(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
20 de diciembre de 2012 (20.12.2012) WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/172147 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A23L 2/52 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070443

(22) Fecha de presentación internacional:
15 de junio de 2012 (15.06.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201131014 16 de junio de 2011 (16.06.2011) ES

(71) Solicitantes *(para todos los Estados designados salvo US)*: **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID** [ES/ES]; Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **FUNDACION PARA LA INVESTIGACION BIOMEDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PAZ** [ES/ES]; Paseo de la Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **REGLERO RADA, Guillermo J.** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **DE MIGUEL DEL CAMPO, Enrique** [ES/ES]; Fundacion para la Investigacion Biomedica del Hospital Universitario de la Paz, Paseo de la Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). **MARÍN MARTÍN, Francisco** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **FORNARI REALE, Tiziana** [IT/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **PRODANOV PRODANOV, Marin** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **RUIZ RODRÍGUEZ, Alejandro** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **LARGO ARAMBURU, Carlota** [ES/ES]; Fundacion para la Investigacion Biomedica del Hospital Universitario de la Paz, Paseo de la Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). **TABERNERO URBIETA, María** [ES/ES]; Fundacion para la Investigacion Biomedica del Hospital Universitario de la Paz, Paseo de la Castellana, 261, E-28046 Madrid (ES). **IBÁÑEZ EZEQUIEL, Elena** [ES/ES]; Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **JAIME DE PABLO, Laura** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **SOLER RIVAS, Cristina** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **RODRÍGUEZ GARCÍA-RISCO, Mónica** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **SANTOYO DIEZ, Susana** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **GONZÁLEZ LORENTE, Monserrat** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **ARRANZ GUTIÉRREZ, Elena** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **GIL RAMÍREZ, Alicia** [ES/ES]; Universidad Autónoma de Madrid, Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; Abg Patentes, S.L., Avenida de Burgos 16D, Edificio Euromor, E-28032 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

(54) **Title**: FUNCTIONAL HEART-HEALTHY DRINK CONTAINING WINE AND EXTRACTS OF HOPS

(54) **Título** : BEBIDA FUNCIONAL CARDIOSALUDABLE DE VINO Y EXTRACTOS DE LÚPULO

(57) **Abstract**: The invention relates to a functional drink containing dealcoholised wine, aroma of wine, isoxanthohumol-enriched hops extract and, optionally, grape marc extract and grape seed extract. The invention also relates to a method for obtaining the hops extract and to the use of said drink in the prevention or treatment of metabolic syndrome.

(57) **Resumen**: La presente invención se refiere a una bebida funcional que comprende vino desalcoholizado, aroma de vino, extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol y, opcionalmente extracto de orujo de uva y extracto de semillas de uva, y a un procedimiento para la obtención del extracto de lúpulo, así como al uso de dicha bebida en la prevención o tratamiento del síndrome metabólico.

WO 2012/172147 A1

BEBIDA FUNCIONAL CARDIOSALUDABLE DE VINO Y EXTRACTOS DE LÚPULO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención pertenece al campo de los alimentos de uso específico para la salud constituidos por productos alimenticios enriquecidos con ingredientes bioactivos naturales. En particular, se refiere a los denominados alimentos funcionales, de forma específica al campo de las bebidas saludables, tratándose en concreto de una bebida a base de vino a la que se han incorporado extractos naturales con efectos antioxidantes y antiinflamatorios con efectos preventivos del riesgo cardiovascular.

ANTECEDENTES

En los últimos 10 años, la bibliografía internacional recoge numerosos artículos sobre trabajos de investigación que tratan de establecer las bases fisiológicas de la asociación entre vino y salud, puesta de manifiesto por numerosos estudios epidemiológicos (Sun, A.Y.; Simony, A.; Sun, G.Y. The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. Free Radical Biology and Medicine. 32: 314–318; 2002). La mayoría de estos estudios demuestran ciertos efectos protectores de vino frente a enfermedades cardiovasculares.

Durante mucho tiempo se ha mantenido la controversia de si es el etanol o la fracción polifenólica la responsable de las propiedades cardiosaludable del vino. En unos casos se atribuyen las propiedades saludables del vino a su contenido en etanol por los efectos de éste en el incremento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (McDonough, K. H. Antioxidant nutrients and alcohol. Toxicology 189:89–97; 2003) y su repercusión en diversos factores hemostáticos y en la función endotelial (Abou-Agag, L.H.; Khoo, N.K.; Binsack, R.; White, C.R.; Darley-Usmar, V.; Grenett, H.E.; Booyse, F.M.; Digerness, S.B.; Zhou, F.; Parks, D.A. Evidence of cardiovascular protection by moderate alcohol: role of nitric oxide. Free Radical Biology and Medicine 39:540–548; 2005).

Pero, por el contrario, también es bien conocido que el etanol actúa como oxidante en diversas rutas metabólicas (Wu, D.; Cederbaum, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. Alcohol Research & Health. 27: 277–284; 2003). Recientemente, se han obtenido resultados de la fuerte asociación entre el consumo de etanol a niveles tan bajos como 10 g/día, y el incremento de los niveles circulatorios de lipoproteínas de baja densidad oxidadas, siendo independiente de si la bebida alcohólica es vino, cerveza o un licor (Schroder, H.; Marrugat, J.; Fíto, M.; Weinbrenner, T.; Covas, M.I. Alcohol consumption is directly associated with circulating oxidized low-density lipoprotein. Free Radical Biology & Medicine. 40: 1474–1481; 2006).

Mann & Folts (Mann, L.B.; Folts, J.D. Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease. Areview. Pathophysiology. 10 : 105-112; 2004) proporcionan una interesante revisión sobre este tema. Estos autores consideran que los mecanismos que contribuyen a la iniciación y progreso de la arteriosclerosis, son mecanismos con puntos finales específicos que pueden ser medidos directamente; y que en el otro extremo del espectro científico de la aterogénesis se encuentran los estudios epidemiológicos, que sugieren un efecto beneficioso por el consumo moderado de bebidas alcohólicas. Sin embargo, Mann & Folts (2004) afirman que, cuando uno mide los puntos finales específicos relacionados con la aterogénesis, tendría lugar que las bebidas alcohólicas con mayores contenidos en polifenoles ofrecen mayor protección frente a la arteriosclerosis que el etanol por sí solo. En lo que respecta a los polifenoles del vino, esta fracción tiene un efecto antiaterogénico a través de los cinco eventos claves del mismo. En cuanto al etanol, se le ha descrito efecto antiagregante plaquetario y capacidad de incrementar los niveles de HDLs, que debe ser contrapuesta, a la hora de evaluar la relación beneficio-riesgo, a su actividad prooxidante, haciendo que el balance entre alcohol y polifenoles en el vino pueda ser crítico sobre su efecto en la oxidación de las LDLs (Schroder, H.; Marrugat, J.; Fíto, M.; Weinbrenner, T.; Covas, M.I. Alcohol consumption is directly associated

with circulating oxidized low-density lipoprotein. Free Radical Biology & Medicine. 40: 1474–1481; 2006).

Por otro lado, los escasos estudios médicos de intervención, en los que se evalúa el efecto del vino en el estrés oxidativo, muestran un efecto positivo del vino tinto frente a la práctica ausencia de efecto en blanco, lo que confirma la responsabilidad de la fracción polifenólica (Pignatelli et al, 2006). Finalmente, haciendo un balance entre los pocos efectos positivos descritos para el etanol, y los adversos, cabe decir que este juega un papel químico en la estabilidad de los polifenoles del vino favoreciendo su solubilidad, biodisponibilidad, así como por el efecto sobre la microflora intestinal y los posibles metabolitos de degradación de los compouestos fenólicos, además de incrementar el ratio de excrección vía aumento de diuresis (Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition 79: 727-747; 2004), por lo que un vino desalcoholizado (0º) no tendría un efecto idéntico al producto de partida, lo que explicaría el efecto diferente encontrado en algunos estudios (Mann, L.B.; Folts, J.D. Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease. Areview. Pathophysiology. 10 : 105-112; 2004).

Es creciente el número de publicaciones que relacionan el efecto saludable del vino con su contenido en compuestos fenólicos antioxidantes (Akcay Y.D.; Yıldırım H.K.; Güvenc U.; Sözmen E.Y. The effects of consumption of organic and nonorganic red wine on low-density lipoprotein oxidation and antioxidant capacity in humans. Nutrition Research 24: 541–554; 2004). Estos compuestos proceden del metabolismo secundario de los vegetales. Se encuentran básicamente en las partes sólidas de cubertura, semillas, corteza u hojas. En la uva las mayores concentraciones están en los hollejos, semillas y raspones (36%, 38% y 20%, respectivamente) y muy poco (6%) en la pulpa. Su contenido depende de muchos factores como la variedad, las condiciones de cultivo de la vid y las prácticas enológicas. Los principales compuestos fenólicos presentes en las uvas y en los vinos son de tipo noflavonoide (derivados de ácidos hidroxicinámicos e

hidroxibenzoicos), flavonoides (antocianos, flavonoles, flavanoles) y estilbenos (resveratrol, viniferin, piceid). Muchos de ellos poseen capacidad de neutralizar radicales libres y de acomplejamiento de metales de transición. Son conocidos como buenos antioxidantes lipídicos, se ha descrito que ejercen efectos antiinflamatorios y que actúan como protectores de las LDL frente a la oxidación. Sin embargo, queda mucho por estudiar acerca de los mecanismos de su actividad *in vivo* ya que aún se sabe poco de su biodisponibilidad y de su metabolismo (Cerdá, B.; Llorach, R.; Cerón, J.J., Espín, J.C.; Tomás-Barberán, F.A. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. European Journal of Nutrition. 42: 18-28; 2003).

