

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 547**

21 Número de solicitud: 201231152

51 Int. Cl.:

A61K 36/87 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

19.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2014

Fecha de la concesión:

29.09.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.10.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**LORES AGUIN, Marta;
GARCÍA JARES, Carmen;
ÁLVAREZ CASAS, Marta y
LLOMPART, María**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **Extracto polifenólico a partir de residuos de uva blanca**

57 Resumen:

Extracto polifenólico a partir de residuos de uva blanca. La invención se refiere a un proceso sencillo y en pocas etapas para la obtención de extractos con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos de uva blanca. Por las características de la vinificación en blanco, que se elabora fermentando exclusivamente el mosto exprimido de las uvas, sin contacto con los restos de pulpa, hollejos y pepitas; el residuo generado en el proceso (bagazo de uva blanca) es muy rico en polifenoles, en la medida en que han pasado al vino en menor cantidad. El procedimiento que se propone emplea materiales no contaminantes, transcurre en condiciones suaves y además evita los sólidos en suspensión en los eluatos obtenidos; permitiendo la provisión de extractos ricos en polifenoles bioactivos utilizables a nivel industrial, fundamentalmente en los sectores cosmético, farmacéutico y/o alimentario.

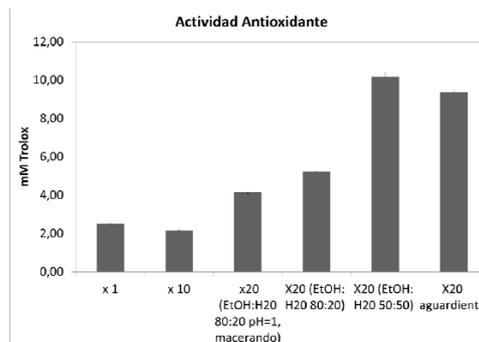


FIGURA 3

ES 2 443 547 B2

DESCRIPCIÓN

Extracto polifenólico a partir de residuos de uva blanca

Sector de la técnica

Antecedentes

5 Barker y colaboradores desarrollaron un nuevo método para la disrupción y extracción de muestras sólidas: la dispersión de matriz en fase sólida ("matrix solid-phase dispersion", MSPD) (US 08/026,275). Este procedimiento combina aspectos de varias técnicas para la disrupción de la muestra y, al mismo tiempo, genera un material que posee un carácter único para la extracción de los compuestos de interés de una muestra dada. Las primeras aplicaciones de la MSPD estaban orientadas al aislamiento de componentes activos o metabolitos presentes en matrices biológicas, pero posteriormente esta técnica también se ha aplicado a la extracción de compuestos naturales (vitaminas, flavonoides), pesticidas y otros contaminantes de tejidos animales, frutas, vegetales y otras matrices alimentarias, biológicas y medioambientales.

15 En su concepción original, la MSPD implicaba la mezcla de una muestra viscosa, sólida o semisólida con un soporte sólido de sílica previamente derivatizado para producir en su superficie una fase orgánica enlazada, como por ejemplo octadecilsilil (C18). Algunas aplicaciones de la MSPD han supuesto la mezcla de las muestras con silicatos sin derivatizar (sílica gel, arena, etc.) u otros sólidos orgánicos (fibras grafitizadas) o inorgánicos (Florasil, alúmina, etc.). (Barker, S.A. Matrix solid-phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, 151-162).

20 Las primeras aplicaciones de la MSPD a la extracción de polifenoles fueron en el campo de las plantas medicinales, específicamente ácidos fenólicos (Ziaková A, Brandsteterová E, Blahová E (2003) Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*, *Journal of Chromatography A* 983, 271-275) e isoflavonoides (Xiao HB, Krucker M, Albert K, Liang XM (2004) Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* 1032, 117-124). Más tarde, Manhita y colaboradores la aplicaron a la extracción de antocianinas a muestras vegetales [5], en la que parece ser la primera aplicación de esta técnica en *Vitis vinifera* (uvas tintas).

25 En ocasiones, las cantidades de muestra disponibles para su análisis son limitadas, particularmente en el caso de muestras biológicas, por lo que los errores en la etapa de preparación de muestra se hacen inadmisibles, y los protocolos que implican el uso de pequeñas cantidades de muestra pasan a ser muy valiosos. De este modo, la técnica MSPD se ha venido optimizando para extracciones con cantidades muy pequeñas de muestras, inferiores a 30 50 miligramos y empleando una cantidad de disolvente del orden de los microlitros, lo que convierte a esta técnica en un proceso miniaturizado que permite los análisis cromatográficos de las muestras (Kristenson, E.M.; Haverkate, E.G.J.; Slooten, C.J.; Ramos, L.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.Th. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* **2001**, 917, 277-286; Kristenson, E.M.; Shahmiri, S.; Slooten, C.J.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.Th. Matrix solid-phase dispersion micro-extraction of pesticides from single insects with subsequent GC-MS analysis. *Chromatographia* **2004**, 59, 315-320).

Aunque existen diversas técnicas para la extracción de polifenoles a partir de residuos vitivinícolas, existe todavía una necesidad de proporcionar un método sencillo, eficaz y fácilmente industrializable.

Descripción breve de la invención

40 La presente invención proporciona un procedimiento sencillo y en pocas etapas para la obtención de extractos con propiedades antioxidantes y antibacterianas a partir de residuos de uva blanca. Este procedimiento emplea materiales no contaminantes, transcurre en condiciones suaves y además evita los sólidos en suspensión en los eluatos obtenidos, por lo que no es necesario un proceso de filtrado posterior. El procedimiento de la invención permite la provisión de extractos a nivel industrial.

