

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 759**

51 Int. Cl.:

A23L 2/52 (2006.01)

A23L 2/02 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

A23L 33/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 13181725 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2745712**

54 Título: **Bebida promotora de la salud**

30 Prioridad:

27.03.2008 NO 20081487

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

21.09.2018

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:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 682 759 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

Bebida promotora de la salud

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una nueva fórmula de bebida, que comprende aceite omega-3 marino fresco en una emulsión y antioxidantes, bien conocida por promover la salud en seres humanos, a un procedimiento para la producción de dicha bebida y al uso de dicha bebida para la producción de un medicamento.

Descripción de la técnica anterior

10 Los efectos promotores de salud de aceites poliinsaturados, son bien conocidos. Los efectos promotores de la salud de los antioxidantes son también conocidos. Sin embargo, se necesita una composición que combine estos nutrientes en una fórmula, que dé como resultado un aumento en la absorción y donde el cuerpo sea capaz de utilizar de manera óptima los nutrientes.

Existe la necesidad de nuevas composiciones, donde estos nutrientes nativos inestables promotores de la salud sean formulados, tal que cada componente se mantenga intacto y fresco.

15 El efecto de los ácidos grasos omega-3 (EPA, DHA y DPA) sobre varias enfermedades y condiciones, tales como enfermedad cardiovascular, mental, de la piel y envejecimiento, está bien documentado. La adición de omega-3 como suplemento aumenta a nivel mundial. Existe un aumento en el consumo de productos que contienen omega-3, y las autoridades de salud recomiendan altamente el omega-3 en la forma de pescado y/o suplementos alimenticios.

20 La tensión oxidativa es un tipo de "tensión química" inducida por la presencia en nuestro cuerpo de cantidades anormales de radicales libres. Cualquiera que sea la causa, se cree que la tensión oxidativa es responsable del envejecimiento prematuro y de una muy larga serie de enfermedades comunes - aproximadamente 100 - que varían desde hipertensión arterial hasta aterosclerosis, desde infarto hasta ictus, desde enfermedad de Parkinson hasta enfermedad de Alzheimer, desde colitis hasta pancreatitis, desde obesidad hasta diabetes, desde bronquitis crónica hasta reumatoide, desde SIDA hasta varios tipos de cáncer.

25 El cuerpo está protegido contra los radicales libres por antioxidantes, tanto producidos por sí mismo como antioxidantes suministrados a través de alimentos y bebidas. Los antioxidantes pueden ser vitaminas, minerales y enzimas, sea solubles en grasa o solubles en agua.

30 En situaciones en las que el cuerpo está sometido a aumento en la oxidación (muchos radicales libres), el cuerpo podría no tener suficientes antioxidantes para neutralizar o inactivar los radicales libres. Ocurren reacciones de cadena destructivas, que podrían causar el aumento de la tensión oxidativa dañina.

Un procedimiento convencional para medir el estado oxidativo es el FRAS (Sistema Analítico de Radicales Libres). La prueba es evaluada en una unidad de medición convencional llamada unidad Carr (por el químico Carratelli, el inventor de la prueba). El procedimiento es rápido y sólo se requiere una gota de sangre tomada de la punta del dedo.

35 La tabla abajo da un panorama de valores oxidativos normales y elevados.

Valores FRAS:

Valores normales 250 - 300 U.Carr

Valores límite 300 - 320 U.Carr (mostrando un valor ligeramente elevado de radicales libres, lo cual podría conducir a condiciones de tensión oxidativa)

40 Tensión oxidativa suave 320 - 340 U.Carr

Tensión oxidativa moderada 340 - 400 U.Carr

Tensión oxidativa severa 400 - 500 U.Carr

45 La base teórica para los efectos de los antioxidantes es bien reconocida. También se reconoce que la absorción de antioxidantes en el cuerpo, desde suplementos antioxidantes, es un desafío. Sin embargo, los estudios han demostrado que los antioxidantes en una forma no nativa o como vitaminas aisladas, son tomados de manera inadecuada por el cuerpo. Algunos estudios indican que la ingestión de elevadas dosis de vitaminas aisladas puede convertir los antioxidantes en prooxidantes, conduciendo a una elevada oxidación del cuerpo. Los estudios y

la literatura indican mejor absorción y biodisponibilidad de antioxidantes presentes de modo natural, cuando son consumidos en alimentos, por ejemplo como frutas y vegetales.

Se sabe que los seres humanos que tienen severa tensión oxidativa son frecuentemente deficientes en ácidos grasos omega-3 (DHA y EPA), y poseen un bajo estado antioxidativo.

- 5 El daño oxidativo y deficiencia en antioxidantes son ahora mirados como factores cruciales para muchas enfermedades, y son probablemente la razón primaria para un reemplazo imperfecto de células viejas dañadas, por células nuevas.