Otra línea de investigación sobre la relación vino y salud es el estudio del efecto del vino como protector de daños al DNA mediados por especies oxígeno reactivas. Los daños al DNA están asociados a enfermedades crónicas no transmisibles (Lu, T.; Pan, Y.; Kao, S.Y.; Li, C.; Kohane, I.; Chan, J.; Yankner, B. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. Nature 429: 883–891; 2004). Los estudios realizados hasta el momento en esta línea, establecen una cierta relación entre efecto protector del vino frente a la oxidación del DNA atribuible a los compuestos fenólicos, pero queda mucho trabajo por hacer, ya que los resultados aun no son concluyentes (Greenrod, W.; Stockley, C.S.; Burcham, P.; Abbey, M.; Fenech, M. Moderate acute intake of de-alcoholised red wine, but not alcohol, is protective against radiation-induced DNA damage ex vivo—Results of a comparative in vivo intervention study in younger men. Mutation Research 591: 290–301; 2005)

Los compuestos fenólicos se podrían clasificar según su mecanismo de actuación sobre de las LDL. Así, se pueden distinguir los flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas y derivados que actúan por mecanismos no hormonales (anteriormente mencionados) que son compuestos propios del vino y productos derivados, y los fitoestrógenos propios del lúpulo, usado para aromatizar la cerveza, que actúan por mecanismos hormonales.

La fracción fenólica del vino, responsable de las propiedades cardiosaludables del mismo, presenta una alta complejidad en cuanto a su composición. Así, se pueden

encontrar flavonoles como la quercetina, el kaemferol y la miricetina, flavan-3-oles como la catequina, epicatequina y taninos, además de antocianinas. Estos compuestos pueden estar presentes además, dependiendo de la naturaleza de cada uno de ellos, en forma libre como aglicón, como glucósido, ramnoglucósido o formando parte de estructuras poliméricas como las procianidinas. Junto a la fracción flavonoidea se encuentran otros fenoles no fenólicos como los derivados del ácido hidroxicinámico, como el cafeico y el p-cumárico, del ácido hidroxibenzoico, como el gálico, o del tipo de los estilbenos (Van de Wiel, A.; Van Golde, P.H.M.; Hart, H.C. Blessings of the grape. European Journal of International Medicine. 12: 484-489; 2001). Esta complejidad en la composición podría ser la responsable de los efectos sinergicos observados tanto *in vitro* (Cirico, T.L.; Omaye, S.T. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. Food and Chemical Toxicology 44: 510-516; 2006) como *in vivo* (Pignatelli, P.; Ghiselli, A.; Buchetti, B.; carnevale, R.; Natella, F.; Germano, G.; Fimognari, F.; Di Santo, S.; Lanti, L.; Violi, F. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. Atherosclerosis. 188: 77-83; 2006). Este efecto abre la posibilidad de aumentar la actividad biológica de la fracción fenólica del vino mediante suplementación con polifenoles procedentes de la misma uva o de otras fuentes.

Por su parte, los polifenoles presentes en la cerveza aportan los mismos efectos antioxidantes y efectos protectores de enfermedades cardiovasculares que se han descrito ya para los polifenoles del vino. Estos compuestos provienen fundamentalmente del lúpulo añadido a la cerveza para concederle su característico sabor amargo.

El lúpulo contiene entre otros polifenoles xanthohumol y otros prenilflavonoides derivados. El xanthohumol y otras chalconas preniladas son tema de estudios recientes ya que parecen actuar como agentes químicos preventivos del cáncer. Otros derivados como la 8-prenilnaringenina, el producto de isomerización del desmetilxanthohumol se considera un potente fitoestrógeno (Stevens, J.F.; Page,

J.E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. Phytochemistry. 65: 1317-1330; 2004).

Los fitoestrógenos son compuestos químicos de origen vegetal que muestran efectos sugestivos de estrogenicidad, como la unión a receptores de estrógenos, la inducción de respuestas genéticas estrógeno-especificas para la producción de ciertos compuestos, etc. Estos compuestos son estructuralmente similares a los estrógenos endogenos de mamíferos y pueden actuar como antagonistas o agonistas dependiendo de su concentración en los tejidos donde deben actuar.

La mayoría de los fitoestrogenos más conocidos, como la genisteina y la daidzeina (soja) se unen al receptor estrogénico beta (ER-β) mientras que la 8-prenilnaringenina del lúpulo, aunque un tipo de enantiomero también es capaz de unirse a este receptor, tiene una altísima afinidad y una alta selectividad por la forma alfa del receptor de estrógenos (ER-α), unas 100 veces mayor que genisteina (Shaefer, O.; Humpel, M.; Fritzemeier, K.H.; Bohlmann, R.; Schleuning, W.D. 8-Prenylnaringenin is a potent Eralpha selective phytoestrogen present in hops and beer. Journal of Steroid Biochemistry. Molecular Biology. 84: 359–360; 2003). Los receptores estrogénicos ER-α y ER-β tienen considerable homología y su diferencia parece ser que únicamente radica en que mientras que algunos tejidos, tales como los ovarios y el útero, expresan ambos receptores, otros tejidos expresan preferentemente un receptor más que otro.

La actividad de los fitoestrogenos no solo se reduce a mejorar la salud de las mujeres (actuando como el 17□-estradiol, hormona femenina), también se ha demostrado que inhiben enfermedades cardiovasculares y reducen el riesgo de arteriosclerosis actuando como compuestos reductores del nivel de LDL en plasma, de colesterol y de triglicéridos bien por los mecanismos anteriormente mencionados por ser polifenoles o bien por otros mecanismos propios y específicos por su capacidad de actuar como hormonas.

Los efectos de los fitoestrogenos en las concentraciones plasmáticas lipídicas resultan de la acción estrógeno-receptor sobre la expresión hepática de genes de

apoproteínas (ApoA, B, D y E, y Lp(a)). Estos incrementan las lipoproteínas de densidad alta (HDL), lipoproteína antiaterogénica, y reduce los niveles de las lipoproteínas de densidad baja (LDL) y de la lipoproteína(a) (Lp(a)), ambas lipoproteínas aterogénicas. También los fitoestrogenos, al interferir con la actividad del factor de transcripción NF-kB, producen una dramática reducción en la expresión de genes inflamatorios.

Existen numerosos estudios que sugieren además que los fitoestrógenos influyen la regulación del tono vascular. Las células endoteliales y musculares lisas vasculares expresan ambos receptores ER-α y ER-β. En la vasculatura coronaria, los estrógenos revierten la vasoconstricción inducida por acetilcolina, vía estimulación de la sintetasa del óxido nítrico, a través de la activación de ER-α. Los estrógenos tienen acciones vasodilatadoras rápidas y efectos a largo plazo que inhiben las respuestas el daño vascular, previniendo la ateroesclerosis. Los efectos rápidos probablemente ocurren sin cambios en la expresión genética (efectos no-genómicos), mientras que los efectos a largo plazo comprenden cambios en la expresión genética (efectos genómicos) mediada por los receptores (Mendelsohn, M.E.; Karas, R.H. Estrogen and the blood vessel wall. Current Opinion on Cardiology 9: 619-26; 1994).

Aunque son bien conocidas las propiedades saludables que confieren los compuestos fenólicos del vino y la cerveza, no se han descrito hasta la fecha las propiedades beneficiosas para la salud resultantes de la combinación de los compuestos fenólicos del vino con los fitoestrógenos procedentes del lúpulo.

Por otra parte, las técnicas tradicionales de extracción requieren de varios pasos que incluyen trituración y secado y, frecuentemente, del uso de disolventes orgánicos que pueden presentar problemas de residuos. Las extracciones basadas en fluidos presurizados pueden presentar la ventaja de realizar la extracción en un solo paso y no dejar trazas de disolventes orgánicos, por lo que han venido en denominarse como tecnologías límpias de extracción. Estas incluyen a la ESFC y a los globalmente conocidos como PLE Pressurized Liquid Extraction), en los que un disolvente es presurizado sin llegar a alcanzar su punto crítico. El uso combinado de altas temperaturas y altas presiones permite mejorar la capacidad del fluido

extractante de disolver sustancias de la matriz, al mismo tiempo que se produce un aumento en la velocidad de transferencia de materia una disminución de la viscosidad y ruptura de la matriz, facilitando la extracción. De entre estas, el uso de agua presurizada y sobrecalentada recibe el nombre, de SWE (Subcritical Water Extraction). Esta última es la tecnología propuesta para extraer las fracciones fenólicas de uva y lúpulo destinadas a suplementar el vino desalcoholizado, al ser potencialmente más compatible con la polaridad de los compuestos polifenólicos de interés en este proyecto de investigación que las del CO_2 en condiciones supercríticas (Reglero, G., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. Supercritical fluid extraction: an alternative for the isolation of natural food preservatives. En: Novel food processing technologies. Barbosa-Cánovas, G., Tapia, M.S., Cano, M.P. Eds. CRC Press. Boca Raton. Florida.USA. pp. 539-554; 2005).