45 Así, en un aspecto la invención se dirige a un procedimiento para obtener un extracto a partir de residuo de uva blanca que comprende:

- a) preparar una mezcla que comprende residuo de uva blanca y un dispersante,
- b) añadir un disolvente,
- c) eluir, y
- 50 d) recoger los eluatos.

En otro aspecto, la invención se dirige a un extracto polifenólico de uva blanca caracterizado por la ausencia de antocianos y un pH de entre 4 y 8 medido en disolución acuosa.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a una composición cosmética, farmacéutica o nutricional que comprende el extracto descrito anteriormente.

Además, la invención también se refiere al uso del extracto de la invención para la preparación de un conservante alimentario o de una composición antibacteriana.

5 Descripción de las figuras

Figura 1. Aspecto de los extractos en disolución obtenidos en algunos de los ejemplos.

Figura 2. Representa el índice de polifenoles totales expresado en mg equivalentes de ácido gálico por cada gramo de bagazo (peso seco) respecto a la masa de muestra de partida (1, 10 y 20 g, respectivamente).

Figura 3. Representa la actividad antioxidante en milimoles de Trolox de los extractos del ejemplo 2.1.

10 Figura 4. Foto del antibiograma realizado con el extracto de residuo de uva blanca obtenido en el ejemplo 1, en una placa cubierta de colonias de la bacteria Gram + *Staphylococcus aureus*. Se observa el tamaño patente del halo de inhibición frente al control.

Descripción detallada de la invención

15 El procedimiento descrito anteriormente es sencillo, económico y fácilmente escalable. Está diseñado para la extracción de polifenoles de manera que los eluatos obtenidos presentan propiedades antioxidantes y antibacterianas, no comprenden sólidos en suspensión por lo que posteriores etapas de filtración y/o ultrafiltración no son necesarios. Esto presenta una ventaja adicional ya que simplifica el proceso y la obtención de los extractos de interés.

20 El procedimiento de la invención permite emplear como materia de partida cualquier residuo de uva blanca, como por ejemplo, bagazo, lías, pulpa, piel, semillas u orujos agotados (residuo de destilación). La distribución de las sustancias fenólicas en la uva no es homogénea, por ejemplo la pulpa contiene aproximadamente entre el 83 y el 91 %; los hollejos o pieles entre el 7 y el 12 % y las semillas pueden alcanzar un 6 %. En una realización particular, el residuo de uva blanca es bagazo. En una realización particular el residuo de uva blanca se almacena previamente entre -40°C y 20 °C, preferiblemente entre -30°C y 10°C.

25 La uva es el fruto comestible de la vid, pequeño y de forma redonda u ovalada, con una carne muy jugosa y una piel fina; se utiliza para elaborar vino. La mayoría de la uva cultivada proviene de la especie *Vitis vinifera*, natural de la Europa mediterránea y Asia central. Las uvas se clasifican fundamentalmente en dos tipos: uvas blancas y negras o tintas.

30 Cada tipo de uva presenta una composición en polifenoles diferente, especialmente en lo que se refiere a uvas blancas y tintas, la cual se plasmará en los vinos que se elaboren a partir de las mismas. En los vinos tintos hay mayor cantidad de polifenoles en general, debido a la distinta manera en que se fermenta. Mientras que el vino blanco se elabora fermentando exclusivamente el mosto exprimido de las uvas, el vino tinto se elabora macerando durante un cierto tiempo el mosto con los pellejos y las pepitas. Esto hace que el residuo generado en el proceso de vinificación en blanco (bagazo de uva blanca) sea muy rico en polifenoles, en la medida en que han pasado al vino
35 en menor cantidad. Así, para la presente invención son de interés los residuos de uva blanca.

Un ejemplo de uva blanca es la variedad Albariño, que supone en Galicia el 95 % de la producción total de uva blanca (Consello Regulador DO Rías Baixas). En una realización particular de la invención, el residuo de uva blanca es bagazo de la variedad Albariño.

40 Para la presente invención, "dispersante" se refiere a un material sólido que mezclado con una muestra biológica permite su disrupción y su dispersión en su superficie, de modo que la mezcla mecánica perturba la arquitectura de la muestra, rompiendo el material en pedazos de menor tamaño e incrementando la liberación de los compuestos químicos presentes en el interior de las células vegetales de la muestra.

45 En una realización particular el dispersante se selecciona de entre el grupo constituido por arena, florisil, C18, alúmina y sílica gel. En una realización particular el dispersante es arena. En una realización particular el dispersante es arena de origen natural. En una realización particular el tamaño del grano del dispersante se selecciona de entre 100 μ m y 1 mm, preferiblemente de entre 250 μ m y 320 μ m.

50 La preparación de la mezcla que comprende residuo de uva blanca y un dispersante se puede llevar a cabo utilizando un mortero (vidrio, porcelana, ágata) o cualquier otro dispositivo que permita triturar y homogeneizar la mezcla mecánicamente. Esta etapa transcurre en un rango de temperaturas de entre 10 °C y 40 °C y presión atmosférica, razones por las cuales no hay riesgo de degradación de los compuestos a extraer. En una realización particular, el dispersante y la muestra se mezclan a una temperatura de entre 10 y 40 °C y a una presión de entre 0,8-1,2 atm.

