

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 404**

51 Int. Cl.:

A23L 2/52 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A23L 33/15 (2006.01)

A23L 2/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2009 PCT/NO2009/000112**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09120091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09725643 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2268163**

54 Título: **Fórmula de bebida que comprende aceite omega-3 fresco de origen marino y antioxidantes**

30 Prioridad:

27.03.2008 NO 20081487

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

30.08.2017

73 Titular/es:

**SMARTFISH AS (100.0%)
P.O. Box 77, Smestad
0309 Oslo, NO**

72 Inventor/es:

**MATHISEN, JANNE SANDE y
MATHISEN, HENRIK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 631 404 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fórmula de bebida que comprende aceite omega-3 fresco de origen marino y antioxidantes

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva fórmula de bebida que comprende aceite omega-3 fresco de origen marino en una emulsión y antioxidantes de acuerdo con la reivindicación 1, muy conocidos por ser beneficiosos para la salud de seres humanos. Se describe un proceso para llevar a cabo la producción de dicha bebida, pudiéndose usar la bebida para la producción de un medicamento.

Descripción de la técnica anterior

Los efectos beneficiosos para la salud de los aceites poliinsaturados son muy conocidos. También se conocen los efectos beneficiosos para la salud de los antioxidantes. Sin embargo, existe la necesidad de una composición que combine estos nutrientes en una fórmula que produzca un aumento de la absorción y de la que el organismo pueda utilizar los nutrientes de manera óptima. Existe la necesidad de nuevas composiciones en las que se formulen estos nutrientes nativos inestables beneficiosos para la salud, de manera que cada componente se mantenga intacto y fresco. Los efectos de los ácidos grasos omega-3 (EPA, DHA y DPA) en una serie de enfermedades y afecciones, tales como enfermedades cardiovasculares, mentales, cutáneas y el envejecimiento, están bien documentados. La suplementación de omega-3 aumenta en todo el mundo. Hay un aumento en el consumo de los productos que contienen omega-3, y el omega-3 en forma de pescado y/o complemento alimenticio es altamente recomendado por las autoridades sanitarias. El estrés oxidativo es una especie de "estrés químico" inducido por la presencia en nuestro organismo de cantidades anómalas de radicales libres. Cualquiera que sea la causa, se cree que el estrés oxidativo es responsable del envejecimiento prematuro y de una serie muy amplia de enfermedades comunes - aproximadamente un centenar - que abarcan de la hipertensión arterial a la aterosclerosis, del infarto al ictus, de la enfermedad de Parkinson a la enfermedad de Alzheimer, de la colitis a la pancreatitis, de la obesidad a la diabetes, de la bronquitis crónica a la artritis reumatoide, del SIDA a varios tipos de cáncer. El organismo está protegido contra los radicales libres por los antioxidantes, tanto por los autoproducidos como por los antioxidantes suministrados a través de alimentos y bebidas. Los antioxidantes pueden ser vitaminas, minerales y enzimas, ya sean liposolubles o hidrosolubles. En situaciones en las que el organismo está sometido a una potenciación de la oxidación (una gran cantidad de radicales libres), el organismo podría no tener suficientes antioxidantes para neutralizar o inactivar los radicales libres. Se producen reacciones en cadena destructivas, que podrían causar un aumento del estrés oxidativo perjudicial.

Un método convencional de medición del estado oxidativo es el FRAS (*Free Radical Analytical System*: sistema de análisis de radicales libres). El ensayo se evalúa en una unidad de medición convencional denominada U. Carr (del químico Carratelli, el inventor del ensayo). El método es rápido y solo se requiere una gota de sangre extraída de la punta del dedo.

La siguiente tabla da una visión general de los valores oxidativos normales y elevados.

	Valores FRAS
Valores normales	250-300 U. Carr
Valores límite	300-320 U. Carr (que muestran un nivel ligeramente elevado de radicales libres que podría conducir a condiciones de estrés oxidativo)
Estrés oxidativo leve	320-340 U. Carr
Estrés oxidativo moderado	340-400 U. Carr
Estrés oxidativo grave	400-500 U. Carr

La base teórica para los efectos de los antioxidantes es bien conocida. También se sabe que la absorción de los antioxidantes en el organismo a partir de suplementos antioxidantes es un desafío. Sin embargo, los estudios han demostrado que los antioxidantes en una forma no nativa o como vitaminas aisladas son captados de manera inadecuada por el organismo. Algunos estudios indican que la ingestión de altas dosis de vitaminas aisladas puede convertir los antioxidantes en prooxidantes, lo que conduce a una elevada oxidación en el organismo. Los estudios y la literatura indican una mejor absorción y biodisponibilidad de los antioxidantes que están presentes de manera natural cuando se consumen en alimentos, por ejemplo, como frutas y verduras.

Se sabe que los seres humanos que tienen estrés oxidativo grave suelen tener deficiencia en ácidos grasos omega-3 (DHA y EPA), y poseen un bajo estado antioxidante.

El daño oxidativo y la deficiencia de antioxidantes se consideran ahora factores cruciales para muchas enfermedades, y son probablemente la principal razón de que se produzca un reemplazo imperfecto de las células envejecidas dañadas por células nuevas.

