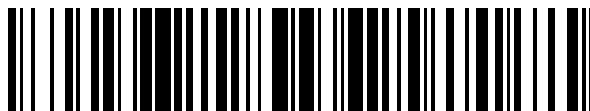


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 984**

21 Número de solicitud: 201930142

51 Int. Cl.:

**A61K 36/87** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**G01N 33/15** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.02.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.08.2020**

71 Solicitantes:

**BODEGA MATARROMERA, S.L. (50.0%)**  
**Ctra. San Bernardo s/n**  
**47359 Valbuena de Duero (Valladolid) ES y**  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SRIVASTAVA, Girish Kumar;**  
**GUADARRAMA RODRIGUEZ, Alberto;**  
**MORO GONZÁLEZ, Luis Carlos;**  
**VENDRELL LAGUNA, Victor David y**  
**PASTOR JIMENO, José Carlos Salvador**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

54 Título: **Procedimiento para identificar propiedades de un extracto de uva**

57 Resumen:

La invención implica una serie de procesos que establecen la solubilidad, las concentraciones no-citotóxicas y citotóxicas del extracto de uva, posteriormente estableciendo su capacidad antioxidante y antidegenerativa y su eficacia utilizando cultivos de células epiteliales pigmentarias retinales humanas y diversas estrategias de ensayo que combinan diferentes tratamientos oxidativos. Adicionalmente, se describe una composición para tratar o mejorar un trastorno oftalmológico, que comprende un extracto de uva.

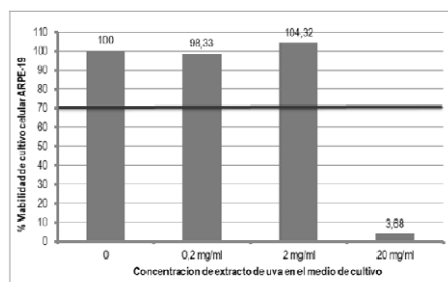


Figura 1

ES 2 779 984 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para identificar propiedades de un extracto de uva

### 5 ANTECEDENTES

Las uvas son antioxidantes naturales y pueden actuar como una quimioterapia natural para aliviar algunos de los síntomas de enfermedades oculares como la retinosis pigmentaria, la degeneración macular asociada a la edad, el glaucoma, el síndrome de ojo seco, la conjuntivocalasia, el queratocono, las cataratas, la retinopatía diabética y algunas uveítis entre otros, y otras patologías distintas a las oculares como el edema cardiovascular o la integridad capilar deteriorada, o la aterosclerosis y también patologías hematológicas como agregación plaquetaria espontánea excesiva entre otras. En el procedimiento de su obtención, como en este caso "el extracto", su formulación junto con otros componentes para fabricar un producto, sus beneficios en el uso humano y el nivel de efectividad de esas características antioxidantes a nivel celular y/o tisular se puede alterar, además de depender de las variedades de las uvas. Por otra parte, la evaluación de las características antidegenerativas es crucial porque el daño oxidativo puede producir la degeneración celular y/o tisular, procesos que además pueden ser agudos o crónicos. Un producto basado a la capacidad antioxidante menos potente puede ser que no rescate a las células y/o tejido que están en degeneración (es decir que no tenga capacidad antidegenerativa). Por ello, es necesario evaluar esas características -antioxidante y antidegenerativa- incluyendo una valoración sobre su solubilidad, su citotoxicidad y su comparación con otros productos ya existentes en el mercado, para lograr nuevos productos más potentes y efectivos para uso humano.

El riesgo del daño oxidativo se produce en casi todos los tejidos del organismo, pero es especialmente relevante en algunos como la piel, el tejido neuronal, el corazón, y el ojo entre otros. Tomando los ojos como ejemplo, se puede afirmar que presentan un riesgo especial de sufrir los efectos del daño oxidativo debido a su alta exposición al oxígeno, su gran cantidad de ácidos grasos oxidables y también su alta exposición a la luz, a los contaminantes ambientales y muy especialmente a la radiación ultravioleta. Gran parte de las células y tejidos del ojo se exponen continuamente al daño oxidativo como consecuencia de su constante exposición a la luz y al oxígeno atmosférico, lo que incrementa el riesgo de

enfermedades oculares. Existen numerosos estudios que sugieren que algunas de estas enfermedades (como la Degeneración Macular Asociada a la Edad, DMAE) tienen su origen en la pérdida o en graves alteraciones de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR)(degeneración celular), que son esenciales para la supervivencia de los fotorreceptores y de otras células retinianas (degeneración tisular), y consecuentemente, para el mantenimiento de la visión. Y existen evidencias de que esta pérdida de células del EPR puede ser consecuencia del estrés oxidativo al que esta capa celular se ve sometida constantemente, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos o productos basados en compuestos antioxidantes y antidegenerativos que sean más potentes y efectivos para prevenirla, retrasarla o detenerla, que los disponibles en actualidad, se ha convertido en una cuestión sumamente relevante de la investigación en estas enfermedades. Así mismo existen evidencias que este daño oxidativo puede conducir a deficiencias funcionales y morfológicas en los fotorreceptores, las células endoteliales y las células ganglionares de la retina, entre otras. Por todo ello, resulta necesario estudiar procedimientos que pueden actuar contra el ambiente que produce el daño oxidativo en las células y/o tejidos. Se ha comprobado la presencia de compuestos antioxidantes tanto en el vino como en extractos de uva y se ha demostrado, en el caso de los polifenoles como las catequinas, los flavonoides y el resveratrol, su eficacia frente al daño oxidativo celular. También cabe destacar la presencia de otros antioxidantes como los carotenoides (luteína, zeaxantina) y pequeñas concentraciones de Cu y Zn. Sin embargo, los procedimientos para obtener vino o un extracto desde las uvas dependen de protocolos variables y de las tecnologías implicadas que no son uniformes. Además es necesario averiguar el efecto de estos procedimientos sobre determinadas características como, la solubilidad de los productos, su citotoxicidad y las capacidades antioxidantes y antidegenerativas.

El primer indicador sobre si es aceptable o no utilizar un producto para uso humano es la evaluación de su citotoxicidad sobre las células y/o tejidos (es decir establecer, una parte esencial de su bio-compatibilidad). De esa manera, los estudios de citotoxicidad establecen un aspecto muy importante de la bio-compatibilidad, y por tanto, del nivel de seguridad del producto, antes de iniciar estudios de experimentación con animales. Los avances actuales en la ciencia y tecnología proponen varios tipos de pruebas de citotoxicidad, pero un buen test de citotoxicidad es aquel que sigue protocolos estándar, tiene alta sensibilidad y produce datos cuantitativos y comparables de forma rápida para ser evaluados. Las directrices de la norma ISO (UNE-EN ISO 10993-5:2009 Evaluación biológica de productos

sanitarios, Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*) recomiendan protocolos estándar de los métodos directos e indirectos para los estudios de citotoxicidad. El método de contacto directo permite detectar niveles de citotoxicidad más débiles debido a su alta sensibilidad.

5 El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre los oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes que promueven el daño en las macromoléculas biológicas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular e inducción génica entre otras). El oxígeno es imprescindible para la vida porque casi todo en la naturaleza (las grasas, los carbohidratos entre otros) se oxida por acción del oxígeno (reacción de óxido-reducción) y durante este proceso se generan las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia, y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes y de luz ultravioleta, 15 contaminación ambiental, humo del tabaco, entre otros. Existen evidencias suficientes de que las ROS aumentan el estrés oxidativo en las células y/o tejidos que causan el desarrollo y evolución de una gran variedad de procesos degenerativos y enfermedades. El término “especies reactivas” hace referencia a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales. Esta serie de moléculas se forma como resultado del metabolismo celular y se encuentran representados dentro de los sistemas biológicos por las ROS. Dentro de las ROS inorgánicas los más importantes son el oxígeno molecular  $O_2$ , el radical-anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $HO^-$ ) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Las ROS secundarias u orgánicas son el radical peroxilo ( $ROO^-$ ), el hidroperóxido orgánico ( $ROOH$ ) y los lípidos peroxidados. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Inicialmente, causan la despolarización mitocondrial y luego activan un ciclo de retroalimentación positiva 25 de la liberación de las ROS inducidas por las propias ROS.

Los sistemas de cultivos celulares son muy útiles para estudiar los efectos del estrés oxidativo, tanto en términos de cito-toxicidad como de respuestas adaptativas celulares. Existen varios modelos del daño celular oxidativo producido por indexación o bloqueo de los

mecanismos de señalización celular. Los sistemas modelo para el estrés oxidativo más utilizados en los estudios son: fuentes extracelulares de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  e hiperoxia normobárica (niveles altos de oxígeno ambiental).

- 5 En el ser humano, las enfermedades pueden estar producidas por el daño agudo o por el daño crónico. Por ello, es necesario entender los mecanismos implicados en ambos daños y reproducir modelos basados en estos mecanismos. Existen evidencias suficientes que demuestran que incubar células con  $H_2O_2$  en condiciones determinadas como el tiempo de exposición, la concentración o el crecimiento celular entre otras, generan un daño agudo y
- 10 cuando los cultivos están expuestos a una enzima denominada glucosa oxidasa, se produce un daño crónico.

Las ROS poseen una vida media bastante corta y por esta razón es difícil medir directamente sus cantidades *in vivo* en las células y/o tejidos. La “electron spin resonance”

15 es una técnica que permite la medición de las ROS. Sin embargo, existen otras técnicas indirectas que pueden ayudar a estimar sus concentraciones. Dichas técnicas permiten ver el daño causado por las ROS y la actividad de ciertos parámetros dentro del estrés oxidativo e incluyen la evaluación de proteínas (método de Lowry y método de Bradford), quimioluminiscencia, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), actividad de SOD,

20 determinación de catalasa, determinación de la enzima glutathion peroxidasa, medición de glutathion S-transferasa, medición de glutathion y determinación de nitritos y nitratos. En la norma ISO/TS 19006:2016 se menciona en el ensayo con CM-H2DCFDA. En este estudio para determinar el efecto antioxidante sobre las células, se determinan las especies oxidantes intracelulares mediante la utilización de 2', 7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato

25 (DCFH-DA). Su modo de acción consiste en la difusión hacia el interior de las células del DCFH-DA (no fluorescente). Posteriormente el DCFH-DA será des-acetilado por las esterasas intracelulares a 2', 7'-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH), (no fluorescente), y rápidamente oxidado al fluorescente 2', 7'-Diclorodihidrofluoresceína (DCF) por las especies reactivas oxidantes. La intensidad de la fluorescencia será proporcional a la concentración

30 de especies reactivas oxidantes del citosol.

En las mismas normas ISO se recomiendan las líneas celulares CCL 1 (clon 929 de la NCTC; fibroblastos de ratón), CCL 163 (clon A31 de la Balb/3T3; fibroblastos de ratón), CCL 171 (MRC-5; fibroblastos humanos), CCL 75 (WI-38; fibroblastos humanos), CCL 81 (Vero;

células epiteliales de primate no humano), CCL 10 [BHK-21 (C-13); fibroblastos de hámster] y V-79 379A (fibroblastos de hámster) de la "American Type Culture Collection" (ISO 10993-5:2009). Sin embargo, los cultivos primarios celulares y/o tisulares obtenidos directamente a partir de tejidos vivos, también se recomiendan para realizar análisis en los que se requiera una sensibilidad específica, siempre que se pueda demostrar la reproducibilidad y la exactitud de la respuesta celular y/o tisular frente a las muestras estudiadas. La elección de los cultivos celulares y/o tisulares depende del objeto del estudio y puede variar en función de las normas de las autoridades certificadoras en los diferentes países. En los estudios *in vitro* se utilizan habitualmente los cultivos de células de mamífero; más concretamente, se han utilizado líneas celulares establecidas obtenidas a partir de repositorios reconocidos. Las células de una línea celular ARPE-19 son células epiteliales pigmentadas de origen humano localizadas en la retina, caracterizada por Dunn (Dunn et al. Exp Eye Res. 1996;62:155-69), y se pueden comprar fácilmente desde la "American Type Culture Collection". Son de fácil acceso, ampliamente utilizadas en la investigación y necesitan menos esfuerzos para que crezcan y se mantengan en condiciones de laboratorio. Los cultivos de otras células de la retina, como las células ganglionares no están bien establecidos y los cultivos primarios de otras células de la retina son difíciles de cultivar y mantener. Así pues una buena alternativa son las células del EPR y dentro de ellas las de la línea celular ARPE-19 que muestran ventajas sobre otros tipos de células de la retina en cuanto a disponibilidad, crecimiento, mantenimiento y su aplicación en la investigación.

Por lo tanto, teniendo en cuenta todas estas razones, se hace necesario diseñar las estrategias adecuadas para evaluar de forma sensible y fiable la solubilidad, la citotoxicidad, la capacidad antioxidante y antidegenerativa, y la eficacia de los extractos de uva para desarrollar los productos de uso humano que puedan tener un efecto beneficioso en las patologías humanas. Concretamente, la detección de la capacidad antioxidante y antidegenerativa y sus potencias y eficacias de dicho extracto permitirá su uso en otros campos como nutricionales, terapéuticos, gastronómicos o cosméticos, entre otros.

Es por tanto objeto de la presente invención es evaluar la solubilidad, la citotoxicidad, la capacidad antioxidante y antidegenerativa, y su potencial eficacia del mencionado extracto de uva que proporcionara las bases científicas para el desarrollo de productos beneficiosos en diferente campos como nutricionales, terapéuticos, gastronómicos o cosméticos, entre otros .

La presente invención se refiere a unos procedimientos que permitan establecer la solubilidad, las concentraciones no cito-tóxicas y cito-tóxicas de dicho extracto de uva, posteriormente se establece su capacidad antioxidante y antidegenerativa, su potencia y eficacia aplicando los cultivos de células de epitelio pigmentario de la retina de origen humano y diferentes estrategias de ensayo.

Existen varios extractos de uva a nivel mundial pero cada uno de ellos tiene unas características que se deben identificar aplicando diferentes estrategias de ensayo para proponerlas a distintas industrias nutricionales, terapéuticas, gastronómicas o de cosméticos entre otras, como base para el desarrollo de productos para uso humano tal como el tratamiento de patologías oculares.

Este objeto se consigue por medio de la presente invención según se reivindica en la reivindicación independiente. Otras formas ventajosas de realización se describen en las reivindicaciones dependientes.

El objeto de la presente invención también se consigue por medio de un método. En los párrafos siguientes se describen en mayor detalle cada etapa individual del método.

El problema de la presente invención se resuelve mediante un procedimiento, que comprende las siguientes etapas:

- a) Proporcionar un extracto de uva obtenido por procedimientos implicados;
- b) Determinar la solubilidad del extracto en uno o más disolventes;
- c) Determinar la concentración no-citotóxica y citotóxica de dicho extracto para las células a ensayar;
- d) Determinar la capacidad antioxidante de dicho extracto en base a una concentración no-citotóxica determinada en la etapa a) para las células a ensayar.

También, otras etapas adicionales no especificadas de forma explícita pueden formar parte del método. En particular:

- e) Determinar la capacidad antioxidante de dicho extracto en un modelo celular de daño oxidativo agudo.

- f) Determinar la capacidad antioxidante de dicho extracto en un modelo celular de daño oxidativo crónico.
- j) Determinar que dicho extracto de uva rescata a las células previamente dañadas (efecto antidegenerativo).
- 5 k) Determinar la capacidad antidegenerativa de dicho extracto en un modelo celular de daño agudo.
- l) Determinar la capacidad antidegenerativa de dicho extracto en un modelo celular de daño crónico.
- m) Determinar que dicho extracto de uva rescata a las células dañadas en mayor medida que otros compuestos obtenidos también a partir de la uva, tal y como puede ser el Resveratrol y que en alguna medida puede considerarse como la referencia.
- 10

La solubilidad del extracto se determina preferentemente para un medio acuoso y dimetilsulfóxido (DMSO), más preferentemente para el medio de cultivo de las células a ensayar y el dimetilsulfóxido (DMSO). Puede ser necesario filtrar la solución antes de su uso, preferiblemente utilizando un filtro de 0,2 µm.

15

La concentración no cito-tóxica y cito-tóxica del extracto se mide preferentemente exponiendo el extracto directamente en contacto con las células y/o tejidos. Preferentemente la medición de la concentración se realiza empleando el ensayo de Azul Alamar (AlamarBlue®) o el ensayo del MTT®.

20

Para las etapas siguientes se emplea una concentración, que se ha establecido como no cito-tóxica (viabilidad de al menos > 90%) en al menos un ensayo, y preferentemente en todos los ensayos.

25

En la etapa siguiente se determina la capacidad antioxidante de dicho extracto. Preferentemente esta determinación comprende el tratamiento de las células con la enzima glucosa oxidasa (GOx) y/o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ambos tratamientos, después se realiza la determinación de especies oxidantes intracelulares, preferentemente empleando 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA).

30

En la etapa siguiente se determina la capacidad antidegenerativa de dicho extracto. Preferentemente esta determinación comprende el tratamiento de las células con la enzima



glucosa oxidasa (GOx) y/o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ambos tratamientos, después se realiza la determinación de la actividad metabólica de las células, preferentemente empleando el ensayo del MTT®.

5

En otro modo de realización de la presente invención se realizan ensayos comparativos empleando Resveratrol.