- En una realización particular, el disolvente de la etapa b) descrita anteriormente está en una proporción de entre 1 y 10 volúmenes de disolvente respecto al peso de la mezcla de residuo de uva blanca y dispersante, preferiblemente de entre 2 y 6.
- 5 De un modo opcional, es posible mantener durante cierto tiempo la suspensión formada en la etapa b) en determinadas condiciones de forma que se produce la maceración de la muestra. Así, en una realización particular la invención se dirige a un procedimiento como se describió anteriormente, donde la suspensión de la etapa b) se mantiene entre 1 y 5 horas a una temperatura de entre 10 °C y 40 °C.
- 10 Los autores de la invención comprobaron que la recirculación de los eluatos recogidos en la etapa d) permite disminuir el volumen total de disolvente utilizado en el proceso y además permite aumentar de manera significativa la cantidad de polifenoles totales extraídos de los residuos de uva blanca. Así, en una realización particular, el procedimiento de la invención comprende además la elución de la mezcla de la etapa a) con los eluatos recogidos en la etapa d).
- En una realización particular la etapa d) se repite entre 1 y 7 veces. En una realización particular la etapa d) se repite 3, 4 o 5 veces.
- 15 La combinación de las etapas de maceración y de recirculación de los eluatos conducen a un procedimiento más optimizado en cuanto a rendimiento del extracto obtenido y el bajo consumo de disolventes. Así en una realización particular, el procedimiento de la invención comprende:
- a') preparar una mezcla que comprende residuo de uva blanca y un dispersante,
 - 20 b') añadir un disolvente a la mezcla preparada en la etapa a) y mantener entre 1 y 5 horas a una temperatura de entre 10 °C y 40 °C,
 - c') eluir la mezcla de la etapa a) con un disolvente,
 - d') recoger los eluatos,
 - e') eluir la mezcla de la etapa a) con los eluatos recogidos en la etapa c).
- 25 En otra realización particular, el disolvente se selecciona de forma independiente de entre el grupo constituido por agua, alcohol alquílico, glicoles, o sus mezclas.
- En la presente invención "alcohol alquílico" se refiere a una sustancia con una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene un grupo hidroxilo, de entre 1 y 12 átomos de carbono, preferiblemente de entre 1 y 6 átomos de carbono. Son por ejemplo alcoholes alquílicos el metanol, etanol, isopropanol, terc-butil alcohol, etc. En una realización particular el alcohol alquílico se selecciona entre metanol, etanol, isopropanol, y sus mezclas.
- 30 En la presente invención "glicoles" se refiere a una sustancia con una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene dos o más grupos hidroxilo, de entre 1 y 12 átomos de carbono, preferiblemente de entre 1 y 8 átomos de carbono, y opcionalmente puede contener uno o más grupos éter. En una realización particular, el glicol se selecciona de entre 1,2-etanodiol (etilenglicol), butano-1,4-diol (1,4-butilenglicol), butano-1,3-diol, 1,5-pentanodiol (pentilenglicol), 2-metil-2,4-pentanodiol (hexilenglicol), 2-(2-etoxietoxi)etanol (dietilenglicol monoetil eter), éter 2,2'-dihidroxi-dipropilo (dipropilenglicol) y 1,2-octanodiol (caprilil glicol).
- 35 En una realización particular, el disolvente empleado en el procedimiento de la invención puede tener un pH modificado de entre 0,5 y 3. Este pH se consigue mediante la adición de ácidos orgánicos o inorgánicos al disolvente previamente a su utilización como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, etc.
- En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende además la evaporación del disolvente.
- 40 En otra realización particular, el procedimiento de la invención comprende además una etapa de liofilización. En esta etapa de liofilización es posible congelar previamente los eluatos recogidos o bien los eluatos tras la evaporación del disolvente, aunque en este último caso el alto porcentaje etanólico del disolvente de extracción no permite alcanzar la solidificación total (punto de fusión del etanol= -117°C). En una realización particular la liofilización se lleva a cabo entre -50°C y -20°C, preferiblemente entre -45°C y -35°C. En una realización particular la liofilización se lleva a cabo entre $1,31 \cdot 10^{-6}$ atm y $6,60 \cdot 10^{-6}$ atm (1-50 mm Hg), preferiblemente entre $1,31 \cdot 10^{-6}$ atm y $1,31 \cdot 10^{-5}$ atm (1-10 mm Hg). El extracto es estable y no es necesaria la adición de estabilizantes en la etapa de liofilización. Sin embargo, es posible añadir pequeñas cantidades de azúcares tales como glucosa, sacarosa o trealosa a una concentración que oscila desde un 1 hasta un 5% u otras moléculas que actúen como crioprotectores y/o lioprotectores. El extracto de la invención después de la liofilización no se altera de ningún modo.
- 45 En otro aspecto, la invención se dirige a un extracto polifenólico de uva blanca caracterizado por la ausencia de antocianos y un pH de entre 4 y 8 medido en disolución acuosa.
- 50