10 La investigación ha demostrado que los productos de oxidación de ácidos grasos son altamente reactivos y pueden afectar e interferir con los procedimientos intracelulares. Muchos suplementos de omega-3 disponibles comercialmente contienen aceite de pescado que tiene un grado significativo de oxidación, que a su vez puede inducir efectos adversos sobre procedimientos intracelulares.

15 Aunque a estos suplementos dietarios se añaden frecuentemente antioxidantes, esto no revertirá la rancidez ya presente en el suplemento dietario. Por otro lado, para prevenir la oxidación adicional del aceite insaturado de pescado, los antioxidantes serán consumidos y finalmente (después de algunos meses) cesarán. Así, los antioxidantes en los suplementos dietarios disponibles comercialmente no inducirán ningún efecto promotor de la salud en seres humanos. El documento WO 2007/064222A1 describe una composición que comprende aceite de pescado y jugo, formando una emulsión estable aceite-en-agua. Así, existe una necesidad por una nueva composición que combine aceite fresco de pescado y antioxidantes específicos, para suministrar una nueva fórmula de bebida que tenga efectos mejorados de promoción de la salud en seres humanos.

20 **La invención presente**

Así, el objeto de la presente invención es suministrar una nueva fórmula de bebida que comprende aceite marino fresco omega-3 y antioxidantes, bien conocida por promover la salud en seres humanos.

25 Un objeto adicional de la presente invención es suministrar un procedimiento para la producción de la nueva fórmula de bebida, en la que el aceite de pescado es emulsificado y manipulado bajo condiciones suaves, a través de un mínimo de pasos de procedimiento.

Un objeto adicional de la presente invención es suministrar una bebida, para el uso como bebida terapéutica. Los antioxidantes específicos que va a ser incluidos en la bebida son seleccionados de acuerdo con la enfermedad o trastorno que va a ser tratado.

30 Estos y otros objetos son logrados por la presente invención, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 14. Por ello, la presente invención se refiere a una bebida que combina aceite marino fresco y antioxidantes específicos. Los antioxidantes que tienen un efecto promotor de la salud en seres humanos están presentes en la bebida para reducir la tensión oxidativa en el ser humano, no con el propósito de estabilizar el aceite en la preparación. La bebida puede ser una bebida funcional o una bebida terapéutica, una bebida para apagar la sed o una bebida ordinaria. Preferiblemente, la bebida tiene una base que contiene antioxidantes naturales, por ejemplo jugo de frutas o vegetales, té verde, pero puede usarse cualquier líquido bebible.

35 La nueva bebida combina la emulsión estable de omega-3 conocida de la técnica previa, y antioxidantes bien conocidos por promover la salud. La bebida revela sorprendentes características como absorción de antioxidantes y el efecto de antioxidantes en el cuerpo. Comparada con la técnica previa, donde en diferentes fórmulas se ingieren cantidades correspondientes de omega-3 y antioxidantes, la bebida de acuerdo con la presente invención muestra una entrega mejorada, mejor absorción y efecto mejorado en la tensión oxidativa.

Tanto el aceite omega-3 como los antioxidantes presentes en la bebida de acuerdo con la invención, son notablemente estables en la composición, y el progreso de la rancidez y efectos de pérdida de antioxidante son mucho menores que en los productos conocidos, formulados como cápsulas separadas.

45 Un aspecto de la presente invención se refiere a una bebida que comprende aceite marino fresco en una emulsión aceite-en-agua, donde el aceite marino tiene un valor totox inferior a 10, añadida además con por lo menos un antioxidante no naturalmente presente en dicha emulsión aceite-en-agua.

50 El término aceite marino fresco describe un aceite preparado a partir de aceite fresco, donde todos los pasos del procedimiento son conducidos cuidadosamente y bajo estricto control de oxígeno, de acuerdo con estándares funcionales de aceite, con objeto de prevenir la oxidación del aceite. El aceite marino fresco tendrá un bajo estado oxidativo, revelando un aceite incoloro sin el olor o sabor característicos del pescado. El nivel de oxidación, dado como el valor totox (2 veces el valor de peróxido (PV) añadido al valor de anisidina (AV)), debería ser inferior a 10, preferiblemente inferior a 8, y más preferiblemente inferior a 5. El aceite marino presente en muchos suplementos

alimenticios actualmente contiene aceite con un valor tototox mucho mayor, típicamente 20 - 30 o incluso mayor.

El aceite marino fresco puede ser cualquier aceite rico en omega-3, por ejemplo aceite de pescado, aceite de foca o aceite de kril. El aceite puede estar mezclado con otros aceites poliinsaturados de origen vegetal, tales como aceite de algas y aceite herbal tal como aceite de primula y aceite de colza.

