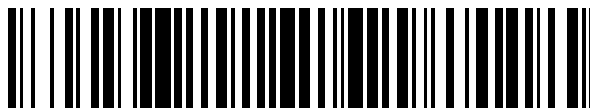


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 296**

21 Número de solicitud: 201300226

51 Int. Cl.:

**A23L 1/025** (2006.01)

**A61K 36/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**22.02.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.09.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)  
OTRI - Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias  
s/n  
41012 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**PARRADO RUBIO, Juan y  
HERRERA GONZALEZ, María Dolores**

54 Título: **Procedimiento de obtención de extractos enzimáticos con actividad farmacológica a partir de orujo de uva**

57 Resumen:

El objeto de la invención es el desarrollo de un nuevo proceso biológico de extracción que conduzca a la obtención de un extracto con actividad farmacológica a partir de orujo de uva.

El proceso conduce a la obtención de un nuevo producto de origen natural totalmente soluble y con capacidad vasodilatadora, el cual tiene características como alimento funcional o nutracéutico para la prevención y/o tratamiento de ciertas patologías cardiovasculares.

ES 2 489 296 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de extractos enzimáticos con actividad farmacológica a partir de orujo de uva

### 5 **Objeto de la invención**

La presente invención tiene por objeto el desarrollo de un nuevo sistema de extracción de los compuestos funcionales contenidos en el orujo de uva, la obtención de un extracto enzimático de orujo de uva (EE-OU) y su aplicación farmacológica en la terapéutica como agente vasodilatador, así como la dilucidación del mecanismo de acción de dicho efecto, centrando nuestra atención en los factores derivados del endotelio que participan en el posible efecto vasodilatador.

La actividad farmacológica del extracto en el sistema vascular podría ser la base para proponer su uso como alimento funcional o nutracéutico para la prevención y/o tratamiento de ciertas patologías cardiovasculares.

15

### **Estado de la técnica**

El orujo de uva es un residuo industrial del proceso de vinificación y que se compone básicamente de las semillas, piel y tallos de la uva. Este subproducto contiene una cantidad considerable de polifenoles bioactivos. Esta composición proporciona al orujo de uva de un prometedor potencial como alimento funcional o nutracéutico.

La evaluación cualitativa del total de compuestos fenólicos como equivalentes de ácido gálico (GAE), muestra la piel de la uva como la principal fuente de estos compuestos, seguido de la semilla y la hoja (Xia et al., 2010). Las antocianinas, catequinas, flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes y estilbenos, así como el resveratrol, son algunos de los polifenoles presentes en el orujo de uva. Por lo tanto, este residuo de uva se convierte en una fuente de gran potencial de productos biológicos.

Numerosos estudios epidemiológicos apoyan las propiedades beneficiosas de los compuestos fenólicos de la uva y del vino tinto, especialmente en las enfermedades cardiovasculares a través de sus acciones antioxidante, vasodilatadora y antiagregante plaquetaria (Stoclet et al., 2004). En los últimos años, se ha centrado la atención en los efectos positivos de los extractos de semilla de uva (Edirisinghe et al, 2008) y de la piel (Madeira et al, 2009) en la función vascular de arterias aisladas. Los extractos de semilla también han demostrado propiedades antiangiogénicas en las células endoteliales (Agarwal et al, 2004; Lu et al, 2009), así como protección contra la formación de aterosclerosis (Vinson et al, 2002). Además, se ha comprobado que la ingesta de un extracto de semilla de uva mejora la función vascular en seres humanos

con un riesgo cardiovascular superior a la media (Clifton et al, 2004) y en sujetos de alto riesgo cardiovascular con diabetes mellitus tipo 2 (Kar et al, 2009).

Se han patentado diversos procedimientos conducentes a la extracción de dichos compuestos relacionados con la invención propuesta, que a su vez son muy afines entre ellos.