- 5 En una realización particular, la invención se dirige a un extracto polifenólico de uva blanca caracterizado por a) un índice de polifenoles totales de entre 8 y 50 mg de ácido gálico/g de bagazo seco; b) una concentración de ácido gálico de entre 0,035 y 0,125 mg/ g de bagazo seco; c) una concentración de catequina de entre 1,14 y 1,28 mg/ g de bagazo seco; d) una concentración de epicatequina de entre 0,57 y 0,72 mg/ g de bagazo seco; e) un pH de entre 4 y 8; y f) ausencia de antocianos.
- En una realización particular, la invención se dirige a un extracto polifenólico de uva blanca caracterizado por a) un índice de polifenoles totales de entre 15 y 25 mg de ácido gálico/g de bagazo seco; b) ácido gálico de entre 0,064 y 0,082 mg/ g de bagazo seco; c) catequina de entre 1,19 y 1,23 mg/ g de bagazo seco; d) epicatequina de entre 0,63 y 0,68 mg/ g de bagazo seco, e) un pH de entre 4 y 8 medido en disolución acuosa; y f) ausencia de antocianos.
- 10 Los métodos de análisis y los aparatos empleados se describen en los ejemplos.
- Para la presente invención, "antocianos" se refiere a un grupo de polifenoles flavonoides que comprende el conjunto formado por antocianinas y antocianidinas, que también incluye las combinaciones osídicas de una antocianidina con un azúcar. Son los responsables del color rojo azulado de la piel de las uvas tintas.
- 15 En una realización particular, el extracto polifenólico de uva blanca es obtenible mediante el procedimiento anteriormente descrito.
- En una realización particular el extracto se encuentra en disolución, en suspensión o liofilizado. En otra realización particular, el extracto se encuentra en forma sólida, como polvo o como pasta.
- En otro aspecto, la invención se dirige a una composición cosmética que comprende el extracto previamente descrito.
- 20 Las composiciones cosméticas según la invención incluyen cualquier composición líquida o cualquier composición que comprenda el extracto de la invención y que esté en la forma de gel, crema, pomada o bálsamo para su administración por vía tópica.
- Dicha composición cosmética puede ser aplicada a diversas partes superficiales del cuerpo humano o animal tal como la piel, sistema piloso y capilar, uñas, labios o mucosas del cuerpo humano o animal.
- 25 En una realización particular, la composición cosmética también puede incorporar moléculas activas de naturaleza lipófila e hidrófila tienen propiedades como agente cosmético o de higiene personal. Entre las moléculas activas que pueden incorporarse pueden citarse agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antitranspirantes, agentes contra la caspa, despigmentantes, agentes antiséborreicos, tintes, lociones bronceadoras, absorbentes de luz UV, enzimas, entre otros.
- 30 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el extracto descrito anteriormente.
- Las composiciones farmacéuticas según la invención, incluyen cualquier composición líquida o cualquier composición en la forma de gel, pomada, crema o bálsamo para su administración por vía tópica.
- 35 Debido a sus propiedades antibacterianas, el extracto de la invención es adecuado para la preparación de una composición antibacteriana. En un aspecto, la invención se refiere al uso del extracto descrito previamente para la preparación de una composición antibacteriana. En una realización particular, la composición antibacteriana es una composición antibacteriana contra bacterias Gram-positivo.
- En otro aspecto la invención se refiere a una composición nutricional que comprende el extracto anteriormente descrito. Dicha composición nutricional puede ser un alimento, un suplemento dietético o un suplemento nutricional.
- 40 Las composiciones nutricionales pueden incluir leche, yogures, zumos de fruta y de vegetales, postres, productos infantiles o productos deshidratados. La adición del extracto a la composición nutricional se realiza mediante mezcla y homogenización según el procedimiento técnico para elaborar cada producto.
- Debido a sus propiedades antioxidantes el extracto de la invención es adecuado para la preparación de un conservante alimentario. En un aspecto, la invención se refiere al uso del extracto descrito previamente para la preparación de un conservante alimentario. Dicho conservante alimentario puede ser un aditivo alimentario o formar parte de un envase o envoltorio biodegradable. Los conservantes alimentarios según la invención incluyen cualquier composición líquida o cualquier composición que comprenda el extracto de la invención y que esté en la forma de sólido, gel o disolución para su adición al alimento o a su envase.
- 45 En otro aspecto, la invención se dirige a un envase o envoltorio biodegradable que comprende el extracto de la invención.
- 50 En otro aspecto, la invención se dirige a un conservante alimentario que comprende el extracto de la invención.

A continuación, y a modo ilustrativo se recogen ejemplos de la invención sin que estos supongan una limitación de la misma.

Métodos empleados

Preparación y conservación de las muestras

- 5 Todas las muestras de bagazo utilizadas son de la variedad Albariño, y pertenecen a los residuos de vinificación en blanco de bodegas de la Denominación de Origen Rías Baixas.

Para calcular la humedad contenida en las muestras de bagazo se secaron en una estufa 3 g de bagazo a 105 °C. Se pesaron las muestras antes y después de la etapa de secado. Esta operación se llevó a cabo por triplicado.

- 10 Todas las muestras de bagazo utilizadas fueron congeladas a una temperatura de -20 °C para su almacenaje, inmediatamente después de su recogida en bodega, donde se introdujo el bagazo en bolsas de plástico (20 x 20 cm) con cierre de zip.

Para la homogeneización de las muestras conteniendo hollejos, restos de pulpa y semillas, se trituraron con un molinillo para café antes de proceder a su extracción mediante el método propuesto.