Cerca del punto crítico (374ºC, 22.1 MPa) la constante dieléctrica (ε) del agua cae desde 80 hasta el rango de 30-3 comportándose como un disolvente orgánico fuerte o moderado, i.e. metanol (ε:33), etanol (ε:24), con lo que se pueden alcanzar condicionesde extracción similares a las realizadas con estos disolventes o mezclas binarias metanol agua similares a las utilizadas para la extracción industrial de polifenoles. Hasta el momento se han realizado algunos trabajos, bastante conservadores en el uso de disolventes, de extracción de polifenoles con PLE (Ju, Z.Y.; Howard, L.R. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total poliphenolics from died red grape skin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 5207-5213; 2003; Piñeiro, Z.; Palma, M.; Barroso, C.G. Determination of catechins by jeans of extraction with pressurized liquids. Journal of Chromatography A. 1026: 19-23; 2004). A este respecto, se ha utilizado metanol a temperaturas con rango entre 80 ºC y 130 ºC para la extracción de polifenoles de uva, en particular catequinas y antocianinas. Por el contrario, en nuestro grupo de investigación hemos realizado varios estudios, en los que hemos extraido de forma efectiva diferentes tipos de polifenoles con estructura de flavona, flavanona y flavanol a partir de orégano (Rodriguez-Meizoso, I.; Marín, F.R.; Herrero, M.; Señorans, F.J.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. Subcritical water extraction of

antioxidants from orégano. Chemical and functional characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Special Issue in Nutraceutical Analysis. 41: 1560-1565; 2006) así como terpenos fenólicos procedentes de romero (Ibáñez, E.; Kubatova, A.; Señorans, F.J.; Cavero, S.; Reglero, G.; Hawthorne, B. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 375-382; 2003). Igualmente, miembros del grupo de investigación, han realizadoe studios preliminares en donde se confirma que extracciones secuenciales con SWE permiten obtener rendimientos de extracción para catequinas y aprocianidinas superiores a los obtenidos con las solucines hidroalcohólicas de metanol :agua (75:25) tradicionalmente usadas (García-Marino, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ibañez, E.; García-Moreno, C. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. Analytica Chimica Acta 56344–56350; 2006). Por el contrario, no se han encontrado referencias bibliográficas respecto al uso de SWE en la extracción de fitoestrógenos de lúpulo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han encontrado que la combinación de vino desalcoholizado, aroma de vino y un extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol posee una importante actividad para deprimir las señales inflamatorias y estimular las antiinflamatorias tanto en presencia como en ausencia de desencadenantes de ateroesclerosis como partículas LDL oxidadas. Asimismo, la administración de dicha combinación permite controlar los niveles de triglicéridos plasmáticos e impedir su incremento en dietas hipercolesterolémicas, así como disminuir la inflamación, reducir el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica en órganos con alto contenido en grasa como el tejido adiposo, y modular la actividad metabólica, propiedades todas ellas que permiten reducir la aparición de factores de riesgo que conducen al desarrollo de ateroesclerosis y enfermedades cardiovasculares.

Por tanto, en un primer aspecto la invención se relaciona con una composición (de aquí en adelante composición de la invención) que comprende vino desalcoholizado, aroma de vino y extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol.

En una realización particular, la composición comprende además extracto de orujo de uva y extracto de semillas de uva.

Un segundo aspecto de la presente invención lo constituye un procedimiento para la preparación de una composición como se ha definido previamente, que comprende la adición del aroma de vino, del extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol y, opcionalmente del extracto de orujo de uva y extracto de semillas de uva, sobre el vino desalcoholizado.

Adicionalmente, se ha desarrollado un procedimiento que permite la obtención de extractos enriquecidos en isoxantohumol de manera selectiva, favoreciendo la extracción del isoxantohumol y simultáneamente la transformación del xantohumol en isoxantohumol en un solo paso, conservando además la presencia de α y β-ácidos característicos de la lupulina, así como de otros compuestos químicos propios del lúpulo.

Así, la presente invención también se dirige a un procedimiento para la obtención de extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol que comprende:

a) proporcionar materia prima vegetal procedente de lúpulo;
b) secado de dicha materia prima vegetal;
c) trituración o molienda de la materia prima vegetal seca;
d) extracción de la materia prima vegetal seca y molida con agua presurizada y sobrecalentada en condiciones de temperatura comprendida entre 25 y 374ºC y presión comprendida entre 100 y 218 bares.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol que comprende:

a) 0.05-80% en peso seco de prenilflavanona isoxantohumol;

b) 0.001-10% en peso seco de prenilchalcona xantohumol; y

c) 1-90% en peso seco de α y β-ácidos seleccionados entre cohumulona, n-humulona, ad-humulona, iso-co-humulona, iso-n-humulona, iso-ad-humulona, colupulona, n-lupulona y ad-lupulona, además de azúcares, polisacáridos y aminoácidos.

La presente invención también se relaciona con una bebida funcional que comprende una composición como se ha definido previamente. Dicha bebida presenta además unas propiedades sensoriales análogas al vino.

Un aspecto adicional de la presente invención lo constituye el uso de una composición como se ha definido previamente o de la bebida funcional que la comprende para la preparación de un medicamento dirigido a la prevención o tratamiento del síndrome metabólico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Efecto comparativo de extractos de lúpulo sobre la producción de citoquinas en macrófagos THP-1. Tratamientos: 1. Control; 2. Indometacina (5µg/mL); 3. Extracto de lúpulo (1,5 µg/mL); 4. Isoxantohumol contenido en el extracto (10 ng/mL).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se dirige a una composición que comprende vino desalcoholizado, aroma de vino y extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol.

Se ha observado que la suplementación de los componentes fenólicos presentes en el vino desalcoholizado, responsables de la actividad antioxidante y anti-inflamatoria del vino, con fitoestrógenos presentes en el lúpulo, y en particular con isoxantohumol, permite tratar, o al menos prevenir, los riesgos que conducen al

desarrollo de ateroesclerosis y enfermedades cardiovasculares, y que constituyen algunos de los síntomas del síndrome metabólico.

Vino desalcoholizado

El vino desalcoholizado es el componente base de la composición de la invención. Por vino desalcoholizado debe entenderse un vino con un contenido en alcohol inferior al 1.2% en volumen, preferentemente inferior al 1% en volumen. Dicho vino desalcoholizado debe mantener además su actividad biológica lo menos alterada posible.

Así, el vino desalcoholizado comprende la fracción fenólica del vino responsable de la actividad biológica, es decir, la que le confiere sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Dicha fracción fenólica comprende los compuestos fenólicos del vino como flavonoles, entre los que se encuentran la quercetina, el kaemferol y la miricetina; flavan-3-oles como la catequina, epicatequina y taninas, además de antocianinas. Estos compuestos pueden estar presentes, dependiendo de la naturaleza de cada uno de ellos, en forma libre como aglicón, como glucósido, ramnoglucósido o formando parte de estructuras poliméricas como las procianidinas. Junto a la fracción flavonoidea se encuentran otros fenoles como los derivados del ácido hidroxicinámico, entre los que se encuentran el ácido cafeico y el ácido p-cumárico, y los derivados del ácido hidroxibenzoico como el ácido gálico, o derivados de estilbeno.

El vino desalcoholizado se obtiene a partir de cualquier procedimiento que permita reducir el contenido en etanol del vino hasta un porcentaje inferior al 1.2% en volumen. Dado que el vino suele contener más de un 10% en volumen de etanol, es preciso eliminar selectivamente dicho etanol en condiciones en las que no resulte alterada la actividad biológica del vino. La desalcoholización o eliminación parcial o total del contenido alcohólico en vino puede realizarse mediante distintas técnicas conocidas en el estado de la técnica que incluyen procesos de destilación con recuperación de los aromas, evaporación en columnas de platos con flujo descendente, como columnas de rectificación o columnas críticas centrífugas,

procesos de separación por difusión a través de membranas semipermeables, como diálisis, ósmosis inversa, pervaporación o extracción con fluidos supercríticos.

No obstante, en una realización preferente la desalcoholización del vino se efectúa mediante extracción del vino base con fluidos supercríticos, dado que es la técnica que mejor permite conservar tanto las propiedades biológicas como las organolépticas del vino base.

La desalcoholización de bebidas por medio de extracción con fluidos supercríticos se fundamenta en el equilibrio termodinámico que se establece entre las fases que se ponen en contacto, es decir la bebida alcohólica y el solvente supercrítico (una sustancia en condiciones de temperatura y presión por encima de sus valores críticos). En estas condiciones el solvente tiene unas propiedades que lo hacen particularmente atractivo para ser utilizado como agente de extracción, ya que es un gas denso, mantiene propiedades de transporte similares a las de los gases, y posee a la vez un gran poder solvente por tener densidades típicas de los líquidos.

Las ventajas que ofrece la tecnología de fluidos supercríticos como alternativa a los procedimientos tradicionales de extracción y fraccionamiento son bien conocidas en el estado de la técnica y consisten en la conservación de sus propiedades naturales, debido a las bajas temperaturas de procesamiento, y a la ausencia de riesgos de permanencia de residuos. Por otro lado, la tecnología de fluidos supercríticos permite rapidez de procesado (por ejemplo, eliminación del solvente de los solutos simplemente por despresurización), alta selectividad y nula agresión medioambiental.

En una realización particular, el vino desalcoholizado se obtiene mediante extracción supercrítica en contracorriente utilizando dióxido de carbono como fluido o solvente supercrítico. De forma preferente, el dióxido de carbono se encuentra a una temperatura comprendida entre 40 y 100ºC y a una presión comprendida entre 200 y 400 bares. Este método permite reducir el contenido de alcohol a concentraciones menores al 1% en volumen y mantener una actividad antioxidante similar a la del vino de partida.

A modo de ejemplo, el procedimiento de extracción supercrítica con dióxido de carbono consiste en introducir el vino de partida, o vino base, por la parte superior de una columna apta para realizar la extracción con dióxido de carbono en condiciones supercríticas en contracorriente, mientras que por la parte inferior de la columna, se introduce el dióxido de carbono. La presión en el interior de la columna puede estar comprendida entre 5 y 11 MPa, preferentemente entre 9 y 10 MPa, mientras que la temperatura de la columna puede oscilar entre 32 y 50ºC, preferentemente entre 37 y 42ºC. La relación entre el caudal de dióxido de carbono y el caudal de vino oscila entre 10 y 40, preferentemente entre 18 y 22. El vino con un contenido reducido en etanol se recoge en un recipiente colocado en la parte inferior de la columna y conectado con la misma.

Este procedimiento permite además recoger en la parte superior de la columna el extracto que contiene los compuestos responsables del aroma del vino. Así, una ventaja importante de la tecnología de extracción supercrítica, respecto de las demás técnicas de desalcoholización mencionadas previamente, radica en la posibilidad de recuperar una fracción importante del aroma simplemente por despresurización parcial del mencionado extracto, pudiéndose modificar la calidad del aroma recuperado variando las condiciones de extracción y de fraccionamiento. Por tanto, mediante la técnica de extracción con fluidos supercríticos se puede obtener tanto el vino desalcoholizado como el aroma de vino, y la mezcla resultante permite conservar tanto las propiedades biológicas como las propiedades organolépticas del vino base o vino de partida.