Grape extract, dietary supplement thereof, and processes therefor: US 2007/0071871A1 (Shrikhande A.J. et al., 2007) y US 20100297741A1 (Shrikhande A.J. et al., 2010), en los cuales se describe el proceso de elaboración y caracterización de un extracto acuoso de semilla de uva, así como su efecto sobre la presión arterial y niveles de LDL oxidada en individuos (hombres y mujeres) con pre-hipertensión o síndrome metabólico. El extracto es preparado según un proceso de extracción donde primero es procesado con agua caliente (según la patente US 6544581 y ligeramente modificado), para posteriormente sufrir un tratamiento enzimático con una enzima pectolítica (Pectinex®Ultra SP-L). El extracto es administrado a los pacientes como suplemento dietético a dosis de 150 y 300 mg/día, que se encuentra manufacturado como Mega Natural®-BP.

Los otros dos documentos describen prácticamente lo mismo, pero sin describir el proceso de extracción y caracterización:

Method for lowering blood pressure in pre-hypertensive individuals and/or individuals with metabolic syndrome: US 2007/0071841A1 (Kappagoda Ch.T., 2007) y US 7651707B2 (Kappagoda Ch.T., 2010).

En la presente invención se ha innovado y se ha desarrollado un nuevo proceso de invención mediante un método de extracción enzimática el cual da lugar a un nuevo extracto del orujo de uva soluble en agua (EE-OU), que proporciona una gran cantidad de compuestos fenólicos, entre otros componentes. El proceso de extracción biológica realizado por las enzimas hidrolíticas tiene ciertas ventajas, ya que al utilizarse bajas temperaturas y presiones se ve favorecida la estabilidad de los ingredientes activos. También hay que tener en cuenta, que protege el medioambiente, ya que el método de extracción enzimática excluye el uso de xenobióticos o tóxicos reactivos.

Uno de los mecanismos más importantes por los cuales los productos derivados de uva provocan las acciones descritas a nivel vascular, es mediante el aumento de la producción por las células endoteliales del factor vasodilatador y antiagregante plaquetario, el óxido nítrico (NO). Por lo tanto, el NO está implicado en los efectos vasodilatadores in vitro de los compuestos polifenólicos del vino tinto (Fitzpatrick et al, 1993; Andriambeloston et al, 1997; Andriambeloston et la de 1999; Duarte et al, 2004),

de los extractos de semilla de uva (Fitzpatrick et al, 2000;. Fitzpatrick et al, 2002; Edirisinghe et al, 2008) así como de la piel (Madeira et al, 2009)..

En cuanto a los extractos de orujo de uva en su totalidad, no existen estudios sobre sus efectos vasculares hasta ahora. Las investigaciones existentes se limitan a las propiedades antioxidantes (Chidambara et al, 2002) y antiinflamatorias asociadas al estado inflamatorio presente en la obesidad y resistencia a la insulina (Yunoki et al, 2008; Hogan et al, 2010)

Las invenciones antes citadas demuestran que el extracto administrado con Mega Natural®-BP diariamente durante 4 semanas a las dosis de 150 mg y 300 mg, es capaz de reducir tanto la presión arterial sistólica como diastólica en individuos con síndrome metabólico. Cuando los ensayos son realizados en individuos prehipertensos, es la dosis de 300mg de extracto, administrada durante 8 semanas la que provoca una reducción significativa de la presión sistólica y diastólica.

Pero en estas invenciones, en ningún momento relaciona este efecto con ninguna acción directa reconocida de carácter vasodilatador que es la presentada en nuestra invención. Es por lo que se propone en la invención propuesta, el estudio "in vitro" del extracto que presentamos y que nos permitirá también conocer el mecanismo de acción posible de dicho efecto.

El objetivo del presente estudio fue evaluar los posibles efectos vasculares en aorta y arterias mesentéricas aisladas de rata de un extracto de orujo de uva, obtenido a través de un proceso enzimático. Además, es también intención dilucidar los factores derivados del endotelio que participan en el posible efecto vasodilatador inducido por el extracto, centrando nuestra atención en la participación de NO y la capacidad antioxidante.