Índice de Polifenoles Totales (IPT)

- 15 En los siguientes ejemplos se mide el IPT o índice de polifenoles totales, que se expresa en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de bagazo seco. Se trata de un índice espectrofotométrico clásico y robusto para lo que se empleó el método descrito por Singleton et al. (**Singleton, V. L.**; Rossi, J. A., Jr., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, 16, (3), 144-58). En un tubo de ensayo se introdujeron 5 mL de la muestra diluida en agua milli-Q, 100 µL del reactivo Folin & Ciocalteu y 1 mL de una disolución de carbonato sódico (20 % Na₂CO₃ en H₂O Milli-Q) previamente preparada. Se agitó en vórtex y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente y oscuridad, tiempo suficiente para que el reactivo Folin & Ciocalteu sea reducido por los compuestos fenólicos en condiciones alcalinas, desarrollando color azul. La medida espectrofotométrica se realizó a 760 nm. Se utilizó agua milli-Q como blanco de la medida. La concentración de los polifenoles totales se calculó mediante una curva de calibrado de ácido gálico ($y = 0,0735x - 0,0044$; $R^2 = 0,9985$), cuyo rango de concentraciones fue (3-20 mg.L⁻¹). Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (mg.L⁻¹ GAE). Las concentraciones de los extractos finales se expresaron como mg de ácido gálico por gramo de bagazo seco (mg gálico/g peso seco).
- 20
- 25

Análisis de Polifenoles por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

- 30 El extracto concentrado obtenido como se describe en el ejemplo 1 se filtró mediante un filtro de 0.22 µm PVDF y se analizó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con un detector de red de diodos (HPLC-DAD); la columna cromatográfica utilizada fue una Waters Nova-Pak C18 (3.9 mm x 150 mm, 4 µm, 60 Å). El volumen de inyección fue de 20µL.

- 35 La fase móvil está constituida por los disolventes (A) 1% ácido fórmico/agua y (B) 1% ácido fórmico/metanol. El gradiente de fase móvil comienza con un 5 % B, cambia al 20% B a los 20 min, y cambia al 100 % B a los 25 min. La duración total del análisis cromatográfico es de 25 min con un flujo de 1.0 mL/min y una temperatura de la columna de 50 °C. Los polifenoles mayoritarios del extracto se detectaron a 280 nm y se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y de sus espectros, con los correspondientes a los patrones puros analizados en las mismas condiciones experimentales.

Actividad Antioxidante (AA)

- 40 La actividad antioxidante de los extractos se determinó con 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH) frente a Trolox®, mediante el método de Brand-Williams modificado (W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *LWT - Food Sci. Technol.* 28 (1995) 25). Se preparó una disolución de DPPH 0.1 mM en 100% metanol. En un tubo de centrifuga, se pipetea 0,1 mL del extracto de bagazo y se le añaden 3,9 mL de la disolución metanólica de DPPH. La mezcla se agita vigorosamente y se deja reposar en oscuridad durante 30 minutos. La disminución de la absorbancia de la disolución resultante se monitoriza a 515 nm a los 30 min. La actividad antirradicálica (AA) se determina mediante la siguiente ecuación ($y = 0,5223x + 0,0276$; $R^2 = 0,999$) obtenida por regresión lineal después de representar la A₅₁₅ de disoluciones conocidas de Trolox frente a la concentración (0,1-1 mM). La AA de los extractos se expresa en mM Trolox/g de bagazo (peso seco). La disolución stock radicálica se prepara fresca diariamente.
- 45

- 50 **Ejemplo 1. Proceso general para la obtención de extractos antioxidantes y antibacterianos a partir de residuos de uva blanca.**

La extracción de los residuos de uva blanca de la variedad Albariño se lleva a cabo en una columna con una frita en su parte inferior y otra en su parte superior. La relación dispersante: muestra es 2:1 y se tritura en un mortero. La

mezcla se vierte en la columna y se compacta ligeramente para un mayor contacto con el eluyente. A continuación se hace pasar el disolvente de elución, procurando una elución constante, y se recoge el eluato.

5 Una muestra de 20 g mezclada con 40 g de arena y triturada, se introduce en la columna de vidrio, estrecha y alargada (1,5 cm de diámetro x 45 cm de largo) y se compacta ligeramente. El volumen de disolvente de elución, EtOH:H₂O (50:50), es de 50 mL. En esta realización particular, el extracto se concentró a vacío 8 veces. El rendimiento es del 6,9 % y el extracto final tiene un contenido de polifenoles totales del 29 %. Los datos obtenidos para esta realización particular se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Datos característicos del extracto obtenido en el ejemplo 1.

Índice de Polifenoles Totales	18,31 mg GAE/g bagazo seco
Gálico	103 ppm (0,074 mg/g)
Catequina	1692 ppm (1,21 mg/g)
Epicatequina	920 ppm (0,66 mg/g)
pH	5,90

10 **Ejemplo 1.1.** Estudio de disolvente

Se llevó a cabo la extracción según se describe en el ejemplo 1 empleando disolventes diferentes: metanol acuoso, etanol acuoso y aguardiente blanca; y se compararon los resultados obtenidos sobre la base del índice de polifenoles totales, expresado en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de bagazo seco.

No hay diferencias significativas ($P_{95} = 0,82$) ente los datos obtenidos con los diferentes disolventes (Tabla 2).

15 **Tabla 2:** Datos de IPT obtenidos según el tipo de disolvente empleado.

Disolvente	IPT (mg gálico/g bagazo seco)
MeOH : H ₂ O (80:20)	16,08
EtOH : H ₂ O (80:20)	16,20
EtOH : H ₂ O (50:50)	18,31
Aguardiente	22,75

Ejemplo 1.2. Estudio de dispersante en combinación con disolvente

Se llevó a cabo la obtención de extractos a partir de bagazo de uva blanca de la variedad Albariño, según se describe en el ejemplo 1 empleando como dispersante arena de diferentes orígenes.