En otro modo de realización de la presente invención se miden las capacidades antioxidante y antidegenerativa del extracto en al menos una de las siguientes estrategias de tratamiento:

10

- Tratamientos previos (PRE): las células se exponen al extracto de uva y posteriormente se miden las especies intracelulares oxidantes y la actividad metabólica con y sin tratamiento oxidativo, usando glucosa oxidasa después del tratamiento con el extracto.

15

- Tratamientos simultáneos (SIMU): las especies oxidantes intracelulares y la actividad metabólica se miden durante el tratamiento con el extracto con y sin tratamiento oxidativo, usando glucosa oxidasa.

20

- Tratamientos combinados (COMB = PRE+SIMU): las células se exponen al extracto de uva y posteriormente las especies oxidantes intracelulares y las actividades metabólicas se miden con y sin tratamiento oxidativo, usando glucosa oxidasa, durante un tratamiento posterior con el extracto.

La duración de cada tratamiento puede variar desde 1 minuto a 48 horas, preferentemente desde 1 minuto a 24 horas.

25

En una forma de realización preferida el tratamiento antioxidante y antidegenerativa en cada una de las estrategias es un tratamiento con glucosa oxidasa de 1 a 40 horas. La duración depende de la concentración del extracto empleado y del tipo de células.

30

En una forma de realización preferida la viabilidad de las células se mide después de cada estrategia.

En otra forma de realización preferida, la medición de las especies oxidantes intracelulares se realiza midiendo la fluorescencia del 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato.

En otra forma de realización de la presente invención, el tratamiento oxidativo comprende un tratamiento del cultivo celular con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El tratamiento se realiza preferiblemente durante al menos 30 minutos a 4 horas, preferiblemente durante 1 a 2 horas. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está entre 0,05 M y 2 mM, preferiblemente 0,25 mM.

En adelante, la expresión empleada para referirnos a este proceso será “el procedimiento de la presente invención”.

Otro objeto de la invención es una composición para tratar o mejorar un trastorno oftalmológico que comprende un extracto de uva.

Dichos trastornos oftalmológicos son enfermedades oculares como la retinosis pigmentaria, la degeneración macular asociada a la edad, el glaucoma, el síndrome de ojo seco, la conjuntivocalasia, el queratocono, las cataratas, la retinopatía diabética y algunas uveítis, preferentemente la degeneración macular, más preferentemente la degeneración macular, con o sin, visión reducida o dañada.

Un extracto de uva de este tipo se identifica preferiblemente utilizando el procedimiento de la invención. Preferiblemente, un extracto de uva de este tipo muestra un mejor comportamiento que 5 a 20 µM de resveratrol en el procedimiento de la invención, más preferiblemente el extracto de uva muestra un mejor comportamiento que 10 µM de resveratrol.

En otra realización, el extracto de uva en una concentración de 1 a 5 mg/l, preferiblemente en una concentración de 2 mg/l, tiene un mejor comportamiento que 10 µM de resveratrol en el procedimiento de la invención.

Por comportamiento se entiende preferiblemente una capacidad antioxidante elevada y/o una baja citotoxicidad, preferiblemente una capacidad antioxidante elevada para un tratamiento idéntico de cultivos de células del epitelio pigmentario de la retina, preferiblemente el tratamiento antioxidante contra el daño provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o glucosa oxidasa. Un mejor comportamiento es preferiblemente una mejora de al menos 5 %, 10 % o 15 %, cuando se compara con un control que tenga mismas condiciones, pero sin

tratamiento anti-oxidativo. Preferiblemente, la mejora se mide como la viabilidad y/o la fluorescencia DCF, preferiblemente como la fluorescencia DCF.

El extracto de uva se obtiene preferiblemente de orujo de uva.

5

La composición comprende como ingredientes activos un extracto de uva que comprende como ingredientes activos los siguientes componentes:

10 a) una o más concentraciones de polifenoles en una concentración de entre 0,5 y 100 mg / g de la composición;

b) fibras dietéticas, en las que las fibras dietéticas comprenden uno o más azúcares o derivados del mismo a una concentración de 50 a 600 mg / g en base a la composición.

15 Los polifenoles son compuestos químicos o sustancias que se encuentran en una gran cantidad de alimentos derivados de plantas. El término abarca una amplia variedad de moléculas con una estructura común, caracterizada por tener varios grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. Sin embargo, los polifenoles también incluyen moléculas con un anillo de fenol, como en el caso de los ácidos fenólicos o los alcoholes fenólicos.

20 Clasificación de polifenoles:

Los polifenoles se clasifican en función del número de anillos de fenol que contienen, así como de los elementos estructurales que unen estos anillos. Como tal, los principales grupos de polifenoles son:

25

Flavonoides: los cuales presentan un esqueleto de carbono de difenilpropano y dos anillos de benceno unidos juntos por una cadena lineal de 3 átomos de carbono. Hasta la fecha, se han identificado más de 6.000 flavonoides en las plantas, y la lista continúa creciendo. Los flavonoides se pueden dividir en 6 subclases, en función del estado de oxidación del anillo de pirano central. Los flavonoides se pueden dividir en Flavonoles, Flavonas, Flavanonas, 30 Lisoflavonas, Antocianinas y Flavanoles.

Flavonoles: que tienen un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, con un grupo hidroxilo en C3.

Son los flavonoides más ubicuos en los alimentos, y la quercetina es la más representativa.

Flavonas: Presentan un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, y son los flavonoides menos comunes. Se encuentran en el perejil y en el apio.

5

Flavanonas: Se caracterizan por tener una cadena saturada de 3 átomos de carbono y un átomo de oxígeno en el carbono 4. Se encuentran solo en altas concentraciones en los cítricos, aunque también están presentes en los tomates y en algunas plantas aromáticas como la menta.

10

Isoflavonas: que son estructuralmente similares a los estrógenos, y en los pies se pueden unir a sus receptores, por lo que también se conocen como fitoestrógenos. La soja y sus derivados son las principales fuentes de isoflavonas.

15

Antocianinas: que son los pigmentos responsables de la coloración roja, azul y púrpura de frutas, flores y otros tejidos y productos vegetales

20

Flavanoles: que tienen una cadena saturada de 3 carbonos, con un grupo hidroxilo en C3. Existen tanto como monómeros como polímeros, conocidos como catequinas y proantocianidinas, respectivamente.

25

Los principales flavonoides en la fruta son la catequina y la epicatequina, mientras que la galocatequina, la epi-galocatequina y el galato de epigalocatequina se encuentran esencialmente en el té. Las catequinas se encuentran en frutas como los albaricoques y las cerezas y en otros productos como el té, el chocolate y el vino blanco.

30

Ácidos fenólicos: que se dividen en dos grupos, los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico.

Ácidos hidrogeno benzoicos: que se encuentran en muy pocas plantas consumidas por humanos, y por lo tanto no se consideran de particular interés para la nutrición. Entre ellos, destacan el ácido gálico o ácido egálico

Ácidos hidroxicinámicos: que están representados principalmente por ácido cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico.

Alcoholes fenólicos: tirosol e hidroxitirosol son los principales tipos. Se encuentran principalmente en el aceite de oliva. El tirosol también se encuentra en el vino, tanto blanco como tinto, y en la cerveza; el hidroxitirosol, por otro lado se encuentra en el vino tinto.

5

Estilbenos: el principal estilbeno presente en la dieta de los humanos es el resveratrol, aunque la cantidad de estos compuestos ingeridos en la dieta es pequeña. Los estilbenos son producidos por las plantas como respuesta a patógenos o a ciertas condiciones de estrés. Se han detectado en más de 70 especies de plantas, como uvas, bayas y cacahuetes.

10

Lignanos: los lignanos se producen por la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano. La principal fuente de estos compuestos es la semilla de lino.

15

Preferiblemente, el compuesto o compuestos de polifenol comprenden ácido elágico, flavanoles o flavonoles o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente ácido elágico, flavanoles y flavonoles. Preferiblemente, los polifenoles comprenden como flavanoles catequina, epicatequina o proantocianidina o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente catequina, epicatequina y proantocianidina. Preferiblemente la composición comprende como flavonoles, miricetina, quercetina o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente micetrina, quercetina y kaempferol.

20

Uno o más azúcares o derivados de los mismos son preferiblemente los azúcares medidos por hidrólisis del residuo insoluble en alcohol (RIA) de la composición.

25

Preferiblemente los azúcares comprenden azúcares neutros y ácidos urónicos. Preferiblemente, los azúcares neutros seleccionados del grupo que comprende celulosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa y cualquier combinación de las mismas. Preferiblemente, los azúcares neutros se seleccionan del grupo que consiste en celulosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y manosa y cualquier combinación de las mismas.

30

Preferiblemente, la concentración total de fibras dietéticas en la composición es de 50 a 850 mg/g, más preferiblemente de 300 mg/g 850 mg/g, incluso más preferiblemente de 550 mg/g 750 mg/g.

Preferiblemente, la concentración total de uno o más polifenoles está entre 10 y 100 mg / g, más preferiblemente entre 20 y 50 mg / g. La concentración total se mide en mg de ácido gálico/g.

- 5 Preferiblemente, la concentración total de fibras dietéticas es al menos 3 veces mayor que la concentración de polifenoles, más preferiblemente entre 5 y 30 veces mayor.

Preferiblemente, la concentración de azúcares neutros es de 5 a 20 veces mayor que la concentración de los ácidos urónicos.

10

En una realización preferida de la invención, la composición comprende la siguiente concentración de polifenoles en peso:

- ácido elágico: entre 0,5 y 10 mg / g de la composición
- flavanoles: entre 0,2 y 20 mg / g de la composición
- 15 • flavonoles: entre 0,11 y 12 mg / g de la composición.

Preferiblemente, los flavanoles comprendidos por la composición son los siguientes:

- catequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- epicatequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- 20 • proantocianidina: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición.

Preferiblemente, los flavonoles comprendidos por la composición son los siguientes:

- miricetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- quercetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- 25 • kaempferol: entre 0,01 y 2 mg / g de la composición.

Preferiblemente, los azúcares comprendidos por las fibras dietéticas son los siguientes:

- azúcares neutros: entre 150 y 550 mg / g de la composición
- Ácidos urónicos: entre 1 y 100 mg / g de la composición
- 30 • Lignina Klason: entre 1 y 200 mg / g de la composición.

Preferiblemente, los azúcares neutros comprendidos por la composición son los siguientes:

- celulosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- glucosa: entre 150 y 400 mg / g de la composición

- xilosa: entre 0,1 y 5 mg / g de la composición
- galactosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- arabinosa: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición
- manosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición

5

En una realización preferida de la invención, la composición comprende la siguiente concentración de polifenoles en peso:

- ácido elágico: entre 0,5 y 10 mg / g de la composición
- flavanoles: entre 0,2 y 20 mg / g de la composición
- flavonoles: entre 0,11 y 12 mg / g de la composición,

10

y en donde, los flavanoles comprendidos por la composición son los siguientes:

- catequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- epicatequina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- proantocianidina: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición,

15

y en donde, los flavonoles comprendidos por la composición son los siguientes:

- miricetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- quercetina: entre 0,05 y 5 mg / g de la composición
- kaempferol: entre 0,01 y 2 mg / g de la composición.

20

En una realización preferida de la invención, la composición de los azúcares comprendidos por las fibras dietéticas es la siguiente:

- azúcares neutros: entre 151,7 y 505 mg / g de la composición
- Ácidos urónicos: entre 1 y 100 mg / g de la composición
- Lignina Klason: entre 1 y 200 mg / g de la composición;

25

en el que los azúcares neutros comprendidos por la composición son los siguientes:

- celulosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- glucosa: entre 150 y 400 mg / g de la composición
- xilosa: entre 0,1 y 5 mg / g de la composición
- galactosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición
- arabinosa: entre 0,1 y 10 mg / g de la composición
- manosa: entre 0,5 y 30 mg / g de la composición

30

Todos los azúcares mencionados son preferiblemente las formas naturales de los azúcares, p/ej. RE- Glucosa.

La composición puede ser parte de un complemento dietético funcional (nutracéutico).

5 La composición de la presente invención que comprende el extracto de uva se puede administrar de cualquier manera deseada y eficaz: como composiciones farmacéuticas para la ingesta oral o como un ungüento o gotas para la administración local a los ojos (instilación), o para la administración parental u otra administración de cualquier manera apropiada, tal como intraperitoneal, subcutánea, tópica, intradérmica, por inhalación, intrapulmonar, rectal, vaginal, sublingual, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal o  
10 intralinfática. Además, un compuesto de la presente invención se puede administrar en unión con otros tratamientos. Si se desea, el extracto de uva de la presente invención puede ser encapsulado o protegido de otra manera frente a las secreciones gástricas u otras secreciones.

15 Aunque es posible que el extracto de uva de la invención sea administrado solo, es preferible administrar el compuesto en forma de una formulación (composición) farmacéutica o un nutracéutico. Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la invención comprenden uno o más compuestos como un ingrediente activo en mezcla con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más de otros compuestos, fármacos, ingredientes y/o materiales.  
20

Independientemente de la vía de administración seleccionada, el extracto de uva de la presente invención se formula en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

25 Soportes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen azúcares (p. ej., lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol), almidones, preparados de celulosa, fosfatos de calcio (p. ej., fosfato dicálcico, fosfato tricálcico e hidrógeno-fosfato de calcio), citrato de sodio, agua, soluciones acuosas (p. ej. solución salina, inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer lactada), alcoholes (p. ej. alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol bencílico), polioles (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), ésteres orgánicos (p. ej., oleato de etilo y triglicéridos), polímeros biodegradables (p. ej., polilactida-poliglicolida, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos)), matrices elastoméricas, liposomas, microesferas, aceites (p. ej., de maíz, de germen, de oliva, de ricino, de sésamo, de semilla de algodón y  
30



- de cacahuete), manteca de cacao, ceras (p. ej., ceras para supositorios), parafinas, siliconas, talco, silicilato, etc. Cada uno de los soportes farmacéuticamente aceptables utilizados en una composición farmacéutica de la invención debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Soportes adecuados para una forma de dosificación seleccionada y una vía de administración pretendida son bien conocidos en la técnica, y soportes aceptables para una forma de dosificación elegida y un método de administración se pueden determinar utilizando una experiencia ordinaria en la técnica.
- 10 Las composiciones farmacéuticas o nutracéuticos de la invención pueden contener, opcionalmente, ingredientes adicionales y/o materiales comúnmente utilizados en composiciones farmacéuticas o nutracéuticos de este tipo. Estos ingredientes y materiales son bien conocidos en la técnica e incluyen (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como
- 15 carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y acacia; (3) humectantes, tal como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, fécula de patata o tapioca, ácido alginico, determinados silicatos, almidón glicolato de sodio, carboximetilcelulosa de sodio reticulada y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleraores de la
- 20 absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos y lauril-sulfato de sodio; (10) agentes de suspensión, tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán,
- 25 celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto; (11) agentes tamponadores; (12) excipientes, tales como lactosa, azúcares de la leche, polietilenglicoles, grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, manteca de cacao, almidones, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco, salicilato, óxido de zinc, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de
- 30 poliamida; (13) diluyentes inertes, tales como agua u otros disolventes; (14) conservantes; (15) agentes tensioactivos, (16) agentes dispersantes; (17) agentes para el control de la liberación o retardantes de la absorción, tales como hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, polímeros biodegradables, liposomas, microesferas, monoestearato de aluminio, gelatina y ceras; (18) agentes opacificantes; (19) adyuvantes; (20) agentes

humectantes; (21) agentes emulsionantes y de suspensión; (22) agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán; (23) agentes propulsores, tales como hidrocarburos clorofluorados e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano; (24) antioxidantes; (25) agentes que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido, tales como azúcares y cloruro sódico; (26) agentes espesantes; (27) materiales de revestimiento, tales como lecitina; y (29) agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Cada uno de dichos ingredientes o materiales debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Ingredientes y materiales adecuados para una forma de dosificación seleccionada y vía de administración pretendida son bien conocidos en la técnica, e ingredientes y materiales aceptables para una forma de dosificación elegida y un método de administración se pueden determinar utilizando una experiencia ordinaria en la técnica.

Composiciones farmacéuticas o nutracéuticos adecuados para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, saquitos, píldoras, comprimidos, polvos, gránulos, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, un elixir o jarabe, una pastilla, un bolo, un electuario o una pasta. Estas formulaciones se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica, p. ej., por medio de revestimiento en bandeja convencional, procesos de mezcladura, granulación o liofilización.

Formas de dosificación sólidas para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares) se pueden preparar mezclando el o los ingredientes activos con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, una o más cargas, extendedores, aglutinantes, humectantes, agentes disgregantes, agentes retardadores de la solución, aceleradores de la absorción, agentes humectantes, absorbentes, lubricantes y/o agentes colorantes. Composiciones sólidas de un tipo similar se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina blandas y de relleno duras utilizando un excipiente adecuado. Una tableta se puede preparar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Tabletas comprimidas se pueden

preparar utilizando un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante, agente tensioactivo o de dispersión adecuado. Tabletas moldeadas se pueden preparar mediante moldeo en una máquina adecuada. Las tabletas y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente proveerse de una muesca o prepararse con revestimientos y envolturas tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular de modo que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo contenido en las mismas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente activo solamente o, preferentemente, en una determinada parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente de una manera retardada. El ingrediente activo también puede estar en una forma microencapsulada.

Formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables.

Las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes adecuados, habitualmente utilizados en la técnica. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión.

Composiciones farmacéuticas para la administración rectal o vaginal pueden presentarse en forma de un supositorio u óvulos, los cuales se puede preparar mezclando uno o más ingredientes activos con uno o más soportes no irritantes adecuados, que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en el recto o la cavidad vaginal y liberarán el compuesto activo. Composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración vaginal incluyen también pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de aerosol que contienen soportes farmacéuticamente aceptables de este tipo, tal como se conocen en la técnica como apropiados.

Formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas y agentes de inhalación. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un soporte farmacéuticamente aceptable adecuado. Los ungüentos, las pastas, cremas y los geles pueden contener excipientes. Polvos y aerosoles pueden contener excipientes y propulsores.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas acuosas y no acuosas, estériles y farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, o agentes de suspensión o espesamiento adecuados. Una fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes adecuados, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco (p. ej., formulación farmacéutica o nutracéutico), es deseable ralentizar su absorción desde la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material amorfo que tiene poca hidrosolubilidad.

Alternativamente, la absorción retardada de un fármaco administrado por vía parenteral se puede lograr disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso. Formas de depósito inyectables pueden prepararse formando matrices de microencapsulación del ingrediente activo en polímeros biodegradables. Dependiendo de la relación del ingrediente activo al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del ingrediente activo. Formulaciones inyectables de depósito se pueden también preparar atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son

compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias.

5 Las formulaciones se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado liofilizado que requiere solo la adición del soporte líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes del uso. La inyección extemporánea de soluciones y suspensiones se puede preparar a partir de polvos estériles, gránulos y tabletas del tipo arriba descrito.

#### 10 **Datos experimentales:**

El término “extracto” se refiere a un extracto de uvas seco. La materia prima para el extracto, fue el orujo obtenido después del proceso de elaboración de vinos rosados o tintos. Las uvas rojas utilizadas en el proceso de elaboración del vino fueron todas de la variedad  
15 Tempranillo, cosechadas en viñedos ubicados en la Denominación de Origen Ribera de Duero. El orujo fresco se utilizó como materia prima y se sometió a un proceso de destilación para eliminar los compuestos aromáticos y el alcohol. El residuo se extrajo a través del método de extracción tradicional sólido-líquido usando una solución hidroalcohólica (agua-etanol) como disolvente. La extracción de sólido-líquido se realizó  
20 mediante la técnica de difusión. Una vez que se obtuvo el extracto líquido polifenólico, el producto resultante se centrifugó y se estabilizó para desplazar posibles residuos sólidos. La solución rica en polifenoles se concentró y finalmente se secó mediante un proceso de secado por pulverización (spray). La maltodextrina y el dióxido de silicio se usaron como agentes de encapsulación en el proceso de secado por pulverización. La humedad en el  
25 extracto fue de alrededor del 4,6%. También se puede llevar a cabo el proceso como se describe en ES2319032A1.

El extracto contenía altas cantidades de fibra dietética (659,7 mg / g de extracto) y una concentración moderada de polifenoles totales (37,44 mg de ácido gálico / g de extracto)  
30 (Tabla 1). Entre los compuestos fenólicos, se incluyen diferentes ácidos fenólicos, flavonoles y flavanoles (Tabla 1). Otros parámetros químicos analizados en el extracto fueron humedad (4,6%), proteína total (8,7%), grasa (0,8%) y ceniza (20,7%). El extracto podría obtenerse de uvas rojas utilizadas en el proceso de elaboración del vino, tal como se describe en Gil-

Sánchez, I. (2017) para extraer L1. El contenido de azúcares basado en un residuo insoluble en alcohol del extracto se muestra en la Tabla 2.

### **Análisis de flavanoles, ácidos fenólicos y flavonoles**

5

El extracto (50 mg) se extrajo con acetonitrilo al 50% (1 ml) en un baño ultrasónico durante 30 minutos y se centrifugó adicionalmente a 6700xg durante 5 minutos; el sobrenadante se recogió y el residuo fue sometido al mismo proceso otras tres veces. Los cuatro sobrenadantes se combinaron y se evaporaron por sequedad a presión reducida. El residuo se recuperó en 1 ml de acetonitrilo-agua (25:75, v/v) y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución, mediante detección de diodo en serie, ionización por electro-pulverización/espectrometría de masas HPLC-DAD-ESI/MS en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba cuaternaria y un detector de diodos en serie acoplado a una HPChemStation de procesamiento de datos (rev.A.05.04). El sistema HPLC se conectó a través de la salida de células del detector de diodos en serie a un espectrómetro de masas API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), que consta de una fuente ESI y un analizador de masas con trampa de iones triple-cuádrupolo controlado por el software Analyst 5.1.

La separación se realizó en una columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,7 $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm) a 35 ° C, usando (A) ácido fórmico al 0,1% y (B) acetonitrilo como disolventes, utilizando diferentes gradientes para el análisis de flavanoles y ácidos fenólicos (0% B a 8% B en 5 min y de 8 a 10% durante 20 min, 10-14,5% B durante 20 min, 14,5-60% B durante 10 min) y flavonoles (isocrático 15% B durante 5 min, 15-20% B durante 5 min, 20-35% B durante 10min, 35-50% B durante 10min, 50-60% B durante 7min), usando en ambos casos un índice de flujo de 0,5 mLmin<sup>-1</sup>. Se llevó a cabo una doble detección en línea por DAD a 280 y 370 nm como longitudes de onda preferidas. Los espectros de masas se registraron entre m / z 100 y m / z 1400 en el modo de ion negativo. El aire de grado cero sirvió como gas nebulizador (40 psi) y como gas turbo (400C°) para secado con disolvente (30 psi). El nitrógeno sirvió como cortina en (10psi) y gas de colisión (medio).

Los cuádrupolos se ajustaron a la resolución de la unidad y el detector de espectrómetro de masas se programó para realizar una serie de dos análisis consecutivos: un sondeo completo de alta sensibilidad (MS mejorada, EMS) y un análisis de ion de producto

mejorado (EPI) para obtener el patrón de fragmentación del ion padre. Los parámetros EMS fueron: tensión de pulverización de iones 4500V, desclasamiento potencial (DP) -40V, potencial de entrada (EP) -7V y energía de colisión (CE) -20V; mientras que los ajustes de EPI fueron: DP -40V, EP -10V, CE -25V y CES 0V, para flavanoles y ácidos fenólicos; y DP -40V, EP -10V, CE -25V y CES 0V, para flavonoles.

Los compuestos fenólicos se caracterizaron de acuerdo con su absorción, espectros de masas y tiempos de retención en comparación con una biblioteca de datos, así como con estándares auténticos cuando estuvieron disponibles. Los compuestos se cuantificaron a partir de las áreas de sus picos cromatográficos registrados a 280 nm (ácidos fenólicos y flavanoles) y 370 nm (flavonoles). Para la cuantificación del compuesto, se obtuvieron curvas de calibración para catequina, epicatequina, uercetina, ácido gálico y ácido elágico. Los flavonoles se expresaron como equivalentes de quercetina y los dímeros de procianidina como epicatequina. Todas las muestras se analizaron por triplicado, y los resultados se expresaron en miligramos de compuesto fenólico por gramo de extracto (producto secado por pulverización).

### **Análisis de antocianinas**

Se extrajeron muestras (50 mg) usando ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA)-acetonitrilo (1:1, v / v) (1 ml) en un baño ultrasónico durante 30 minutos y se centrifugó adicionalmente a 6700xg durante 5 minutos; el sobrenadante se recogió y el residuo se sometió al mismo proceso otras tres veces. Todos los sobrenadantes se combinaron y se evaporaron por sequedad a presión reducida. El residuo se recuperó en 1 ml de TFA al 0,1% -acetonitrilo (75:25, v/v) y se analizó por HPLC-DAD-ESI/MS. Se utilizó una columna AQUA (Phenomenex) C18 (5µm,150mm x 4,6mm) a 35°C. Los disolventes fueron (A) 0,1% TFA y (B) acetonitrilo, con el siguiente gradiente de elución establecido: isocrático 10% B durante 5 min, 10-15% B en 15 min, isocrático 15% B durante 5 min, 15-18% B durante 5 minutos, 18-35% de B durante 20 min, 35-60% de B durante 7 min. El índice de flujo fue de 0,5 mLmin<sup>-1</sup>. Se llevó a cabo DAD a 280 y 520nm. Los espectros de masas se registraron entre m/z 100 y m/z 900 en el modo de iones positivos. El aire de grado cero sirvió como nebulizador (50 psi) y gas turbo (600 °C) para secado con solvente (40 psi). El nitrógeno era la cortina (10 psi) y el gas de colisión (alto). EMS y el análisis EPI también se llevaron a cabo. Los parámetros del modo EMS fueron: voltaje de pulverización de iones 5000V, DP 55V, EP 4V

y CE 10V; Los parámetros de EPI fueron: DP 5541V, EP 4V y CE 10V y dispersión de energía de colisión (CES) 0V.

### **Análisis de los componentes de la pared celular**

5

De cada extracto, los residuos insolubles en alcohol (RIA) se obtuvieron sumergiendo las muestras en etanol (96%) a 60 °C y homogeneizando con un mezclador durante 5 minutos. Los materiales se filtraron a través de un filtro de vidrio sinterizado (No.3, Scientific FurnishingsLtd, Chichester, Reino Unido) y se volvieron a extraer dos veces durante 10 minutos en etanol al 96% a 20 °C y se volvieron a filtrar.

10

Los residuos se volvieron a suspender en alcohol absoluto (dos veces) y acetona (dos veces), filtrándose entre veces, y luego secados al aire, después de lo cual se almacenaron en un recipiente sellado a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron en miligramos de RIA por gramo de extracto (producto secado por pulverización). La cantidad de RIA corresponde a la cantidad de fibra dietética del extracto tal como se usa en la presente memoria descriptiva.

15

Los polisacáridos presentes en los RIA se extrajeron y la composición química de cada fracción se determinó. Los RIA se sometieron a un tratamiento de 12molL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a temperatura ambiente durante 3 h, seguido de dilución a 0,6 molL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hidrólisis a 100 °C durante 3 h (columna HF en la tabla 2), y también a 0,6 molL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hidrólisis en 100 °C durante 3 h (columna HS en tabla 2). Ambos ácidos hidrolizados liberaron diferentes componentes de fibra dietética. Los residuos insolubles obtenidos después de realizar la hidrólisis ácida, utilizando 12 molL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> seguidos por 0,6 molL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se cuantificaron gravimétricamente como lignina de Klason. Los hidrolizados fueron pasados a través de una columna de resina de intercambio iónico AG4x4 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EE. UU.) para neutralizarlos. La composición de azúcares neutros de los hidrolizados se determinó por HPLC usando una columna de microguard (Aminex Carbo-P, Bio-Rad) en serie con una columna de análisis de carbohidratos (Aminex HPX-87P heavy metal, 300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad) operado con un índice de flujo de 0,5 mLmin<sup>-1</sup> usando un detector de índice refractiva. Se calcularon las cantidades de azúcares utilizando el software de la versión System Gold 7.0 después de la calibración con azúcares estándar (Sigma, St Louis, MO, EE. UU.). Antes de la neutralización, se añadió eritritol como estándar interno.

25

30



El contenido de ácido urónico se determinó mediante el método colorimétrico de m-hidroxidifenilo usando ácido D-galacturónico como estándar.

5

El término “cultivo celular” se refiere a un cultivo de células eucariotas o procariotas, preferiblemente eucariotas, más preferiblemente de mamífero (por ejemplo células humana, felinas, cánidas, bovinas, de roedor o porcinas), aún más preferiblemente de humano. Los tres tipos de células –aquellas derivadas de ectodermo, mesodermo y endodermo- se pueden emplear en el método de la presente invención. Las líneas celulares preferidas para el cultivo celular en la etapa (a) son las recomendadas por las normas ISO (ISO 10993-5:2009). Por ejemplo, aunque sin carácter limitativo, pueden ser las líneas celulares CCL 1 (clon L929 de la NCTC; fibroblastos de ratón), CCL 163 (clon A31 de la Balb/3T3; fibroblastos de ratón), CCL 171 (MRC-5; fibroblastos humanos), CCL 75 (WI-38; fibroblastos humanos), CCL 81 (Vero; células epiteliales de primate no humano) o CCL 10 [BHK-21 (C-13); fibroblastos de hámster] y V-79 379A (fibroblastos de hámster) de la “American Type Culture Collection”. Sin embargo, los cultivos primarios celulares obtenidos directamente a partir de tejidos vivos, también son recomendables para realizar el método de la presente invención.

20

Preferiblemente las células empleadas en el cultivo celular son células que pueden servir para proporcionar las bases científicas sobre las características del extracto de uva, y las que sean útiles en general para el desarrollo de productos que contengan dicho extracto. La evaluación sobre los tipos de células donde se aplican los efectos beneficiosos de extracto, - en este caso cito-toxicidad y las capacidades antioxidante y antidegenerativas- de forma habitual en la práctica clínica, proporciona más garantías sobre su bio-compatibilidad, y por tanto, sobre su seguridad.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, se emplea un cultivo celular de células de epitelio pigmentario de la retina (EPR). En una realización más preferida, las células de epitelio pigmentario de la retina son de origen humano. En una realización aún más preferida, las células de EPR son células de la línea celular ARPE-19 (ATCC CRL-2302), la cual es una línea celular generada de forma espontánea a partir de EPR humano. Estas células forman una monocapa estable que muestra polaridad

5 morfológica y funcional. Las células ARPE-19 expresan marcadores específicos de EPR, tales como CRALBP y RPE-65 y presentan polarización morfológica. Estas células forman uniones estrechas en monocapas con resistencia transepitelial. Así mismo, pueden emplearse para la realización del método de la presente invención otras fuentes de células del EPR y otras células de la retina en cultivo: ganglionares, Müller, o de orígenes no retinianos como los fibroblastos entre otras y no solamente de origen humano modificado, sino también células frescas y de otros animales.

10 El "epitelio pigmentario de la retina" o "EPR" es la capa de células pigmentadas ubicada en la parte exterior de la retina que interactúa estrechamente con los fotorreceptores (conos y bastones) en el mantenimiento de la función visual. Está firmemente anclado a la coroides subyacente por medio de su membrana basal y la membrana de Bruch. El epitelio pigmentario retiniano está compuesto por una capa de células hexagonales que están densamente empaquetadas y que tienen gránulos de pigmentos. Vistas en sección, cada  
 15 célula consta de una parte externa no pigmentada en la que se sitúa un núcleo grande y ovalado y una porción interior pigmentada que extiende una serie de procesos filiformes rectos entre los bastones. También sirve como factor limitante del transporte que mantiene el ambiente de la retina, suministrando pequeñas moléculas como aminoácidos, ácido ascórbico y D-glucosa, al tiempo que representa una barrera estrecha para las sustancias  
 20 transportadas por la sangre de la coroides (forman la estructura fundamental de la barrera hemoretiniana-externa). El epitelio pigmentario de la retina también tiene muchas otras funciones como la fagocitosis de los segmentos externos de las células fotorreceptoras, la liberación de factores de crecimiento, o la regeneración del fotopigmento entre otras.

25 Se entiende por "células de epitelio pigmentario de la retina" o "células de EPR" cualquier tipo celular presente en dicho epitelio, preferiblemente células epiteliales. Las células de EPR se pueden cultivar en presencia de los medios y condiciones de cultivo conocidas en el campo técnico para el cultivo de células epiteliales. Así, por ejemplo, aunque sin limitarnos, el medio de cultivo puede comprender suero fetal bovino (FBS) o humano, antibióticos,  
 30 antimicóticos, factores de crecimiento, etc. El medio base que puede utilizarse en el medio de cultivo podría ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica para el cultivo celular *in vitro*, como por ejemplo, aunque sin limitación, el medio basal "Eagle", CRCM-30, CMRL-1066, "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" (DMEM), "Eagle's Minimum Essential Medium" (EMEM), "Fischer's Medium", "Glasgow Minimum Essential Medium", Ham's F-10,

5 Ham's F-12 (F12), "High Cell Density Medium", "Iscove's Modified Dulbecco's Medium", Leibovitz's L-15, McCoy's 5A, medio 199, "Minimum Essential Medium Eagle", "Alpha Minimum Essential Medium", CnT20, NCTC 109, NCTC 135, RPMI-1640, "William's Medium E", Waymouth's MB 75211, Waymouth's MB 70511, "Keratinocyte serum-free medium" (KSFM), o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el medio de cultivo comprende un medio base DMEM/F12, suplementado o no con FBS y en presencia de antibióticos y antimicóticos. Además, por ejemplo, aunque sin limitación, las condiciones de cultivo pueden ser condiciones estándar de cultivo, es decir, en presencia de entre el 5 y el 10% de CO<sub>2</sub>, entre 36 y 38°C y renovando el medio cada 48 a 72h. Preferiblemente, dicho cultivo se lleva a cabo como se describe a continuación en los ejemplos de la presente invención.

10 El cultivo celular *in vitro* en el método de la presente invención se lleva a cabo en las placas de cultivo de 96 pocillos.

15 Para el método de la presente invención se expondrán diferentes concentraciones de dicho extracto, preferiblemente en un medio acuoso (en este caso en el medio de cultivo), hasta finalizar el tiempo de exposición.