### Descripción de las figuras

Figura 1: Curvas concentración-respuesta de relajación inducidas por EE-OU en anillos de aorta aislada ratas Wistar precontractados con fenilefrina (0,3  $\mu$ M) con endotelio (E+) o sin endotelio funcional (E-), y en presencia del inhibidor de la NO-sintasa, L-NAME (300 $\mu$ M). \*\*\* P < 0.001 vs E(+) (2-way ANOVA)

Figura 2: Curvas concentración-respuesta de relajación inducidas por EE-OU en segmentos de arterias mesentéricas de menor calibre aislada de ratas Wistar precontractadas con fenilefrina (10  $\mu$ M) con endotelio (E+) o sin endotelio funcional (E-), y en presencia del inhibidor de la NO-sintasa, L-NAME (300 $\mu$ M). \*\*\* P < 0.001 vs E(+) (2-way ANOVA).

Figura 3: Trazado original del efecto relajante de dosis acumulativas de EE-OU (0,0001 a 0,3 g L<sup>-1</sup>) sobre anillos de aorta aislada de rata con endotelio funcional precontraídos con fenilefrina (0,3 μM).

Figura 4: Trazado original del efecto relajante de dosis acumulativas de EE-OU (0,0001 a 0,3 g L<sup>-1</sup>) sobre segmentos de arteris mesentéricas con endotelio funcional precontraídos con fenilefrina (10 μM).

### Descripción de la invención

#### 1. Proceso de obtención del extracto.

10 Proceso de hidrólisis enzimática.

Los extractos enzimáticos se obtienen mediante la ruptura de los enlaces peptídicos de unión de aminoácidos que forman las proteínas, produciendo péptidos y, eventualmente, aminoácidos mediante el uso de enzimas proteolíticas.

A continuación se describe el proceso de obtención:

15

1. El orujo de uva es homogenizado mediante un sistema de molienda, hasta obtener un producto en forma de polvo.

20

2. El orujo pulverizado es resuspendido en agua, la proporción peso/volumen será ente un 10 y un 20%, siendo el óptimo el 15%, una vez resuspendido será llevado a un pH, con un rango óptimo de la proteasa que llevará a cabo la hidrólisis enzimática, utilizando cualquier base concentrada.

25

3. Extracción enzimática. El producto del paso 2 es trasladado a un biorreactor con control de pH, temperatura y agitación. Las enzimas proteolíticas, preferentemente proteasas alcalinas serán las herramientas biológicas de extracción de las biomoléculas a una concentración entre 0.05-0.5% peso/volumen de reacción, a partir de una solución stock de proteasa 70.000 Unidades de actividad/Ensayo de azocaseína)). El desarrollo de la reacción enzimática se realiza un pH=8-11 y T<sup>a</sup>=40-70°C, lo que supone las condiciones óptimas de máxima actividad de las enzimas. El tiempo de operación estará comprendido entre 2 y 48 horas, siendo recomendable la franja de 6-24 horas.

30

En el proceso de hidrólisis se mantiene constante el pH mediante la adición de base para seguir manteniendo el pH óptimo de actuación de la enzima con una base, preferentemente amoniaco o potasa (KOH).

35

El resultado final de la hidrólisis enzimática es un producto denominado **EXTRACTO ENZIMÁTICO DE ORUJO DE UVA (EEOU)**. Para su consecución no se realiza ningún tipo de separación, solamente pasos para proceder a su estabilización como:

- 5 4. **Concentración:** Para aumentar la estabilidad del EEOU, facilitar almacenamiento y transporte, se procede a una etapa opcional de concentración, a fin de conseguir un producto final con un contenido en materia seca no inferior al 40%, siendo recomendable no inferior al 50% (p/p).