60

Los trabajos de investigación han demostrado que los productos de oxidación de los ácidos grasos son altamente reactivos y que pueden afectar e interferir en los procesos intracelulares. Muchos suplementos de omega-3 disponibles en el mercado contienen aceite de pescado que tiene un grado significativo de oxidación que, a su vez, puede inducir efectos adversos en los procesos intracelulares.

Aunque estos suplementos dietéticos suelen ser antioxidantes añadidos, esto no invertirá la rancidez ya presente en el suplemento dietético. Por otra parte, para evitar la oxidación adicional del aceite de pescado insaturado, los antioxidantes del suplemento se consumirán y, finalmente, (tras algunos meses) se agotarán. Por lo tanto, los antioxidantes de los suplementos dietéticos disponibles en el mercado no inducirán ningún efecto beneficioso para la salud en los seres humanos.

Por lo tanto, existe la necesidad de una nueva composición que combine el aceite de pescado fresco y antioxidantes específicos para proporcionar una nueva fórmula de bebida que tenga efectos beneficiosos para la salud en los seres humanos.

Presente invención

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una nueva fórmula de bebida que comprenda aceite de omega-3 fresco de origen marino y antioxidantes conocidos por ser beneficiosos para la salud en los seres humanos.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un proceso de producción de la nueva fórmula de bebida, en el que el aceite de pescado se emulsiona y se manipula en condiciones suaves a través de un mínimo de etapas del proceso.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una bebida para su uso como bebida terapéutica. Los antioxidantes específicos que se incluirán en la bebida se seleccionan de acuerdo con la enfermedad o el trastorno que se vaya a tratar.

Estos y otros objetivos se consiguen mediante la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una bebida que combina aceite fresco de origen marino y antioxidantes específicos. Los antioxidantes que tienen un efecto beneficioso para la salud en los seres humanos están presentes en la bebida para reducir el estrés oxidativo del ser humano, no con el fin de estabilizar el aceite en la preparación. La bebida puede ser una bebida funcional o una bebida terapéutica, una bebida para saciar la sed o una bebida normal. Preferentemente, la bebida tiene una base que contiene antioxidantes naturales, por ejemplo, zumo de frutas o verduras, té verde, pero se puede usar cualquier líquido potable.

La nueva bebida combina la emulsión de omega-3 estable conocida de la técnica anterior, y antioxidantes muy conocidos por sus beneficios para la salud. La bebida revela características sorprendentes en cuanto a la absorción de los antioxidantes y al efecto de los antioxidantes en el organismo. En comparación con el estado de la técnica en el que las cantidades correspondientes de omega-3 y antioxidantes se ingieren en diferentes fórmulas, la bebida de acuerdo con la presente invención muestra un suministro mejorado, una captación mejorada y un efecto mejorado sobre el estrés oxidativo.

Tanto el aceite omega-3 como los antioxidantes contenidos en la bebida de acuerdo con la invención son notablemente estables en la composición, y el progreso de la rancidez y la pérdida de los efectos antioxidantes son mucho más bajos que en el producto conocido formulado como cápsulas separadas. Un aspecto de la presente invención se refiere a una bebida que comprende aceite fresco de origen marino en una emulsión de aceite en agua, en la que el aceite de origen marino tiene un valor TOTOX inferior a 10, añadiéndose además al menos un antioxidante no presente de manera natural en dicha emulsión de aceite en agua. La expresión "aceite fresco de origen marino" describe un aceite preparado a partir de pescado fresco donde todas las etapas del proceso se realizan cuidadosamente y bajo un estricto control del oxígeno de acuerdo con las normas funcionales para el aceite con el fin de prevenir la oxidación del aceite. El aceite fresco de origen marino tendrá un bajo estado oxidativo, revelando un aceite incoloro sin el olor ni el sabor característicos del pescado. El nivel de oxidación dado como valor TOTOX (el doble del valor de peróxido (PV) más el valor de anisidina (AV)) debe ser inferior a 10, preferentemente inferior a 8 y lo más preferentemente inferior a 5. El aceite de origen marino presente en muchos complementos alimenticios de hoy en día contiene aceite con un valor TOTOX mucho más alto, normalmente de 20 a 30 o incluso más alto. El aceite fresco de origen marino puede ser cualquier aceite rico en omega-3, por ejemplo, aceite de pescado, aceite de foca o aceite de krill. El aceite puede mezclarse con otros aceites poliinsaturados de origen vegetal tales como aceite de algas y aceite de hierbas tal como aceite de onagra y aceite de colza. La presente invención proporciona una bebida en la que el contenido de aceite de origen marino es del aproximadamente 0,5 % al 5 % en peso basado en el peso total, más preferentemente en el intervalo del 0,5 % al 3 %, más preferentemente en el intervalo del 1,5 % al 2,5 %. La emulsión de aceite en agua se prepara mediante cualquier método convencional, preferentemente como se describe en las solicitudes noruegas n.º 20044542, 20053136 y 20055620, propiedad de las solicitantes. En dichas emulsiones, los antioxidantes están presentes para estabilizar el aceite

durante la producción y el almacenamiento, no con el fin de inducir ningún efecto beneficioso para la salud en seres humanos. La fase acuosa de la emulsión de aceite en agua es preferentemente una fase acuosa que contiene antioxidantes naturales, por ejemplo, zumos de frutas/verduras, té verde, té blanco y té de hierbas. El zumo puede ser un zumo recién exprimido, o un zumo en forma de concentrado de zumo o puré de zumo diluido para obtener un zumo listo para su uso normal. La fase acuosa también puede contener proteínas tales como soja, proteínas de avena, proteínas de suero de la leche y/o proteínas de la leche.

