere a que ha tenido lugar una fermentación de una cepa de bacterias del ácido láctico añadida en presencia de un material vegetal que contiene polifenoles. La fermentación tiene lugar y afecta a los grupos de polifenoles presentes para proporcionar uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados.

En el presente contexto, la expresión “uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados” se refiere a uno o más productos tal como se obtienen tras la fermentación del material vegetal que contiene polifenoles en presencia de una cepa de bacterias del ácido láctico en las condiciones especificadas en la presente. En la parte

experimental el material que contiene polifenoles ensayado es uno de los siguientes: arándanos, arándanos rojos y escaramujo y se ha demostrado que únicamente el producto de ensayo que contiene arándanos, arándanos rojos y escaramujo que ha fermentado es el que provoca el efecto significativo de reducir las respuestas de insulina, lo que significa que, muy probablemente, es la fermentación de los materiales que contienen polifenoles la que provoca la respuesta de insulina más baja. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención la expresión "uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados" se refiere a este tipo de sustancias que se obtienen tras la fermentación de los materiales vegetales que contienen polifenoles. Tales "materiales vegetales que contienen polifenoles modificados" deberían proporcionar el efecto deseado de disminuir las respuestas de insulina en seres humanos tras su ingesta en comparación con la ingesta de un material vegetal que contiene polifenoles, el cual no ha sido fermentado con una cepa de bacterias de ácido láctico. El descenso del nivel de insulina por la ingesta de materiales vegetales que contienen polifenoles modificados en cualquier forma adecuada debería estar comprendido en el intervalo de aproximadamente un 1-50%, de manera preferente aproximadamente un 5-40%, de manera más preferente aproximadamente un 10-30%, e incluso de manera más preferente aproximadamente un 15-25%, por ejemplo aproximadamente un 25%.

La invención además se refiere a la utilización de una mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados que comprende bacterias del ácido láctico vivas o una mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados exenta de bacterias del ácido láctico vivas, para la producción de una composición para la prevención o tratamiento de la diabetes, síndrome metabólico, obesidad y enfermedades cardiovasculares.

La composición es preferentemente una composición farmacéutica o composición alimentaria. La composición alimentaria es, por ejemplo, un producto alimentario o un suplemento alimentario.

El producto alimentario se podría escoger a partir del grupo que comprende panes, quesos, yogures líquidos con zumo, bebidas dietéticas, barritas dietéticas, productos para untar, galletas y cereales. Es conveniente incluir la mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados o la mezcla de uno o más materiales vegetales que contienen polifenoles modificados exenta de bacterias del ácido láctico vivas en una composición alimentaria ya que un individuo puede tomar fácilmente una composición de este tipo para mantenerse saludable, y se podrían prevenir las enfermedades cardiovasculares tales como las mencionadas anteriormente.

Método y materiales

Productos de ensayo

Con el fin de mostrar los efectos de la presente invención, esta se ha estudiado para evaluar las diferencias potenciales en las respuestas de insulina y glucosa sanguíneas posprandiales tras la ingesta de diferentes composiciones a base de un material vegetal que contiene polifenoles tal como los arándanos y la sacarosa dependiendo de 1) el tipo y grado del tratamiento térmico de la composición de arándanos, 2) la presencia de bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus plantarum* 299v y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, respectivamente) en la composición y 3) la fermentación de la composición de arándanos con *L. plantarum* HEAL 19.

En el estudio se incluyeron cinco bebidas de ensayo diferentes y una bebida de referencia (Ref.). Las bebidas de ensayo consistieron en una bebida de arándanos no fermentada y no tratada (B- no trat), una bebida a base de arándanos no fermentados que se había pasteurizado (B- past), dos bebidas las cuales se habían pasteurizado y no fermentadas con la adición de *Lactobacillus plantarum* 299v y HEAL 19, respectivamente, (B- 299v y B- HEAL) y una bebida que se había pasteurizado y fermentado (B- ferm) con *L. plantarum* HEAL 19. La bebida de referencia consistió en glucosa disuelta en agua. Los arándanos (*Vaccinium myrtillus*) se mezclaron en un puré, antes de su almacenamiento a -20 ºC. Después de la descongelación, se diluyeron los arándanos con agua (1:1) y se homogeneizaron durante 5 minutos utilizando una batidora doméstica. A continuación, se diluyeron los arándanos una segunda vez (1:1) y se obtuvo una solución de arándanos al 25%. La solución de arándanos se homogeneizó a continuación a 25 000 rpm con una mezcladora de alto rendimiento (Ultra Turrax T25, Janke & Kunkel IKA, Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemania). Se tomaron muestras de la bebida de arándanos no fermentada (B- no tratada) y se congelaron a -20 ºC hasta que se utilizaron en el estudio de la comida. Se pasteurizó el resto de la solución de arándanos (94 ºC, 2s) y se almacenó a -20 ºC (B- pasteurizada).

Las dos bebidas con la adición separada de *Lactobacillus plantarum* 299v (B-299v) y *Lactobacillus plantarum* HEAL 19 (B-HEAL 19) se prepararon descongelando la bebida B-pasteurizada un día antes del estudio, se añadió la cepa de *Lactobacillus* respectiva y a continuación se permitió que la bebida reposara toda la noche en la nevera (+4 ºC) hasta el momento de servirla.

Aproximadamente una semana antes de que se sirviera, se fermentaron 600 mL de la solución de arándanos pasteurizada en un recipiente y se añadió KOH para ajustar el pH a 5. A continuación, se inoculó la solución de arándanos utilizando *Lactobacillus plantarum* HEAL 19 (1×10^7 unidades formadoras de colonias (cfu)/mL). Se añadió un gramo de flores de habas autoclavadas como fuente de nitrógeno. Se dejó que la solución de arándanos

fermentara durante 20 horas hasta que se obtuvo una cfu final de 1 x 10^9/mL (pH 3.8) (B- fermentada). Tras la fermentación, se almacenó la solución de arándanos a 4 ºC. Probi AB (Lund, Suecia) llevó a cabo la fermentación. Se utilizó una bebida de glucosa que contenía 30 g de D-(+)-glucosa (VWR International Ltd. Poole, Inglaterra) en 300 mL de agua como referencia. Todas las comidas contribuyeron con 30 g de hidratos de carbono. Se proporcionó una barra de pan blanco de trigo (PBT, Dollar Storfranska, Lockarp, Suecia) a cada de los sujetos del ensayo al inicio del estudio. La noche anterior a cada día de ensayo ingirieron una cantidad de rebanadas elegida individualmente. La Tabla 1 muestra la composición diferente de las bebidas de ensayo y referencia.

Tabla 1

	Cantidad de bebida (g)	Cantidad total de hidratos de carbono de bajo peso molecular procedentes de bayas (g)	Fructosa procedente de bayas (g)	Glucosa procedente de bayas (g)	Glucosa añadida (g)	Sacarosa añadida (g)	Cantidad total de hidratos de carbono (g)
Ref	300	-	-	-	30		30
B-no trat.*	300	3.82	2.19	1.63	-	26.18	30
B-past.*	300	3.82	2.19	1.63	-	26.18	30
B-ferm.*	300	2.64	2.03	0.61	1.18	26.18	30
B-299v*	300	3.82	2.19	1.63	-	26.18	30
B-HEAL 19*	300	3.82	2.19	1.63	-	26.18	30
Las bayas contuvieron <0.04 de sacarosa *Todas las bebidas de arándanos contuvieron 72.8 mg de ácido ascórbico, 320.1 mg de trecomex, 291 mg de CNK adicionales.							

Antes de que se sirvieran se añadieron 72.8 de ácido ascórbico, 320.1 de trecomex (almidón de patata modificado), 291 mg de CNK (carragenano E407) y 26.18 g de sacarosa a cada bebida de arándanos. Además, se añadieron 1.18 g de glucosa a la bebida B-fermentada para compensar las pérdidas de este hidrato de carbono durante la fermentación. Finalmente, se ajustaron todas las bebidas de arándanos con 32.0 g de agua de modo que se obtuvieron 300 g de bebidas de arándanos que contenían un 20% de arándanos y 30 g de hidratos de carbono.