Aroma de vino

El aroma de vino lo constituyen numerosos compuestos orgánicos volátiles entre los que destacan ésteres y alcoholes como componentes mayoritarios.

Tal como se ha mencionado previamente, el aroma de vino se puede obtener también mediante extracción supercrítica en contracorriente utilizando dióxido de

carbono como fluido o solvente supercrítico según el procedimiento anteriormente mencionado.

En una forma de realización preferente, el dióxido de carbono se encuentra a una temperatura comprendida entre 40 y 70 ºC y a una presión comprendida entre 80 y 200 bares.

A modo de ejemplo, se introduce el vino de partida, o vino base, por la parte superior de una columna apta para realizar la extracción con dióxido de carbono en condiciones supercríticas en contracorriente, mientras que por la parte inferior de la columna, se introduce el dióxido de carbono. La presión en el interior de la columna puede estar comprendida entre 5 y 11 MPa, preferentemente entre 9 y 10 MPa, mientras que la temperatura de la columna puede oscilar entre 32 y 50ºC, preferentemente entre 37 y 42ºC. La relación entre el caudal de dióxido de carbono y el caudal de vino oscila entre 1 y 6, preferentemente entre 2 y 4. El extracto aromático se recoge en un recipiente colocado en la parte superior de la columna y conectado con la misma mantenido a una presión entre 3 y 6 MPa y a una temperatura entre 29 y 37ºC. Por cada litro de vino se recogen entre 10 y 30 mL de extracto aromático. Dicho extracto muestra un olor intenso y muy similar al del vino de partida y un aspecto transparente, sin color.

Extracto de lúpulo

El lúpulo (Humulus lupulus) es una planta del género humulus, perteneciente a la familia de las Cannabáceas. El lúpulo contiene, entre otros polifenoles, un prenilflavonoide como el xantohumol, así como derivados del mismo.

El extracto de lúpulo contenido en la composición de la invención está enriquecido en isoxantohumol, producto de isomerización del xantohumol, que también se encuentra presente en el lúpulo aunque en menores proporciones.

La relación de isoxantohumol:xantohumol en el material vegetal de origen es de aproximadamente 1:8, por lo que para obtener un extracto de lúpulo rico en

isoxantohumol se requiere aumentar la proporción de isoxantohumol, bien realizando una extracción selectiva de dicho componente o bien transformado el xantohumol en isoxantohumol.

Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento que, a diferencia de los procesos de extracción mediante disolventes orgánicos, de síntesis química o de extracción de xantohumol y transformación en isoxantohumol utilizados en el estado de la técnica, permite la obtención de extractos enriquecidos en isoxantohumol de manera selectiva, favoreciendo la extracción del isoxantohumol y simultáneamente la transformación del xantohumol en isoxantohumol en un solo paso, conservando además la presencia de α y β-ácidos característicos de la lupulina, así como de otros compuestos químicos propios del lúpulo, permitiendo así aprovechar las propiedades farmacológicas de la planta. Dicho procedimiento utiliza como disolvente de extracción agua sobrecalentada y presurizada, en condiciones cercanas a su punto crítico.

El procedimiento desarrollado se basa fundamentalmente en el acondicionamiento de la materia prima vegetal y en la modificación de las condiciones físicas a las que se realiza el proceso de extracción, aprovechando la variación del comportamiento químico del agua como disolvente, para obtener extractos vegetales enriquecidos en isoxantohumol y producir simultáneamente la isomerización del xantohumol en el anterior, utilizando el comportamiento de este último en condiciones de alta temperatura.

Así, en un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol que comprende:

a) proporcionar materia prima vegetal procedente de lúpulo;
b) secado de dicha materia prima vegetal;
c) trituración o molienda de la materia prima vegetal seca;
d) extracción de la materia prima vegetal seca y molida con agua presurizada y sobrecalentada en condiciones de temperatura

comprendida entre 25 y 374ºC y presión comprendida entre 100 y 218 bares.

Como materia prima vegetal más adecuada para utilizarse en este procedimiento, pueden mencionarse los amentos o conos femeninos de la planta, sus productos deshidratados y presentados en cualquier forma, así como la torta extenuada de los procesos de extracción de la lupulina, tanto procedente de métodos tradicionales como de extracción con fluidos supercríticos.

El secado de la parte de la planta a utilizar puede llevarse a cabo en una estufa o en un secadero con corriente de aire forzado a una temperatura comprendida entre 55 ºC y 65 ºC, preferentemente a 60 ºC. La duración del secado es variable dependiendo de la cantidad de materia prima a secar y del estado de humedad en que se encuentre la misma pudiendo variar entre unas cuantas horas y varios días. Un periodo de secado habitual puede ser de aproximadamente 1 día.

En una realización particular, la materia prima seca se tritura, utilizando por ejemplo un molino, hasta un tamaño de partícula entre 500 µm y 1000 µm. Este producto así secado y molido constituye la materia prima vegetal que se somete al proceso de extracción con el agua presurizada y sobrecalentada.

Dicha extracción se lleva a cabo en un dispositivo adecuado capaz de generar las presiones y las temperaturas utilizadas en este procedimiento. Así, en una realización particular, una vez colocado el material vegetal, convenientemente secado y molido, en un vaso de extracción, se procede a llenarlo de agua a la que se le habrá retirado el oxígeno disuelto, mediante cualquiera de los procedimientos disponibles. La proporción de material vegetal/agua puede oscilar desde 1/3 hasta cualquier proporción de agua mayor de 3. A continuación, y una vez lleno el vaso de extracción, se procede a precalentar el vaso hasta alcanzar la temperatura y la presión de extracción. La temperatura puede oscilar entre 25 ºC y 374 ºC, preferentemente entre 100 ºC y 250 ºC, mientras que la presión puede hacerlo entre 100 y 218 bares, preferentemente entre 125 y 200 bares.

El proceso puede realizarse mediante diferentes ciclos extractivos. El número de ciclos puede oscilar entre 1 y 10 ciclos, con una duración entre 3 y 60 minutos cada uno de los ciclos. Una vez transcurrido ese tiempo se recoge el extracto acuoso, se filtra y se deja enfriar.

Tras la filtración se obtiene una suspensión acuosa en la que el isoxanthohumol pierde progresivamente su solubilidad como consecuencia de la variación del comportamiento como disolvente del agua con la variación de las condiciones físicas, por lo que es necesario realizar de manera inmediata la separación del sólido y de la suspensión acuosa. Para la obtención del extracto seco se procede a eliminar el agua, de dicha suspensión, mediante cualquiera de los procedimientos existentes.

Los extractos vegetales, obtenidos mediante el presente procedimiento, tienen la ventaja de poder ser utilizados directamente en la formulación de distintos tipos de alimentos enriquecidos sin aportar ningún tipo de disolvente químico al alimento.

Una ventaja adicional de este procedimiento radica en la utilización del agua como único disolvente, evitándose así la presencia de impurezas o residuos de disolventes orgánicos, de otros reactivos o de posibles reacciones secundarias.

El procedimiento descrito en la presente invención proporciona un extracto enriquecido en isoxantohumol en el que se invierte la relación entre isoxantohumol:xantohumol, pasando de relaciones inferiores a 1:8 en el material vegetal de origen, a relaciones superiores a 10:1 en el extracto obtenido conforme a dicho procedimiento.

En una forma de realización preferente, el extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol comprende:

- 0.05-80% en peso seco de prenilflavanona isoxantohumol;
- 0.001-10% en peso seco de prenilchalcona xantohumol; y
- 1-90% en peso seco de α y β-ácidos seleccionados entre cohumulona, n-humulona, ad-humulona, iso-co-humulona, iso-n-humulona, iso-ad-

humulona, colupulona, n-lupulona y ad-lupulona, además de azúcares, polisacáridos y aminoácidos.

De forma aún más preferente, el extracto de lúpulo enriquecido en isoxantumol comprende:

- 0.2-60% en peso seco de prenilflavanona isoxantohumol;
- 0.01-1% en peso seco de prenilchalcona xantohumol; y
- 10-50% en peso seco de α y β-ácidos seleccionados entre cohumulona, n-humulona, ad-humulona, iso-co-humulona, iso-n-humulona, iso-ad-humulona, colupulona, n-lupulona y ad-lupulona, además de azúcares, polisacáridos y aminoácidos.

Extractos de orujo y semillas de uva

Cuando el vino base utilizado como producto de partida para la obtención del vino desalcoholizado y del aroma de vino es tinto, éste suele contener polifenoles suficientes como proporcionar una alta actividad antioxidante y antiinflamatoria. Sin embargo, cuando el vino base posee una actividad antioxidante baja, bien por tratarse por ejemplo de un vino rosado o de un vino blanco, es conveniente adicionar un extracto rico en polifenoles. De forma particular, dicho extracto procede de orujos y/o de semillas de uva.

Así, en una realización particular, la composición de la invención comprende además extracto de orujo de uva y extracto de semillas de uva.

Dichos extractos se pueden obtener a partir de los hollejos y semillas de la uva utilizando un procedimiento de extracción sólido/líquido convencional.

Así, en una realización particular, se lleva a cabo la extracción por separado de hollejos y semillas. El orujo se recoge inmediatamente después de su prensado y se separa en semillas y hollejos de una forma mecanizada, utilizando un separador de tamices vibratorio. Las semillas se secan en un secadero con aire forzado a temperaturas comprendidas entre 60 y 90ºC, preferentemente entre 70ºC y 80ºC.

Se almacenan en frío para su posterior extracción, mientras los hollejos se someten a extracción inmediatamente después de su separación.

La extracción sólido/líquido se lleva a cabo sobre ambos sustratos, hollejos y semillas, con agua y SO_2 a distintas temperaturas y con mezclas hidroalcohólicas con y sin SO_2. Se aplican procedimientos de extracción convencional sólido-líquido con proporciones etanol/agua que varían entre 90/10 y 50/50 a temperaturas entre 50 y 80ºC, preferentemente entre 60ºC y 70ºC. Las mayores proporciones de etanol favorecen la extracción de compuestos fenólicos (tanto de semillas, como de hollejos) y al mismo tiempo suprimen la extracción de compuestos no deseables (oligo y policarbohidratos), lo que indica que los extractos obtenidos con mayor contenido en etanol tienen mayor contenido en polifenoles y, por tanto, son de mayor interés para ser utilizados como aditivos en preparación de la composición de la invención.