- 5 Una realización de la presente invención suministra una bebida en la cual el contenido de aceite marino es 0,5% - 5% en peso basado en el peso total, preferiblemente en el intervalo de 0,5% - 3%, más preferiblemente en el intervalo de 1,5%- 2,5%.

10 La emulsión aceite-en-agua es preparada mediante cualquier procedimiento convencional, preferiblemente como se describe, en los documentos noruegos NO 20044542, 20053136 y 20055620, del solicitante. En dichas emulsiones, los antioxidantes están presentes para estabilizar el aceite durante la producción y almacenamiento, no con el propósito de inducir ningún efecto promotor de la salud en seres humanos.

15 La fase acuosa de la emulsión aceite-en-agua es preferiblemente una fase acuosa que contiene antioxidantes naturales, por ejemplo jugos de fruta/vegetales, té verde, té blanco, y té herbal. El jugo puede ser un jugo recientemente comprimido o jugo en la forma de concentrado de jugo o puré de jugo diluido para obtener un jugo normal listo para consumir. La fase acuosa puede contener también proteínas tales como soja, proteína de avena, proteínas de suero y/o proteínas de leche.

20 De acuerdo con la invención, los términos antioxidantes añadidos o añadidos adicionalmente deben ser entendidos como antioxidantes no presentes naturalmente presentes en la fase acuosa o fase de aceite, sino añadidos separadamente. El antioxidante añadido adicionalmente puede ser similar a uno o más antioxidantes naturalmente presentes en la fase acuosa o fase de aceite, o diferentes. El por lo menos un antioxidante añadido adicionalmente puede ser uno o una combinación de dos o más antioxidantes.

25 Los antioxidantes útiles de acuerdo con la presente invención son antioxidantes conocidos por tener efectos promotores de la salud en seres humanos. Los antioxidantes útiles son por ejemplo astaxantina, vitamina E, vitamina C, beta-caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina, glutatión, flavonoides, carotenoides, fenoles de planta, polifenoles, coenzima Q10, resveratrol, curcumina, picnogenol, selenio, cobre, zinc y magnesio. Los antioxidantes pueden estar presentes individualmente o en una mezcla de dos o más. Los antioxidantes pueden ser seleccionados para satisfacer propósitos específicos, es decir los efectos deseables en la salud que van a ser alcanzados. Como ejemplos, una bebida de acuerdo con la invención que comprende luteína y zeaxantina tendrá probablemente un impacto positivo en diferentes condiciones del ojo. Una bebida de acuerdo con la invención que comprende el antioxidante curcumina rica 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 benéfica para reducir osteoartritis. El beta-caroteno añadido a dicha bebida puede ser útil para trastornos respiratorios y CoQ10 y selenio serán útiles para trastornos cardiovasculares.

35 En una realización de la presente invención, a la bebida pueden añadirse 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 procedimiento para la producción de una bebida, de acuerdo con la invención, que comprende los siguientes pasos:

- 40 a) se añaden antioxidantes y agentes saborizantes solubles en aceite, junto con el emulsificante a la fase de aceite,
b) se añaden aditivos solubles en agua a la fase acuosa,
c) se mezclan las fases de aceite y acuosa, para dar una emulsión homogénea,
d) opcionalmente, la emulsión obtenida es sometida a procedimientos de pasteurización y/u homogenización,
e) se enfría la emulsión obtenida y se envasa en recipientes desechables limpios;
en el que todos los pasos son ejecutados bajo estricto control de oxígeno.

45 De modo alternativo, el procedimiento para la producción de una bebida de acuerdo con la invención comprende los siguientes pasos:

- a) se añaden a la fase de aceite los antioxidantes y agentes saborizantes solubles en aceite,
b) a la fase acuosa se añaden los aditivos solubles en agua,

c) se mezclan la fase de aceite y la fase acuosa y se añade el emulsificante, seguido por mezcla suave para lograr una emulsión homogénea,

d) la emulsión obtenida es sometida opcionalmente a procedimientos de pasteurización y/u homogenización,

e) se enfría la emulsión obtenida y se empaca en recipientes desechables limpios;

5 en el que todos los pasos son ejecutados bajo estricto control de oxígeno.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una bebida para el uso como una bebida terapéutica. Otros aspectos se relacionan con el uso de una bebida de acuerdo con la invención, para la producción de una preparación médica, para la profilaxis o tratamiento de enfermedades asociadas con tensión oxidativa elevada, tales como cáncer o trastornos neurológicos. La presente divulgación describe también el uso de la bebida para la producción de una preparación medicinal para la profilaxis o tratamiento de enfermedades asociadas con trastornos cardiovasculares y trastornos respiratorios. Sorprendentemente se ha hallado que la nueva fórmula de bebida que combina ácidos grasos omega-3 frescos y por lo menos un antioxidante añadido, tiene un mejorado efecto promotor de la salud, comparado con suplementos alimenticios donde se ingieren aceite marino y antioxidantes en fórmulas separadas, por ejemplo cápsulas, píldoras o comprimidos. Se cree que la formulación específica de la invención es de gran importancia, que presenta los nutrientes esenciales y agentes específicos de promoción de salud (ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes añadidos) al sistema digestivo y a las células, en un formato altamente benéfico para las células y el cuerpo.