20 No hay diferencias significativas ($P_{95} = 0,076$) entre los datos obtenidos con arena comercial y arena natural (Tabla 3.); ni en ninguna de las combinaciones con los isolvntes ($P_{95} = 0,15$) (Tabla 3).

Tabla 3: Datos de IPT obtenidos según el origen de la arena y el tipo de disolvente empleado.

Arena/Disolvente	IPT (mg gálico/g bagazo seco)			
	Media	Desviación estándar	Límite inferior	Límite superior
Natural/EtOH	16,27	0,48	15,47	17,08
Natural/MeOH	16,84	0,59	15,85	17,82

Comercial/EtOH	16,09	0,21	15,77	16,44
Comercial/MeOH	15,33	0,47	15,01	15,64

Tampoco se observan diferencias significativas ($P_{95} = 0,48$) según el tamaño de grano después de tamizar la arena natural por tamices de diferente luz de malla (250-320 μm) (Tabla 4).

Tabla 4: Datos de IPT obtenidos según el tamaño de grano de la arena natural.

IPT (mg gálico/g bagazo seco)				
Tamaño de arena	Media	Desviación estándar	Límite inferior	Límite superior
< 320 μm	16,27	1,43	14,98	18,2
320-250 μm	16,07	0,34	15,68	16,43
< 250 μm	17,06	1,17	15,93	18,2

5

Ejemplo 1.3. Estudio de la maceración

Se llevó a cabo la extracción según se describe en el ejemplo 1. Se estudia la maceración poniendo en contacto el disolvente con la mezcla durante tres horas para ser recogido finalmente por gravedad o empleando una bomba, que acelera el proceso de recogida del eluato. La bomba utilizada tiene un caudal máximo de 7 L/min.

10 Después de analizar el efecto de macerar o no macerar la mezcla bagazo:dispersante con el disolvente; y la utilización o no de una bomba, se concluye que es mejor macerar y bombear (Tabla 5).

Tabla 5: Datos de IPT obtenidos en el estudio de la combinación de dos factores: bomba y maceración.

IPT (mg gálico/g bagazo seco)				
Maceración/Bomba	Media	Desviación estándar	Límite inferior	Límite superior
Con/con	26,02	0,33	25,76	26,30
Con/sin	27,03	0,19	26,76	27,30
Sin/con	24,03	0,22	23,77	24,30
Sin/sin	17,66	0,21	17,40	17,93

Ejemplo 1.4. Escalado

Se llevó a cabo la extracción según se describe en el ejemplo 1, pero empleando diferentes cantidades del bagazo inicial: 1 g, 10 g y 20 g. Los resultados demuestran que a medida que aumenta la masa de bagazo, manteniendo constante la relación muestra:dispersante, la extracción de polifenoles aumenta proporcionalmente (Figura 2, Tabla 6).

5

Tabla 6: Datos de IPT obtenidos con diferente masa de muestra de partida.

Peso de residuo de uva blanca inicial (g)	IPT (mg gálico/g bagazo seco)			
	Media	Desviación estándar	Límite inferior	Límite superior
1	15,33	0,47	14,79	15,72
10	21,61	0,68	20,78	22,20
20	24,03	0,19	23,84	24,26

Ejemplo 1.5. Recirculación

Se llevó a cabo la extracción según el ejemplo 1, pero en este caso la cantidad de muestra inicial es de 100 g mezclados con 200 g del dispersante. Para estos experimentos se empleó una columna de 5 cm de diámetro x 37 cm de largo. Se emplearon 500 mL de una mezcla EtOH: H₂O 50:50, que se recirculó tres veces. Los datos se muestran en la siguiente tabla (Tabla 7).

10

Tabla 7: Datos de IPT obtenidos en el escalado x100 con recirculación.

MSPDx100 recirculación	IPT (mg gálico/g bagazo seco)
1ª fracción (500 ml)	16,17
2ª fracción (490 ml)	17,06
3ª fracción (480 ml)	21,82

15 Ejemplo 2. Evaluación de las actividades de los extractos obtenidos

Ejemplo 2.1. Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante (AA) de los extractos obtenidos en diferentes escalas y empleando diferentes combinaciones de disolventes según se indica en la tabla 8 (y en la figura 3). En los casos en los que se modifica el pH del disolvente de elución, este se ajusta con HCl concentrado monitorizándolo en un pHmetro. Los mejores resultados se obtuvieron cuando a una escala de 20 g se emplearon como disolventes EtOH:H₂O (50:50) o aguardiente blanca, y además las diferencias observadas entre ambos resultados no son significativas desde el punto de vista estadístico.