Posteriormente, todos los extractos hidroalcohólicos se destilan y se restauran con agua hasta su volumen original. Se obtienen extractos con una actividad antioxidante 40 veces superior a la natural de un vino, para el mismo volumen.

La adición de extracto alcohólico de orujo y semillas de uva refuerza las propiedades antioxidantes de la composición, sin incrementar sustancialmente su grado alcohólico y sin alterar significativamente sus propiedades sensoriales.

Composición de la invención

De forma preferente, la composición de la invención comprende:

- 50-98.9% en peso de vino desalcoholizado;
- 1-20% en peso de aroma de vino;
- 0.1-20% en peso de extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol, y

opcionalmente:

- 0-20% en peso de extracto de orujo de uva; y
- 0-20% en peso de extracto de semillas de uva.

En una realización preferente, el aroma de vino se encuentra en una proporción de entre 9 y 11% en peso.

En una realización preferente, el extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol se encuentra en una proporción de entre 0.1 y 5% en peso, más preferentemente entre 0.1 y 1% en peso.

En una realización preferente, el extracto de orujo de uva se encuentra en una proporción de entre 0.1 y 5% en peso, más preferentemente entre 0.1 y 1% en peso.

En una realización preferente, el extracto de semillas de uva se encuentra en una proporción de entre 0.1 y 5% en peso, más preferentemente entre 0.1 y 1% en peso.

En otra forma de realización preferente, la composición de la invención contiene una proporción de etanol inferior al 1.2% en peso, más preferentemente inferior al 1% en peso, aún más preferentemente inferior al 0.5% en peso.

La composición de la invención se caracteriza además por no contener trazas de disolventes orgánicos distintos de etanol.

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un procedimiento para la preparación de la composición de la invención, donde dicho procedimiento comprende la adición del aroma de vino, del extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol y, opcionalmente, del extracto de orujo de uva y del extracto de semillas de uva, sobre el vino desalcoholizado.

En una realización preferente, los distintos componentes de la formulación se adicionan en las proporciones mencionadas anteriormente.

Bebida funcional

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a una bebida funcional que comprende la composición de la invención.

En el contexto de la presente invención, por "bebida funcional" se debe entender una bebida tradicional que ha sido modificada en su composición incorporando sustancias que no contiene de forma natural, con el fin de que adquiera una actividad biológica beneficiosa para la prevención o mejora de enfermedades.

En la presente invención, dicha bebida comprende vino desalcoholizado y aroma de vino procedente de un vino base al que se incorpora un extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol. De manera opcional, se puede adicionar a dicha bebida un extracto de orujo de uva y un extracto de semillas de uva. Dicha bebida presenta unas propiedades sensoriales análogas al vino.

Dicha bebida funcional puede comprender además vitaminas o precursores de vitaminas, entre las que se incluyen vitamina A, ácido ascórbico (Vitamina C), beta caroteno, niacina (Vitamina B3), riboflavina (Vitamina B2), tiamina (Vitamina B1), niacinamida, folato o ácido fólico, alfa-tocoferoles o ésteres de los mismos, Vitamina D, Vitamina E, Vitamina K, retinil acetato, retinil palmitato, piridoxina (Vitamina B6), ácido fólico (Vitamina B9), cianocobalimina (Vitamina B12), ácido pantoténico, biotina y combinaciones de las mismas.

Asimismo, dicha bebida puede incluir aromatizantes, agentes potenciadores del sabor, aditivos, agentes colorantes, emulsificantes, mineraels, micronutrientes, conservantes, estabilizadores, agentes espesantes y combinaciones de los mismos.

El consumo de dicha bebida funcional de forma regular a lo largo del día puede resultar una manera efectiva de mantener una concentración suficiente de ingredientes funcionales que proporcionan el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

Indicaciones profilácticas y terapéuticas

Los ensayos *in vitro* aportados en la presente solicitud han puesto de manifiesto que la administración de una bebida funcional que comprende la composición de la invención permite estimular la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en

macrófagos THP-1 nativos, en ausencia y presencia de partículas de lipoproteínas LDL oxidadas desencadenantes de ateroesclerosis. Asimismo, reduce la producción de citoquinas inflamatorias como TNF-α y IL-6, en presencia de dichas partículas de LDL oxidadas.

El papel de las partículas de LDL oxidadas en la aterogénesis se desarrolla mediante múltiples rutas. Inducen la expresión de señales de adhesión y quimiotácticas en células endoteliales. Esta sobreexpresión resulta, en la unión de los monocitos a las células endoteliales dentro de la pared arterial, su entrada en el sistema vascular, su diferenciación en macrófagos, y finalmente su transformación en células floculantes. Asimismo, estimulan a las células T a través del MHC y el receptor CD4+helperT-cell receptor. Las células T secretan IL-1 que incrementa la proliferación de células de músculo liso, IL-2 que activa a los monocitos e incrementa la proliferación de las células T, e induce IFN-γ que induce la expresión de MHC en las células endoteliales y de músculo liso, generando un proceso de retroalimentación. Además, los macrófagos ya activados secretan una amplia variedad de citoquinas (TNF-α, TGF-β, M-CSAF, etc) que influyen sobre la expresión de otros mediadores como el NO. De manera adicional, los aldehídos producidos en la oxidación de las LDLs ejercen un efecto tóxico directo sobre el endotelio y las plaquetas (Kaliora, A.C.; Dedoussis, G.V.Z.; Schmidt, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187: 1–17; 2006).

Por otra parte, los ensayos *in vivo* sobre ratones sometidos a una dieta enriquecida en colesterol han demostrado que la administración de dicha bebida permite un eficaz control de los niveles de triglicéridos plasmáticos impidiendo su incremento. Asimismo, dicha bebida provoca un eficaz descenso de los niveles de oxidación en órganos con alto contenido en grasas, como es el caso de hígado, riñón y tejido adiposo, así como un descenso de los niveles inflamatorios en tejido adiposo y una eficaz modulación de la actividad metabólica de dicho tejido adiposo.

Como se verá más adelante, todos estos ensayos están relacionados con distintos factores de riesgo que conducen al desarrollo de ateroesclerosis y enfermedades cardiovasculares.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención lo constituye el uso de una composición que comprende vino desalcoholizado, aroma de vino y extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol, para la preparación de un medicamento dirigido a la prevención o tratamiento del síndrome metabólico.

Por "síndrome metabólico" debe entenderse un conjunto de factores de riesgo y condiciones físicas que incrementan la propensión a desarrollar patologías tales como diabetes tipo 2, ateroesclerosis y enfermedades cardiovasculares. Existen distintas definiciones entre la que destaca la de la federación internacional de diabetes (The International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 2005 Disponible en: http://www.idf.org/webdata/docs/Metac). A pesar de la falta de consenso en las directrices para el diagnóstico del síndrome metabólico, existen evidencias que soportan las alteraciones metabólicas asociadas al desarrollo de esta enfermedad.

Así, entre los factores de riesgo que incrementan el desarrollo de la ateroesclerosis se incluye la dislipemia aterogénica. Clínicamente, la dislipemia aterogénica se caracteriza por elevados niveles de triglicéridos, incremento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) especialmente las partículas de menor tamaño y mayor densidad (sdLDL) y descenso de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL). También se ha descrito un incremento de los niveles circulantes de LDL oxidado asociado al síndrome metabólico. Generalmente la dislipemia aterogénica precede a la manifestación clínica del síndrome metabólico.

Dado que la composición de la invención ha demostrado controlar e impedir el aumento en los niveles de triglicéridos, dicha composición resulta de utilidad en el tratamiento de la dislipemia aterogéncia.

Por tanto, en una realización preferente la composición de la invención se dirige a la prevención o tratamiento de la dislipemia aterogénica.

Por otra parte, otro de los principales causantes del síndrome metabólico es la obesidad. El mecanismo de acción está relacionado con un incremento en el estrés oxidativo de las grasas acumuladas. Se ha demostrado una correlación directa entre

los niveles de estrés oxidativo sistémico y los depositos de grasa acumuladas, tanto en humanos como en modelos murinos (Carrière A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Pénicaud L, Casteilla L. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. J Biol Chem. 2004 Sep 24;279(39):40462-9, 2004). Por lo tanto, la obesidad en sí misma se caracteriza por un incremento del estrés oxidativo a nivel de tejido adiposo. Este estrés oxidativo incrementa la proliferación de preadipociotos y su posterior diferenciación, modulado por factores de transcripción sensibles a los radicales libres. Por lo tanto, se produce un ciclo retroalimentativo en el incremento de tejido adiposo que incrementa el estrés oxidativo, que a su vez promueve la síntesis de triglicéridos y la diferenciación de adipocitos por lo que se promueve y amplifica la base de la obesidad.

En este sentido, la composición de la invención ha demostrado reducir significativamente los niveles de estrés oxidativo y peroxidación lipídica en órganos con alto contenido en grasa como hígado, riñón y tejido adiposo.

En consecuencia, en otra realización preferente la composición de la invención se dirige a la prevención o tratamiento de la obesidad.

Como se ha descrito anteriormente, ante un proceso de estrés oxidativo la proliferación del tejido adiposo aumenta, incrementando el volumen del tejido, que en determinados niveles puede afectar a los vasos circulatorios, de tal manera que la irrigación sanguínea se ve afectada. Ocurren por tanto situaciones localizadas de hipoxia que tienen como consecuencia el desencadenamiento de procesos celulares de apoptosis. Esta situación da inicio a un proceso inflamatorio, aumentando la producción de citoquinas proinflamatorias e infiltración de macrófagos en el tejido adiposo. Los adipocitos, preadipocitos y otras células, pueden sintetizar TNF-α, y varias interleucinas, sobre todo IL-1beta e IL-6. Se ha descrito que los niveles de marcadores de inflamación como TNF-α, IL-6 y Proteína C reactiva se encuentran sistemáticamente elevados en individuos y modelos animales obesos.