Estudios de las bebidas de ensayo

Se sirvieron todas las bebidas como desayuno y se suministraron de manera aleatoria, con una diferencia de al menos cinco días. Se obtuvo un consentimiento informado escrito de todos los sujetos del estudio. Estos también fueron plenamente conscientes del hecho de que se podían retirar del estudio en cualquier momento y sin ninguna explicación adicional. El comité de ética de la facultad de medicina de la Universidad de Lund aprobó el estudio.

Sujetos del estudio

En el estudio de una única comida participaron quince voluntarios, 7 mujeres y 8 hombres, no fumadores y sanos. La edad promedio fue de 25 ± 2.4 (promedio ± DE) años y el índice de masa corporal promedio estuvo comprendido en el intervalo normal (22.4 ± 2.0 kg/m^2; promedio ± DE). Los sujetos no estaban recibiendo ningún tratamiento farmacológico. Se les pidió que evitaran la ingesta de alcohol, actividad física y una cena rica en fibra el día anterior al ensayo. Los sujetos tomaron una cantidad elegida individualmente de PBT entre las 9 y las 10 pm de la noche anterior a cada día del ensayo. La cantidad de rebanadas elegida individualmente se mantuvo invariante a lo largo de todo el estudio. Después de la comida a base de PBT, se les pidió a los sujetos que no ingirieran nada más antes de su llegada al laboratorio. Sin embargo, en caso necesario, se les permitió beber una pequeña cantidad de agua después de las 10 pm. Cada sujeto participó en cuatro ocasiones, con una diferencia de al menos una semana.

Diseño del estudio y muestreo sanguíneo

Los sujetos llegaron al laboratorio a las 07.45 de la mañana, y se les insertó un catéter periférico en la vena antecubital. En cada ocasión todos los participantes cumplimentaron un cuestionario acerca de su condición física ese día, incluidos los sentimientos de estrés o ansiedad. Se consumió la comida de manera regular a lo largo de 10 minutos. Se extrajo sangre capilar para determinar la insulina sérica y un análisis de glucosa sanguínea plasmática en ayunas y 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos tras las ingesta de comida.

Análisis de glucosa

Se determinó la glucosa sanguínea con un analizador de B-glucosa (Hemocue 201+, Hemocue AB, Ängelholm, Suecia).

Análisis de insulina

Se almacenaron las muestras de insulina sérica a -20 ºC. Los análisis se llevaron a cabo en un analizador de inmunoensayos integrado (CODA Open Microplate System; Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando un kit de inmunoensayo enzimático (Mercodia Insulin Elisa; Mercodia AB, Uppsala, Suecia).

Cálculos y análisis estadísticos

Se calcularon las áreas incrementadas bajo la curva (AUC) a 0-45 minutos y 0-120 minutos para la insulina sérica y la glucosa sanguínea utilizando GraphPad PRISM (versión 3.02; GraphPad Software Inc, San Diego) para cada participante y cada bebida de ensayo. Se excluyeron de los cálculos todas las áreas bajo la línea de base. Se analizaron estadísticamente la insulina sérica y glucosa sanguínea en cada punto de evaluación. Se llevaron a cabo los cálculos estadísticos con el Software MINITAB Statistical (versión 13.1 para windows). Se determinaron las significaciones mediante un modelo lineal general (ANOVA), y a continuación por el método de las comparaciones múltiples de Tukey o el método de Dunnett. Se consideraron significativas las diferencias que dieron como resultado una $P<0.05$.

Glucosa plasmática

Tanto las áreas tempranas bajo las curvas de glucosa (0-45 min) como las tardías (0-90 min) fueron significativamente menores tras la ingesta de bebidas de arándanos en comparación con la referencia de glucosa. Todos los valores de IG para las bebidas de arándanos estuvieron muy agrupados en el intervalo 58-64 y fueron significativamente menores que el de la referencia de glucosa (IG = 100). La respuesta de glucosa plasmática se muestra en la fig. 1.

Tabla 2 – Glucosa plasmática tras la referencia de glucosa y las bebidas de arándanos que se habían pasteurizado, fermentado y/o suplementado con bacterias.

	Glucosa				
Bebidas	n	Valor en ayunas (mmol/L)	Valor máximo (delta) a los 30 min (mmol/L)	Área bajo la curva 0-45 min (mmol min/L)	IG (0-90 min)
Glucosa	15	5.2 ± 0.1	4.1 ± 0.3 [a]	115.6 ± 8.2 [a]	100 ± 0.0 [a]
B- no trat	14	5.2 ± 0.1	3.0 ± 0.2 [b]	80.8 ± 7.2 [b]	58 ± 4.6 [b]
B- past	13	5.2 ± 0.1	3.0 ± 0.3 [b]	82.4 ± 7.1 [b]	64 ± 5.5 [b]
B- ferm	15	5.2 ± 0.1	2.8 ± 0.3 [b]	76.6 ± 8.0 [b]	61 ± 6.9 [b]
B- 299v	14	5.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2 [b]	81.1 ± 6.9 [b]	60 ± 4.7 [b]
B-HEAL 19	14	5.2 ± 0.1	2.9 ± 0.2 [b]	80.2 ± 5.3 [b]	63 ± 4.4 [b]
Los números muestran valores promedios ± DE, n = número de personas en el ensayo. Los valores promedio en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($P<0.05$).					

Insulina sérica

En la fig. 2 se muestran las respuestas de insulina tras la ingesta de las diferentes bebidas de arándanos y referencias. En el intervalo de 30-60 min todas las bebidas de arándanos dieron lugar a unas respuestas de insulina significativamente menores en comparación con la referencia de glucosa. Tras 15 min, el nivel de insulina tras la ingesta de B-ferm fue significativamente menor en comparación con la referencia de glucosa. En la fase posprandial temprana (expresada como 0-45 min del AUC) B-ferm dio lugar a una respuesta de insulina menor que B-HEAL 19.

Con el fin de estudiar la importancia de la pasteurización y fermentación (con *L. plantarum* HEAL 19), o de la adición de *Lactobacillus plantarum* a la materia prima de arándanos, se compararon las respuestas de insulina de B-past, B-ferm, B-299v y B-HEAL 19 con la bebida de control no tratada (B- no trat). A los 30 minutos de la ingesta, la respuesta de B-ferm fue significativamente menor en comparación con la B- no tratada. A los 120 minutos, B-299v y HEAL 19 mostraron unas respuestas de insulina significativamente menores en comparación con la B- no tratada. Una comparación de la respuesta de insulina temprana (0-45 min del AUC) mostró que B-ferm proporcionó una respuesta de insulina significativamente menor (25%) en comparación con la bebida de arándanos no tratada ($P<0.05$, Tabla 4). Ni la pasteurización ni la adición de *Lactobacillus plantarum* 299v o *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, respectivamente, afectaron al área de insulina posprandial de manera significativa en comparación con la bebida de arándanos no tratada.

Tabla 3 – Respuestas de insulina sérica de los sujetos de ensayo sanos tras la ingesta de la bebida de glucosa y las bebidas a base de materia prima de arándanos sometidas a pasteurización, fermentación y/o suplementada con bacterias.

	Insulina				
Bebidas	n	Valor en ayunas	Valor máximo	Área bajo la	II (0-90 min)

		(pmol/L)	(delta) a los 30 min (pmol/L)	curva 0-45 min (nmol min/L)	
Glucosa	15	43.3 ± 2.2 [ab]	243 ± 30.3 [a]	6.8 ± 0.8 [a]	100 ± 0.0 [a]
B- no trat	14	33.8 ± 6.2 [b]	166 ± 18.9 [bc]	4.4 ± 0.4 [bc]	63 ± 6.6 [b]
B- past	13	47.2 ± 6.7 [ab]	141 ± 21.6 [bc]	3.9 ± 0.5 [bc]	56 ± 3.2 [b]
B- ferm	15	50.0 ± 5.6 [a]	119 ± 17.8 [b]	3.3 ± 0.4 [c]	46 ± 3.7 [b]
B- 299v	14	49.3 ± 7.8 [a]	188 ± 25.9 [c]	4.9 ± 0.8 [b]	61 ± 5.8 [b]
B- HEAL 19	14	45.0 ± 5.7 [ab]	153 ± 18.8 [bc]	4.4 ± 0.6 [bc]	64 ± 6.0 [b]
Los números muestran valores promedio ± DE, n = número de personas en el ensayo. Los valores promedios en la misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.05).					