De acuerdo con la invención, la expresión “antioxidantes añadidos o añadidos adicionales” debe entenderse como antioxidantes no presentes de manera natural en la fase acuosa u oleaginosa, sino que se añaden por separado. El antioxidante añadido adicional puede ser similar a uno o más antioxidantes presentes de manera natural en la fase acuosa u oleaginosa, o diferentes. El al menos un antioxidante añadido adicional puede ser uno o una combinación de dos o más antioxidantes.

Los antioxidantes útiles de acuerdo con la presente invención son antioxidantes conocidos por tener efectos beneficiosos para la salud en los seres humanos. Los antioxidantes útiles son, por ejemplo, astaxantina, vitamina E, vitamina C, betacaroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, glutatión, flavonoides, carotenoides, fenoles vegetales, polifenoles, coenzima Q10, resveratrol, curcumina, picnogenol, selen, cobre, cinc y magnesio. Los antioxidantes pueden presentarse individualmente o en una mezcla de dos o más. Los antioxidantes se pueden seleccionar para satisfacer fines específicos, es decir, los efectos deseables para la salud que se han de conseguir. Como ejemplos, una bebida de acuerdo con la invención que comprende luteína y zeaxantina tendrá probablemente un impacto positivo en diferentes condiciones oculares. Una bebida de acuerdo con la invención que comprende la curcumina rica en antioxidantes es adecuada para aliviar la inflamación y combatir las infecciones. Una bebida de acuerdo con la invención que comprende CoQ10 puede ser útil para los trastornos neurológicos. Además, una bebida de acuerdo con la invención que comprende picnogenol puede ser beneficiosa para reducir la artrosis. El betacaroteno añadido a dicha bebida puede ser útil para los trastornos respiratorios, y la CoQ10 y el selenio serán útiles para los trastornos cardiovasculares.

En una realización de la presente invención, se pueden añadir a la bebida prebióticos y/o probióticos.

En una realización de la presente invención, la bebida puede ser carbonatada.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un proceso de producción de una bebida de acuerdo con la invención que comprende las siguientes etapas:

- a) se añaden antioxidantes y agentes aromatizantes liposolubles junto con emulsionante a la fase oleaginosa;
- b) se añaden aditivos hidrosolubles a la fase acuosa;
- c) se mezclan la fase oleaginosa y acuosa, obteniéndose una emulsión homogénea;
- d) se somete la emulsión obtenida, opcionalmente, a procesos de pasteurización y/u homogeneización;
- e) se enfría la emulsión obtenida y se usa para llenar recipientes desechables limpios; en el que todas las etapas se realizan bajo un estricto control del oxígeno.

Como alternativa, el proceso de producción de una bebida de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- a) se añaden antioxidantes y agentes aromatizantes liposolubles a la fase oleaginosa;
- b) se añaden aditivos hidrosolubles a la fase acuosa;
- c) se mezclan la fase oleaginosa y acuosa, y se añade el emulsionante, seguido de un mezclado suave, obteniéndose una emulsión homogénea;
- d) se somete la emulsión obtenida, opcionalmente, a procesos de pasteurización y/u homogeneización;
- e) se enfría la emulsión obtenida y se usa para llenar recipientes desechables limpios;

en el que todas las etapas se realizan bajo un estricto control del oxígeno.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una bebida para su uso como bebida terapéutica. Otros aspectos se refieren al uso de una bebida de acuerdo con la invención para la producción de un preparado medicinal para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo elevado, tales como cáncer, trastornos inflamatorios, trastornos neurológicos, trastornos cardiovasculares y trastornos respiratorios.

Se ha encontrado, sorprendentemente, que la nueva fórmula de bebida que combina ácidos grasos omega-3 frescos y al menos un antioxidante añadido tiene un mayor efecto beneficioso para la salud en comparación con los complementos alimenticios en los que el aceite de origen marino y los antioxidantes se ingieren en fórmulas separadas, por ejemplo, cápsulas, píldoras o comprimidos. Se cree que la formulación específica de la invención es de gran importancia, presentando los nutrientes esenciales y los agentes específicos beneficiosos para la salud (ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes añadidos) al sistema digestivo y a las células en un formato altamente beneficioso para las células y para el organismo.

Figuras

La **Figura 1** muestra el efecto de los aceites de origen marino sobre la peroxidación lipídica en células U937. Las células se incubaron durante 48 h con diferentes concentraciones de ácidos grasos omega-3 de diferentes proveedores como se muestra en la leyenda. Las concentraciones se indican en el eje X. El eje Y muestra los niveles relativos de peroxidación lipídica usando la fluorescencia mediada por DPPH como un sensor. Se indica la desviación típica.