En los ensayos aportados, se ha demostrado que la administración de la composición de la invención reduce de forma significativa los niveles de expresión génica de la citoquina proinflamatoria TNF-α en tejido adiposo, lo que provoca un descenso en los niveles de inflamación en dicho tejido.

Por tanto, en otra realización preferente la composición de la invención se dirige a la prevención o tratamiento de la inflamación, y de forma particular en el tejido adiposo.

Asimismo, en el proceso del desarrollo del síndrome metabólico se produce una desregulación en cuanto al uso de lípidos y carbohidratos como fuentes de energía, lo que conduce a una disfunción metabólica. Se producen situaciones anómalas que se asocian al proceso que desencadena la resistencia a insulina. En este proceso el músculo esquelético y el tejido adiposo juegan un papel clave en la utilización correcta de los triglicéridos circulantes o almacenados. En un correcto funcionamiento del tejido adiposo, el exceso de glucosa circulante es absorbido por los adipocitos estimulados por insulina. Los carbohidratos son metabolizados en triglicéridos para su almacenamiento. En caso de necesidad energética, los adipocitos liberan al torrente sanguíneo ácidos grasos libres, para su utilización como fuente de energía por parte del músculo esquelético e hígado.

En el caso del síndrome metabólico, se produce una desregulación de los adipocitos, liberando ácidos grasos al torrente sanguíneo cuando no es necesario, aumentando el riesgo aterogénico. En el control de la regulación metabólica del tejido adiposo, los receptores activados por proliferación de peroxisomas (PPAR) juegan un papel crucial. Son factores de transcripción que se activan por la unión de ligandos específicos (naturales o sintéticos) y regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa, formando así una conexión directa entre las señales extracelulares y la expresión de genes. Existen tres subtipos de PPARs, los PPARa, PPARb/d y PPARg, cuya expresión es tejido-específica. La activación farmacológica de estos receptores con ligandos específicos ha permitido evidenciar su papel en la fisiología celular. Actualmente se utilizan en la clínica dos tipos de activadores, los fibratos específicos para los PPARa con efecto

hipolipemiante, y las tiazolidinedionas o glitazonas, agonistas PPARg (Zariwala, Mark J. Holness. PPARs and the orchestration of metabolic fuel selection Pharmacological Research 60 (2009) 141–150) con acción hipoglucemiante, cuyos principales efectos radican en la activación de la oxidación y movilización de lípidos, y en la sensibilización de los tejidos periféricos a la acción de la insulina. Además de su efecto benéfico sobre la homeostasis lipídica y de la glucosa, la activación de los PPARs confiere protección al miocardio en el desarrollo de enfermedades y participa en la modulación de la respuesta inflamatoria

En este sentido, los ensayos sobre los niveles de expresión génica de PPAR en tejido adiposo han evidenciado que la administración de la composición de la invención aumenta los niveles de expresión génica de dicho factor de transcripción, por lo que dicha composición resulta de utilidad para el tratamiento de la disfunción metabólica.

Por tanto, en otra realización preferente, la composición de la invención se dirige a la prevención o tratamiento de la disfunción metabólica, y de forma particular de la disfunción metabólica en el tejido adiposo.

Ejemplos

EJEMPLO 1. Evaluación in vitro de la actividad antiinflamatoria de una bebida funcional a base de vino desalcoholizado y extracto de lúpulo.

Se preparó una bebida funcional según el siguiente procedimiento. Se tomó una fracción de vino tinto de la variedad Merlot de 12º alcohólicos. Se sometió a extracción con dióxido de carbono supercrítico a una presión de 9,5 Mpa, temperatura de 308 K y relación entre el caudal de caudal de dióxido de carbono y el caudal de vino de 3,5. Se obtuvo un extracto de aroma de vino. El residuo de la anterior extracción se sometió a extracción con dióxido de carbono supercrítico a una presión de 9,5 Mpa, temperatura de 308 K y relación entre el caudal de caudal de dióxido de carbono y el caudal de vino de 20. Se obtuvo un vino con un contenido en etanol del 1% y valores de capacidad secuestrante del radical estable

DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y de capacidad ORAC (Capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno) similares al vino original. Se añadió extracto de aroma al vino bajo en etanol en una proporción de 10 ml de extracto de aroma por litro de vino.

Se tomaron flores femeninas de lúpulo (*Humulus lupulus*) y se sometieron a un proceso de secado, molienda, extracción con agua, filtrado y secado posterior. A continuación se someten a extracción con agua presurizada en una proporción de material vegetal y agua 1:3, presión de 125 atm y temperatura de 200ºC. Se obtiene un extracto de lúpulo enriquecido en isoxantumol.

Dicho extracto de lúpulo se adicionó a la mezcla del vino bajo en etanol y aroma de vino obtenido previamente, obteniéndose así la bebida funcional.

Las propiedades anti-inflamatorias de la bebida han sido evaluadas en cultivos celulares de monocitos THP-1, en los que se evaluó la producción y expresión génica de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β y IL-6) y de citoquinas antiinflamatorias (IL-10), activadas con partículas de LDL-oxidado y no activados, en presencia de partículas de LDL oxidado y de LDL no oxidado, tras suministrar dicha bebida.

La bebida funcional que comprende dosis del extracto de lúpulo iguales o inferiores a 2 µg/mL provocaron un descenso en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β e IL-6) y un aumento de la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10), tanto cuando los macrófagos han sido activados con partículas LDL-oxidadas como cuando no lo son. El aumento observado en la producción de citoquinas antiinflamatorias en macrófagos activados por partículas de LDL oxidadas es de aproximadamente un 243% para dosis de 1,5 µg de extracto/mL respectivamente; siendo el aumento de aproximadamente un 195% en macrófagos no activados. Simultáneamente, se midió una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6 y IL-1β) de aproximadamente un 51% de TNF-α para dosis de 1,5 µg de extracto/mL en macrófagos activados con partículas LDL-oxidadas, de aproximadamente un 67% de IL-6 para la dosis de 1,5 µg de extracto/mL respectivamente en macrófagos activados con partículas LDL-oxidadas,

no considerándose relevantes, en las dos últimas citoquinas, en macrófagos no activados por LDL oxidadas. La variación en la producción de IL-1β supuso un descenso de un 93% para dosis de 1,5 µg de extracto/mL en macrófagos activados con partículas LDL-oxidadas, y ligeros aumentos en ausencia de partículas de LDL oxidadas.

Asimismo, se evaluó el efecto anti-inflamatorio de la bebida funcional con respecto a una dosis de isoxantohumol y xantohumol puros como la contenida en el extracto de lúpulo, y frente a un fármaco antiinflamatorio convencional como la indometacina. Los resultados se muestran en la figura 1.

Se observa que el patrón de producción de citoquinas de los macrófagos THP-1 cuando son tratados, en presencia y ausencia de partículas de LDL oxidadas, con cantidades de isoxanthohumol y xanthohumol puros indica que el patrón antioxidante no se justifica exclusivamente por la posible actividad de estos compuestos, sino que el extracto en su conjunto presenta una mayor, y diferente, actividad antiinflamatoria, tal como puede verse en la figura 1. Así, por ejemplo, dosis de lúpulo comprendidas entre 0,01 µg/mL 0,05 µg/mL dan lugar a variaciones de IL-10 en un rango del 15% y el 30% respecto a los tratamientos control con partículas de LDL oxidadas y en ausencia de estas, respectivamente; mientras que los extractos de lúpulo, obtenidos conforme a lo descrito en la presente invención, conteniendo la misma cantidad de isoxanthohumol dan lugar a incrementos de producción de IL-10 del orden de 255% y 195% en macrófagos activados con partículas de IDL oxidadas y en su ausencia, respectivamente. Asimismo, dicho extracto presenta una actividad supresora de la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-α e IL-6), y de estimulación de las citoquinas antiinflamatorias (IL-10) muy superior a fármacos antiinflamatorios como la indometacina a dosis farmacológicas (5µg/mL).

EJEMPLO 2. Evaluación in vivo de los efectos saludables de una bebida funcional a base de vino desalcoholizado y extractos de lúpulo.

Se preparó una bebida funcional según el siguiente procedimiento. Se tomó una fracción de vino tinto de la variedad Merlot de 12º alcohólicos. Se sometió a extracción con dióxido de carbono supercrítico a una presión de 9,5 Mpa, temperatura de 308 K y relación entre el caudal de caudal de dióxido de carbono y el caudal de vino de 3,5. Se obtuvo un extracto de aroma de vino. El residuo de la anterior extracción se sometió a extracción con dióxido de carbono supercrítico a una presión de 9,5 Mpa, temperatura de 308 K y relación entre el caudal de caudal de dióxido de carbono y el caudal de vino de 20. Se obtuvo un vino con un contenido en etanol del 1% y valores de DPPH y ORAC similares al vino original. Se añadió extracto de aroma al vino bajo en etanol en una proporción de 10 ml de extracto de aroma por litro de vino.

Se tomaron flores femeninas de lúpulo (*Humulus lupulus*) y se sometieron a un proceso de secado, molienda, extracción con agua, filtrado y secado posterior. A continuación se someten a extracción con agua presurizada en una proporción de material vegetal y agua 1:3, presión de 125 atm y temperatura de 200ºC. Se obtiene un extracto de lúpulo enriquecido en isoxantumol. Se añadió extracto de lúpulo al vino bajo en etanol a razón de 50 ml por litro.

Para la evaluación del efecto de la bebida de manera parcialmente trasladable a la población general sana, se diseño un modelo animal joven y sano al que se le sometió a un leve estrés cardiovascular, mediante la suplementación en la dieta con colesterol.