Figuras

20 **La figura 1** muestra el efecto de aceite marinos sobre la peroxidación de lípidos en células U937. Las células fueron incubadas por 48 h con diferentes concentraciones de ácidos grasos omega-3, de diferentes vendedores, como se muestra en la leyenda. En el eje X se indican las concentraciones. El eje Y muestran los niveles relativos de peroxidación de lípidos, usando fluorescencia mediada por DPPP como un sensor. Se indica la desviación estándar.

Realizaciones

25 La invención será ahora ilustrada en más detalle, con referencia a los siguientes ejemplos de comparación.

Bebida de acuerdo con la invención

El aceite marino usado en todas las preparaciones fue aceite de salmón Xalar de Marine Harvest Ingredients, número de lote: 099000F016. El valor totox estaba por debajo de 5 y la preparación fue conducida de acuerdo con estándares funcionales de aceite.

30 Ejemplo 1

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

	%
Agua, purificada	42,31
Jugo vegetal	45,00
Extracto de romero 201	0,02
Toco 50	0,01
Grindsted 3115	1,00
Jugo concentrado de manzana	10,00
Aroma natural a limón	0,15

ES 2 682 759 T3

(continuación)

Astaxantina	0,01
Aceite marino	1,50
Suma	100,00

Jugo vegetal Granini

Grindsted 3115 de Dansico

5 Aroma natural a limón de Firmencih

Polvo de Haematococcus pluvialis calidad alimenticia (complejo de astaxantina esterificada en la forma de biomasa de algas haematococcus pluvialis), suministrado por: Sinochem Hebei corporation, 707 Lianmeng, Shijiazhuang, China

Ejemplo 2

10 Bebida que comprende emulsión de omega-3 marino fresco, suministrada con vitaminas 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 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
Sabor de naranja/mandarina	0,10	0,80
Sabor de frambuesa	0,12	0,96
Vitamina C	0,01	0,80
Selenio		0,4
Vitamina E		0,08
Aceite marino	2,00	16,00
Suma	100,00	800,80

Sabor natural de frambuesa de Firmenich

Sabor natural de naranja/mandarina de Firmenich

Vitamina E: D-alfa, D-beta, D-delta, D- gamma tocoferol y D-gamma tocotrenol

ES 2 682 759 T3

Vitamina C: L- ascorbato de calcio (neutro ácido)

Selenio: L (+) metionina de selenio;

todos de G.O Johnsen

Ejemplo 3

- 5 Bebida que comprende ácidos grasos omega-3 marinos frescos emulsificados y licopeno y luteína.

	%
Extracto de romero 201	0,020
Toco 50	0,01
Grindsted 3115	1,00
Proteína de suero	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
Sabor a naranja/mandarina	0,10
Sabor a frambuesa	0,20
Aceite marino	1,50
Lyconat (6% de licopeno)	0,12
Lutenat (10% de luteína)	0,05
Suma	100,00

Extracto de romero 201, Toco 50 y Grindsted 3115 de Dansico

Proteína de suero de Arla Foods

Agentes saborizantes naturales de Firmenich

- 10 Licopeno natural (Lyconat) de Vitatene

Luteína natural (Lutenat) de Vitatene

Ejemplo 4

Bebida que comprende ácidos grasos omega-3 marinos frescos emulsificados y luteína.

	%
Extracto de romero 201	0,020
Toco 50	0,01
Grindsted 3115	1,00
Concentrado de manzana	3,23
Conc.de granada	1,40
Concentrado de uva	2,56
Leche de soja	58,40
Agua, purificada	31,42
Sabor a albaricoque	0,25

ES 2 682 759 T3

(continuación)

Sabor a limón	0,10
Aceite marino	1,50
Luteína	0,11
Suma	100,00

Extracto de romero 201, Toco 50 y Grindsted 3115 de Danisco

Agentes saborizantes naturales de Firmenich

- 5 Aceite de salmón por Marine Harvest Ingredients, valor Totox por debajo de 5 y procesado de acuerdo con estándares funcionales de aceite

Luteína natural (Lutenat 10% OS) de Vitatene, Italia

Ejemplo 5

Bebida que comprende ácidos grasos omega-3 marinos frescos emulsificados y CoQ10 y selenio.