La fermentación de los arándanos utilizando *Lactobacillus plantarum* HEAL 19 parece ser un factor clave para la respuesta de insulina reducida. Los resultados sugieren que el proceso fermentativo mejora la economía de la insulina.

Tabla 4 – Comparación de la respuesta de insulina de la bebida de arándanos fermentada y pasteurizada con la bebida de arándanos no tratada como control.

Bebidas	Área bajo la curva 0-45 min (nmol min/L)	Diferencia en la respuesta de insulina respecto a la B- no tratada (%)
B- no trat	4.4 ± 0.4	-
B- past	3.9 ± 0.5	-11
B- ferm	3.3 ± 0.4	-25
* Indica una diferencia significativa respecto a la bebida de control, B- no tratada (P<0.05, método de Dunnett con B- no tratada como bebida de control.		

La respuesta de insulina menor, de un 25%, tras la ingesta de la bebida de arándanos fermentada con *Lactobacillus plantarum* HEAL 19 no se observó simultáneamente con un descenso similar en la glucosa plasmática, debido a que las respuestas de glucosa plasmática posprandial tras las bebidas de arándanos estuvieron en el mismo nivel. Sin embargo, la fermentación de los arándanos utilizando *Lactobacillus plantarum* HEAL 19 parece ser un factor clave de la respuesta de insulina reducida observada con las bebidas que contenían arándanos fermentados. Este efecto no se aprecia cuando se añade la misma bacteria, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, a la bebida de arándanos justo antes de su ingesta. Por lo tanto, no es la presencia de la bacteria *per se* la que da lugar a la respuesta de insulina reducida, sino más bien la propia fermentación la que es importante. El mecanismo activo que causa este interesante efecto podría deberse a los componentes producidos o modificados por la fermentación, es decir, componentes que son polifenoles modificados disponibles en los arándanos tras la fermentación.

En resumen, se puede concluir que la bebida de arándanos fermentada reduce la respuesta de insulina en un 25% en comparación con la bebida de arándanos no fermentada. En el futuro, los productos dirigidos a personas con trastornos metabólicos podrían presentar una manera adicional de prevenir y, tal vez, también reducir el desarrollo de la diabetes de tipo 2 y los trastornos endoteliales. Considerando la “epidemia de trastornos metabólicos” desde una perspectiva más amplia, preferentemente integrando todos los aspectos del problema, es decir, no solos los nutricionales y clínicos, sino también los sociales, culturales y económicos, tal vez será posible introducir un estilo de vida saludable general en occidente y en los países en vías de desarrollo. Un mayor conocimiento por parte de todos los consumidores podría hacer, con suerte, que la industria siguiera los deseos del mercado.

<u>Ensayo para comparar los efectos de bebidas con bacterias vivas con los efectos de bebidas en los que se han eliminado las bacterias</u>

Se incluyeron dos bebidas de ensayo diferentes en un estudio para evaluar si una bebida en la que el cultivo de *L. plantarum* HEAL 19 se pasteuriza tras la fermentación proporciona la misma respuesta baja de insulina que una bebida en la que el cultivo de *L. plantarum* HEAL 19 se deja vivo tras la fermentación.

Las bebidas de ensayo estuvieron constituidas por una bebida pasteurizada y fermentada con *L. plantarum* HEAL 19 y una bebida que se pasteurizó y fermentó con *L. plantarum* HEAL 19 y se pasteurizó posteriormente tras la fermentación. Los arándanos (*Vaccinium myrtillus*) se mezclaron en un puré, antes de su almacenamiento a -20 ºC. Después de la descongelación, se diluyeron los arándanos con agua (1:1) y se homogeneizaron durante 5 minutos utilizando una batidora doméstica. A continuación, se diluyeron los arándanos una segunda vez (1:1) y se obtuvo una solución de arándanos al 25%. La solución de arándanos se homogeneizó a continuación a 25 000 rpm con una mezcladora de alto rendimiento (Ultra Turrax T25, Janke & Kunkel IKA, Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemania). Se tomaron muestras de la bebida de arándanos no fermentada (B- no tratada) y se congelaron a -20 ºC hasta que

se utilizaron en el estudio de la comida. Se pasteurizó el resto de la solución de arándanos (94 ºC, 2s) y se almacenó a -20 ºC (B- past).

Aproximadamente una semana antes de que se sirviera, se fermentaron 600 mL de la solución de arándanos pasteurizada en un recipiente y se añadió KOH para ajustar el pH a 5. A continuación, se inoculó la solución de arándanos utilizando *Lactobacillus plantarum* HEAL 19 (1 x 10^7 unidades formadoras de colonias (cfu)/mL). Se añadió un gramo de flores de habas autoclavadas como fuente de nitrógeno. Se dejó que la solución de arándanos fermentara durante 20 horas hasta que se obtuvo una cfu final de 1 x 10^9/mL (pH 3.8). Tras la fermentación, se almacenó la solución de arándanos a 4 ºC o se pasteurizó de nuevo (94 ºC, 2s) y se almacenó a 4 ºC. Probi AB (Lund, Suecia) llevó a cabo la fermentación.

La Tabla 5 muestra la composición diferente de las bebidas de ensayo.

Tabla 5

	Cantidad de bebida (g)	Cantidad total de hidratos de carbono de bajo peso molecular procedentes de bayas (g)	Fructosa procedente de bayas (g)	Glucosa procedente de bayas (g)	Sacarosa añadida (g)	Cantidad total de hidratos de carbono (g)
B-ferm.* vivas	300	2.64	2.03	0.61	26.18	29
B-ferm. y pasteurizada*	300	2.64	2.03	0.61	26.18	29
Las bayas contuvieron <0.04 de sacarosa *Todas las bebidas de arándanos contuvieron adicionalmente 72.8 mg de ácido ascórbico, 320.1 mg de trecomex y 291 mg de CNK.						

Antes de que se sirvieran se añadieron 72.8 mg de ácido ascórbico, 320.1 mg de trecomex (almidón de patata modificado), 291 mg de CNK (carragenano E407) y 26.18 g de sacarosa a cada bebida de arándanos. Además, se añadieron 1.18 g de glucosa a la bebida B-fermentada para compensar las pérdidas de este hidrato de carbono durante la fermentación. Finalmente, se ajustaron todas las bebidas de arándanos con 32.0 g de agua de modo que se obtuvieron 300 g de bebidas de arándanos que contenían un 20% de arándanos y 30 g de hidratos de carbono.

Estudios de las bebidas de ensayo

Se sirvieron todas las bebidas como desayuno y se suministraron de manera aleatoria, con una diferencia de al menos cinco días. Se obtuvo un consentimiento informado escrito de todos los sujetos del estudio. Estos también fueron plenamente conscientes del hecho de que se podían retirar del estudio en cualquier momento y sin ninguna explicación adicional. El comité de ética de la facultad de medicina de la Universidad de Lund aprobó el estudio.

Sujetos del estudio

En el estudio de una única comida participaron trece voluntarios no fumadores. La edad promedio fue de 25.5 ± 1.34 (promedio ± DE) años y el índice de masa corporal promedio estuvo comprendido en el intervalo normal (20.8 ± 0.24 kg/m^2; promedio ± DE). Uno de los sujetos padeció gripe intestinal los días anteriores a uno de los días de ensayo y por eso se le excluyó del estudio. Los sujetos no estaban recibiendo ningún tratamiento farmacológico. Se les pidió que evitaran la ingesta de alcohol, actividad física y una cena rica en fibra el día anterior al ensayo. Los sujetos tomaron una cantidad elegida individualmente de PBT entre las 9 y las 10 pm de la noche anterior a cada día de ensayo. La cantidad de rebanadas elegida individualmente se mantuvo invariante a lo largo de todo el estudio. Después de la comida a base de PBT, se les pidió a los sujetos que no ingirieran nada más antes de su llegada al laboratorio. Sin embargo, en caso necesario, se les permitió beber una pequeña cantidad de agua después de las 10 pm. Cada sujeto participó en cuatro ocasiones, con una diferencia de al menos una semana.