REALIZACIONES

La invención se ilustrará ahora mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Bebida de acuerdo con la invención

El aceite de origen marino usado en todos los preparados fue el aceite de salmón Xalar de Marine Harvest Ingredients, número de lote: 099000F016. El valor TOTOX era inferior a 5, y la preparación se realizó de acuerdo con las normas funcionales para el aceite.

Ejemplo 1 - comparativo

Bebida que comprende emulsión de omega-3 fresco de origen marino y astaxantina

	%
Agua, purificada	42,31
Zumo de verduras	45,00
Extracto de romero 201	0,02
Toco 50	0,01
Grindsted 3115	1,00
Concentrado de zumo de manzana	10,00
Aroma de limón Nat	0,15
Astaxantina	0,01
Aceite de origen marino	1,50
Suma	100,00

Zumo de verduras Granini

Grindsted 3115 de Dansico

Aroma de limón Nat de Firmencih.

Haematococcus pluvialis en polvo de calidad alimentaria (complejo de astaxantina esterificado de biomasa del alga *Haematococcus pluvialis*), suministrado por: Sinochem Hebei corporation, 707 Lianmeng, Shijiazhuang, China.

- comparativo.

Bebida que comprende emulsión de omega-3 fresco de origen marino suministrada con vitamina C y E.

	%	kg
Extracto de romero 201	0,02	0,16
Toco 50	0,01	0,08
Grindsted 3115	1,00	8,00
Concentrado de manzana	6,05	48,40
Concentrado de manzana y granada	2,40	19,20
Concentrado de aronia	0,80	6,40
Concentrado de pera	6,49	51,92
Agua, purificada	81,00	648,00
Aroma de naranja/mandarina	0,10	0,80
Aroma de frambuesa	0,12	0,96
Vitamina C	0,01	0,80
Selenio		0,4
Vitamina E		0,08
Aceite mineral	2,00	16,00
Suma	100,00	800,80
Aroma de frambuesa natural de Firmenich		

Aroma de naranja/mandarina natural de Firmenich
 Vitamina E: D-alfa, D-delta, D-gamma tocoferol y D-gamma tocotrenol
 Vitamina C: Calsio-L-ascorbato (ácido neutro)
 Selenio: metionina de L(+)-selenio;
 Todo de G.O. Johnsen

Ejemplo 3

Bebida que comprende ácidos grasos omega-3 frescos de origen marino emulsionados, y licopeno y luteína.

5

	%
Extracto de romero 201	0,020
Toco 50	0,01
Grindsted 3115	1,00
Proteína de suero lácteo	0,45
Concentrado de manzana	6,23
Concentrado de granada	2,40
Concentrado de aronia	0,88
Concentrado de pera	5,56
Agua, purificada	81,48
Aroma de naranja/mandarina	0,10
Aroma de frambuesa	0,20
Aceite de origen marino	1,50
Lyconat (licopeno al 6 %)	0,12
Lutenat (luteína al 10 %)	0,05
Suma	100,00
Extracto de romero 201, Toco 50 y Grindsted 3115 de Dansico Proteína de suero lácteo de Arla Foods Agentes aromatizantes naturales de Firmenich Licopeno natural (Lyconat) de Vitatene Luteína natural (Lutenat) de Vitatene	

Ejemplo 4 - Comparativo

Bebida que comprende ácidos grasos omega-3 frescos de origen marino emulsionados y luteína.

10

	%
Extracto de romero 201	0,020
Toco 50	0,01
Grindsted 3115	1,00
Concentrado de manzana	3,23
Concentrado de granada	1,40
Concentrado de uva blanca	2,56
Leche de soja	58,40
Agua, purificada	31,42
Aroma de albaricoque	0,25
Aroma de limón	0,10
Aceite de origen marino	1,50
Luteína	0,11
Suma	100,00
Extracto de romero 201, Toco 50 y Grindsted 3115 de Dansico Agentes aromatizantes naturales de Firmenich Aceite de salmón para Marine Harvest Ingredients, TOTOX inferior a 5 y procesado de acuerdo con las normas funcionales para el aceite Luteína natural (Lutenat OS al 10 %) de Vitatene, Italia	

Ejemplo 5 - Comparativo

Bebida que comprende ácidos grasos omega-3 frescos de origen marino emulsionados, y CoQ10 y selenio.

15

	%
Extracto de romero 201	0,02
Toco 50	0,01
Proteínas de suero lácteo	0,35

	%
Grindsted 3115	1,20
Concentrado de manzana	6,66
Concentrado de granada	1,90
Concentrado de aronia	2,56
Agua, purificada	84,15
Aroma de mangostán	0,25
Aroma de umbu	0,10
Aceite de origen marino	2,50
CoQ10 (%)	0,30
Selenio	50 µg
Vitamina D	1,5 µg
Suma	100,00
Extracto de romero 201, Toco 50 y Grindsted 3115 de Dansico Agentes aromatizantes naturales de Cargill Selenio suministrado por: Sinochem Hebei corporation, 707 Liamneng, Shijazhuang, China Coenzima Q10 de DSM Vitamina D de G. O. Johnsen Proteína de suero lácteo de Arla Foods	

Ejemplo 6

PROCESO DE PRODUCCIÓN

5

1. Fase oleaginosa

Se mezcla el aceite con extracto de romero, Toco 50 (un preparado antioxidante favorable a la estabilización del aceite). Es importante que el aceite esté protegido contra la oxidación durante el procesamiento. A continuación, se añade el emulsionante (Grindsted 3115) al aceite, se mezcla suavemente a temperatura ambiente hasta obtenerse una mezcla homogénea. Después, se añaden los agentes aromatizantes.