	%
Extracto de romero 201	0,02
Toco 50	0,01
Proteínas de suero	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
Saborizante a mangostino	0,25
Saborizante Umbu	0,10
Aceite marino	2,50
CoQ10 (10%)	0,30
Selenio	50 µg
Vitamina D	1,5 µg
suma	100,00

10

Extracto de romero 201, Toco 50 y Grindsted 3115 de Dansico

Agentes saborizantes naturales de Cargill

Selenio suministrado por: Sinochem Hebei corporation, 707 Lianmeng, Shijiazhuang, China Coenzyme Q10 de DSM

- 15 Vitamina D de G.O Johnsen

Proteínas de suero (Lacprodan) de Arla Foods

Ejemplo 6

Procedimiento de producción

1. Fase de aceite

5 Se mezcla el aceite con extracto de romero, Toco 50 (una preparación antioxidante favorable para la estabilización del aceite). Es importante que durante el procesamiento, el aceite esté protegido contra la oxidación. Después de ello, se añade el emulsificante (Grindsted 3115) al aceite, se mezcla suavemente a temperatura ambiente hasta obtener una mezcla homogénea. Se añaden entonces los agentes saborizantes.

2. Antioxidantes

10 Se mezclan los antioxidantes solubles en aceite con la fase de aceite, y se mezclan los antioxidantes solubles en agua con la fase acuosa, antes del calentamiento. Opcionalmente, se mezclan los antioxidantes solubles en agua con la fase acuosa, después del calentamiento mediante sistemas especializados tales como Flexdose (Tetra Pack solution), o se añaden dentro de un tanque estéril a través de un procedimiento ultra puro.

3. Fase acuosa

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

15 Opcionalmente, puede mezclarse la fase de aceite con la fase acuosa, después de lo cual se añade el emulsificante y se obtiene una emulsión. Se añaden entonces los concentrados de fruta a la emulsión obtenida y se mezcla completamente.

Alternativamente, la emulsión obtenida puede ser sometida a una pasteurización rápida (aproximadamente 90°C por 8 s), seguida por homogenización y enfriamiento a una temperatura de 4 - 8°C.

20 Finalmente se empaqueta la bebida en recipientes asépticos herméticos, preferiblemente recipientes de una sola dosificación, por ejemplo Tetra Brick de aproximadamente 200ml y se almacena a 6-8°C hasta el uso.

Tiene que implementarse estricto control de oxígeno en todos los pasos, para evitar la oxidación del aceite marino.

Efectos promotores de la salud de la bebida de acuerdo con la invención

Materiales y procedimientos

25 Para investigar los efectos fisiológicos de la bebida de acuerdo con la invención, se ha analizado la oxidación de PUFAs en membranas de célula. Se usó un sensor fluorescente de peroxidación de lípidos llamado difenil-1-pirenilfosfina (DPPP), para evaluar la peroxidación de lípidos. La DPPP se incorpora rápidamente dentro de la membrana celular, y por oxidación emite luz, la cual puede ser medida mediante un fluorómetro (Okimoto et al., FEBS Letter, junio de 2000). Se analizaron y compararon muestras de acuerdo con la invención y muestras que
30 contienen aceite de pescado de cápsulas comercialmente disponibles de aceite marino.

Preparación de la muestra

Se usó bebida como se describe en el Ejemplo 3 y se identificó como muestra 1 = Smartfish.

La bebida contiene 900 mg de omega-3 por 200 ml de bebida. Las cantidades de licopeno y luteína eran 16 mg y 10 mg de luteína por 900 mg de omega-3, respectivamente.

35 Fecha de caducidad: 15 de agosto de 2009. Sabor y olor fresco frutal. No pudo experimentarse olor o sabor de aceite de pescado. Apariencia homogénea jugosa roja oscura.

Se prepararon muestras de referencia a partir de cápsulas comercialmente disponibles que contienen aceite marino.

Muestra 1 de referencia = Triomega

40 Triomega (Número de lote: 56416408; Midelfart) que contiene 620mg de omega-3 por g de aceite.

Fecha de caducidad: 06 de noviembre de 2010. Color: Claro. Olor: Débil pero detectable.

Muestra 2 de referencia= Omega 3

Omega 3 (Número de lote: 58212708 , Eldorado) que contiene 570 mg de omega-3 por g de aceite.

Fecha de caducidad: 27 de octubre de 2010. Color: claro; Olor: débil pero detectable

Muestra 3 de referencia= Direct Care

CAREMAX (Número de lote 71105, Direct Care) que contiene 600 mg de omega-3 por g de aceite.

Fecha de caducidad: octubre de 2009; Color: marrón; Olor: fuerte.

- 5 Las muestras 1 y 2 de referencia están disponibles en las tiendas y fueron compradas en tiendas de comestibles. La muestra 3 de referencia 3 fue ordenada vía internet.

10 Los aceites marinos fueron recolectados de las cápsulas usando una jeringa y se mezclaron con el mismo emulsificante que se usa en la bebida de acuerdo con la invención, es decir Grindsted 3115. Se mezclaron 1,5 g de aceite marino con 0,75 g de emulsificante (aceite marino:emulsificante 2:1). Se añadió medio celular para dar un volumen total de 10 ml para dar una emulsión aceite-en-agua. Luego de la adición de medio se sometió a agitación con vortex.