20 La incubación del cultivo celular en presencia de las diferentes concentraciones de dicho extracto se realiza durante un tiempo de exposición determinado y preferiblemente bajo las condiciones apropiadas para permitir el crecimiento o proliferación celular. Dichas condiciones y tiempo de cultivo dependerán del tipo celular elegido para el cultivo. Los expertos en la materia reconocerán dichas condiciones y el tiempo de incubación aplicables en cada caso.

25 Para dichos cultivos, los cultivos de control comprenden células del mismo tipo celular y misma procedencia que las células cultivadas en el método de la presente invención. Dichas células de los cultivos de control se incuban bajo las mismas condiciones de tiempo, temperatura, pH, ciclos de luz/oscuridad, humedad, concentración de CO<sub>2</sub>, composición de medio de cultivo, etc., que el cultivo bajo estudio. Los cultivos de control se procesan también de la misma manera tras la incubación.

En una realización preferida, los cultivos de control comprenden células no expuestas a ningún compuesto (blanco), células o tejidos expuestos a resveratrol (control negativo) o células o tejidos expuestos a un compuesto tóxico de control (al cloruro de benzalconio; control positivo). El control negativo comprende resveratrol (a estudiar para ayudar a  
5 determinar que los efectos sobre las células se deben al compuesto resveratrol que es conocido por tener capacidad antioxidante y del que existen numerosos estudios publicados).

Otras realizaciones más preferidas, consisten en exponer los cultivos a la enzima glucosa  
10 oxidasa para producir un daño crónico en las cultivos bajo las mismas condiciones de tiempo, temperatura, pH, ciclos de luz/oscuridad, humedad, concentración de CO<sub>2</sub>, composición de medio de cultivo, etc., que el cultivo bajo estudio, y también en exponer los cultivos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para producir el daño agudo. A continuación, se expondrán los cultivos a controles positivos, negativos y el extracto a determinadas tiempos según las estrategias  
15 propuestas y los protocolos descritos posteriormente como ejemplos de estudio.

En la presente invención se desarrollan varias estrategias cuyas ventajas, según los procedimientos propuestos son, por tanto, las siguientes:

20 - Permiten establecer la solubilidad de dicho extracto en diferentes solventes orgánicos o inorgánicos. La detección de solubilidad de un extracto en diferentes solventes orgánicos o inorgánicos es una de primeras características que dirige las líneas de investigación e innovación. El medio acuoso y el dimetilsulfóxido (DMSO) son solventes comunes que se utilizan ampliamente en los desarrollos de productos porque existen suficientes estudios  
25 publicados en su favor. Sin embargo, es necesario a determinar su concentración no cito-tóxico y cito-tóxica antes de su uso final. Por todo ello, se debe determinar la solubilidad de dicho extracto en el medio acuoso (en este caso el medio de cultivo) y el dimetilsulfóxido (DMSO).

30 - Permiten confirmar las concentraciones no cito-toxico y cito-toxico de dicho extracto preparadas en el medio acuoso y el dimetilsulfóxido (DMSO). La detección de cito-toxicidad es otra de las primeras características que dirige las líneas de investigación e innovación. La norma ISO recomienda varios métodos para determinar la cito-toxicidad siendo uno de ellos el detectar la cito-toxicidad exponiendo el extracto directamente en contacto con las células,

en este caso epitelio pigmentario de la retina (EPR). El contacto directo entre dicho extracto y las células y/o tejidos implica que no existe interferencia con ningún otro factor, como sí ocurre en los ensayos por contacto indirecto o en los métodos de dilución de extractos donde están implicados otros factores tales como los vehículos de extracción, la capa de agar sobre la capa de células, etc., que podrían afectar a la proliferación celular o al crecimiento de la estructura tisular en cultivo y, por consiguiente, a los resultados del ensayo. Por todo ello, se determinaron las concentraciones no cito-tóxicas y cito-tóxicas en las células de EPR de dicho extracto en el medio acuoso (en este caso el medio de cultivo) y el dimetilsulfóxido (DMSO). Se emplearon dos ensayos para medir la cito-toxicidad: el ensayo de Azul Alamar (alamarBlue®) y el ensayo del MTT®.

- Permiten confirmar en los modelos celulares del daño oxidativo la capacidad antioxidante de dicho extracto. La detección de la capacidad antioxidante es otra de las primeras características que dirigen las líneas de investigación e innovación para el desarrollo de productos que actúan contra la ROS producida por desequilibrio en el metabolismo celular. Por tanto, se propusieron dos modelos celulares del daño oxidativo; uno consistió en tratar las células con la enzima glucosa oxidasa (GOx) para producir un daño crónico y el otro es con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que produce un daño agudo, y la determinación de especies oxidantes intracelulares mediante la utilización de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA).

-Permiten confirmar en los modelos celulares de daño oxidativo la capacidad antidegenerativo de dicho extracto. La detección de la capacidad antidegenerativo es otra de las primeras características a la que se dirigen las líneas de investigación e innovación para el desarrollo de productos que actúan contra la ROS producidos por un desequilibrio en el metabolismo celular que genera degeneración celular. Por tanto, se propusieron dos modelos celulares del daño oxidativo y degenerativo; uno consiste en tratar las células con la enzima glucosa oxidasa (GOx) para producir un daño crónico y en el otro se tratan con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que produce un daño agudo, y la determinación de la actividad metabólica de las células se realiza por el ensayo denominado MTT®.

- Permiten confirmar las cito-toxicidades de dicho extracto en los modelos celulares del daño oxidativo y otras estrategias empleadas descritas en párrafos posteriores.

- Permiten confirmar el elevado nivel de la capacidad antioxidante y antidegenerativa de dicho extracto en comparación con el control comparativo del resveratrol, que es una molécula ampliamente utilizada en suplementos alimenticios y con demostrada capacidad antioxidante.

- Permiten confirmar la capacidad antioxidante y antidegenerativa de dicho extracto en varios tipos de estrategias de tratamientos:

i) Tratamientos previos (PRE)

5 En el grupo de tratamientos PRE, los cultivos están expuestos durante 1 hora a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o de 10  $\mu$ M de resveratrol (control negativo) (tratamiento PRE) y posteriormente se trataron durante 30 minutos con 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>DCF-DA para medir la capacidad antioxidante. Después de tratar durante 24 horas con 11 mU/ml de glucosa oxidasa, al final de los experimentos se incubaron con el compuesto MTT durante 2 horas para medir la capacidad antidegenerativa.

ii) Tratamientos simultáneos (SIMU)

15 En el grupo de tratamientos SIMU, los cultivos son tratados durante 30 minutos con 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>DCF-DA para medir la capacidad antioxidante y posteriormente durante 24 horas con 11 mU/ml de glucosa oxidasa a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o con 10  $\mu$ M de resveratrol (control negativo). Al final de los experimentos se incubaron con el compuesto MTT durante 2 horas para medir la capacidad antidegenerativa.

20 iii) Tratamientos combinados (COMB = PRE+SIMU)

25 En el grupo de tratamientos COMB, los cultivos están expuestos durante 1 hora a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o de 10  $\mu$ M de resveratrol (tratamiento PRE). Posteriormente se trataron con 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>DCF-DA durante 30 minutos para medir la capacidad antioxidante y finalmente los cultivos se expusieron durante 24 horas a 11 mU/ml de glucosa oxidasa y a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o 10  $\mu$ M de Resveratrol (tratamiento SIMU). Al final de los experimentos se incubaron con el compuesto MTT durante 2 horas para medir la capacidad antidegenerativa.

30

- Permiten confirmar la cito-toxicidad y la capacidad antioxidante y antidegenerativa en otros grupos de tratamientos PRE, SIMU y COMB. En este grupo los cultivos no se trataron durante 24 horas con 11 mU/ml de glucosa oxidasa para producir el daño celular.

Estos ensayos y estrategias proporcionan los datos científicos sobre la solubilidad, la citotoxicidad y las capacidades antioxidante y antidegenerativas y la eficacia de dicho extracto en diferentes condiciones (uno de ellos es su comparación con el Resveratrol), lo que será muy útil en el desarrollo de productos que contengan este extracto.

5

Los datos de los resultados se comparan entre ellos siguiendo la norma UNE-EN ISO 10993-5 "C.2.5 Análisis de los datos".

Incluso si no se redactan reivindicaciones de múltiple subordinación, se describirán todas las combinaciones razonables de las características en las reivindicaciones.

10

Mientras que la presente invención se ha descrito e ilustrado en unión con un cierto número de realizaciones específicas, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar variaciones y modificaciones sin apartarse de los principios de la presente invención tal como se ilustran en la presente, tal como se describe y se reivindica. La presente invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse de su espíritu o características esenciales. Las realizaciones descritas se consideran en todos los aspectos ilustrativas y no restrictivas. El alcance de las invenciones se indica, por lo tanto, por las reivindicaciones adjuntas más que por la descripción que antecede. Todos los cambios que entran dentro del significado e intervalo de equivalencia de las reivindicaciones han de quedar abarcados dentro de su alcance.

15

20

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25

### **EJEMPLOS**

A continuación, se ilustra la invención mediante una serie de ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método descrito para evaluar la solubilidad, la citotoxicidad y las capacidades antioxidante y antidegenerativa y su eficacia, de dicho extracto sobre cultivos celulares de epitelio pigmentario de retina humana en diferentes condiciones desarrollando estudios comparativos y establecer bases científicas.

30

Cultivos celulares de Epitelio Pigmentario de la Retina (línea celular ARPE-19)

Cultivo de la línea celular ARPE-19

Para lograr el objeto principal de este estudio, se planificaron varios experimentos utilizando cultivos celulares de epitelio pigmentario de la retina, específicamente de la línea celular humana ARPE-19, procedente de la compañía “American Type Culture Collection® (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.)”. Se eligió esta línea celular porque se considera adecuada para simular las condiciones clínicas de un posible uso terapéutico, al tratarse de células de la retina y además de origen humano.

Tras descongelar las células, se cultivaron en frascos con área superficie de 25 cm<sup>2</sup> para cultivo celular con el medio de cultivo DMEM/F12 (Dulbecco’s Modified Eagle Medium y F12 Nutrient Mixture (Ham); Gibco®, Paisley, Reino Unido), suplementado con un 10% de suero fetal bovino y un 1% de antibiótico/antimicótico (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, Gibco®). Las células se cultivaron en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada dos días hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80-90%. Cuando alcanzaron la confluencia deseada, se tripsinizaron y se sembraron en placas de 96 pocillos, donde se llevaron a cabo los experimentos, o se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, para usarse en las repeticiones del experimento.

20

Siembra de placas de 96 pocillos para los experimentos

Tras tripsinizar las células, se realizó un recuento celular con Trypan Blue Solution 0,4% (Sigma-Aldrich®, St. Luis, MO, EE.UU.) y posteriormente se sembraron en una placa de 96 pocillos (Costar, Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.) a una densidad de 1×10<sup>4</sup> células/pocillo. Se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado, hasta que alcanzaron el estado de pre-confluencia. En ese momento, se procedió a su sincronización a la fase G0/G1 del ciclo celular cultivándolas durante 24 horas con el medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico pero sin suero fetal bovino (incompleto).

30

Tratamientos:

Después de la sincronización, se utilizaron los cultivos en los diferentes experimentos para lograr los diferentes objetos enfocados a conseguir el objeto principal.



A continuación se describe cada experimento de forma más detallada.

Ejemplo 1. Determinación de una concentración no citotóxica del extracto de uva por el ensayo AlamarBlue®

5

Según los estudios previos realizados con este extracto en otras áreas de estudio, se trata de un producto hidrofílico. Por ello, inicialmente se decidió utilizar el medio de cultivo para preparar las diferentes concentraciones del extracto. Se prepararon tres concentraciones (20, 2 y 0,2 mg/ml). Se evaluó la posible citotoxicidad de estas concentraciones del extracto de uva incubándolo 24 horas con los cultivos de ARPE-19 y midiendo la citotoxicidad mediante el ensayo de Azul Alamar (AlamarBlue®).

10

En el ensayo de Azul Alamar (AlamarBlue®), el ingrediente activo de Azul Alamar es la resazurina, un compuesto no tóxico que es permeable a las células y de color azul. Al entrar en las células, la resazurina se reduce a resorufina por óxido-reductasas que se encuentran principalmente en las mitocondrias de las células vivas y se difunde al medio e inicialmente al no concentrarse al interior de la célula no induce su muerte, como sí ocurre en otras técnicas. La resorufina produce una fluorescencia roja muy brillante o rosa. Las células viables realizan esta reacción y generan así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad. Se preparó la solución de trabajo de estudio (Alamar blue al 10 % disuelto en medio de cultivo). Al final del experimento, el medio de cultivo se retiró y se lavaron las células. Después se añadieron 200 µl de la solución de trabajo por pocillo. Posteriormente se incubaron en las condiciones estándar de cultivo (37°C y 5% CO<sub>2</sub>) durante 5 horas. Tras 5 horas se recogió el medio de cada pocillo y se depositó en otra placa de 96 pocillos. La intensidad de fluorescencia del medio de cada pocillo se leyó utilizando un lector de placas a una intensidad de excitación de 560 nm y de emisión de 590 nm.

15

20

25

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

30

- Grupo de control del cultivo: se incubaron las células con el medio de cultivo DMEM/F12 suplementado. Se dispusieron dos grupos control: uno en el lado izquierdo (control 1) y otro en el lado derecho (control 2) siguiendo las recomendaciones de las normas ISO.
- Grupo de extracto de uva: se incubaron los cultivos con diferentes concentraciones de extracto de uva.

- Subgrupo 20 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 20 mg/ml de extracto de uva.
- Subgrupo 2 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 2 mg/ml de extracto de uva.
- 5 ○ Subgrupo 0,2 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 0,2 mg/ml de extracto de uva.

Resultados:

Una vez preparada la disolución de 20 mg/ml de extracto de uva en medio de cultivo, se  
10 filtró utilizando un filtro de 0,2 µm. A partir de la disolución filtrada, se prepararon otras dos disoluciones adicionales de 2 mg/ml y 0,2 mg/ml.

Observación:

Se comprobó que, con la filtración, se pierde mucho volumen de la disolución de 20 mg/ml. Se observó que las partículas del extracto de uva no se disolvieron totalmente en el medio  
15 de cultivo y, por esta razón, se perdía una cantidad considerable de la disolución preparada durante la filtración. En relación con este resultado, es posible que sea necesario utilizar otro método de esterilización, como la exposición a la luz UV durante un tiempo aún por determinar.

Resultado y discusión:

20 Los datos obtenidos son bastante homogéneos y aceptables como para poder realizar el correspondiente análisis estadístico. El análisis estadístico de los datos (figura 1) ha demostrado que:

- El valor medio de viabilidad (%) de cultivos de los grupos de control sembrados tanto en el lado izquierdo como en el derecho del resto de los grupos no fue de  
25 más del 15% del valor medio de viabilidad (%) de cultivos de todos los pocillos de controles. El ensayo cumple los criterios de norma ISO a asegurar que la cantidad de células es coherente en todos los pocillos de placa de cultivo celular. Se aprecia que los cultivos mantienen la morfología de las células ARPE-19. Se aprecia que es un cultivo sano. Los datos obtenidos de los grupos de control se  
30 establecieron como el 100%.
- Las mayoría de las células incubadas con el extracto de uva a 20 mg/ml murieron (3,68% viabilidad), pero las incubadas con las disoluciones de 2 y 0,2 mg/ml crecieron bien y mantuvieron el mismo rango de valores de OD que se obtuvieron en los controles (98,33% y 104,32% de viabilidad).

Conclusión:

La conclusión de este primer estudio es que la concentración de 20 mg/ml del extracto es citotóxica, mientras que las disoluciones de 2 y 0,2 mg/ml no lo son, aunque tampoco mejoran significativamente la capacidad de proliferación de las células ARPE-19.

5

La Figura 1 muestra el efecto de tres concentraciones diferentes de extracto de uva sobre los cultivos de células de epitelio pigmentario de la retina, específicamente de células de una línea celular ARPE-19 tras una exposición de 24 horas de duración y medido por el ensayo de Azul Alamar. En el eje de abscisas se representa la viabilidad celular en porcentaje tras el tratamiento con las distintas concentraciones de extracto, así como las células no tratadas (control). Se muestra la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos a partir de los resultados de los experimentos desarrollados. Debido a que los resultados se muestran como media de porcentajes, no se muestran los valores de desviación estándar.

10

15 Ejemplo 2. Determinación de una concentración no citotóxica del extracto de uva por el ensayo MTT®

Teniendo en cuenta los resultados del estudio anterior, en este experimento se prepararon seis concentraciones del extracto de uva (2, 5, 10, 12, 15 y 20 mg/ml) en un medio de cultivo. En base a los resultados del estudio anterior, se calculó que la IC50 de este producto podría ser de 12 mg/ml, y por este motivo se incluyó esta dosis en este experimento. Se evaluó la posible citotoxicidad de estas concentraciones del extracto de uva incubándolas durante 24 horas con los cultivos de ARPE-19 y midiendo la citotoxicidad mediante el ensayo de MTT.