Diseño del estudio y muestreo sanguíneo

Los sujetos llegaron al laboratorio a las 07.45 de la mañana, y se les insertó un catéter periférico en la vena antecubital. En cada ocasión todos los participantes cumplimentaron un cuestionario acerca de su condición física ese día, incluidos los sentimientos de estrés o ansiedad. Se consumió la comida de manera regular a lo largo de 10 minutos. Se extrajo sangre capilar para determinar la insulina sérica y un análisis de glucosa sanguínea plasmática en ayunas y 15, 30, 60, 90 y 120 minutos tras las ingesta de comida.

Análisis de glucosa

Se determinó la glucosa sanguínea con un analizador de B-glucosa (modelo n.º 120401, Hemocue AB, Ängelholm, Suecia).

Análisis de insulina

Se almacenaron las muestras de insulina sérica a -20 ºC. Los análisis se llevaron a cabo en un analizador de inmunoensayos integrado (CODA Open Microplate System; Laboratorios Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando un kit de inmunoensayo enzimático (Mercodia Insulin Elisa; Mercodia AB, Uppsala, Suecia).

Cálculos y análisis estadísticos

Se calcularon las áreas incrementadas bajo la curva (AUC) a 0-45 minutos y 0-120 minutos para la insulina sérica y la glucosa sanguínea utilizando GraphPad PRISM (versión 3.02; GraphPad Software Inc, San Diego) para cada participante y cada bebida de ensayo. Se excluyeron de los cálculos todas las áreas bajo la línea de base. Se analizaron estadísticamente la insulina sérica y glucosa sanguínea en cada punto de evaluación. Se llevaron a cabo los cálculos estadísticos con el Software MINITAB Statistical (versión 13.1 para windows). Se determinaron las significaciones mediante un modelo lineal general (ANOVA), y a continuación por el método de las comparaciones múltiples de Tukey o el método de Dunnett. Se consideraron significativas las diferencias que dieron como resultado una $P<0.05$.

Glucosa plasmática

Tanto las áreas tempranas bajo las curvas de glucosa (0-45 min) como las tardías (0-120 min) fueron ligeramente menores tras la ingesta de la bebida de ensayo que se pasteurizó tras la fermentación en comparación con la bebida de ensayo con bacterias vivas, tal y como puede apreciarse en la Fig. 4. Se ha analizado el perfil de la curva de glucosa dividiendo el periodo en que la glucosa sanguínea permanece por encima del valor en ayunas por el incremento máximo en la glucosa sanguínea a partir del valor en ayunas. Este cociente se denomina la cuota Duración/Pico de glucosa (min/Δ mM). Un valor elevado en la cuota Duración/Pico de glucosa significa que la curva de glucosa es larga y baja y un valor bajo indica un perfil de la curva desfavorable con una curva corta y alta. No se pudo determinar ningún valor de IG ya que no se incluyó ninguna referencia en este ensayo.

Tabla 6 – AUC 120 min (glucosa plasmática) de una bebida fermentada con bacterias vivas y una bebida fermentada y pasteurizada

Bebidas	AUC 120 min	EEM (n = 12)
B-ferm. vivas	85.86	8.13
B-ferm. y pasteurizada	81.43	9.10
Los números indican los valores promedio ± DE, n = número de personas en el ensayo		

Tabla 7 – AUC 45 min (glucosa plasmática) y cuota Duración/Pico de glucosa para una bebida fermentada con bacterias vivas y una bebida pasteurizada y fermentada

Bebidas	AUC 45 min	EEM (n = 12)	AUC neg 30-120 min	EEM (n = 12)	Cuota Duración/Pico de glucosa	EEM (n = 12)
B-ferm. vivas	69.90	6.11	22.65	4.93	26.36	3.21
B-ferm. y pasteurizada	62.28	5.93	16.66	4.50	29.21	3.21
Los números indican los valores promedio ± DE, n = número de personas en el ensayo						

Insulina sérica

Las respuestas de insulina tras la ingesta de las dos bebidas de arándanos se muestran en la Fig. 5. El AUC fue menor tras la ingesta de la bebida de ensayo pasteurizada tras la fermentación en comparación con la bebida de ensayo con bacterias vivas. No se pudo determinar ningún valor de II ya que no se incluyó ninguna referencia en este ensayo.

Tabla 8 – AUC 120 min (respuestas de insulina sérica) para una bebida fermentada con bacterias vivas y una bebida fermentada y pasteurizada

Bebidas	AUC 120 min	EEM (n = 12)
B-ferm. vivas	6.65	1.06
B-ferm. y pasteurizada	4.75	0.51
Los valores se transformaron mediante la Transformación de Box-Cox antes del análisis		

Discusión

Ambas bebidas proporcionaron aproximadamente la misma respuesta para la glucosa. La bebida que estaba pasteurizada, es decir, en la que se habían aniquilado las bacterias, mostró mejores resultados en la respuesta de insulina que la bebida con bacterias vivas. En el estudio anterior no se apreció ningún efecto a partir únicamente de la pasteurización en la respuesta de insulina, es decir, los arándanos pasteurizados proporcionaron el mismo resultado que los arándanos no pasteurizados. El presente estudio indica, sin embargo, que el grado de tratamiento térmico tras la fermentación puede afectar en buena medida la respuesta de insulina.

El mecanismo para este efecto necesita evaluarse adicionalmente. Una teoría es que un tratamiento térmico más potente proporciona un efecto reductor sobre la insulina, por medio de los efectos sobre los polifenoles y otros componentes bioactivos de los arándanos, ilustrado mediante la bebida con bacterias aniquiladas térmicamente debido al paso adicional del tratamiento térmico.

Análisis de compuestos fenólicos

Con el fin de aportar pruebas de que tiene lugar una modificación de los materiales vegetales que contienen polifenoles se llevó a cabo un estudio que comparaba los contenidos de catequina, epicatequina, aglicona del dímero de proantocianidina, aglicona del trímero de proantocianidina, aglicona del tetrámero de proantocianidina, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido L-(-)-3-fenilláctico, ácido protocatecuico y cianidin-3-galactósido/cianidin-3-glucósido en puré de escaramujo, arándano, piel de arándano y piel de arándano rojo antes y después de la fermentación.

Se pasteurizaron todas las fracciones de fruta antes de la fermentación con el fin de evitar que otros microorganismos afectaran la fermentación.

Para el análisis de los compuestos fenólicos se pesaron las muestras y se añadió una solución para la extracción (concentración en la muestra: 50% de etanol, ácido fosfórico 0.05 M, de manera alternativa 50% de metanol, 0.5%). Posteriormente las muestras se extrajeron durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos y a continuación se centrifugaron, tras lo cual se transfirió el sobrenadante a viales para su análisis por análisis de HPLC-MS. El análisis de HPLC-MS se llevó a cabo tal como se describe en Salminen *et al.*, Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid cromatography-mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C. *J. Chrom A* 2005; 1077: 170-180, y Salminen *et al.*, Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom A* 1999; 864: 283-291 mediante un Turbonebulizador de Iones API 150 EX.

Se programó el instrumento en un modo negativo, es decir, se analizaron los iones negativos. El sistema de HPLC consistió en una bomba de HPLC del tipo Micro Bomba LC-200 de PerkinElmer y también un Automuestreador 200 de Perkin Elmer. El volumen de inyección de las muestras fue de 8 µL.

Se realizó el barrido sobre los números másicos entre 90-1000 m/z.

Números másicos específicos utilizados para la detección:

Catequina, m/z 289 (M-H)
Epicatequina, m/z 289 (M-H)
Procianidina B2, m/z 577 (M-H)
Aglicona del dímero de proantocianidina, m/z 577 (M-H)
Aglicona del trímero de proantocianidina, m/z 865 (M-H)
Aglicona del tetrámero de proantocianidina, m/z 1153 (M-H)
Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, m/z 181 (M-H)
Ácido L-(-)-3-fenilláctico, m/z 165 (M-H)
Ácido protocatecuico, m/z 153 (M-H)
Cianidin-3-galactósido, Cianidin-3-glucósido, m/z 447 (M-H)

Los resultados del estudio se pueden ver en la Fig. 6, que muestra que la modificación de los materiales vegetales que contienen polifenoles tiene lugar tanto en los arándanos como en los arándanos rojos y escaramujo.