A la muestra 1 se añade licopeno y luteína. Así, los aceites marinos de las cápsulas fueron suplementados con licopeno y luteína para corresponder a la cantidad de licopeno y luteína presentes en la muestra 1.

15 Licopeno y luteína fueron comprados de Sigma-Aldrich y disueltos en DMSO (Sigma-Aldrich) hasta soluciones madre que contienen 3,6 µg/ml o 2,2 µg/ml, respectivamente. Se añadieron 10 µl de las soluciones madre a 316 µl de aceite marino de las muestras de referencia, para alcanzar las cantidades correspondientes de licopeno y luteína como en la muestra 1 de la invención. La tabla 1 dada a continuación muestra la preparación de soluciones madre y la adición a las muestras de referencia.

	Licopeno en DMSO	Luteína en DMSO	Vol añadido a 3.160 µM de ω3
Solución madre	3,6 µg/µl (1 mg/277 µl DMSO)	2,2 µg/µl (1 mg/454 µl DMSO)	10 µl de cada uno

20 Tabla 2: Resumen de la preparación de muestras

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

Células

25 U937 (ATCC No CRL-1593.2^{MR}), una línea celular de monoblasto humano, que fueron infectadas de manera estable con NF-κB-RE acoplada con luciferasa. Las células fueron cultivadas en RPMI + L-glut, 10 % FCS, 2x P/S, higromicina.

Las células fueron incubadas con muestra 1 y muestras 1-3 de referencia en concentraciones de ácidos grasos omega-3 que variaban de 1 µM a ~3.000 µM para 48 horas. Las muestras fueron suplementadas con lipoproteína lipasa, la cual hidroliza y libera ácidos grasos desde la estructura de los triglicéridos, como se describe abajo.

Sonda para peroxidación de lípidos:

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

Lipasa

- 5 Se añadieron 10 unidades de lipoproteína lipasa de leche bovina (de Sigma-Aldrich, L2254, número de lote 114K7430) a las células que contienen las concentraciones más altas de ácidos grasos omega-3 en los aceites marinos. A continuación de la dilución de las muestras, se diluyó la lipasa de manera acorde. Así, la mínima concentración de las muestras ricas en omega-3 (1 µM) contenía 0,003 unidades de lipoproteína lipasa.

Tratamiento de las células y mediciones de oxidación de DPPP, LDH y contenido de proteína

- 10 Se prepararon la muestra 1 de acuerdo con la invención y muestras 1-3 de referencias que contienen licopeno y luteína, como soluciones madre que contienen 14.000 µM y 300.000 µM de ácidos grasos omega-3, respectivamente. Las concentraciones de ácidos grasos omega-3 fueron calculadas sobre la base de contenido de omega-3 listado en las descripciones de producto. Dado que las muestras son aceites de pescado, los ácidos grasos omega-3 son presentados a las células como triglicéridos y no como ácidos grasos libres. Ellos fueron diluidos adicionalmente para dar concentraciones finales en el medio celular, que variaban de 1 a 3.160 µmol/L en triplicados (véase la tabla 5 para el ajuste de la placa). Se añadieron licopeno, luteína y lipoproteína lipasa a muestras diluidas destinadas a células con 3.160 µM de omega-3, y se diluyeron adicionalmente de acuerdo con las tablas 3 y 4. Se inocularon células (10⁵) en placas de 96 pozos con 100 µl de medio. Antes de la adición de las muestras, se cambió el medio y a las células se añadieron 50 µl de medio/pozo. Luego se añadieron a las células 20 50 µl de las diferentes diluciones que contienen todos los ingredientes indicados. Se incubaron entonces las células por 48 h a 37 °C y se prepararon para la evaluación de fluorescencia con DPPP, de acuerdo con un procedimiento ligeramente modificado, descrito por Okimotoa (Okimotoa et al., FEBS Letter, junio de 2000)

	Conc. (µM) Omega-3	Vol (µL)	Vol del medio (µL)	Vol total (µL)
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) Omega-3	Vol (µL)	Vol del medio (µL)	Vol total (µL)
Madre de aceite	300.000			

(continuación)

	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 están indicadas como 2x de la concentración final en el medio celular, porque fue diluida adicionalmente cuando se añadieron 50µl de las soluciones a las células que contienen 50 µl de medio celular.