20

25

El ensayo del MTT® es una técnica colorimétrica, que mide principalmente la actividad de la enzima succínico deshidrogenasa que está situada en las mitocondrias celulares. Pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. El compuesto MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización en un disolvente orgánico, y se mide su color mediante lector de placas. Al final del experimento, se retiran todos los tratamientos de todos los pocillos y se lavan con medio de cultivo sin rojo fenol. Se añade 50 uL la solución de 10% MTT preparada previamente. Se

30

incuba durante 2 horas en la incubadora bajo las condiciones standard del cultivo de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se resuspenden los cristales formados con 100 uL de una solución al 10 % de HCl en Isopropanol. Se pipetea en cada pocillo para resuspender los cristales. Se lee la absorbancia con unos parámetros de 570 nm y 650 nm.

5

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Grupo control del cultivo: Se incubaron las células con el medio de cultivo DMEM/F12 suplementado. Se pusieron dos grupos control: uno en el lado izquierdo (control 1) y otro en el lado derecho (control 2) siguiendo las recomendaciones de las normas ISO.
- Grupo de extracto de uva: se incubaron los cultivos con diferentes concentraciones de extracto de uva.
  - o Subgrupo 2 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 2 mg/ml de extracto de uva.
  - o Subgrupo 5 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 5 mg/ml de extracto de uva.
  - o Subgrupo 10 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 10 mg/ml de extracto de uva.
  - o Subgrupo 12 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 12 mg/ml de extracto de uva.
  - o Subgrupo 15 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 15 mg/ml de extracto de uva.
  - o Subgrupo 20 mg/ml extracto de uva: se incubaron los cultivos con 20 mg/ml de extracto de uva.
  - o Grupo de control positivo: se incubaron los cultivos con una solución de cloruro de benzalconio al 0,001%.
  - o Grupo de control negativo: se incubaron los cultivos con medio de cultivo con un 8,7% de PBS. El PBS se utilizó en la preparación aplicada para preparar la solución anterior, y por esta razón se incluyó este control, para determinar que el posible efecto fuera debido al cloruro de benzalconio y no al portador.

Resultados:

Se evaluaron seis concentraciones (2, 5, 10, 12, 15 y 20 mg/ml) del extracto de uva siguiendo el mismo método descrito en el apartado anterior, excepto que se utilizó el ensayo MTT para determinar la citotoxicidad de dichas concentraciones.

Observación:

- 5 Las observaciones del experimento anterior se repiten de nuevo confirmando que el extracto de uva no se disuelve completamente en el medio de cultivo. Se requiere utilizar otro disolvente más apropiado u otro método de esterilización.

Resultado y discusión:

El análisis estadístico de datos obtenido (figura 2) ha demostrado que:

- 10 – El valor medio de viabilidad (%) de cultivos de los grupos de control del medio de cultivo, sembrados tanto en el lado izquierdo como en el derecho del resto de los grupos no fue de más del 15% del valor medio de viabilidad (%) de cultivos de todos los pocillos de control. El ensayo cumple los criterios de norma ISO a asegurar que la cantidad de células es coherente en todos los pocillos de placa
- 15 de cultivo celular. Se aprecia que los cultivos mantienen la morfología de las células ARPE-19. Se aprecia que es un cultivo sano. Los datos de los grupos de control se establecieron en el 100%.
- En el grupo control positivo, el porcentaje de viabilidad fue del 3%, confirmando que el cultivo responde perfectamente a la citotoxicidad.
- 20 – En el grupo control negativo, el porcentaje de viabilidad fue del 97% confirmando que el cultivo responde perfectamente en condiciones de no citotoxicidad. La cantidad de PBS (8,7%) añadida en el medio de cultivo no produjo una diferencia significativa en la viabilidad del cultivo, confirmando que se puede aplicar esta cantidad en los siguientes estudios.
- 25 – En el grupo con extracto de uva, los porcentajes de viabilidad fueron del 100%, 98%, 69%, 54%, 23% y 7% para las concentraciones de 2, 5, 10, 12, 15 y 20 mg/ml de extracto de uva.

Conclusión:

- 30 La conclusión de este segundo estudio es que las concentraciones de 10, 12, 15 y 20 mg/ml del extracto de uva son citotóxicas, y las disoluciones de 2 y 5 mg/ml no lo fueron, pero que tampoco mejoran significativamente la proliferación celular. La concentración IC50 del extracto está entre 12 y 13 mg/ml de extracto porque la viabilidad del cultivo es del 54% con la concentración 12 mg/ml y se reduce hasta un 23% al incrementar la concentración del producto a 15 mg/ml.

La Figura 2 muestra el efecto de diferentes concentraciones de extracto de uva sobre los cultivos de células del epitelio pigmentario de la retina, específicamente las células de una línea celular ARPE-19 tras una exposición de 24 horas de duración y medido por el ensayo de MTT. En el eje de abscisas se representa la viabilidad celular en porcentaje tras el tratamiento con las distintas concentraciones de extracto, así como las células no tratadas (Control). Se muestra la media de los porcentajes de viabilidad obtenidos a partir de los resultados de los experimentos desarrollados. Debido a que los resultados se muestran como media de porcentajes, no se muestran los valores de desviación estándar.

Se eligió la concentración de 2 mg/ml para los siguientes experimentos porque la viabilidad del cultivo fue del 104% en el experimento 1 (medido por el ensayo de Alamar Blue®) y del 100% en el experimento 2 (medido por el ensayo del MTT®).

15

Ejemplo 3. Determinación de las capacidades antioxidante y antidegenerativa y su eficacia del extracto de uva en un modelo de daño celular producido tras un tratamiento con glucosa oxidasa

Una vez determinada la concentración no citotóxica del extracto de uva, se planificó un estudio en el que los cultivos se expusieron a diferentes tratamientos. El objeto de este estudio fue evaluar el efecto del extracto de uva en un cultivo dañado con glucosa oxidasa (que induce un daño crónico a los cultivos de EPR).

20

Se compararon tres tipos de tratamientos:

25

i) Tratamientos previos (PRE)

En el grupo de tratamientos PRE, los cultivos fueron expuestos durante 1 hora a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o de 10  $\mu$ M de resveratrol (control negativo) y posteriormente tratados durante 30 minutos con 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>DCF-DA. Después de tratar durante 24 horas con 11 mU/ml de glucosa oxidasa se incubaron con el compuesto MTT durante 2 horas al final del experimento.

30

ii) Tratamientos simultáneos (SIMU)

En el grupo de tratamientos SIMU, los cultivos fueron tratados durante 30 minutos con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  y posteriormente durante 24 horas con 11 mU/ml de glucosa oxidasa a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o con 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol (control negativo). Se incubaron con el compuesto MTT durante 2 horas al final del experimento.

5

iii) Tratamientos combinados (COMB = PRE+SIMU)

En el grupo de tratamientos COMB, los cultivos fueron expuestos durante 1 hora a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o de 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol (tratamiento PRE). Posteriormente se trataron con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  durante 30 minutos y finalmente los  
10 cultivos fueron expuestos durante 24 horas a 11 mU/ml de glucosa oxidasa y a una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva o 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol (tratamiento SIMU). Se incubaron con el compuesto MTT durante 2 horas al final del experimento.

En otros grupos de tratamientos PRE, SIMU y COMB, los cultivos no fueron tratados durante  
15 24 horas con 11 mU/ml de glucosa oxidasa para producir el daño celular. Se eligió la duración de 24 horas y la concentración de 11 mU/ml de glucosa oxidasa teniendo en cuenta resultados previos obtenidos en el laboratorio en el desarrollo de otros estudios.

La duración de 30 minutos y la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  se han elegido por  
20 ser la utilizada en los experimentos que aparecen en los artículos publicados en este campo de estudio, además de ser el utilizado de forma habitual en estudios previos obtenidos en el laboratorio en el desarrollo de otros proyectos.

La concentración de extracto de uva y resveratrol se preparó en el disolvente DMSO.

25 Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Grupo de control del cultivo: se incubaron las células con el medio de cultivo DMEM/F2 suplementado. Se utilizaron dos grupos control: uno en el lado izquierdo (control 1) y otro en el lado derecho (control 2) siguiendo las recomendaciones de las normas ISO.
- 30 - Grupo de extracto de uva: se incubaron los cultivos de este grupo con una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva.
  - o Subgrupo extracto de uva PRE: se incubaron los cultivos siguiendo el protocolo de tratamiento PRE con o sin presencia de glucosa oxidasa.

- Subgrupo extracto de uva SIMU: se incubaron los cultivos siguiendo el protocolo de tratamiento SIMU con o sin presencia de glucosa oxidasa.
- Subgrupo extracto de uva COMB (PRE+SIMU): se incubaron los cultivos siguiendo el protocolo de tratamiento COMB con o sin presencia de glucosa oxidasa.

5

- Grupo de control: se utilizaron varios controles que consisten en cultivos incubados con medio de cultivo, con DMSO y con resveratrol (tratamiento PRE, SIMU y COMB) con o sin presencia de glucosa oxidasa.

Tras la incubación se midió la fluorescencia DCF y la viabilidad del cultivo de cada grupo utilizando el ensayo MTT.

10

### Resultados

#### Observación:

El extracto de uva y el control resveratrol se disuelve completamente en DMSO, lo que facilitó su filtración utilizando un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  para la esterilización. Se midió la fluorescencia DCF (método de detección de la capacidad antioxidante) tras 1, 3, 5, 8 y 24 horas de duración tras el tratamiento, pero únicamente se presenta el análisis de los datos obtenidos tras 24 horas (ya que fue el grupo en el que se obtuvo mejor valor de fluorescencia, mostrado en la figura 5, comparando con el valor de fluorescencia obtenido tras 1 hora). Además, en las figuras 3 y 4 se presenta el análisis de los datos obtenidos tras 24 horas por el ensayo de MTT (la capacidad antidegenerativa).

15

20

#### Resultado y discusión:

El análisis estadístico de los datos (figuras 3 y 4) obtenidos ha demostrado la relación entre las capacidades antioxidante y antidegenerativa en cada grupo de cultivo:

25

- En el Grupo de control con medio de cultivo, se aprecia que los cultivos mantuvieron la morfología de las células ARPE-19. Se aprecia que es un cultivo sano. Los datos de este grupo se establecieron como el 100% para poder comparar los resultados obtenidos tanto para la capacidad antidegenerativa (la viabilidad) como para la capacidad antioxidante. Cuando el Grupo de control fue tratado con glucosa oxidasa (11 mU/ml), la viabilidad fue del 92,17% con respecto al control sin daño (100%) confirmando que la concentración de glucosa oxidasa elegida para este estudio produce un daño menor (8%) al cultivo.

30



5 - En el grupo control con 0,5% DMSO pero sin tratar con glucosa oxidasa, la viabilidad fue del 115,85% confirmando que la concentración de 0,5% de DMSO no es citotóxica para el cultivo. La fluorescencia DCF del cultivo (medido con los parámetros (nm) de la detección del DCF a las 24 horas) ha sido 186,81% confirmando que la presencia de DMSO aumentó las condiciones de oxidación *in vitro* de las células del cultivo pero no produjo degeneración celular (condición oxidativa versus condición degenerativa). El grupo control, cuando se ha tratado con glucosa oxidasa, presentó una viabilidad del 52,69%, confirmando que el 0,5% de DMSO y las 11 mU/ ml de glucosa oxidasa conjuntamente producen un daño cercano al 50% lo que se considera deseable (degeneración celular). Destacar que el efecto de daño degenerativo fue producido al 50% cuando el DMSO y la glucosa oxidasa se actuaron junto a las células. Un daño de casi el 50% en un cultivo es recomendable para este tipo de estudios. Se debe destacar que el DMSO (0,5%) individualmente no produjo daño al cultivo y la glucosa oxidasa (11 mU/ml) produjo un daño de solo un 8%. Además, la fluorescencia DCF ha aumentado (3991,29%), lo cual es 21 veces más que el grupo DMSO sin glucosa oxidasa (186,81%). Estos hallazgos confirman que la degeneración celular del cultivo, se produce por oxidación.

Grupo PRE

20 - En el grupo resveratrol PRE, la viabilidad fue del 111,81%, confirmando que la concentración de 0,8% de DMSO usada para disolver el resveratrol y la concentración de 10 µM de resveratrol, tras 1 hora de exposición, no son citotóxicas para el cultivo. La fluorescencia DCF del cultivo fue del 59,51%. Cuando el cultivo de este grupo fue tratado con glucosa oxidasa, tras una hora de pretratamiento con el resveratrol, la viabilidad fue de 25 115,54%, lo que confirma que en este grupo se ha inhibido el daño producido por la glucosa oxidasa (116,54% respecto al 92,17% del grupo de glucosa oxidasa, y 111,81% del grupo del resveratrol PRE sin glucosa oxidasa). Se debe destacar que no hay un grupo con una hora de pretratamiento con el DMSO y posteriormente expuesto 24 horas a glucosa oxidasa, porque el objetivo del estudio era buscar diferencias entre tratamientos (extracto de uva o resveratrol) sin o con glucosa oxidasa. La fluorescencia DCF fue del 59,75%, la misma que 30 en el grupo del resveratrol pretratado pero sin glucosa oxidasa (59,75% respecto al 59,51%). No se puede confirmar el efecto antioxidante del resveratrol por la ausencia de un grupo pretratado durante una hora con DMSO y posteriormente expuesto a glucosa oxidasa durante 24 horas. Solo se puede confirmar que el pretratamiento de una hora con resveratrol

mejora la viabilidad respecto al grupo con glucosa oxidasa (115,54% respecto al 92,17%), aunque la presencia del DMSO durante una hora previamente a la glucosa oxidasa ha aumentado la condición de oxidación *in vitro* (59,75% respecto al 16,65% del grupo de glucosa oxidasa).

- 5 - En el grupo de extracto de uva PRE, la viabilidad fue del 117,14%, confirmando que la concentración de 0,8% del DMSO usada para disolver el extracto de uva y la concentración de 2 mg/ml del extracto de uva, tras 1 hora de exposición, no son citotóxicas para el cultivo. La fluorescencia DCF del cultivo fue de 183,72%. Cuando el cultivo de este grupo fue tratado con glucosa oxidasa tras una hora de pretratamiento con el extracto de uva, la
- 10 viabilidad fue del 98,78%, lo que confirma que en el grupo se ha inhibido el daño producido por la glucosa oxidasa (98,78% respecto al 92,17% del grupo de glucosa oxidasa, y 117,14% del grupo del extracto de uva PRE sin glucosa oxidasa). Se debe destacar que no hay un grupo con una hora de pretratamiento con el DMSO y posteriormente expuesto 24
- 15 horas a glucosa oxidasa porque el objetivo de estudio era buscar diferencias entre los tratamientos (extracto de uva o resveratrol) sin o con glucosa oxidasa. La fluorescencia DCF se redujo al 101,35%, respecto al 183,72% del grupo de extracto de uva sin glucosa oxidasa. No se puede confirmar el efecto antioxidante del extracto de uva por la ausencia de un grupo pretratado una hora con DMSO y posteriormente expuesto a glucosa oxidasa
- 20 durante 24 horas. Solo se puede confirmar que, el pretratamiento de una hora con el extracto de uva mejora la viabilidad (capacidad antidegenerativa) respecto al grupo con glucosa oxidasa (98,78% respecto al 92,17%), aunque se aprecia un daño por glucosa oxidasa (98,17% del grupo con glucosa oxidasa respecto al 117,14% del grupo sin glucosa oxidasa) y la presencia del DMSO durante una hora previamente a que la glucosa oxidasa haya aumentado la condición de oxidación *in vitro* (101,35% respecto al 16,65% del grupo
- 25 con glucosa oxidasa).

#### Grupo SIMU

- En el grupo resveratrol SIMU, la viabilidad fue del 96,02%, lo que confirma que la concentración de 0,8% de DMSO y 10  $\mu$ M del resveratrol tras 24 horas de exposición, no son citotóxicos (el 96,02% respecto al 100% del Grupo de control). La fluorescencia DCF
- 30 medida en este grupo fue del 93,40%, lo que es 50% menor que lo que se ha detectado en el grupo con 0,5% DMSO (93,40% respecto al 186,81% del grupo con DMSO). La presencia del DMSO, tanto en el grupo de control como en el de resveratrol SIMU, fue de 24 horas. Se confirma que el resveratrol ha inhibido el 50% de la condición oxidativa *in vitro* de células de cultivo. Cuando el cultivo de este grupo fue tratado con glucosa oxidasa junto con el

resveratrol durante 24 horas, la viabilidad fue del 16,65%, lo que es 3 veces menor que el grupo DMSO con glucosa oxidasa (16,65% respecto al 52,69%) y 6 veces menor que el grupo con glucosa oxidasa (16,65% respecto al 92,17%). Este resultado ha confirmado que, aunque la concentración de resveratrol, aplicada no es citotóxica (demostrada por el grupo sin glucosa oxidasa) no fue capaz de recuperar el daño producido al cultivo por el DMSO y glucosa oxidasa. La fluorescencia DCF fue del 3091,21%, lo que es una reducción de 0,8 veces respecto al control (3091,29% respecto al 3991,29%), lo que confirma que el resveratrol ha producido una inhibición parcial en la degeneración oxidativa del cultivo.