10

2. Antioxidantes

Los antioxidantes liposolubles se mezclan con la fase oleaginosa y los antioxidantes hidrosolubles se mezclan con la fase acuosa antes del calentamiento. Opcionalmente, los antioxidantes hidrosolubles se mezclan con la fase acuosa después del calentamiento a través de sistemas especializados tales como Flexdose (solución Tetra Pack), o se añaden a un depósito estéril a través de un proceso ultrapuro.

15

3. Fase acuosa

20

Se llena un tanque con agua purificada y desionizada. Se añade la fase oleaginosa a la fase acuosa.

25

Opcionalmente, la fase oleaginosa puede mezclarse con la fase acuosa, tras lo que se añade el emulsionante y se obtiene una emulsión. A continuación, se añaden los concentrados de fruta a la emulsión obtenida y se mezclan a fondo.

30

Como alternativa, se puede someter la emulsión obtenida a una pasteurización rápida (aproximadamente 90 °C durante 8 s), seguida de la homogeneización y el enfriamiento hasta una temperatura de 4 a 8 °C.

Finalmente, se usa la bebida para llenar recipientes asépticos herméticos, preferentemente recipientes monodosis, por ejemplo, Tetra Brick de aproximadamente 200 ml, y se almacenan a 6-8 °C hasta su uso.

Se debe realizar un estricto control del oxígeno en todas las etapas para evitar la oxidación del aceite de origen marino.

35

EFFECTOS QUE FAVORECEN LA SALUD DE LA BEBIDA DE ACUERDO CON LA INVENCIÓN

Materiales y métodos

40

Para investigar los efectos fisiológicos de la bebida de acuerdo con la invención, se ha analizado la oxidación de los PUFA en membranas celulares. Se usó un sensor fluorescente de peroxidación lipídica denominado difenil-1-pirenilfosfina (DPPP) para evaluar la peroxidación lipídica. La DPPP se incorpora rápidamente a la membrana celular y, tras la oxidación, emite luz, que puede medirse con un fluorómetro (Okimoto *et al.*, *FEBS Letter*, junio de 2000). Se analizaron y se compararon las muestras de acuerdo con la invención y las muestras que contenían aceite de pescado de cápsulas de aceite de origen marino disponibles en el mercado.

45

Preparación de las muestras

5 La bebida descrita en el Ejemplo 3 se usó y se identificó como la muestra 1 = Smartfish. La bebida contiene 900 mg de omega-3 por cada 200 ml de bebida. La cantidad de licopeno y de luteína es de 16 mg y 10 mg por cada 900 mg de omega-3, respectivamente.

Mejor antes de: 15-08-09. Sabor y olor a fruta fresca. No se pudo experimentar olor ni sabor a aceite de pescado. Aspecto jugoso rojo oscuro homogéneo.

10 Se prepararon muestras de referencia a partir de cápsulas disponibles en el mercado que contenían aceite de origen marino.

Muestra de referencia 1 = Triomega

15 Triomega (Lote n.º: 56416408; Midelfart) que contiene 620 mg de omega-3 por cada g de aceite. Mejor antes de: 06-11-2010. Color: Claro. Olor: Débil pero detectable.

Muestra de referencia 2 = Omega 3.

20 Omega 3 (Lote n.º: 58212708, Eldorado) que contiene 570 mg de omega-3 por cada g de aceite. Mejor antes de: 27-10-2010. Color: claro; Olor: débil pero detectable.

Muestra de referencia 3 = Direct Care

25 CAREMAX (Lote n.º 71105, Direct Care) que contiene 600 mg de omega-3 por cada g de aceite. Mejor antes de: octubre de 2009; Color marrón; Olor: fuerte.

30 La muestra de referencia 1 y 2 está disponible en las tiendas y se adquirió en una tienda de comestibles. La muestra de referencia 3 se ordenó a través de Internet.

35 Se recogieron los aceites de origen marino de las cápsulas con una jeringuilla y se mezclaron con el mismo emulsionante que se usó en la bebida de acuerdo con la invención, es decir, Grindsted 3115. Se mezclaron 1,5 g de aceite de origen marino con 0,75 g de emulsionante (aceite de origen marino:emulsionante 2:1). Se añadió medio celular para dar un volumen total de 10 ml, proporcionando una emulsión de aceite en agua. La adición del medio se siguió mediante agitación con formación de vórtice.

40 Se añaden a la muestra 1 licopeno y luteína. Así pues, los aceites de origen marino de las cápsulas se complementaron con licopeno y luteína para corresponder a la cantidad de licopeno y luteína presentes en la muestra 1.

45 Se adquirieron el licopeno y la luteína en Sigma-Aldrich y se disolvieron en DMSO (Sigma-Aldrich) hasta soluciones madre que contenían 3,6 µg/µl o 2,2 µg/µl, respectivamente. Se añadieron 10 µl de las soluciones madre a 316 µl de aceite de origen marino de las muestras de referencia para conseguir cantidades correspondientes de licopeno y de luteína como en la muestra 1 de la invención. La siguiente Tabla 1 muestra la preparación de soluciones madre y la adición a las muestras de referencia.