Tabla 5: ajuste de placa; concentración de Omega-3

DPPP	+			+			+			+		
Lipasa	+			+			+			+		
	Muestra 1 "Smartfish"			Muestra 1 de referencia "Triomega"			Muestra 2 de referencia "Omega 3"			Muestra 3 de referencia "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 mediciones con DPPP, se lavaron las células 2 veces en solución salina amortiguada con fosfato y se añadió DPPP hasta una concentración final de 50 µmol/L. Esto fue hecho en condiciones de oscuridad para evitar la oxidación de DPPP inducida por la luz. Se midió entonces la fluorescencia de las células que contienen la DPPP, usando un espectrofluorómetro (Spectramax Molecular Devices) 3 horas después de la adición de DPPP.

10 Las mediciones de proteína fueron hechas en productos de lisis celular después de las evaluaciones de DPPP. Las proteínas fueron medidas de acuerdo con un kit Bio-rad (ensayo de absorbancia colorimétrica), y usadas para calcular los valores relativos.

Resultados

La Tabla 6 muestra valores fluorescentes normalizados en Smartfish, emulsión (control) y muestras de referencia, a continuación de la incubación de células U937 por 48 h. La fluorescencia está basada en la oxidación de DPPP con subsiguiente cambio de la intensidad fluorescente. Los datos son presentados como valores normalizados corregidos para el contenido de proteína en productos de lisis celular. Se indica +/- la desviación estándar.

Tabla 6

Concentraciones de Omega-3		Muestra 1 Smartfish	Emulsión de control	Muestra 1 de referencia Triomega	Muestra 2 de referencia Omega 3	Muestra 3 de referencia Care direct
1 μM	DPPP SD	100,0 +/-7,0	100,0 +/-7,9	100,0 +/-2,1	100,0 +/-4,7	100,0 +/-9,6
3,16 μM	DPPP SD	98,0 +/-7,5	100,0 +/-8,0	97,7 +/-1,1	101,2 +/-8,6	101,6 +/-6,7
10 μM	DPPP SD	97, +/- 66,2	98,4 +/-3,8	106,2 +/-5,5	106,1 +/-13,3	111,9 +/-4,6
31,6 μM	DPPP SD	102,2 +/-9,8	101,8 +/-2,1	106,0 +/-9,7	117,9 +/-17,0	114,9 +/-8,9
100 μM	DPPP SD	95,1 +/-9,9	105,1 +/-3,7	98,5 +/-0,8	132,1 +/-23,5	121,7 +/-11,8
316 μM	DPPP SD	94,2 +/-14,2	113,3 +/-3,7	107,2 +/-11,1	132,9 +/-19,2	137,1 +/-8,1
1.000 μM	DPPP SD	97,2 +/-7,6	102,3 +/-11,5	110,6 +/-2,7	136,3 +/-43,6	168,9 +/-11,7
3.160 μM	DPPP SD	95,2 +/-15,1	98,2 +/-9,2	121,9 +/-13,0	176,0 +/-31,7	239,1 +/-12,8

Efecto de aceites marinos en la peroxidación de lípidos en células U937

10 Los resultados muestran que no se observó oxidación detectable de lípidos en células incubadas con la muestra de acuerdo con la invención, a ninguna de las dosificaciones usadas, cuando se compara con los controles que recibieron sólo medio celular (datos no mostrados) o una emulsión sin aceite añadido. Para las muestras de referencia, se encontró un aumento en la peroxidación de lípidos, dependiente de la dosificación. De modo notable, el grado de peroxidación de lípidos era coincidente con el olor y apariencia de color de los productos de aceite marino. Olor y color son indicativos de la oxidación del aceite. La adición de licopeno y luteína a los aceites en concentraciones comparables con las de la muestra 1 de acuerdo con la invención, no fue suficiente para inhibir la peroxidación de lípidos.

20 Como se aprecia en la tabla 6 y en la figura 1, no se observó efecto en 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 ha ocurrido peroxidación detectable de lípidos en la membrana de la célula. A mayores concentraciones se observa un débil aumento para todos los aceites, exceptuando la muestra de acuerdo con la invención. Desde 10 μM y hacia arriba, 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 3 de referencia, (Care direct) ($p=0,045$), mientras se nota una tendencia para la muestra 1 de referencia (Triomega) y muestra 2 de referencia (Omega 3). A 316 μM y 1000 μM se halló una diferencia significativa entre la

muestra de acuerdo con la invención y todas las muestras de referencia. La diferencia fue incluso más pronunciada a la máxima concentración, es decir 3.160 μM . El máximo grado de peroxidación de lípidos fue hallado con la muestra 3 de referencia (Care direct), mientras la muestra 1 de referencia (Triomega) dio el menor grado de peroxidación de lípidos, de los tres productos comercialmente disponibles de aceite marino. De modo notable, la muestra de acuerdo con la invención no afectó la peroxidación de lípidos en ninguna de las concentraciones usadas.