- En el grupo de extracto de uva SIMU, la viabilidad fue del 104,28%, lo que confirma que la concentración de 0,8% del DMSO y 2 mg/ml del extracto de uva tras 24 horas de exposición, no son citotóxicos (104,28% respecto al 100% del grupo de control). La fluorescencia DCF medida en este grupo fue del 89,44%, lo que es 48% menos que lo que se ha detectado en el grupo con DMSO (89,44% respecto al 186,81%). La presencia de DMSO, tanto en el grupo de control como en el de extracto de uva SIMU, fue de 24 horas, lo que confirma que el extracto de uva inhibió el 48% de la condición oxidativa *in vitro* de células del cultivo.

Cuando el cultivo de este grupo fue tratado durante 24 horas con glucosa oxidasa y con el extracto de uva, la viabilidad fue de 16,28%, lo que supone 3 veces menos que el grupo DMSO con glucosa oxidasa (16,28% respecto al 52,69%), y 6 veces menos que el grupo con glucosa oxidasa (16,65% respecto al 92,17%). Estos resultados confirman que, aunque el extracto de uva no es citotóxico (demostrado por el grupo sin glucosa oxidasa) no fue capaz de recuperar el daño producido por el DMSO y la glucosa oxidasa al cultivo. La fluorescencia DCF fue del 694,80%, lo que supone una reducción de 6 veces respecto al control (694,80% respecto al 3991,29%), y lo que confirma que el extracto de uva ha producido una inhibición parcial en la degeneración oxidativa del cultivo.

Se debe destacar que en ambos grupos, tanto en el del resveratrol como en el del extracto de uva, la capacidad antioxidante (viabilidad) fue la misma, pero el resveratrol redujo la fluorescencia DCF 0,8 veces y el extracto de uva 6. Estos datos confirman que la capacidad antioxidante del extracto de uva es más potente que la del resveratrol (eficacia).

#### Grupo COMB

- En el grupo resveratrol COMB, la viabilidad fue del 89,05% lo que confirma otra vez que la concentración de 0,8% de DMSO y 10  $\mu$ M del resveratrol, tras 1 hora de pretratamiento y 24 horas con glucosa oxidasa, no es citotóxica (89,09% respecto al 100% de control). La reducción del 6% de viabilidad respecto al grupo resveratrol SIMU (en el cultivo sin pretratamiento con resveratrol, fue del 89,05% respecto al 96,02%) podría ser por la

incubación de una hora más con el DMSO (resveratrol PRE). Después del pretratamiento de una hora con 10  $\mu$ M de resveratrol, se lavó el cultivo, marcado con H<sub>2</sub>DCF-DA, se lavó otra vez y finalmente se incubó durante 24 horas con 10  $\mu$ M del resveratrol. La fluorescencia DCF de este grupo fue 215,04%, lo que supone 1,5 y 3,6 veces más que la detectada en el grupo de control con DMSO (215,04% respecto al 186,81%) y el grupo de resveratrol SIMU (215,04% respecto al 59,51%). Este resultado ha confirmado que se produce inhibición de la degeneración del cultivo por oxidación producida por el DMSO (efecto antidegenerativo). Cuando el cultivo de este grupo fue tratado con glucosa oxidasa durante 24 horas junto con el resveratrol (1 hora de resveratrol PRE y posteriormente 24 horas de resveratrol SIMU), la viabilidad fue del 24,48%, lo que es 3,8 y 2,1 veces menos que la que se detectó en el Grupo de control de la glucosa oxidasa (el 24,48% respecto al 92,17%) y el DMSO con glucosa oxidasa (24,48% respecto al 52,69%) respectivamente, y 1,5 veces más lo que se detectó en el grupo del resveratrol SIMU (24,48% respecto al 16,65%). Este resultado confirma que el resveratrol no es citotóxico como se ha demostrado por el grupo sin glucosa oxidasa y no fue capaz de recuperar el daño producido en el cultivo por el DMSO y la glucosa oxidasa. Sin embargo, el resultado de grupo de resveratrol COMB ha presentado un aumento de 1,5 veces frente al grupo de resveratrol SIMU (el 24,48% respecto al 16,65%), lo que es contrario respecto al grupo sin glucosa oxidasa (donde se obtuvo una reducción del 6%; es decir, el 89,05% respecto al 96,02%). La fluorescencia DCF fue del 3223,23%, lo que es una reducción de 0,8 veces respecto al control (3223,23% respecto al 3991,29%), y confirma que el resveratrol produjo una inhibición parcial en la degeneración oxidativa al cultivo y mejoró la viabilidad en comparación con el grupo de resveratrol SIMU sin glucosa oxidasa.

- En el grupo de extracto de uva COMB, la viabilidad fue de 95,47% lo que confirma que la concentración de 0,8% de DMSO y 2 mg/ml de extracto de uva, tras 1 hora de pretratamiento y 24 horas con glucosa oxidasa, no es citotóxica (95,47% al respecto del 100% de control). La reducción del 9% de la viabilidad respecto al grupo extracto de uva SIMU (sin pretratamiento con extracto de uva, 95,47% respecto al 104,28%) podría deberse a haber tenido una hora más de incubación con DMSO (grupo de extracto de uva PRE). Después del pretratamiento de una hora con 2 mg/m de extracto de uva, se lavó el cultivo, marcado con H<sub>2</sub>DCF-DA, se lavó de nuevo y finalmente se incubó durante 24 horas con la concentración de 2 mg/ml del extracto de uva. La fluorescencia DCF de este grupo fue del 90,16%, lo que supone 2,1 veces menor que la fluorescencia detectada en el grupo de control con DMSO (90,16% respecto al 186,81%) y similar a la detectada en el grupo de

extracto de uva SIMU (90,16% respecto al 89,44%). Este resultado ha confirmado que, cuando se hace un tratamiento PRE y SIMU, el extracto de uva inhibe la oxidación *in vitro* de las células del cultivo, pero no se aprecia una inhibición tan potente como para bloquear la degeneración del cultivo (una reducción del 9% respecto a la viabilidad del grupo de extracto de uva SIMU). Cuando el cultivo de este grupo fue tratado con glucosa oxidasa durante 24 horas junto con el extracto de uva (1 hora de extracto de uva PRE y posteriormente 24 horas de extracto de uva SIMU), la viabilidad fue del 30,35%, lo que es 3 y 2 veces menor que la viabilidad detectada en el grupo de control de glucosa oxidasa (30,35% respecto al 92,17%) y el DMSO con glucosa oxidasa (30,35% respecto al 52,69%) respectivamente, y 2 veces mayor que la viabilidad detectada en el grupo de extracto de uva SIMU (30,35% respecto al 16,28%). Este resultado ha confirmado que el extracto de uva no es citotóxico (como se ha demostrado por el grupo sin glucosa oxidasa) y no fue capaz de recuperar el daño producido al cultivo por el DMSO y la glucosa oxidasa. Sin embargo, el resultado del grupo resveratrol COMB ha presentado un aumento de 2 veces respecto al grupo de extracto de uva SIMU (30,35% respecto al 16,28%), al contrario de lo que se observó en el grupo sin glucosa oxidasa (una reducción del 9%, es decir, 95,47% respecto al 104,28%). La fluorescencia DCF fue de 684,94%, lo que es una reducción de 6 veces respecto al control (684,94% respecto al 3991,29%), lo que confirma que el extracto de uva ha producido una inhibición parcial en la degeneración oxidativa del cultivo.

Se debe destacar que en ambos grupos, tanto el del resveratrol como el del extracto de uva, la diferencia entre las capacidades antidegenerativas (viabilidades) es de solo un 6% (30,35% de la uva respecto al 24,48% de la resveratrol) pero el resveratrol ha reducido la fluorescencia DCF 0,8 veces y el extracto de uva 6. Estos datos confirman que el extracto de uva tiene mayor capacidad antioxidante que el resveratrol (eficacia).

25

#### Conclusión:

La conclusión del tercer estudio es que se podría utilizar este extracto de uva como un tratamiento antioxidante frente al daño producido por la glucosa oxidasa (el daño degenerativo crónico) en las células de epitelio pigmentario de la retina, ya que el extracto inhibe el daño crónico producido en el cultivo y al mismo tiempo se inhibe la fluorescencia. Los resultados obtenidos muestran que 2 mg/ml extracto de uva es más efectivo que el resveratrol (10 µM).

30

La Figura 3 muestra la evaluación de la citotoxicidad y de las capacidades antioxidante y antidegenerativo de diferentes tratamientos (tratamiento PRE, tratamiento SIMU, tratamiento COMB (PRE+SIMU) y controles) sobre los cultivos de las células del epitelio pigmentario de la retina, específicamente las células de la línea celular ARPE-19. Se midieron, tras 24 horas desde que acabó el tratamiento, la citotoxicidad y la capacidad antidegenerativa (viabilidad) por el ensayo de MTT y la capacidad antioxidante por el ensayo con el marcador H<sub>2</sub>DCF-DA. En el eje de abscisas se representa la viabilidad celular y la capacidad antioxidante detectada en porcentaje tras los tratamientos, incluidos los controles. Se muestra la media de los porcentajes de viabilidad celular y la capacidad antioxidante obtenidos a partir de los resultados de los experimentos desarrollados. Debido a que los resultados se muestran como media de porcentajes, no se muestran los valores de desviación estándar.

La Figura 4 muestra la evaluación de la citotoxicidad y la capacidad antidegenerativa (viabilidad) y la capacidad antioxidante de diferentes tratamientos (tratamiento PRE, tratamiento SIMU, tratamiento COMB (PRE+SIMU) y controles) sobre los cultivos de las células del epitelio pigmentario de la retina, específicamente las células de la línea celular ARPE-19 (dañadas con glucosa oxidasa). Se midieron, 24 horas después del tratamiento, la viabilidad celular por el ensayo de MTT y la capacidad antioxidante por el ensayo con el marcador H<sub>2</sub>DCF-DA. En el eje de abscisas se representan la viabilidad celular y la capacidad antioxidante detectada en porcentaje tras los tratamientos, incluidos los controles. Se muestra la media de los porcentajes de viabilidad celular y la capacidad antioxidante obtenidos a partir de los resultados de los experimentos desarrollados. Debido a que los resultados se muestran como media de porcentajes, no se muestran los valores de desviación estándar.

25

La Figura 5 muestra la evaluación de la capacidad antioxidante de diferentes tratamientos (tratamiento PRE, tratamiento SIMU, tratamiento COMB (PRE+SIMU) y controles) sobre los cultivos de las células del epitelio pigmentario de la retina, específicamente las células de la línea celular ARPE-19 (sin dañar o dañadas con glucosa oxidasa). Se midió, tras 1 y 24 horas de duración después del tratamiento, la capacidad antioxidante utilizando el ensayo con el marcador H<sub>2</sub>DCF-DA. En el eje de abscisas se representan la capacidad antioxidante detectada en porcentaje tras los tratamientos, incluidos los controles. Se muestra la media de los porcentajes de la capacidad antioxidante obtenidos a partir de los resultados de los

30

experimentos desarrollados. Debido a que los resultados se muestran como media de porcentajes, no se muestran los valores de desviación estándar.

5 La enzima glucosa oxidasa cataliza una reacción por la que a partir de la glucosa del medio de cultivo se genera de forma constante  $H_2O_2$  en las células de cultivo, provocando un daño oxidativo crónico en el cultivo. Este estudio con células con un daño crónico ha demostrado que el extracto de uva tiene una mayor capacidad antioxidante que el resveratrol pero las diferencias entre capacidad antidegenerativo no fué significativa. Se decidió entonces aplicar otro método para verificar que el extracto de uva tiene una capacidad antioxidante y antidegenerativa más potente que la del resveratrol. Se añadió directamente el  $H_2O_2$  al cultivo para así generar una condición oxidativa directa y aguda.

Ejemplo 4. Determinación de las capacidades antioxidante y antidegenerativa del extracto de uva en un modelo de daño celular producido tras un tratamiento con  $H_2O_2$

15 Una vez que determinada la concentración no citotóxica del extracto de uva, se planificó un estudio en el cual los cultivos fueron expuestos a diferentes tratamientos. El objeto de este estudio fue evaluar el efecto del extracto de uva en un cultivo dañado con  $H_2O_2$  (que produce un daño agudo al cultivo de EPR y por lo tanto degeneración celular).

20 Para optimizar el protocolo de daño oxidativo con  $H_2O_2$  y su detección, se estudió el efecto de distintas combinaciones de  $H_2O_2$  (0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM y 1 mM) y  $H_2DCF$ -DA (5 y 10  $\mu$ M). Los resultados han demostrado que el cultivo cargado con 10  $\mu$ M de  $H_2DCF$ -DA (45 minutos de incubación) y posteriormente incubado con 0,250 mM de  $H_2O_2$  (1 hora de incubación) es adecuado para este tipo de estudios. Se han aplicado estas concentraciones en los siguientes estudios.

25

Se compararon tres tipos de tratamientos:

- Tratamientos posteriores (POST)

30 Se incubaron una y dos horas con el  $H_2O_2$ , posteriormente una hora con el extracto de uva, el resveratrol y los controles.

Los grupos experimentales fueron:

- Grupo de control del cultivo: se incubaron las células con el medio de cultivo DMEM/F12 suplementado.

- Grupo de extracto de uva: se incubaron los cultivos con una concentración de 2 mg/ml de extracto de uva tras incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tratamiento POST)
- Grupo de controles: se utilizaron varios controles que consisten en los cultivos incubados con medio de cultivo; con DMSO y con resveratrol con o sin presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

5

Tras la incubación se midió la fluorescencia DCF y la viabilidad del cultivo de cada grupo utilizando el ensayo MTT.

### Resultados

10 Resultado y discusión: El análisis estadístico de los datos (figuras 6 y 7) ha demostrado la relación entre la viabilidad celular, las capacidades antioxidante y antidegenerativa en cada grupo de estudio de la siguiente manera:

#### 1 hora de incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

15 En el grupo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la viabilidad fue del 90,20%, lo que confirma que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una hora de incubación ha producido un daño de solo un 10% al cultivo (90,20% respecto al 100% del control). La fluorescencia DCF fue del 87,75% (una diferencia de 12% respecto al control). Cuando el cultivo se incubó una hora con el 0,8% de DMSO y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la viabilidad celular fue del 60,95% y la fluorescencia DCF detectada fue la misma que en el grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (87,50% respecto al 87,15%), lo que confirma que esta condición no es la adecuada para

20 producir un daño de 50% en el cultivo. Estos datos han confirmado que una hora de incubación con el DMSO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce un condición oxidativa intensa *in vitro* de las células del cultivo (60% del daño producido). Cuando el cultivo se incubó durante una hora con 10 µM de resveratrol tras una hora de incubación con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la viabilidad celular detectada fue del 62,75%, lo que confirma una reducción casi del 40% en la viabilidad

25 respecto al control (62,75% respecto al 100% de control), del 30% respecto al grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62,75% respecto al 90,20%) y un aumento del 2% respecto al grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con DMSO. Se debe destacar que el resveratrol se disolvió en 0,8% de DMSO. La fluorescencia DCF fue 86,23%, la misma que se ha detectado en el grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (86,23% respecto al 87,15%) y el grupo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con DMSO (86,23% respecto al 87,60%). Estos datos han confirmado que el

30 resveratrol no ha sido capaz de inhibir la condición oxidativa intensa de degeneración (60% el daño). Cuando el cultivo fue incubado con 2 mg/ml del extracto de uva, la viabilidad celular detectada fue del 81,27% y la fluorescencia DCF del 72,65%. En presencia del extracto de uva, la viabilidad celular ha aumentado un 20% respecto al grupo el DMSO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (81,27% respecto al 60,95%) lo que confirma la capacidad antidegenerativa del



extracto de uva y la fluorescencia DCF se redujo un 14% respecto a los controles (72,65% respecto al 86,23%, 87,50% y 87,15%) lo que confirma la capacidad antioxidante del extracto de uva. El resveratrol no fue capaz de inhibir, pero sí el extracto de uva, y la fluorescencia DCF se redujo y aumentó la viabilidad de cultivos, lo que confirma otra vez que el extracto de uva tiene una mayor capacidad antioxidante y antidegenerativa que el Resveratrol. La conclusión de este estudio confirma que aunque en el estudio anterior la capacidad antidegenerativa no parecía considerable, este estudio ha confirmado las capacidades antioxidante y antidegenerativa del extracto de uva.

10 2 horas de incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:-

En el grupo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la viabilidad fue del 82,92%, lo que confirma que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tras dos horas de incubación, ha producido un daño del 18% al cultivo (82,92% respecto al 100% del control) y un 8% más de lo que se detectó tras una hora de incubación (90,20%). La fluorescencia DCF fue del 93,68% (una diferencia de 7% respecto al control), lo que confirma la presencia de una condición oxidativa menor, que ha reducido la viabilidad del cultivo. Cuando el cultivo fue incubado una hora solo con el 0,8% de DMSO, la viabilidad celular y fluorescencia DCF ha sido detectada 53,03% y 104,58% respectivamente, lo que confirma que el 0,8% DMSO solo genera degeneración celular en este estudio. Se aprecia un efecto oxidativo potente que ha reducido la viabilidad un 50% (53,03% respecto al 100% de control). Cuando el cultivo fue incubado durante dos horas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente con el 0,8% de DMSO, la viabilidad y la fluorescencia detectadas fueron de 54,33% y 107,63%, lo mismo que se detectó en el grupo DMSO, confirmando la presencia de una condición oxidativa potente. Se debe destacar que en el experimento anterior, en el que el cultivo fue expuesto a una hora con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente una hora con el DMSO, la condición oxidativo fue menos potente, y la viabilidad celular fue del 81,21%. Cuando el cultivo fue incubado dos horas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente una hora con el resveratrol, la viabilidad y la fluorescencia detectadas fueron un 57,58% y 100,39%, lo que confirma una reducción de la condición oxidativa *in vitro* de las células de cultivo, lo que mejora la viabilidad celular. Cuando el cultivo se incubó dos horas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente una hora con el extracto de uva, la viabilidad y la fluorescencia detectadas fueron un 74,94% y 79,98%, lo que confirma una reducción mayor en la condición oxidativa *in vitro* de las células de cultivo, lo que mejora la viabilidad celular. La comparación entre el grupo resveratrol y el extracto de uva confirma otra vez que el extracto de uva tiene una mayor capacidad antioxidante y antidegenerativa que el resveratrol.