Tabla 9 – modificación del material vegetal que contiene polifenoles en arándanos, arándanos rojos y escaramujo

	Catequina µg/g FV	Epicatequina µg/g FV	Procianidina B2 µg/g FV	Aglicona del trímero de proantocianidina µg/g FV	Aglicona del tetrámero de proantocianidina µg/g FV	Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico µg/g FV	Ácido L-(-)-3-fenilláctico µg/g FV	Ácido protocatecuico µg/g FV	Cianidin-3-galactósido/Cianidin-3-glucósido µg/g FV
Puré de escaramujo antes de la fermentación	77.05	3.44	133.19	7.07	10.37	0.01	0.65	1.23	ND
Puré de escaramujo después de la fermentación	83.01	3.86	134.49	7.22	10.52	0.24	24.63	0.44	ND
Arándanos antes de la fermentación	2.47	9.64	27.63	15.68	2.58	0.01	0.95	2.93	221.44
Arándanos después de la fermentación	2.30	9.64	27.56	15.45	2.79	1.41	48.03	6.89	196.48
Piel de arándanos antes de la fermentación	3.80	3.19	13.31	9.40	1.18	0.02	0.65	7.22	137.24
Piel de arándanos después de la fermentación	3.39	3.19	12.61	8.45	1.59	3.34	19.81	3.20	100.00
Piel de arándanos rojos antes de la fermentación	11.34	7.66	10.55	9.44	1.28	0.20	0.45	8.12	91.75
Piel de arándanos rojos después de la fermentación	11.15	7.85	9.11	8.95	1.30	2.45	12.17	3.01	50.45

En un estudio en ratas se ha demostrado que la concentración de los compuestos fenólicos seleccionados en el intestino ciego era diferente si se consumía escaramujo más *Lactobacillus plantarum* 299v o *Lactobacillus plantarum* HEAL 19 en comparación con el consumo de escaramujo solo (Tabla 10). Esto indica que los componentes polifenólicos se modifican durante la digestión en el intestino ciego.

Tabla 10. Compuestos fenólicos seleccionados en el contenido cecal. Pico 1 = µg de catequina/ g de peso fresco, picos 2, 3, 4 y 6 = µg de equivalentes de catequina / g pf, pico 5 = µg de quercetina—rhamnósido/ g pf.

	Pico 1, t_R de la catequina 13.8 min, m/z 289	Pico 2, t_R 16.1 min, m/z 291	Pico 3, t_R 17.1 min, m/z 385	Pico 4, t_R 18.6 min, m/z 291	Pico 5, t_R 23.1 min, m/z 447	Pico 6, t_R 29.3 min, m/z 289
Control de la colitis	1.6	5.3	0	1.7	0.6	9.3
*Lp*299v	0.9	5.8	0	3.3	1.0	8.2
HEAL 19	1.2	5.4	0	2.2	0.8	2.4
Escaramujo	29.9	122.7	100.8	12.2	0.2	8.6
Escaramujo + *Lp*299v	38.7	119.8	51.5	11.3	0.2	18.2
Escaramujo + HEAL 19	40.9	134.2	28.2	17.1	0.2	64.4

Ensayo de comparación de la fermentación con *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, *Lactobacillus plantarum* 299v o *Pediococcus acidilactici*

Con el fin de aportar pruebas de que tiene lugar una modificación de los materiales vegetales que contienen polifenoles cuando se fermenta con otras bacterias se realizó un estudio que comparaba los contenidos de catequina, epicatequina, procianidina B2, aglicona del trímero de proantocianidina, aglicona del tetrámero de proantocianidina, ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, ácido L-(-)-3-fenilláctico, ácido protocatecuico y cianidin-3-

galactósido/ cianidin-3-glucósido en los arándanos antes y después de la fermentación con *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, *Lactobacillus plantarum* 299v o *Pediococcus acidilactici*.

Los resultados del estudio se pueden ver en la Fig. 7, que muestra que la modificación de los materiales vegetales que contienen polifenoles tiene lugar tras la fermentación con todas las bacterias ensayadas, es decir, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, *Lactobacillus plantarum* 299v o *Pediococcus acidilactici*.

Tabla 11 – modificación de los materiales vegetales que contienen polifenoles tras la fermentación con *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, *Lactobacillus plantarum* 299v o *Pediococcus acidilatici*

	Catequina µg/g FV	Epicatequina µg/g FV	Procianidina B2 µg/g FV	Aglicona del trímero de proantocianidina µg/g FV	Aglicona del tetrámero de proantocianidina µg/g FV	Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico µg/g FV	Ácido L-(-)-3-fenilláctico µg/g FV	Ácido protocatecuico µg/g FV	Cianidin-3-galactósido/Cianidin-3-glucósido µg/g FV
Arándanos antes de la fermentación	2.5	9.6	27.6	15.7	2.6	0.0	0.9	2.9	221.4
Arándanos fermentados con *Lactobacillus plantarum* HEAL 19	2.3	9.6	27.6	15.4	2.8	1.4	48.0	6.9	196.5
Arándanos fermentados con *Lactobacillus plantarum* 299v	1.8	7.3	6.5	6.1	0.7	0.1	29.0	0.9	223.2
Arándanos fermentados con *Pediococcus acidilactici*	1.6	7.0	6.7	5.4	0.7	0.1	34.3	2.1	179.5

REIVINDICACIONES

1. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso en la prevención o tratamiento de la diabetes, el síndrome metabólico, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, donde dicho producto reductor de la respuesta de insulina puede obtenerse por el método que comprende lo siguiente:

   a) mezclar al menos un material vegetal que contiene polifenoles con al menos un disolvente acuoso potable para proporcionar una mezcla;
   b) calentar la mezcla para eliminar las especies bacterianas presentes para proporcionar una mezcla calentada;
   c) añadir al menos una cepa de bacterias del ácido láctico escogidas a partir de *Lactobacillus plantarum* y al menos una fuente de proteínas escogida a partir del grupo que comprende peptonas, triptonas, extractos de levadura y combinaciones de estos, en un orden opcional o simultáneamente, a la mezcla calentada para proporcionar una mezcla de fermentación; y
   d) someter la mezcla de fermentación a condiciones adecuadas para la fermentación de la mezcla de fermentación para proporcionar un producto reductor de la respuesta de insulina; y
   e) opcionalmente eliminar la cepa de *Lactobacillus plantarum* para proporcionar un producto reductor de la respuesta de insulina exento de bacterias del ácido láctico vivas.

2. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha cepa de *Lactobacillus plantarum* se añade en una cantidad de aproximadamente 10^5 – 10^9 cfu/mL de mezcla.

3. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha proteína se añade en una cantidad de 0.0001 – 0.1% en peso respecto a la mezcla.

4. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el *Lactobacillus plantarum* se escoge a partir del grupo de cepas que comprende *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316.

5. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las condiciones de fermentación se encuentran a una temperatura de 30 ºC – 50 ºC, en un medio líquido a presión atmosférica.

6. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la fermentación avanza hasta que se alcanza un valor de pH de <5, preferentemente <4.

7. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la eliminación de la cepa de *Lactobacillus plantarum* tiene lugar por calentamiento, radiación ultravioleta, radiación gamma, presión, corriente eléctrica, descarga eléctrica, campos eléctricos pulsados, filtración estéril o choque eléctrico.

8. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el o los materiales que contienen polifenoles se escogen a partir del grupo que comprende frutas, verduras, bayas, té, té verde, café, cacao, chocolate y corteza.

9. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde las frutas y bayas se escogen a partir del grupo de: arándanos, arándanos rojos, arándanos agrios, manzanas, plátanos, grosella, fresas, frambuesas, escaramujos, uvas, cítricos, aronia, membrillo japonés, endrina, escaramujo y baya de saúco, alcaparras, aceitunas u otras frutas ricas en polifenoles.

10. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la corteza se escoge de la canela.

11. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha composición es una composición farmacéutica o una composición alimentaria.

12. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 y cuya composición alimentaria es un producto alimentario o un suplemento alimentario.

13. Un producto reductor de la respuesta de insulina para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho producto alimentario se escoge a partir del grupo que comprende panes, quesos, yogures líquidos con zumo, bebidas dietéticas, barritas dietéticas, productos para untar, galletas y cereales.

Fig. 1

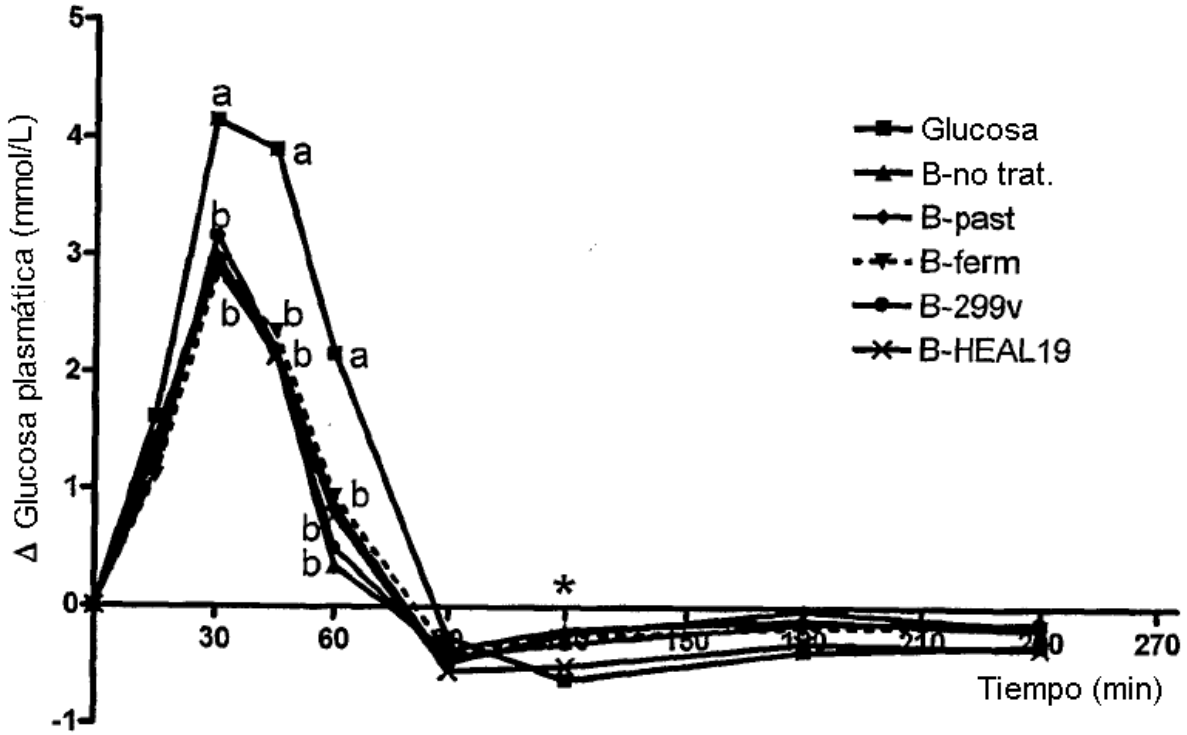

Δ Glucosa plasmática (mmol/L)
5
4
3
2
1
0
-1
30
60
270
Tiempo (min)
Glucosa
B-no trat.
B-past
B-ferm
B-299v
B-HEAL19
a
b
*

Fig. 2

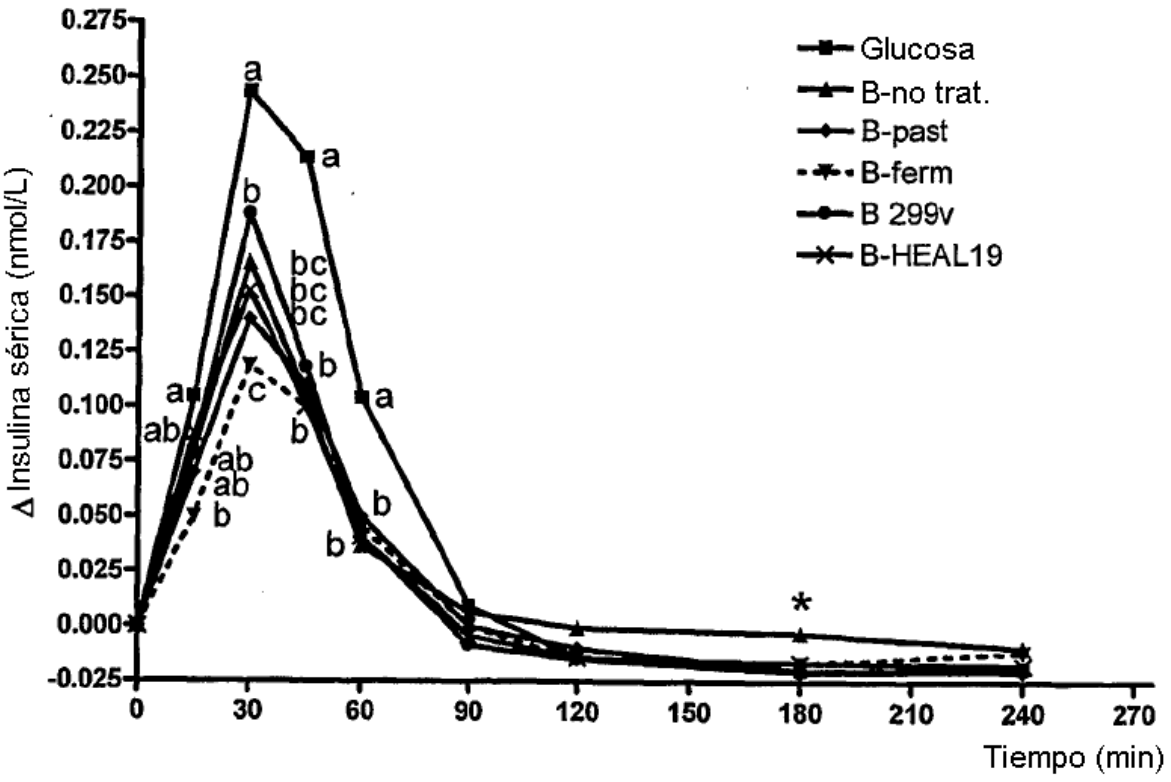

Glucosa
B-no trat.
B-past
B-ferm
B 299v
B-HEAL19
Δ Insulina sérica (nmol/L)
Tiempo (min)
0.275
0.250
0.225
0.200
0.175
0.150
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
-0.025
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
a
a
b
bc
bc
bc
b
a
a
ab
b
ab
ab
b
b
b
*