	Licopeno en DMSO	Luteína en DMSO	Vol añadido a ω-3 3.160 µM
Soluciones madre	3,6 µg/µl (1 mg/277 µl de DMSO)	2,2 µg/µl (1 mg/454 µl de DMSO)	10 µl de cada

Tabla 2: Visión de conjunto de la preparación de las muestras

	Omega-3 (ω-3)	Moles de ω-3/g	Licopeno	Luteína
Muestra 1 - Smartfish	900 mg/200 ml de zumo	14 µmol/g de zumo	16 mg/900 mg de ω3	10 mg/900 mg de ω3
Muestra de ref. 1 - Triomega	620 mg/g de aceite	1,94 mmol/g de aceite	11 mg/620 mg de ω3	6,8 mg/620 mg de ω3
Muestra de ref. 2 – Omega 3	570 mg/g de aceite	1,78 mmol/g de aceite	10,1 mg/570 mg de ω3	10,1 mg/570 mg de ω3
Muestra de ref. 3 – Direct care	600 mg/g de aceite	1,87 mmol/g de aceite	10,7 mg/600 mg de ω3	10,7 mg/600 mg de ω3
Para todas las muestras			18 µg/mg de ω3	11 µg/mg de ω3

50 **Células**

Células U937 (ATCC n.º CRL-1593.2™), una línea celular de monoblastos humanos, que se transfectan establemente con NF-κB-RE unido a luciferasa. Las células se cultivaron en RPMI + L-glut, FCS al 10 %, 2 x P/S, higromicina.

Se incubaron las células con la muestra 1 y la muestra de referencia 1-3 a concentraciones de ácidos grasos omega-3 que variaban de 1 μM a ~3000 μM durante 48 horas. Las muestras se complementaron con lipoproteína lipasa, que hidroliza y libera ácidos grasos de la cadena principal de glicerol de los triglicéridos como se describe a continuación.

Sonda para la peroxidación lipídica:

Se adquirió dipenil-1-pirenilfosfina (DPPP, D7894, lote n.º 29055W) en Invitrogen. PM: 386,43 g/mol, 5 mg. Excitación/emisión: 351/380 nm. Solución madre: 5 mM (5 mg en 2,6 ml de DMSO).

Lipasa

Se añadieron 10 unidades de lipoproteína lipasa de leche bovina (de Sigma-Aldrich, L2254, lote n.º 114K7430) a las células que contenían las mayores concentraciones de ácidos grasos omega-3 en los aceites de origen marino. Tras la dilución de las muestras, se diluyó la lipasa correspondientemente. Por lo tanto, la concentración más baja de las muestras ricas en omega-3 (1 μM) contenía 0,003 unidades de lipoproteína lipasa.

Tratamiento de las células y mediciones de la oxidación de DPPP, LDH y contenido de proteínas

La muestra 1 de acuerdo con la invención y las muestras de referencia 1-3 que contenían licopeno y luteína se prepararon como soluciones madre que contenían 14.000 μM y 300.000 μM de ácidos grasos omega-3, respectivamente. Se calcularon las concentraciones de ácidos grasos omega-3 basándose en el contenido de omega-3 enumerado en las descripciones del producto. Dado que las muestras son aceites de pescado, los ácidos grasos omega-3 se presentan a las células como triglicéridos, y no como ácidos grasos libres. Se diluyeron más, dando concentraciones finales en el medio celular que variaban de 1 a 3.160 μmol/l por triplicado (véase la Tabla 5 para la configuración de la placa). Se añadieron licopeno, luteína y lipoproteína lipasa para diluir las muestras destinadas a las células con omega-3 3.160 μM, y se diluyeron más de acuerdo con las Tablas 3 y 4. Se sembraron las células (10⁵) en placas de 96 pocillos con 100 μl de medio. Antes de la adición de las muestras, se cambió el medio y se añadieron a las células 50 μl de medio/pocillo. A continuación, se añadieron 50 μl de las diferentes diluciones que contenían todos los ingredientes indicados a las células. Las células se incubaron entonces durante 48 horas a 37 °C y se prepararon para la evaluación de la fluorescencia de DPPP de acuerdo con un método ligeramente modificado descrito por Okimotoa (Okimotoa *et al.*, *FEBS Letter*, junio de 2000).