Conclusión: La conclusión del tercer estudio es que se podría aplicar este extracto de uva como un tratamiento antioxidante y antidegenerativo contra el daño producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células del epitelio pigmentario de la retina porque el extracto inhibe el daño agudo producido en el cultivo y al mismo tiempo inhibe la fluorescencia DCF relacionada con la

5

determinación de la capacidad antioxidante y también es más efectivo que el resveratrol. Por todo ello se puede concluir que los resultados obtenidos muestran que 2 mg/ml extracto de uva es más efectivo en las capacidades antioxidante y antidegenerativa que el resveratrol (10 µM).

10

La Figura 6 muestra la evaluación de las capacidades antidegenerativa (viabilidad celular) y antioxidante de diferentes tratamientos sobre los cultivos de células del epitelio pigmentario de la retina, específicamente las células de la línea celular ARPE-19 (dañado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante una hora). Se midieron, tras 1 hora de incubación, la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT y la fluorescencia DCF utilizando el ensayo con el marcador H<sub>2</sub>DCF-DA. En el eje de abscisas se representa la capacidad antidegenerativa (viabilidad celular) y la capacidad antioxidante detectada en porcentaje tras los tratamientos, incluidos los controles. Se muestra la media de los porcentajes de viabilidad celular y de la capacidad antioxidante obtenidos a partir de los resultados de los experimentos desarrollados. Debido a que los resultados se presentan como media de porcentajes, no se muestran los valores de desviación estándar.

15

20

La Figura 7 muestra la evaluación de las capacidades antidegenerativa (viabilidad celular) y antioxidante de diferentes tratamientos sobre cultivos de células del epitelio pigmentario de la retina, específicamente las células de la línea celular ARPE-19 (dañado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante dos horas). Se han medido, tras 1 hora de incubación, la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT, y la fluorescencia DCF utilizando el ensayo con el marcador H<sub>2</sub>DCF-DA. En el eje de abscisas se representa la capacidad anti degenerativa (viabilidad celular) y la capacidad antioxidante detectada en porcentaje tras los tratamientos, incluidos los controles. Se muestra la media de los porcentajes de viabilidad celular y la capacidad antioxidante obtenidos a partir de los resultados de los experimentos desarrollados. Debido a que los resultados se muestran como media de porcentajes, no se muestran los valores de desviación estándar.

25

30

Así, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ejemplos previamente expuestos, se puede concluir que:

- 5 Considerando las diferencias observadas en términos de viabilidad celular (capacidad antidegenerativa) en el cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina ARPE-19 (línea celular) y la fluorescencia de DCF (capacidad antioxidante) en comparación con los controles empleados en los experimentos, se han obtenido las siguientes conclusiones respecto a dicho extracto de uva:
- el DMSO es el mejor disolvente.
  - 10 - la concentración óptima no citotóxica es 2 mg/ml.
  - se ha demostrado que tiene la capacidad antioxidante.
  - se ha demostrado que tiene la capacidad antidegenerativa (la oxidación no siempre produce degeneración celular como ya se ha demostrada en este estudio).
  - se ha demostrado que tiene una capacidad antioxidante más elevada la que tiene el  
15 resveratrol.
  - se ha demostrado que tiene una capacidad antidegenerativa más elevada la que posee el resveratrol.
  - se ha demostrado que se puede actuar como antioxidante y antidegenerativo contra el daño agudo y el crónico.
  - 20 -se ha demostrado que se puede actuar como antioxidante y antidegenerativo contra el daño agudo y el crónico, de forma más eficiente la que tiene el resveratrol.

Tabla 1

	Composición
<b>COMPOSICION FENOLICA (mg/g extracto)</b>	
Polifenoles Totales (mg ácido gálico/g)	37,44
Ácidos Fenólicos	
ácido elágico	5,64±0,65
Flavanoles	
Catequina	0,28±0,07
Epicatequina	1,03±0,25
Proantocianidina	4,62
Flavonoles	
Miricetina	0,26±0,01
Quercetina	0,34±0,03
Kaempferol	0,16±0,00
<b>COMPOSICION RESIDUO INSOLUBLE ALCOHOL (mg/g RIA)</b>	
RIA Rdto Total	660
Azúcares Neutros	294,7
Ácidos Urónicos	32,3±1,0
Azúcares Totales	328,2
Lignina Klason	84,3±1,1

Tabla 2

(mg/g RIA)	HF	HS
Azúcares Neutros		
Celulosa	4,1	11,0
Glucosa	258,2	268,8
Xylosa	0,5	0,4
Galactosa	5,2	6,0
Arabinosa	1,9	2,8
Manosa	6,8	5,7
Ácidos urónicos	32,2	32,3
Azúcares Totales	328,2	328,2
Lignina Klason	84,3	-
Rdto. RIA	659,7	659,7

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para identificar propiedades de un extracto de uva, que comprende las siguientes etapas:
  - a) proporcionar un extracto de uva;
  - b) determinar la solubilidad del extracto en uno o más disolventes;
  - c) determinar la concentración no-citotóxica y citotóxica de dicho extracto para las células a ensayar;
  - d) determinar la capacidad antioxidante y antidegenerativa de dicho extracto en base a una concentración no citotóxica determinada en la etapa a) para las células a ensayar.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que la determinación de la capacidad** antioxidante y antidegenerativa del extracto comprende el tratamiento oxidativo de las células con la enzima glucosa oxidasa y/o el tratamiento de las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
3. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que las células a ensayar son epitelio pigmentario retinal (RPE)**.
4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que la capacidad** antioxidante y antidegenerativa del extracto se mide en al menos una de las siguientes estrategias de tratamiento:
  - i) exposición de las células al extracto y posteriormente medición de la especie oxidante intracelular y la viabilidad celular con y sin tratamiento oxidativo (tratamiento PRE);
  - ii) medición de la especie oxidante intracelular y viabilidad celular durante el tratamiento con el extracto con y sin tratamiento oxidativo (tratamiento SIMU);
  - iii) exposición de las células al extracto y posteriormente medición de la especie oxidante intracelular y viabilidad celular con y sin tratamiento oxidativo durante el tratamiento adicional con el extracto (tratamiento COMB = PRE + SIMU).
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la viabilidad de las células se mide después de la etapa d).

6. Composición que comprende el tratamiento o la mejora de un trastorno oftalmológico, que comprende un extracto de uva, caracterizada por que el extracto de uva muestra un mejor comportamiento que 5 a 20  $\mu\text{M}$  de resveratrol en el procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5.

5

7. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada por que el extracto de uva en una concentración de 1 a 5 mg/l muestra un mejor comportamiento que 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol.

10

8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada por que el extracto de uva en una concentración de 2 mg/l muestra un comportamiento mejor que 10  $\mu\text{M}$  de resveratrol.

9. Composición para tratar o mejorar un trastorno oftalmológico, en donde la composición comprende como ingredientes activos un extracto de uva que comprende como ingredientes

15

activos los siguientes componentes:

- a) uno o más polifenoles a una concentración entre 0,5 y 100 mg/g de la composición;
- b) fibras dietéticas, en donde las fibras dietéticas comprenden uno o más azúcares o derivados de los mismos a una concentración de 50 a 600 mg/g basado en la composición.