El estudio se llevó a cabo en 24 ratas Wistar machos adultos, de dos meses y peso medio 275g, procedentes de un distribuidor oficial. Los animales se estabularon en grupos de 4. Los animales fueron pesados individualmente a tiempo cero. En todo momento se siguió la normativa vigente sobre protección de los animales para experimentación RD 1201/2005.

Los animales fueron distribuidos en 2 grupos de manera aleatoria. A cada grupo se le suministró una bebida diferente con la intención de evaluar el efecto fisiológico del prototipo (grupo lúpulo) frente a un control negativo (grupo control). Los

animales recibieron en el agua de bebida los distintos productos en cantidad equivalente a la de un consumo de etanol moderado en el hombre (300 ml/día - 70 Kg) (1.07 ml/animal/día). Los biberones se prepararon a diario y los animales tuvieron libre acceso a la bebida. Durante la primera semana se valoro diariamente la ingesta líquida de la unidad experimental (jaula) para la verificación de cualquier incremento o descenso de la misma. El grupo control tomó una solución azucarada (5,9 gr/l). Los animales recibieron durante el estudio y simultáneamente con la administración de las distintas bebidas, una dieta enriquecida en colesterol (2%) *ad libitum*.

Tras el periodo de adaptación los animales siguieron el tratamiento durante 12 semanas. Tras ese periodo fueron sacrificados por exanguinación mediante punción intracardíaca y posterior administración de KCl (1M) bajo anestesia inhalatoria con isofluorano (Forane®) al 2%. Se recolectaron muestras de sangre para la obtención de suero y plasma. La sangre recogida mediante punción intracardíaca fue transferida a tubos con EDTA y Gelatina (bioquímica) (6 ml). Mediante centrifugado (4.000 rpm durante 10 min) se obtuvo plasma y suero. A su vez, se diseccionaron los animales y se obtuvieron las aortas completas, muestras de corazón, hígado, riñón y tejido adiposo (grasa retoperitoneal). Todos los tejidos fueron lavados, codificados e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -80ºC hasta su análisis. Los posteriores análisis se realizaron en condiciones "ciegas".

Se analizó la concentración de lípidos plasmáticos de los animales tal y como muestran los resultados a continuación:

Concentraciones de colesterol total y triglicéridos tras la intervención (mg/dL). Valores medios seguidos de la diferencia estándar. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas entre las muestras

	Control		**Bebida funcional**	
	Media	DS	**Media**	DS

Colesterol	68,00	6,16[a]	61,50	10,56 [a]
Triglicéridos	115,57	30,53 [a]	58,20	6,94 [b]

A pesar del aparente descenso en las concentraciones de colesterol total, el análisis de la varianza de los resultados reveló ausencia de diferencias significativas entre los grupos control y bebida funcional (ANOVA $p<0.01$).

Sin embargo, el análisis de la varianza de las concentraciones triglicéridos tras la intervención, revelaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p<0.01$). Cabe destacar, que a pesar de seguir la misma dieta alta en colesterol el grupo tratado con la bebida funcional presentaba casi la mitad de las concentraciones de triglicéridos plasmáticos observadas en el grupo control ($p<0.001$).

Estos resultados ponen de manifiesto que la composición de la invención es eficaz en el control de los niveles de triglicéridos plasmáticos e impide su incremento en dietas hipercolesterolémicas.

Por otra parte, se obtuvieron los tejidos y los plasmas de cada animal y se procesaron para el análisis de la concentración de peróxidos lipídicos, tal y como muestran los siguientes resultados:

Peroxidación lipídica en tejidos grasos (hígado, riñón y adiposo) y plasma como especies reactivas con ácido tiobarbitúrico (miliequivalentes MDA/mg proteína o mL de plasma). Valores medios seguidos de la diferencia estándar. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas entre las muestras

	Control		**Bebida funcional**	
	Media	DS	**Media**	DS
Hígado	4,04	0,61 [a]	3,15	0,80 [b]
Riñón	7,45	1,91 [a]	4,20	1,23 [bb]
Plasma	163,26	39,60 [a]	145,11	22,38 [a]
Grasa	504,48	216,76 [a]	191,03	67,29 [bb]

Para determinar el efecto de las bebidas añadidas en la dieta en el estatus oxidativo global del modelo animal se analizaron las concentraciones de equivalentes de MDA (malondialdehído) en los plasmas recolectados tras 12 meses de tratamiento. Tras el análisis de la varianza de este parámetro no se observaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p<0.01$).

Por el contrario, se encontraron diferencias significativas al analizar el efecto de la bebida enriquecida en lúpulo en los niveles de peroxidación lipídica de órganos grasos. En concreto, tras el análisis de la varianza de los niveles de especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico en homogenados hepáticos tras la intervención, se observaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p<0.01$). En concreto el grupo tratado con la bebida funcional presentó unos valores significativamente inferiores de peróxidos hepáticos comparado con el grupo Control ($p<0.05$).

De manera similar, tras el análisis de la varianza de los niveles de especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico en homogenados renales tras la intervención, se observaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p<0.01$). En concreto el grupo tratado con la bebida funcional presentó unos valores significativamente inferiores de peróxidos renales comparado con el grupo Control ($p<0.01$).

Por último, tras el análisis de la varianza de los niveles de especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico en homogenados de tejido adiposo (grasa retroperitoneal) tras la intervención, se observaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p<0.01$). En concreto el grupo tratado con la bebida funcional presentó unos valores significativamente inferiores de peróxidos en tejido adiposo comparado con el grupo Control ($p<0.01$).

Por lo tanto, estos resultados demuestran que la administración de la composición de la invención provoca un eficaz descenso de los niveles de oxidación en órganos con alto contenido en grasas, más concretamente hígado, riñón y tejido adiposo.

Asimismo, se obtuvo el tejido adiposo de cada animal y se congeló inmediatamente una muestra en nitrógeno líquido. Tras la extracción de RNA se sintetizó cDNA, se

utilizaron cebadores específicos del gen TNF-α para cuantificar su expresión mediante RT-PCR, usando como gen constitutivo de referencia S26. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Niveles de expresión génica a nivel de tejido adiposo de TNF- α, referido al gen constitutivo S26 (unidades arbitrarias). Valores medios seguidos de la diferencia estándar. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas entre las muestras

	Control		**Bebida funcional**	
	Media	DS	**Media**	DS
TNF-α/S26	0,00139	0,00068 [a]	0,00093	0,00021 [b]

El análisis de la varianza de los niveles de expresión génica de TNF- α en tejido adiposo mostró diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p<0.05$). En concreto, el grupo tratado con la bebida funcional ($p<0.05$), presentó unos valores significativamente menores de expresión génica con respecto al grupo Control (disminuye un 30% la expresión de TNF- α).

Por lo tanto, la composición de la invención resulta asimismo eficaz para disminuir los niveles de inflamación en tejido adiposo.

Se obtuvo el tejido adiposo de cada animal y se congeló inmediatamente una muestra en nitrógeno líquido. Tras la extracción de RNA se sintetizó cDNA, y se utilizaron cebadores específicos del gen PPAR-δ para cuantificar su expresión mediante RT-PCR, usando como gen constitutivo de referencia S26. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Niveles de expresión génica a nivel de tejido adiposo de PPAR-δ, referido al gen constitutivo S26 (unidades arbitrarias). Valores medios seguidos de la diferencia estándar. Las diferentes letras en superíndice indican diferencias significativas entre las muestras

	Control		Bebida funcional	
	Media	DS	**Media**	DS
PPAR-δ /S26	0,1425	0,03735 [a]	0,1926	0,04128 [b]

El análisis de la varianza de los niveles de expresión génica de PPAR-δ en tejido adiposo mostró diferencias significativas entre los grupos (ANOVA $p<0.05$). En concreto, el grupo tratado con la composición de la invención ($p<0.05$), presentó unos valores significativamente mayores de expresión génica con respecto al grupo Control (aumenta un 35% la expresión de PPAR-δ).

Estos resultados demuestran que la composición de la invención permite modular la actividad metabólica del tejido adiposo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende vino desalcoholizado, aroma de vino y extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol.

2. Composición según la reivindicación 1, que además comprende extracto de orujo de uva y extracto de semillas de uva.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que comprende:

   - 50-98.9% en peso de vino desalcoholizado;
   - 1-20% en peso de aroma de vino;
   - 0.1-20% en peso de extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol; y

   opcionalmente:

   - 0-20% en peso de extracto de orujo de uva; y
   - 0-20% en peso de extracto de semillas de uva.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol comprende:

   - 0.05-80% en peso seco de prenilflavanona isoxantohumol;
   - 0.001-10% en peso seco de prenilchalcona xantohumol; y
   - 1-90% en peso seco de α y β-ácidos seleccionados entre cohumulona, n-humulona, ad-humulona, iso-co-humulona, iso-n-humulona, iso-ad-humulona, colupulona, n-lupulona y ad-lupulona, además de azúcares, polisacáridos y aminoácidos.

5. Composición según reivindicación 4, donde el extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol comprende:

   - 0.2-60% en peso seco de prenilflavanona isoxantohumol;
   - 0.01-1% en peso seco de prenilchalcona xantohumol; y
   - 10-50% en peso seco de α y β-ácidos seleccionados entre cohumulona, n-humulona, ad-humulona, iso-co-humulona, iso-n-humulona, iso-ad-humulona, colupulona, n-lupulona y ad-lupulona, además de azúcares, polisacáridos y aminoácidos.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada por contener etanol en una proporción entre 0 y 1.2% en peso.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por no contener trazas de disolventes orgánicos distintos de etanol.

8. Un procedimiento para la preparación de una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la adición del aroma de vino, del extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol y, opcionalmente, del extracto de orujo de uva y del extracto de semillas de uva, sobre el vino desalcoholizado.

9. Procedimiento según reivindicación 8, donde el vino desalcoholizado se obtiene mediante extracción supercrítica del vino base con dióxido de carbono, a una temperatura del dióxido de carbono comprendida entre 32ºC y 50ºC y a una presión de dióxido de carbono comprendida entre 5 y 11 MPa.