10 **2 Caracterización farmacológica**

El efecto vasodilatador del extracto enzimático del orujo de uva ensayado fue analizado mediante la adición de dosis acumulativas del extracto (0,0001-0,3 g L<sup>-1</sup>) sobre anillos de aorta y arteria mesentérica aisladas de rata precontraídos con fenilefrina, tanto en presencia como en ausencia de endotelio funcional. La adición de estas dosis acumulativas fue capaz de relajar los anillos aórticos y de arterias mesentéricas cuando el endotelio se encontraba presente, hasta un 75% y un 90% respectivamente. Esta relajación arterial observada, fue significativamente atenuada en aquellos anillos desprovistos de endotelio, al igual que en presencia de un inhibidor de la oxido nítrico sintasa. Estos resultados sugieren la implicación principal del óxido nítrico endotelial en la respuesta vasodilatadora inducida por el extracto.

**Modo de realización de la invención**

Ejemplo 1.

25 **a. Producción de *EXTRACTO ENZIMÁTICO DE ORUJO DE UVA (EEOU)***

Se trataron 1000g de orujo de uva, procedente de la extracción del mosto de uvas variedad verdejo, el procedimiento es independiente de la variedad de uva utilizada para obtener el orujo.

La composición química del orujo se muestra en la tabla 1.

30 El orujo se introduce en un reactor de cristal, y se le adiciona agua hasta obtener una suspensión del 15% peso volumen de orujo.

Posteriormente se procede a subir el pH hasta un valor de 8,5 con NH<sub>3</sub> al 28% y en agitación (60-80 rpm).

35 Tras el tratamiento alcalino se procedió a un proceso físico de autoclavado durante 20 minutos a 120°C. La solución autoclavada así obtenida se ajustó a un pH de 8,5 con potasa 10M.

Esta solución a pH 8,5 se mantuvo a 55°C en un baño termostatzado con agitación (60-80 rpm) y se le añadió un 0,3% v/v de Subtilisina (solución stock de proteasa 70.000 Unidades de actividad/Ensayo de azocaseína). El pH se mantuvo con amoniaco al 28%. Estas condiciones de hidrólisis se mantuvieron durante 24 horas. El rendimiento de solubilización del proceso es del 18%.

El extracto enzimáticos se recogió a las 24 horas y se concentró en un rotavapor con baño termostatzado a 70°C, obteniéndose un concentrado (sirope) estable con un 50-55% de materia seca, cuya composición química era la siguiente, ver tabla 1.

Finalmente, el extracto concentrado se liofiliza hasta obtener un fino polvo de color rojo muy higroscópico.

Tabla 1. Composición del Orujo de uva y del extracto enzimático de orujo de uva EEOU (% peso/peso)

COMPONENTE		Orujo	EEOU
Materia grasa		7	3
Proteínas		9	14
Oligosacáridos		14	47
Fibra	Pectinas	2,5	8
	Hemicelulosa	20	-
	Celulosa	22	-
	Lignina	55,5	-
	Total	54	8
Cenizas		8	7

El análisis de la composición química del EEOU (ver Tabla-1) muestra que el principal componente son los oligosacáridos y pectinas solubles.

El residuo no hidrolizado, está formado principalmente por celulosas y hemicelulosas.

El segundo componente está formado por nitrógeno en forma de proteínas, mostrando un enriquecimiento selectivo respecto a la materia prima de partida. (De un 3 a un 7%).

Respecto a la distribución molecular del tamaño de las proteínas, se observa que el EEOU está formados por péptidos y aminoácidos libres, fundamentalmente. Lo que representa una propiedad muy importante ya que a nivel funcional éste es el rango de tamaño óptimo para una mayor biodisponibilidad, ya que la absorción del nitrógeno proteico está condicionada por el tamaño molecular.