20

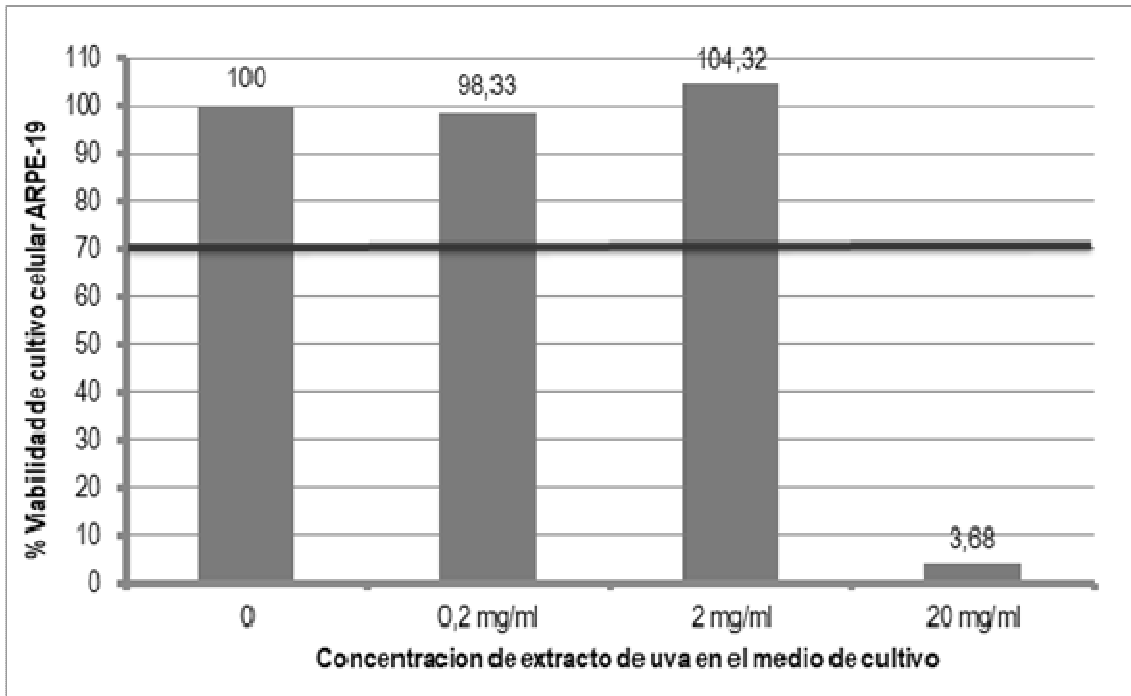


Figura 1

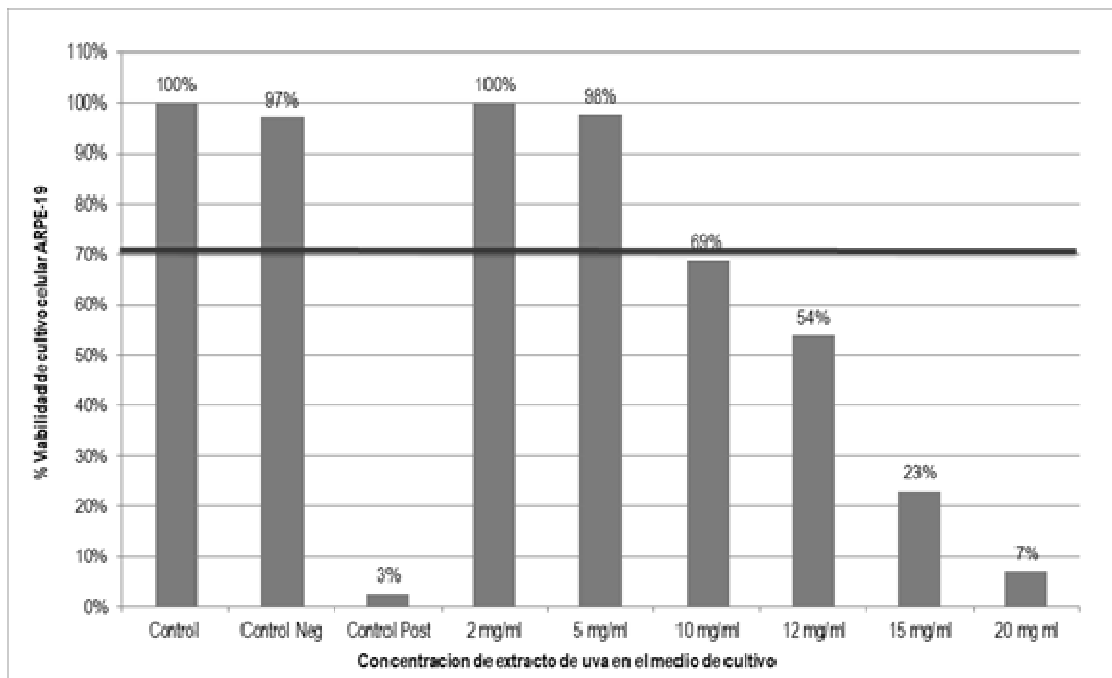


Figura 2



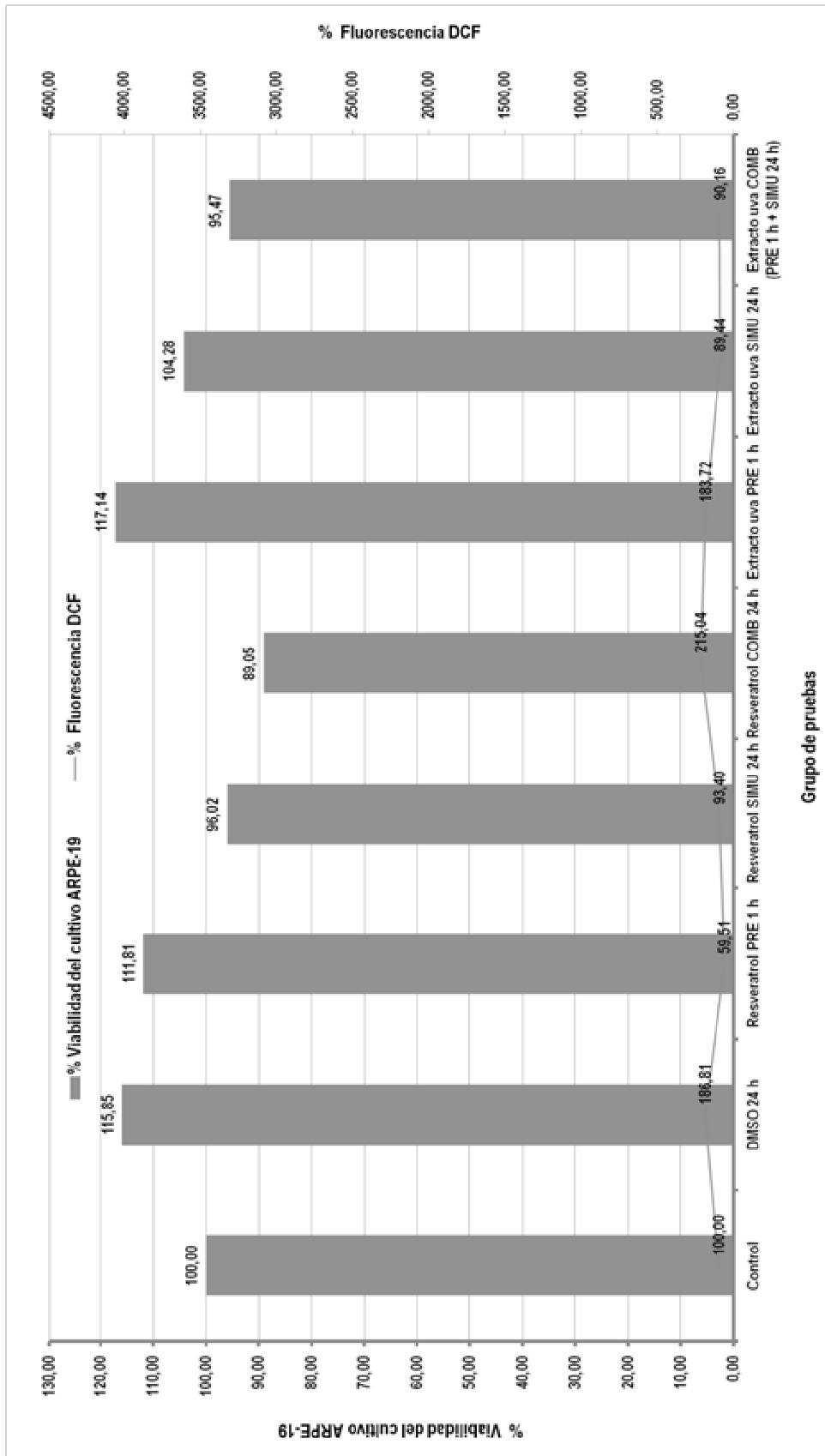


Figura 3

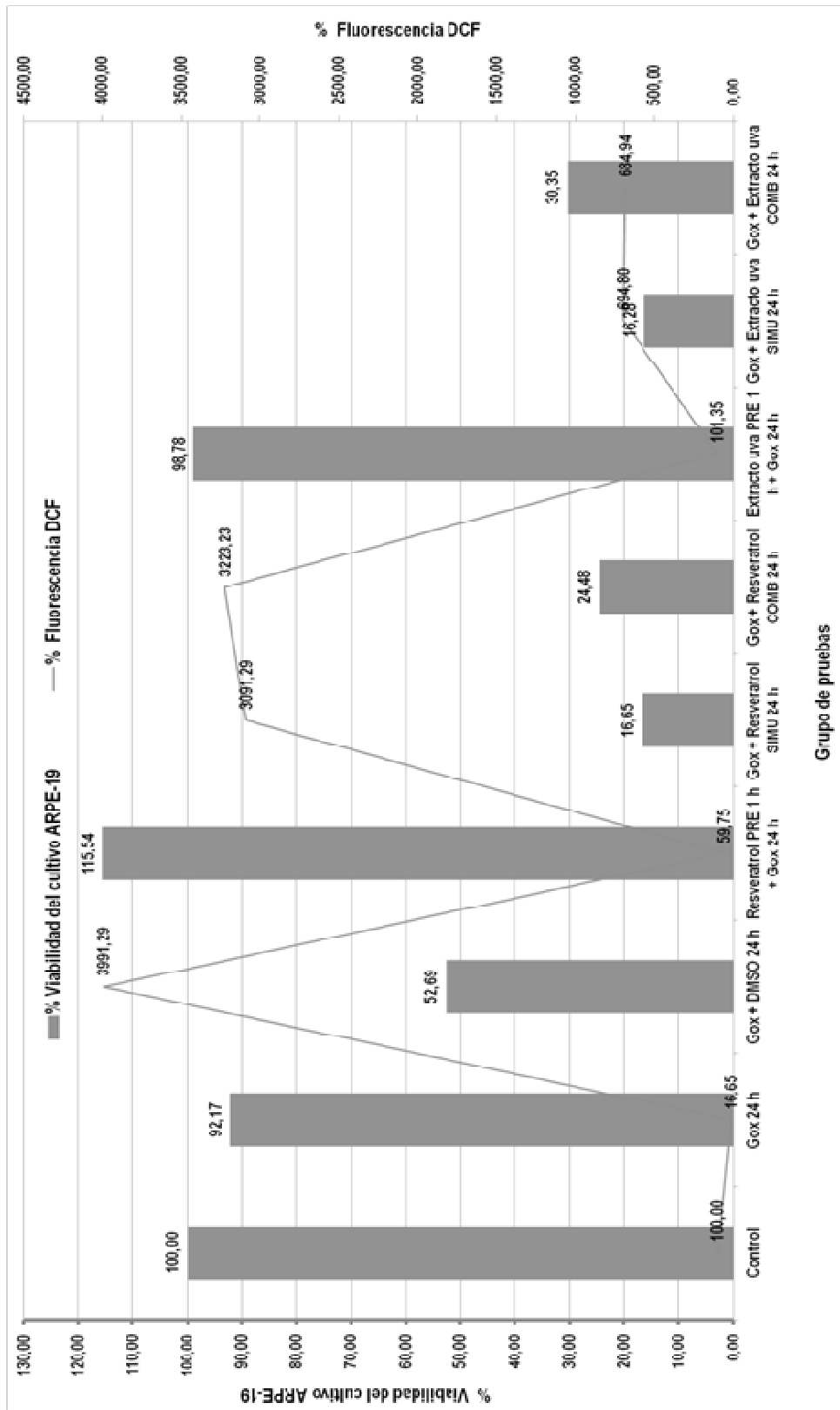


Figura 4

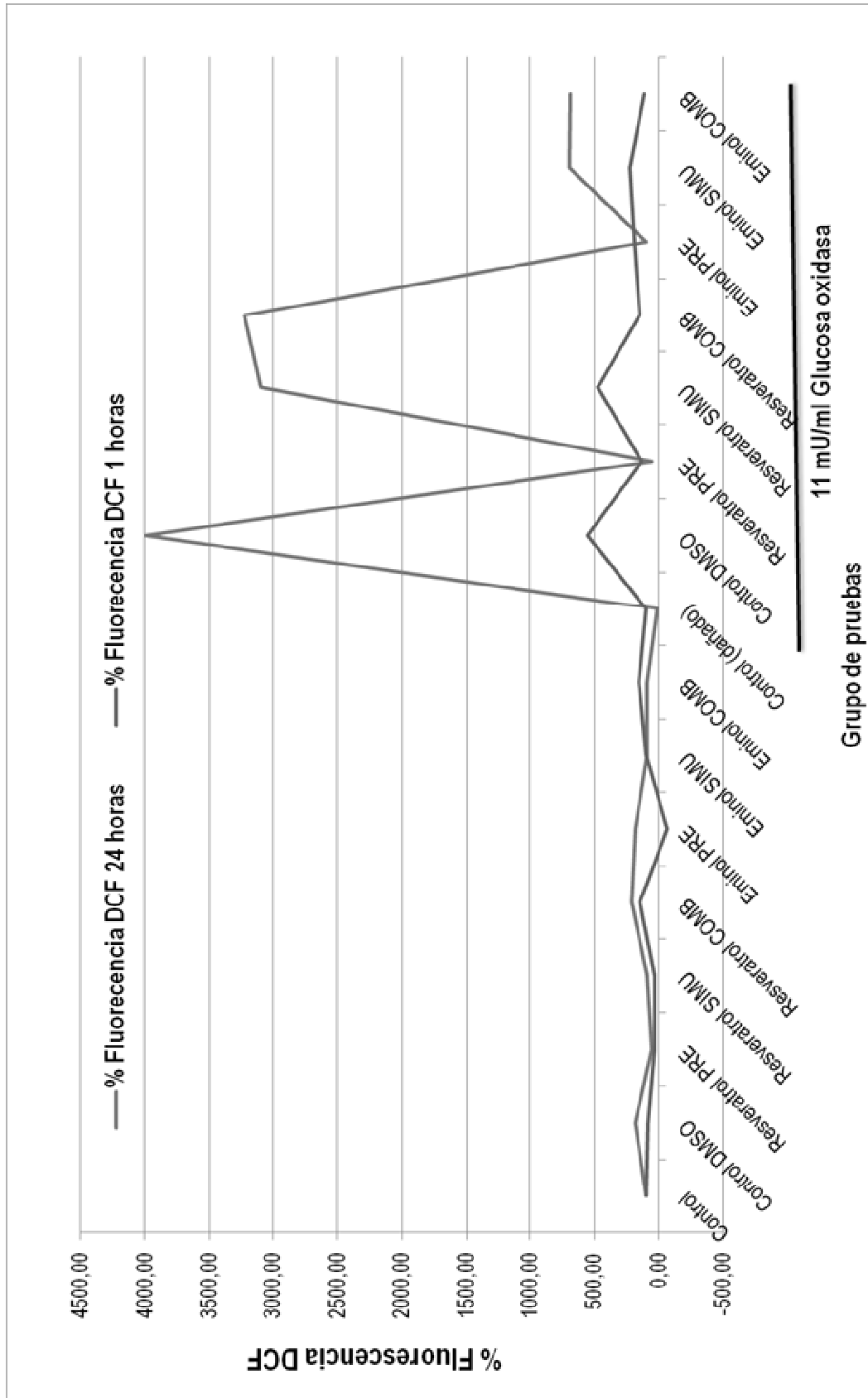


Figura 5

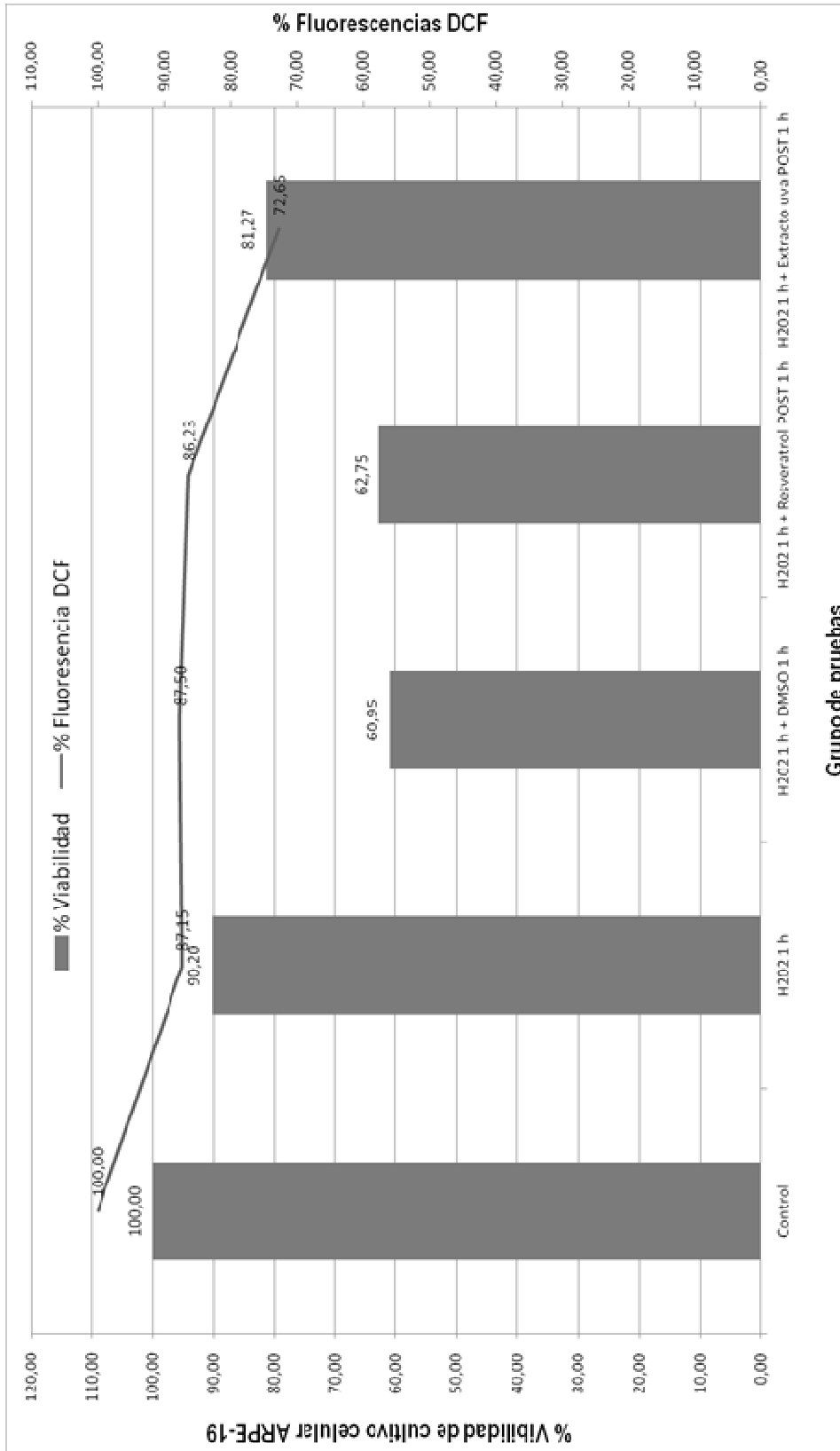


Figura 6

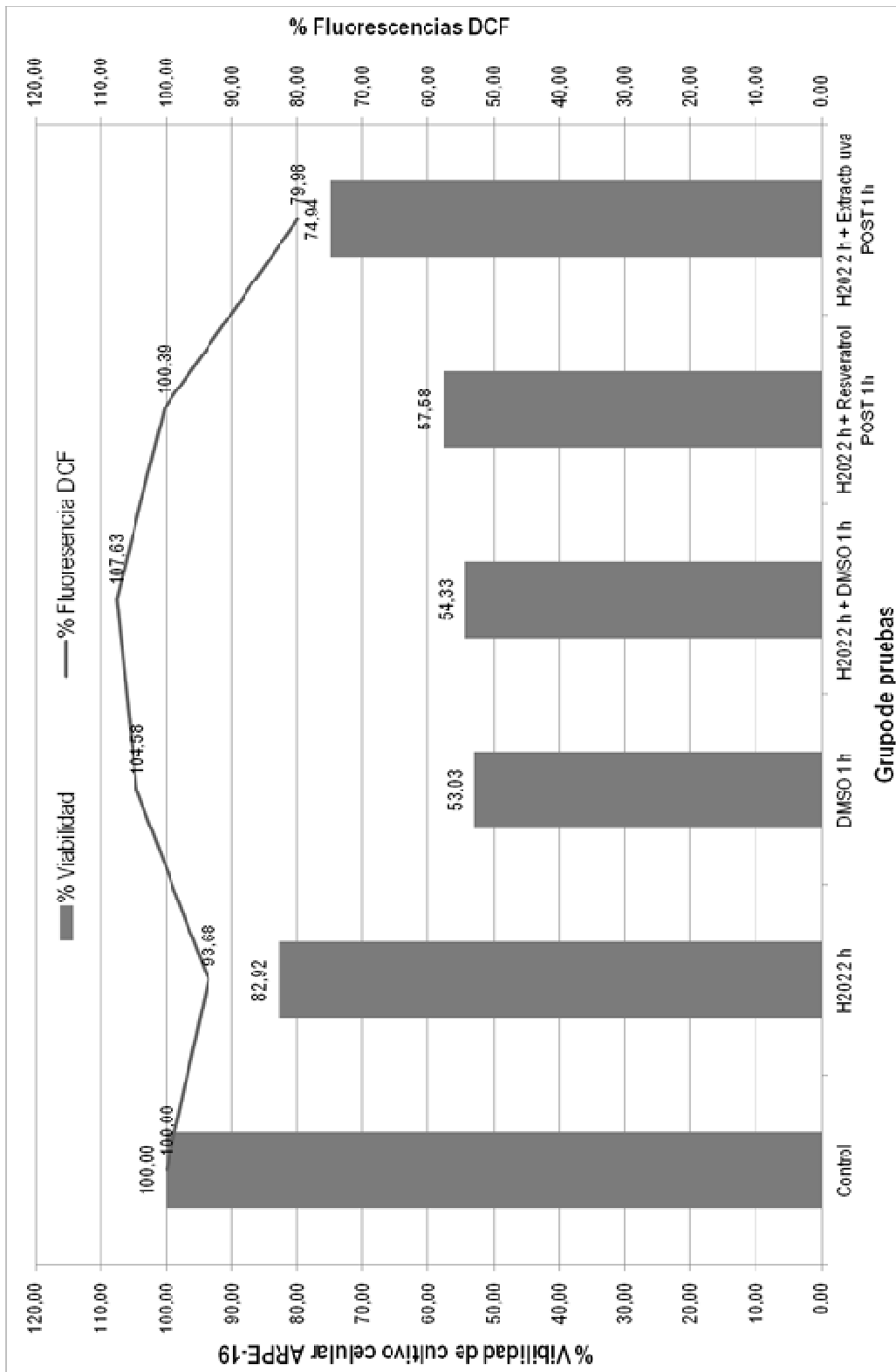


Figura 7



- ②1 N.º solicitud: 201930142  
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 20.02.2019  
③2 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZHAO ZHAO <i>et al.</i> Photooxidative damage in retinal pigment epithelial cells via GRP78 and the protective role of grape skin polyphenols. Food and Chemical Toxicology DEC 2014. , 30/11/2014, Vol. 74, Páginas 216-224, ISSN 0278-6915(print) ISSN 1873-6351(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.fct.2014.10.001>, página 1, columna derecha; página 2, columna izquierda, segundo párrafo; página 2, columna derecha, primer y segundo párrafos; página 3, columna derecha, primer párrafo; página 6, columna derecha; página 7, columna izquierda.	1, 3-8
Y		2
X	EP 2752195 A1 (ABRO BIOTEC S L) 09/07/2014, Página 2, párrafo [0001]; páginas 5 y 6, párrafos [0024]-[0032]; página 7, párrafos [0050] y [0051].	9
X	ES 2319032 A1 (CARLOS MORO GONZALEZ) 01/05/2009, Página 2, líneas 51-54.	9
A	HA JUNG-HEUN <i>et al.</i> Ocular Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress Are Attenuated by Supplementation with Grape Polyphenols in Human Retinal Pigmented Epithelium Cells and in C57BL/6 Mice. Journal of Nutrition JUN 2014. , 31/05/2014, Vol. 144, Páginas 799-806, ISSN 0022-3166(print) ISSN 1541-6100(electronic), <DOI: doi:10.3945/jn.113.186957>, página 799, columna derecha; página 800, columna izquierda, segundo y penúltimo párrafos; página 801, columna izquierda, primer párrafo; página 803.	1-9
A	VECIANA GALINDO C <i>et al.</i> [Assessment of cytotoxicity and biosafety of polyphenolic extracts from olive pits]. Nutricion hospitalaria Spain 01 Jun 2014. , 01/06/2014, Vol. 29, Páginas 1388 - 1393, ISSN 1699-5198 (Electronic), <DOI: doi:10.3305/nh.2014.29.6.7141 pubmed:24972479>. página 1388, columna izquierda; página 1390, columna izquierda, cuarto párrafo.	1-9
Y	KING R E <i>et al.</i> Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS, 20050115 ELSEVIER SCIENCE IRLAND, IR. Wille Timo; Worek Franz; Thiermann Horst, 15/01/2005, Vol. 151, Páginas 143 - 149, ISSN 0009-2797, página 144, columna derecha, segundo párrafo; página 148, columna izquierda, primer párrafo.	2

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
23.05.2019

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K36/87** (2006.01)

**A61P27/02** (2006.01)

**G01N33/15** (2006.01)

**G01N33/50** (2006.01)

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

A61K, A61P, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, INTERNET