20

Tabla 8: Datos obtenidos de AA de las extracciones más representativas

Peso de bagazo inicial	Disolvente	AA (mM Trolox)	
		Media	Desviación estándar
1g	Etanol:H ₂ O (80:20) a pH=1	2,52	0,04
10 g	Etanol:H ₂ O (80:20) a pH=1	2,20	0,05
20 g (macerando)	Etanol:H ₂ O (80:20) a pH=1	4,15	0,03
20 g	Etanol:H ₂ O (80:20)	5,24	0,04
20 g	Etanol:H₂O (50:50)	10,17	0,25
20 g	Augardente	9,38	0,12

Ejemplo 2.2. Actividad antibacteriana

5 Se ha estudiado la actividad antimicrobiana del extracto obtenido frente a bacterias Gram +. Para testar la capacidad antimicrobiana de los extractos polifenólicos de bagazo se empleó una variación de la técnica de difusión estándar descrita por Fattouch et al. [Fattouch, S.; Caboni, P.; Coroneo, V.; Tuberoso, C. I. G.; Angioni, A.; Dessi, S.; Marzouki, N.; Cabras, P. Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 963-969.]. Las pruebas de difusión en disco/pocillo se basan en la capacidad de muchos agentes antimicrobianos de difundir en el agar creando un gradiente continuo de concentración. Si el disco que contiene el antibiótico se deposita sobre una placa recién inoculada, se producirá la inhibición del crecimiento del microorganismo analizado, en un punto del gradiente y dará como resultado un área concéntrica al disco/pocillo de inhibición del crecimiento. Esta área, al ser proporcional a la concentración mínima inhibitoria (CMI) permitirá la distinción de cepas sensibles, resistentes o intermedias.

15 Se partió de una suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* crecida en un caldo de cultivo de soja y triptona (TSB), ajustada a una turbidez correspondiente a 0,5 en la escala de McFarland (108 UFC/ml). Se inoculó, superficialmente y con la ayuda de un asa de Digalsky, una placa agar de medio mínimo M9, con 100 µL de la suspensión bacteriana anterior, con el fin de obtener un césped microbiano. A continuación se hicieron agujeros equidistantes en el agar en los que se pipetearon volúmenes de 100 µL del extracto obtenido como se describe en el ejemplo 1. Se utilizó cloranfenicol (1000 µg/mL) como control positivo y el mismo disolvente del extracto como control negativo. Después de 24h de incubación se midió el tamaño del halo de inhibición usando una regla con una precisión de 0,5 mm.

25 En la Figura 4 se muestra la foto del antibiograma, donde puede observarse como en una placa totalmente cubierta por *S. aureus*, aparece el "halo de inhibición del crecimiento" generado por el extracto concentrado obtenido como se describe en el ejemplo 1. En el centro de la placa, puede verse un control llevado a cabo con etanol acuoso 50/50 (disolvente de elución de los extractos) y en donde no aparece el halo inhibitorio.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener un extracto a partir de residuo de uva blanca que comprende:
 - a) preparar una mezcla que comprende residuo de uva blanca y un dispersante,
 - b) añadir un disolvente,
 - 5 c) eluir, y
 - d) recoger los eluatos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el residuo de uva blanca es bagazo
3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el dispersante se selecciona de entre el grupo constituido por arena, florisil, C18, alúmina y sílica gel.
- 10 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 3, donde el dispersante es arena.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el disolvente de la etapa b) se selecciona de forma independiente de entre el grupo constituido por agua, alcohol alquílico, glicoles, o sus mezclas.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el disolvente de la etapa b) está en una proporción de entre 1 y 10 volúmenes de disolvente respecto al peso de la mezcla de residuo de uva blanca y dispersante.
- 15 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la suspensión de la etapa b) se mantiene entre 1 y 5 horas a una temperatura de entre 10 °C y 40 °C.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde comprende además la elución de la mezcla de la etapa a) con los eluatos recogidos en la etapa d).
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde comprende además la evaporación del disolvente.
- 20 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde comprende además una etapa de liofilización.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el residuo de uva blanca es bagazo de la variedad Albariño.
- 25 12. Extracto polifenólico de uva blanca obtenible mediante el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por la ausencia de antocianos y un pH de entre 4 y 8 medido en disolución acuosa.
13. Extracto polifenólico de uva blanca, según la reivindicación 12, caracterizado por a) un índice de polifenoles totales de entre 8 y 50 mg de ácido gálico/g de bagazo seco; b) una concentración de ácido gálico de entre 0,035 y 0,125 mg/ g de bagazo seco; c) una concentración de catequina de entre 1,14 y 1,28 mg/ g de bagazo seco; d) una concentración de epicatequina de entre 0,57 y 0,72 mg/ g de bagazo seco; e) un pH de entre 4 y 8; y f) ausencia de antocianos.
- 30 14. Extracto polifenólico de uva blanca obtenible mediante el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 35 15. Extracto polifenólico según las reivindicaciones 12 a 14 que se encuentra en disolución, en suspensión o liofilizado.
16. Extracto polifenólico según las reivindicaciones 12 a 14 que se encuentra en forma sólida, como polvo o como pasta.
17. Composición cosmética que comprende el extracto descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16.
- 40 18. Composición farmacéutica que comprende el extracto descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16.
19. Composición nutricional que comprende el extracto descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16.
20. Uso del extracto descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16, para la preparación de un conservante alimentario.

21. Uso del extracto descrito en cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16, para la preparación de composición antibacteriana.
22. Envase o envoltorio biodegradable que comprende el extracto según cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16.
- 5 23. Conservante alimentario que comprende el extracto según cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16.