	Conc. (μM) de Omega-3	Vol (μl)	Volumen medio (μl)	Volumen total (μl)
Solución madre de aceite	14.000			2.000
	6.320*	450	550	1.000
	2.000*	316	684	1.000
	632*	316	684	1.000
	200*	316	684	1.000
	63,2*	316	684	1.000
	20*	316	684	1.000
	6,32*	316	684	1.000
	2*	316	684	1.000

	Conc. (μM) de Omega-3	Vol (μl)	Volumen medio (μl)	Volumen total (μl)
Solución madre de aceite	300.000			
	6.320*	21	979	1.000
	2.000*	316	684	1.000
	632*	316	684	1.000
	200*	316	684	1.000
	63,2*	316	684	1.000
	20*	316	684	1.000
	6,32*	316	684	1.000
	2*	316	684	1.000

*Las concentraciones se indican como el doble de la conc. final en el medio celular, porque se diluyó más cuando se añadieron 50 µl de las soluciones a las células que contenían 50 µl de medio celular

Tabla 5: Configuración de la placa; concentración de Omega-3

DPPP	+			+			+			+		
Lipasa	+			+			+			+		
	Muestra 1 "Smartfish"			Muestra de ref.1 "Triomega"			Muestra de ref. 2 "Omega 3"			Muestra de ref. 3 "Care direct"		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3.160 µM			3.160 µM			3.160 µM			3.160 µM		
B	1.000 µM			1.000 µM			1.000 µM			1.000 µM		
C	316 µM			316 µM			316 µM			316 µM		
D	100 µM			100 µM			100 µM			100 µM		
E	31,6 µM			31,6 µM			31,6 µM			31,6 µM		
F	10 µM			10 µM			10 µM			10 µM		
G	3,16 µM			3,16 µM			3,16 µM			3,16 µM		
H	1 µM			1 µM			1 µM			1 µM		

5 Para las mediciones de DPPP, se lavaron las células 2 veces en solución salina tamponada con fosfato y se añadió DPPP a una concentración final de 50 µmol/l. Esto se realizó en condiciones de oscuridad para evitar la oxidación inducida por la luz de DPPP. A continuación, se midieron las células que contenían la DPPP para determinar la fluorescencia usando un espectrofluorímetro (Spectramax Molecular Devices) 3 horas después de la adición de DPPP.

10 Las mediciones de proteínas se realizaron en lisados celulares después de las evaluaciones de la DPPP. Las proteínas se midieron de acuerdo con un kit Bio-rad (ensayo de absorbancia colorométrica) y se usaron para calcular los valores relativos.

Resultados

15 La Tabla 6 muestra los valores fluorescentes normalizados de muestras de Smartfish, emulsión (control) y de referencia después de la incubación de células U937 durante 48 h. La fluorescencia se basa en la oxidación de la DPPP con el consiguiente cambio en la intensidad de la fluorescencia. Los datos se presentan como valores normalizados corregidos para el contenido de proteínas en lisados celulares. Se indican ± desviación típica.

20

Tabla 6

Concentraciones de Omega-3		Muestra 1 Smartfish	Emulsión de control	Muestra de ref. 1 Triomega	Muestra de ref. 2 Omega 3	Muestra de ref. 3 Care direct
1 µM	DT de DPPP	100,0 ± 7,0	100,0 ± 7,9	100,0 ± 2,1	100,0 ± 4,7	100,0 ± 9,6
3,16 µM	DT de DPPP	98,0 ± 7,5	100,0 ± 8,0	97,7 ± 71,1	101,2 ± 8,6	101,6 ± 6,7
10 µM	DT de DPPP	97,6 ± 6,2	98,4 ± 3,8	106,2 ± 5,5	106,1 ± 13,3	111,9 ± 4,6
31,6 µM	DT de DPPP	102,2 ± 9,8	101,8 ± 2,1	106,0 ± 9,7	117,9 ± 17,0	114,9 ± 8,9
100 µM	DT de DPPP	95,1 ± 9,9	105,1 ± 3,7	98,5 ± 0,8	132,1 ± 23,5	121,7 ± 11,8
316 µM	DT de DPPP	94,2 ± 14,2	113,3 ± 3,7	107,2 ± 11,1	132,9 ± 19,2	137,1 ± 8,1
1.000 µM	DT de DPPP	97,2 ± 7,6	102,3 ± 11,5	110,6 ± 2,7	136,3 ± 43,6	168,9 ± 11,7
3.160 µM	DT de DPPP	95,2 ± 15,1	98,2 ± 9,2	121,9 ± 13,0	176,0 ± 31,7	239,1 ± 12,8

Efecto de los aceites de origen marino en la peroxidación lipídica en células U937

25 Los resultados muestran que no se observó peroxidación lipídica detectable en las células incubadas con la muestra de acuerdo con la invención en ninguna de las dosis usadas, en comparación con los controles que recibieron solo el medio celular (datos no mostrados) o una emulsión sin aceite añadido. Para las muestras de referencia, se encontró un aumento dependiente de la dosis en la peroxidación lipídica. En particular, el grado de peroxidación lipídica coincidió con el olor y el aspecto de color de los productos de aceite de origen marino. El olor y el color son
30 indicativos de la oxidación del aceite. La adición de licopeno y luteína a los aceites a concentraciones comparables a

las de la muestra 1 de acuerdo con la invención no fue suficiente para inhibir la peroxidación lipídica.