Fig. 3

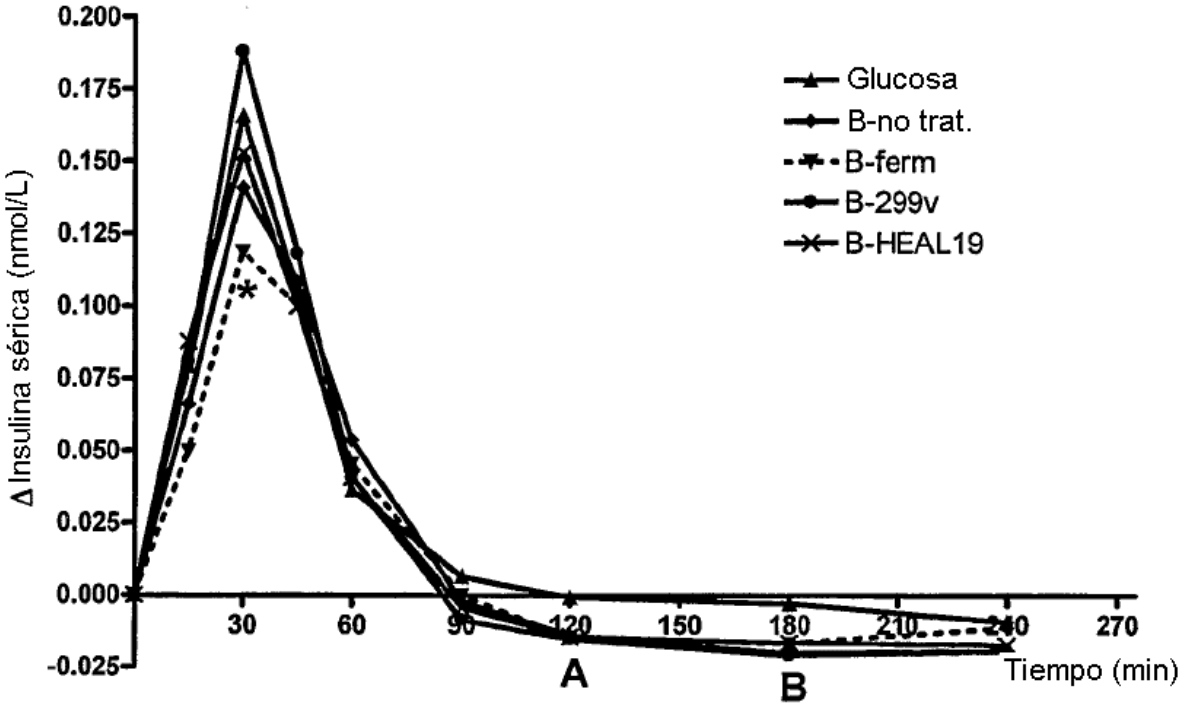

0.200
0.175
0.150
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
-0.025
Δ Insulina sérica (nmol/L)
30
60
90
120
150
180
210
240
270
Tiempo (min)
Glucosa
B-no trat.
B-ferm
B-299v
B-HEAL19
A
B

Fig. 4

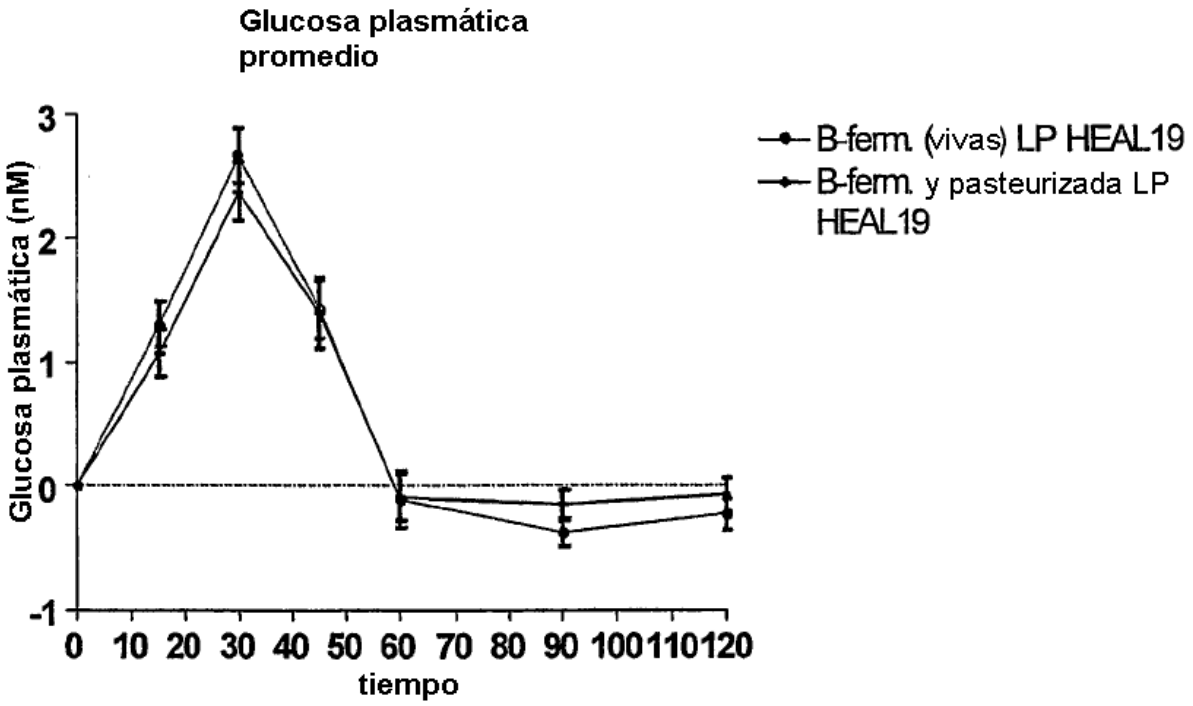

Glucosa plasmática promedio
Glucosa plasmática (nM)
3
2
1
0
-1
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
tiempo
B-ferm. (vivas) LP HEAL19
B-ferm. y pasteurizada LP HEAL19

Fig. 5

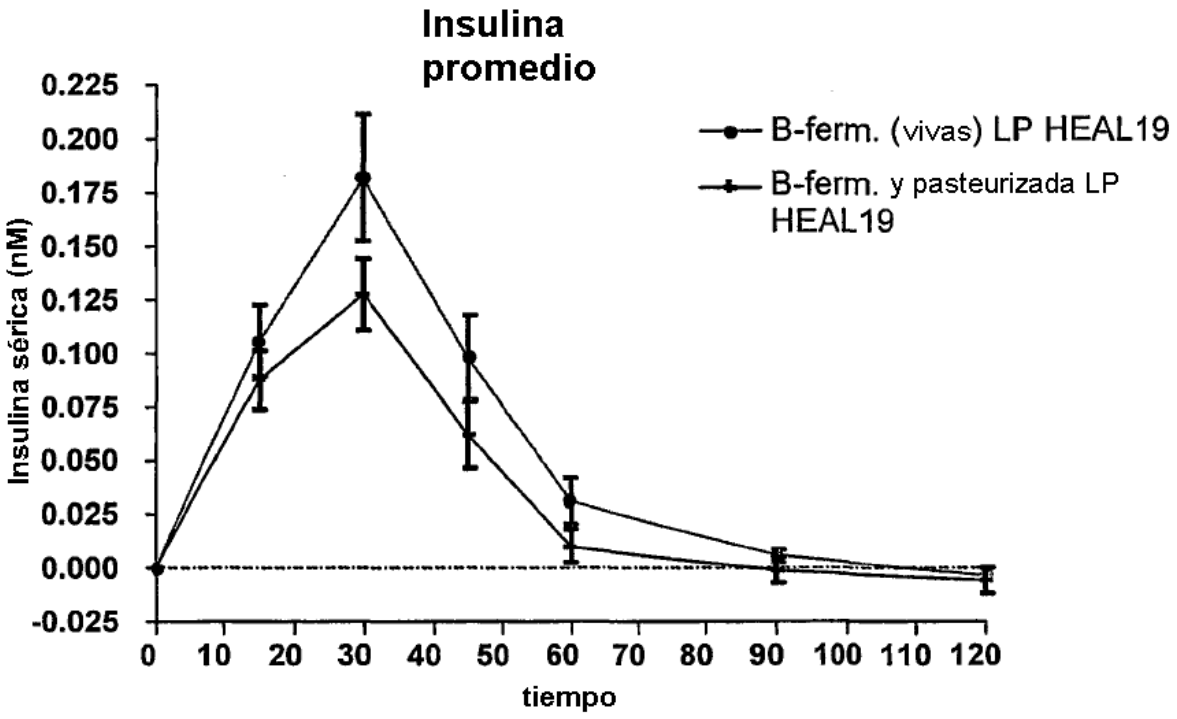

Insulina promedio
B-ferm. (vivas) LP HEAL19
B-ferm. y pasteurizada LP HEAL19
Insulina sérica (nM)
0.225
0.200
0.175
0.150
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
-0.025
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
tiempo