10. Procedimiento según reivindicación 8, donde el aroma de vino se obtiene mediante extracción supercrítica del vino base con dióxido de carbono, a una temperatura de dióxido de carbono comprendida entre 32ºC y 50ºC y a una presión de dióxido de carbono comprendida entre 5 y 11 MPa.

11. Procedimiento según reivindicación 8, donde el extracto de orujo de uva se obtiene mediante un procedimiento de extracción sólido-líquido que comprende:

    - secado de los orujos mediante aire forzado a una temperatura entre 60 y 90ºC; y
    - extracción del orujos secos con una mezcla etanol agua en una proporción comprendida entre 99/1 y 50/50 a una temperatura entre 30 y 80ºC.

12. Procedimiento según reivindicación 8, donde el extracto de semillas de uva se obtiene mediante un procedimiento de extracción sólido-líquido que comprende:

- secado de las semillas de uva mediante aire forzado a una temperatura entre 60 y 90ºC; y
- extracción del orujos secos con una mezcla etanol agua en una proporción comprendida entre 99/1 y 50/50 a una temperatura entre 30 y 80ºC.

13. Un procedimiento para la obtención de extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol que comprende:

a) proporcionar materia prima vegetal procedente de lúpulo;
b) secado de dicha materia prima vegetal;
c) trituración o molienda de la materia prima vegetal seca;
d) extracción de la materia prima vegetal seca y molida con agua presurizada y sobrecalentada en condiciones de temperatura comprendida entre 25 y 374ºC y presión comprendida entre 100 y 218 bares.

14. Un extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol obtenible según el procedimiento definido en la reivindicación 13.

15. Un extracto de lúpulo que comprende:

- 0.05-80% en peso seco de prenilflavanona isoxantohumol;
- 0.001-10% en peso seco de prenilchalcona xantohumol; y
- 1-90% en peso seco de α y β-ácidos seleccionados entre cohumulona, n-humulona, ad-humulona, iso-co-humulona, iso-n-humulona, iso-ad-humulona, colupulona, n-lupulona y ad-lupulona, además de azúcares, polisacáridos y aminoácidos.

16. Extracto de lúpulo según reivindicación 15, que comprende:

- 0.2-60% en peso seco de prenilflavanona isoxantohumol;
- 0.01-1% en peso seco de prenilchalcona xantohumol; y
- 10-50% en peso seco de α y β-ácidos seleccionados entre cohumulona, n-humulona, ad-humulona, iso-co-humulona, iso-n-humulona, iso-ad-

humulona, colupulona, n-lupulona y ad-lupulona, además de azúcares, polisacáridos y aminoácidos.

17. Bebida funcional que comprende una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

18. Uso de una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o de una bebida funcional como se define en la reivindicación 17 para la preparación de un medicamento dirigido a la prevención o el tratamiento del síndrome metabólico.

19. Uso según reivindicación 18, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la dislipemia aterogénica.

20. Uso según reivindicación 18, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la obesidad.

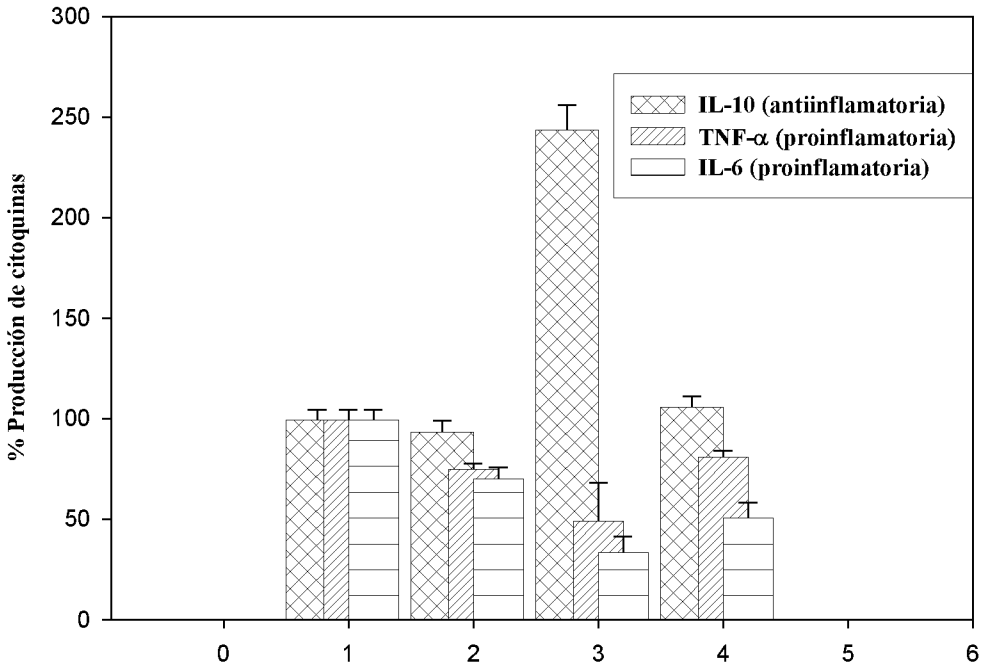
21. Uso según reivindicación 18, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la inflamación.

22. Uso según reivindicación 21, donde la inflamación se produce en el tejido adiposo.

23. Uso según reivindicación 18, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la disfunción metabólica.

24. Uso según reivindicación 23, donde la disfunción metabólica se produce en el tejido adiposo.

Figura 1


% Producción de citoquinas
300
250
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
6
IL-10 (antiinflamatoria)
TNF-α (proinflamatoria)
IL-6 (proinflamatoria)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070443

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L2/52 (2006.01)
A23L1/30 (2006.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, FSTA, SCIENCEDIRECT-ELSEVIER

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03090555 A1 (GREEN ET AL.) 06-11-2003, Pág.5-7.	1-8, 17-24
A	US 2009311381 A1 (GARDNER) 17-12-2009, Paragraphs 0008, 0010, 0016.	1-8, 17-24
A	WO 2009032323 A1 (WILKES AND ASSOCIATED) 12-03-2009, Paragraphs 0004-0006, 0012.	1-8, 17-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09/10/2012	**(15/10/2012)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer J. López Nieto Telephone No. 91 3498426

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070443

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental Box

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-8, 17-24**

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box III

The application contains the following inventions:

Invention 1: Claims 1-8 and 17-24: Composition containing dealcoholized wine, wine aroma and hop extract enriched with isoxanthohumol, method for obtaining it and use thereof.

Invention 2: Claim 9: Method for obtaining dealcoholized wine

Invention 3: Claim 10: Method for obtaining wine aroma.

Invention 4: Claim 11: Method for obtaining grape marc extract.

Invention 5: Claim 12: Method for obtaining grape seed extract.

Invention 6: Claims 13 to 16: Method for obtaining hop extract enriched with isoxanthohumol and extract obtaine.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES2012/070443

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO03090555 A	06.11.2003	AU2002257721 A	10.11.2003
		BR0208418 A	30.03.2004
		CN1499939 A	26.05.2004
		CN1315412 C	16.05.2007
		US2004156950 A	12.08.2004
		EP1503633 A	09.02.2005
		EP20020727486	24.04.2002
US2009311381 A	17.12.2009	CA2732795 A	17.12.2009
		WO2009152237 A	17.12.2009
		EP2303039 A	06.04.2011
		EP20090763527	10.06.2009
WO2009032323 A	12.03.2009	CA2698696 A	12.03.2009
		US2009297681 A	03.12.2009
		EP2190306 A	02.06.2010
		EP20080829811	08.09.2008
		MX2010002580 A	31.08.2010

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2012/070443

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
A23L2/52 (2006.01)
A23L1/30 (2006.01)
De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A23L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, FSTA, SCIENCEDIRECT-ELSEVIER

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 03090555 A1 (GREEN ET AL.) 06-11-2003, Pág.5-7.	1-8, 17-24
A	US 2009311381 A1 (GARDNER) 17-12-2009, Párrafos 0008, 0010, 0016.	1-8, 17-24
A	WO 2009032323 A1 (WILKES AND ASSOCIATED) 12-03-2009, Párrafos 0004-0006, 0012.	1-8, 17-24

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
09/10/2012	**15 de octubre de 2012 (15/10/2012)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado J. López Nieto Nº de teléfono 91 3498426

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070443

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. ☐ Las reivindicaciones nºs:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

VER RECUADRO SUPLEMENTARIO.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs:

4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones **nºs:1-8, 17-24**

Indicación en cuanto a la protesta

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.

☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

RECUADRO SUPLEMENTARIO DE REC. III

La solicitud contiene las siguientes invenciones:

Invención 1: Reivindicaciones 1-8 y 17-24. Composición que comprende vino desalcoholizado, aroma de vino y extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol, procedimiento de obtención y su utilización.

Invención 2: Reivindicación 9. Procedimiento para obtener vino desalcoholizado.

Invención 3: Reivindicación 10. Procedimiento para obtener aroma de vino.

Invención 4: Reivindicación 11. Procedimiento para obtener extracto de orujo de uva.

Invención 5: Reivindicación 12. Procedimiento para obtener extracto de semillas de uva.

Invención 6: Reivindicación 13-16. Procedimiento para obtener extracto de lúpulo enriquecido en isoxantohumol y extracto obtenido.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070443

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO03090555 A	06.11.2003	AU2002257721 A	10.11.2003
		BR0208418 A	30.03.2004
		CN1499939 A	26.05.2004
		CN1315412 C	16.05.2007
		US2004156950 A	12.08.2004
		EP1503633 A	09.02.2005
		EP20020727486	24.04.2002
US2009311381 A	17.12.2009	CA2732795 A	17.12.2009
		WO2009152237 A	17.12.2009
		EP2303039 A	06.04.2011
		EP20090763527	10.06.2009
WO2009032323 A	12.03.2009	CA2698696 A	12.03.2009
		US2009297681 A	03.12.2009
		EP2190306 A	02.06.2010
		EP20080829811	08.09.2008
		MX2010002580 A	31.08.2010