FIGURA 1

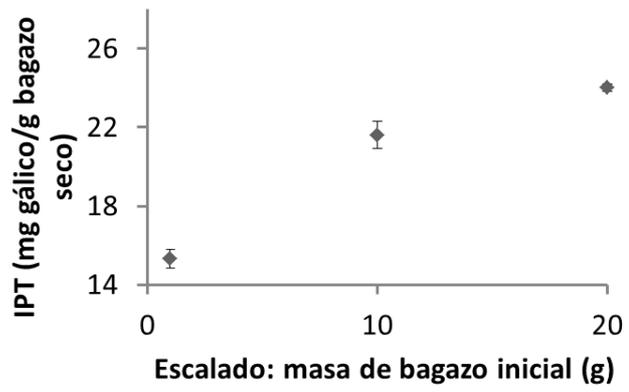


FIGURA 2

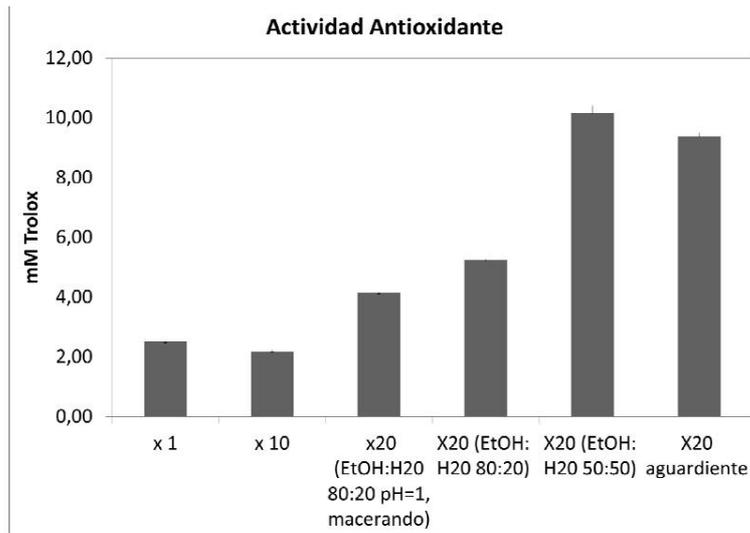


FIGURA 3

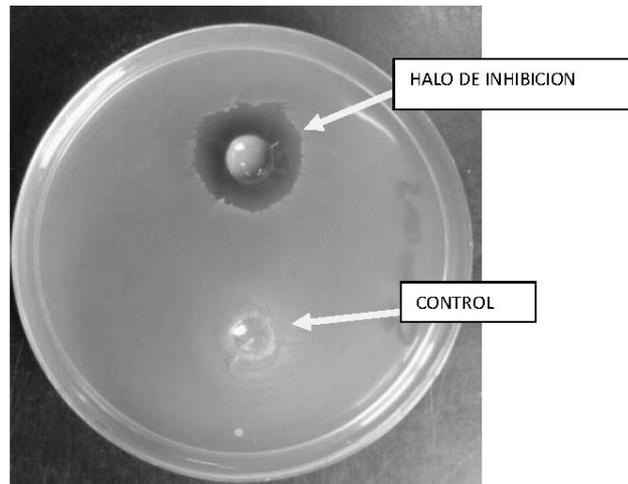


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201231152

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.07.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K36/87** (2006.01)
A23L1/30 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6238673 B1 (HOWARD ALAN NORMAN) 29.05.2001, reivindicaciones.	1-23
A	JONGBERG S. et al. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. FOOD CHEMISTRY 128 (2011) 276-283. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.015. Todo el artículo.	1-23
A	ES 2217966 A1 (JORDA QUILES LEONARDO et al.) 01.11.2004, reivindicaciones.	1-23

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
24.04.2013

Examinador
I. Abad Gurumeta

Página
1/4

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

A61K, A23L

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, NPL, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 6238673 B1 (HOWARD ALAN NORMAN)	29.05.2001
D02	JONGBERG S. et al. Effect of white grape extract and modified atmosphere packaging on lipid and protein oxidation in chill stored beef patties. FOOD CHEMISTRY 128 (2011) 276-283. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.015. Todo el artículo.	
D03	ES 2217966 A1 (JORDA QUILES LEONARDO et al.)	01.11.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un procedimiento para obtener un extracto a partir de residuo de uva blanca (reivindicaciones 1-11), el extracto obtenido (reivindicaciones 12-16) y su uso en composiciones cosméticas, farmacéuticas, nutricionales (reivindicaciones 17-19) y su uso para la preparación de conservantes alimentarios, composición antibacteriana, fabricación o envoltorio biodegradable o conservante alimentario (reivindicaciones 20-23).

El procedimiento comprende la preparación de la mezcla de residuo de uva blanca, bagazo de Albariño, y dispersante, arena, a la que se añade el disolvente, se eluye y se recogen los eluatos pudiendo incluir las etapas de evaporación del disolvente y liofilización (reivindicaciones 1-11).

El D01 se refiere a un extracto de uva y su método de extracción para obtener el extracto fenólico a partir de bagazo mediante una separación en columna cromatográfica polimérica (ver reivindicaciones).

El D02 publica el estudio realizado del efecto del extracto de uva blanca y el envasado en atmósfera modificada en la conservación de los alimentos (ver resumen, introducción y conclusiones).

El D03 se refiere al extracto de uva para la elaboración de productos alimenticios, composiciones dietéticas, farmacéuticas o cosméticas que contienen dicho extracto y de aplicación en la industria alimentaria, cosmética, dietética y farmacéutica (ver todo el documento).

1. NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986)

Los documentos del estado de la técnica D01-D03 reflejan el estado de la técnica más cercano. Todos estos documentos, aunque muestran diversos procedimientos, extractos y usos similares al descrito en la invención, ningún extracto indicado está obtenido por el procedimiento descrito en la presente solicitud.

Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-23 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986.