Fig. 6

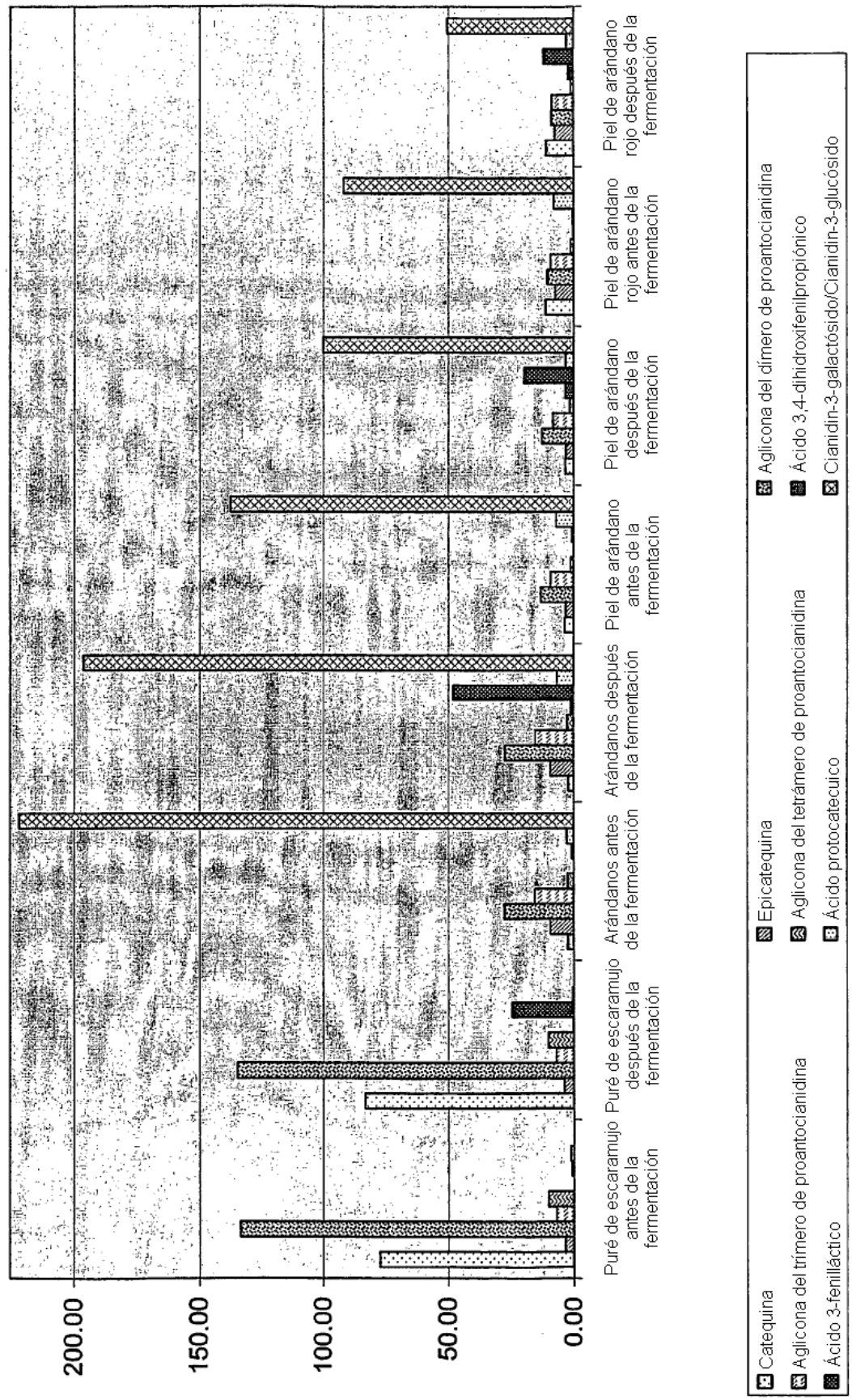
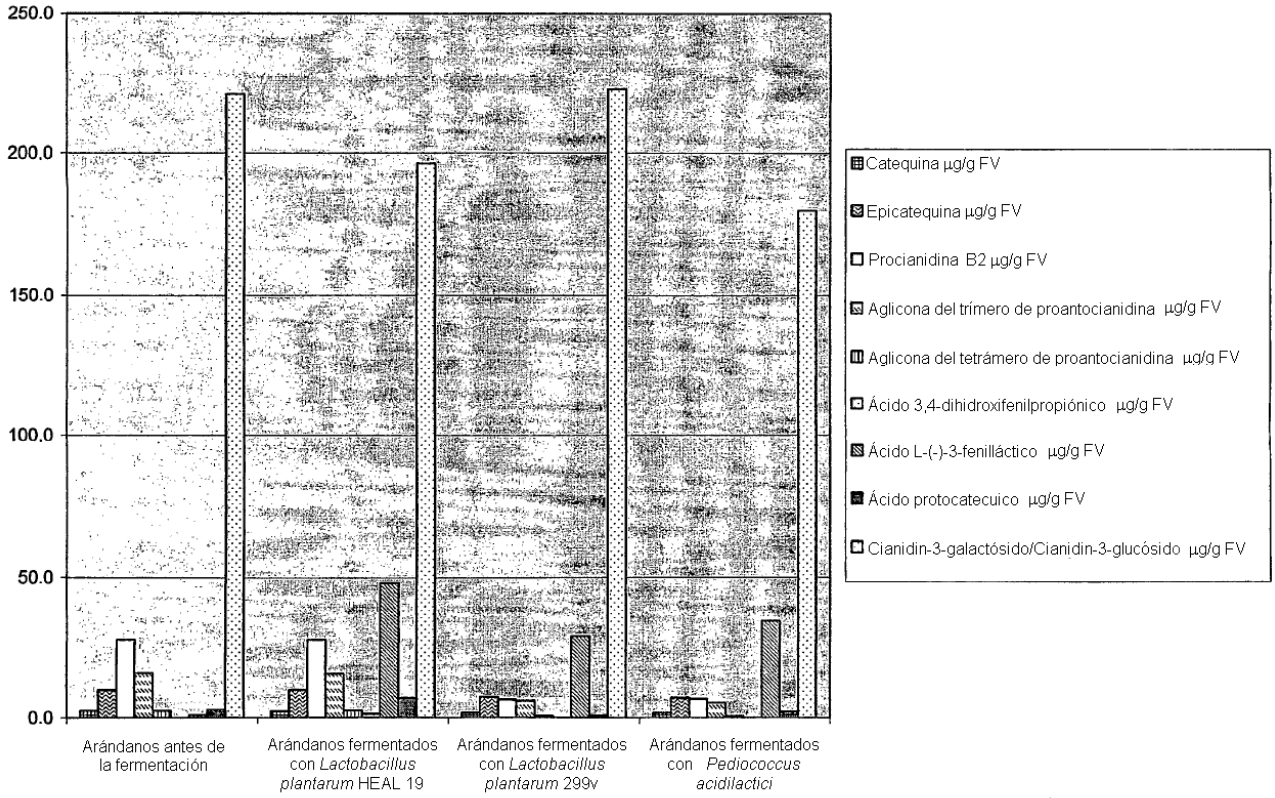

µg/g
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
Puré de escaramujo antes de la fermentación
Puré de escaramujo después de la fermentación
Arándanos antes de la fermentación
Arándanos después de la fermentación
Piel de arándano antes de la fermentación
Piel de arándano después de la fermentación
Piel de arándano rojo antes de la fermentación
Piel de arándano rojo después de la fermentación
Catequina
Epicatequina
Aglicona del dímero de proantocianidina
Aglicona del trímero de proantocianidina
Aglicona del tetrámero de proantocianidina
Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico
Ácido 3-fenillácticо
Ácido protocatecuico
Cianidin-3-galactósido/Cianidin-3-glucósido

Fig. 7


250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
Arándanos antes de la fermentación
Arándanos fermentados con *Lactobacillus plantarum* HEAL 19
Arándanos fermentados con *Lactobacillus plantarum* 299v
Arándanos fermentados con *Pediococcus acidilactici*
Catequina µg/g FV
Epicatequina µg/g FV
Procianidina B2 µg/g FV
Aglicona del trímero de proantocianidina µg/g FV
Aglicona del tetrámero de proantocianidina µg/g FV
Ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico µg/g FV
Ácido L-(-)-3-fenilláctico µg/g FV
Ácido protocatecuico µg/g FV
Cianidin-3-galactósido/Cianidin-3-glucósido µg/g FV