Los estudios en seres humanos han mostrado que la ingestión de ácidos grasos omega-3 como suplementos puede alcanzar 10-20 % del total de ácidos grasos en plasma (revisión de Masson et al., J Cardiovasc.Med, 2007). Dado que las concentraciones de los ácidos grasos totales en plasma, como triglicéridos, están en el intervalo de 1-5 mM, las concentraciones de aceite de pescado en plasma pueden alcanzar 100 a 1.000 μM después de la ingesta oral de aceite de pescado. En el presente estudio se encontró aumento en la peroxidación de lípidos para todas las muestras de referencia en este intervalo de concentración, lo cual puede ser mirado como fisiológicamente relevante.

De modo sorprendente se ha encontrado que la muestra 1 de acuerdo con la invención ofrece una mayor protección contra la peroxidación de lípidos, comparada con las muestras de referencia. No se encontró cambio detectable en la peroxidación de lípidos para ninguna de las concentraciones usadas para la muestra 1. Se observó un incremento dependiente de la dosificación, en la peroxidación de lípidos para todas las tres muestras de referencia, independientemente del hecho según el cual la vida útil de todas las cápsulas no había expirado y todas las cápsulas contenían antioxidantes para estabilizar el aceite de pescado durante el almacenamiento. El efecto sobre la peroxidación de lípidos de los comprimidos a base de aceite marinos, fue diferente entre los proveedores. El olor más fuerte de aceite de pescado y coloración del aceite (marrón), que son indicativos de la oxidación, fueron encontrados en la muestra 3 de referencia (Care direct), lo cual dio como resultado más peroxidación de lípidos. La vida útil de este producto expira en octubre de 2009. Las muestras 1 y 2 de referencia que expiran en octubre/noviembre de 2010 indujeron también significativa peroxidación de lípidos de las células. La adición de licopeno y luteína a las muestras de referencia no permitió evidentemente suficiente protección para inhibir la peroxidación de lípidos.

Así, la presente invención suministra una nueva fórmula de bebida, en la que el aceite fresco de pescado y los antioxidantes añadidos están protegiendo las células contra la tensión oxidativa de una manera mucho más eficiente que los aceites de pescado disponibles comercialmente añadidos con cantidades correspondientes de antioxidantes. Dado que se cree que la tensión oxidativa es responsable de una larga serie de enfermedades, esta nueva fórmula de bebida tiene un gran potencial como bebida promotora de la salud.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Bebida **caracterizada porque** la bebida comprende aceite marino fresco en una emulsión aceite-en-agua, en la que el aceite marino tiene un valor tototox inferior a 10, y además añadida con por lo menos un antioxidante no presente naturalmente en dicha emulsión aceite-en-agua, en la que el contenido de aceite marino es 0,5% - 5% en peso basado en el peso total y en la que el por lo menos un antioxidante añadido es curcumina que no está naturalmente presente en la fase de agua o fase de aceite, pero es añadido separadamente a la bebida.
2. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el valor tototox es menor a 8.
3. Bebida de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el valor tototox es menor a 5.
- 10 4. Bebida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el contenido de aceite marino es 0,5% - 3% en peso basado en el peso total.
5. Bebida de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el contenido de aceite marino es 1,5% - 2,5% en peso basado en el peso total.
6. Bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la fase acuosa en la emulsión aceite-en-agua comprende antioxidantes naturales presentes de modo natural en la fase acuosa.
- 15 7. Bebida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la fase acuosa es una base de jugo.
8. Bebida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la fase acuosa es una base de té.
9. Bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la fase acuosa comprende además proteínas.
- 20 10. Procedimiento de producción de una bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por** los pasos de:
- a) se añaden antioxidantes y agentes saborizantes solubles en aceite, junto con el emulsificante a la fase de aceite,
- b) se añaden aditivos solubles en agua a la fase acuosa,
- c) se mezclan las fases de aceite y acuosa, hasta una emulsión homogénea,
- d) opcionalmente, la emulsión obtenida es sometida a procedimientos de pasteurización y/u homogenización,
- 25 e) se enfría la emulsión obtenida y se envasa en recipientes desechables limpios;
- en el que todos los pasos son ejecutados bajo estricto control de oxígeno.
11. Procedimiento para la producción de una bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **caracterizado por** los pasos de:
- a) a la fase de aceite se añaden antioxidantes y agentes saborizantes solubles en aceite,
- 30 b) a la fase acuosa se añaden aditivos solubles en agua,
- c) se mezclan las fases de aceite y acuosa, y se añade el emulsificante, seguido por mezcla suave para lograr una emulsión homogénea,
- d) opcionalmente se somete la emulsión obtenida a procedimientos de pasteurización y/u homogenización,
- e) se enfría la emulsión obtenida y se envasa en recipientes desechables limpios;
- 35 en el que todos los pasos son ejecutados bajo estricto control de oxígeno.
12. Bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso como un medicamento.
13. Bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en profilaxis o tratamiento de cáncer.
14. Bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso en profilaxis o tratamiento de trastornos neurológicos.

Figura 1