Como se observa en la Tabla 6 y en la Figura 1, no se observó ningún efecto en la fluorescencia mediada por DPPP con las dos concentraciones más bajas, es decir, 1 μM y 3,16 μM de la muestra de acuerdo con la invención o las muestras de referencia. Esto indica que a estas concentraciones no se ha producido ninguna peroxidación lipídica detectable en la membrana celular. A mayores concentraciones, se observa un débil aumento para todos los aceites, a excepción de la muestra de acuerdo con la invención. De 10 μM en adelante, parece ser evidente un cambio gradual en la señal. A 100 μM , hay una diferencia significativa entre la muestra 1 de acuerdo con la invención y la muestra de referencia 3 (Care direct) ($p = 0,045$), mientras que se observa una tendencia para la muestra de referencia 1 (Triomega) y la muestra de referencia 2 (Omega 3). A 316 μM y 1.000 μM , se encontró una diferencia significativa entre la muestra de acuerdo con la invención y todas las muestras de referencia. La diferencia fue aún más pronunciada a la concentración más alta, es decir, a 3.160 μM . El grado más alto de peroxidación lipídica se encontró con la muestra de referencia 3 (Care direct), mientras que la muestra de referencia 1 (Triomega) dio el menor grado de peroxidación lipídica de los tres productos de aceite de origen marino disponibles en el mercado. En particular, la muestra de acuerdo con la invención no afectó a la peroxidación lipídica a ninguna de las concentraciones usadas.

Los estudios realizados en seres humanos han demostrado que la ingestión de ácidos grasos omega-3 como complementos puede alcanzar del 10 al 20 % de los ácidos grasos totales en plasma (revisión de Masson *et al.*, *J Cardiovasc. Med.*, 2007). Dado que las concentraciones en plasma de los ácidos grasos totales como triglicéridos están en el intervalo de 1-5 mM, las concentraciones en plasma de aceite de pescado pueden alcanzar de 100 a 1.000 μM tras la ingestión oral del aceite de pescado. En el presente estudio, se encontró una mayor peroxidación lipídica en todas las muestras de referencia en este intervalo de concentraciones, que puede considerarse fisiológicamente relevante.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que la Muestra 1 de acuerdo con la invención ofrece una mayor protección contra la peroxidación lipídica en comparación con las muestras de referencia. No se encontró ningún cambio detectable en la peroxidación lipídica para ninguna de las concentraciones usadas para la muestra 1. Se observó un aumento dependiente de la dosis en la peroxidación lipídica para las tres muestras de referencia, a pesar de que el período de caducidad de todas las cápsulas no expiró, y todas las cápsulas contenían antioxidantes para estabilizar el aceite de pescado durante el almacenamiento. El efecto sobre la peroxidación lipídica de los aceites de origen marino a base de cápsulas difirió entre los proveedores. El olor más fuerte del aceite de pescado y la coloración del aceite (marrón), que son indicativos de oxidación, se encontraron en la muestra de referencia 3 (Care direct), que también dio lugar a más peroxidación lipídica. El período de caducidad de este producto expira en octubre de 2009. Las muestras de referencia 1 y 2, que expiran en octubre/noviembre de 2010, también indujeron una peroxidación lipídica significativa de las células. La adición de licopeno y luteína a las muestras de referencia evidentemente no proporcionó protección suficiente para inhibir la peroxidación lipídica.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva fórmula de bebida en la que el aceite de pescado fresco y los antioxidantes añadidos protegen a las células contra el estrés oxidativo de una manera mucho más eficaz que los aceites de pescado disponibles en el mercado a los que se añadieron las cantidades correspondientes de antioxidantes. Como se cree que el estrés oxidativo es responsable de una larga serie de enfermedades, esta nueva fórmula de bebidas tiene un gran potencial como bebida beneficiosa para la salud.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Bebida **caracterizada por que** la bebida comprende aceite fresco de origen marino en una emulsión de aceite en agua, en donde el aceite de origen marino tiene un valor tottox inferior a 10, y a la que se añade al menos un antioxidante no presente de manera natural en dicha emulsión de aceite en agua, en donde el contenido de aceite de origen marino es del 0,5 % al 5 % en peso basado en el peso total y en donde el al menos un antioxidante añadido es una combinación de luteína añadida y de licopeno añadido que no están presentes de manera natural en las fases acuosa u oleaginosa, sino que se añaden por separado a la bebida.
- 10 2. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el valor tottox es inferior a 8.
3. Bebida de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el valor tottox es inferior a 5.
- 15 4. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el contenido de aceite de origen marino es del 0,5 % al 3 % en peso basado en el peso total.
5. Bebida de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el contenido de aceite de origen marino es de aproximadamente el 1,5 % al 2,5 % en peso basado en el peso total.
- 20 6. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fase acuosa de la emulsión de aceite en agua comprende antioxidantes naturales que se encuentran presentes de manera natural en la fase acuosa.
7. Bebida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la fase acuosa es una base de zumo.
- 25 8. Bebida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la fase acuosa es una base de té.
9. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la fase acuosa comprende además proteínas.
- 30 10. Bebida de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la proteína es proteína de suero lácteo.
11. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además aceite vegetal poliinsaturado.
12. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en:

	%
Extracto de romero 201	0,020
Toco 50	0,01
Grindsted3115	1,00
Proteína de suero lácteo	0,45
Concentrado de manzana	6,23
Concentrado de granada	2,40
Concentrado de aronia	0,88
Concentrado de pera	5,56
Agua, purificada	81,48
Aroma de naranja/mandarina	0,10
Aroma de frambuesa	0,20
Aceite de origen marino	1,50
Lyconat (licopeno al 6 %)	0,12
Lutenat (luteína al 10 %)	0,05
suma	100,00

35

Figura 1