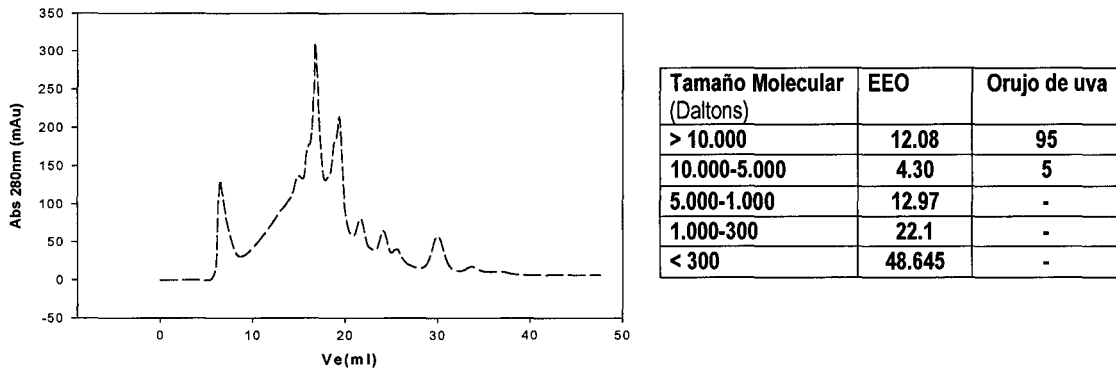


Figura 1. Perfil de pesos moleculares mediante cromatografía de filtración molecular

5 Compuestos Bioactivos.

Se han valorado la presencia y concentración de compuestos bioactivos que pueden intervenir en las actividades beneficiosas del EEOU entre ellos se encuentran: Catequina, epi-catequina, galocatequina, camferol, procianidina B1, procianidina B2, quercetina y resveratrol.

10 Los resultados combinados de espectrometría de masas y cromatografía líquida muestran que se han detectado las moléculas camferol, catequina, quercetina y procianidinas B1 y B2, niveles trazas de resveratrol y se descarta la presencia de galocatequina.

	mg/gramo GP
Catequina	54,06
Epi-catetina	44,96
Galo-Catequina	-
Quercetina	3,46
Camferol	6,39
Procianidina	0.134
Resveratrol	trazas

15

Tabla 2. Cuantificación de compuestos bioactivos en el extracto GP.

*b. Caracterización farmacológica cardiovascular*

Se ha procedido a valorar la actividad farmacológica del EEOU



### Animales de experimentación

Para la realización de las experiencias se han empleado ratas albinas de raza Wistar, machos de 10-12 semanas de edad.

5 Los animales se han mantenido en jaulas con lecho de viruta, alimentándolos con una dieta de piensos especial para animales de laboratorio (Panlab), con un consumo variable en función del peso y la edad del animal, agua ad libitum, temperatura constante de 20-24° C y humedad relativa de 60±20%, y expuestos a un ciclo de luz de 12h/día (8.00 a.m.-8.00 p.m.) (Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE).

### 10 Montaje de las preparaciones arteriales

Los animales se sacrifican por traumatismo retrocervical y se procede a su exanguinación total por arteriotomía carotídea. Las arterias se aislaron y se limpiaron cuidadosamente del exceso de grasa y tejido conectivo. Este proceso se realizó en frío y las arterias se mantuvieron sumergidas en todo momento en solución fisiológica  
15 Krebs-Henseleit (KHS) de composición: NaCl 118 mM, KCl 4.75 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 mM y glucosa 11 mM.

A continuación, se cortaron secciones transversalmente de diferente longitud según el tipo arterial: anillos de aorta de rata de 3-4mm de longitud, segmentos de las ramas II y III de la arterias mesentéricas de entre 1.6-2.0 mm (Mingorance et al., 2009).

20 Las arterias se dispusieron en baños de órganos que reproducían las condiciones fisiológicas a las que se encuentran las arterias en el organismo. Concretamente, los anillos de aorta de rata se dispusieron mediante un soporte constituido por dos alambres de alambre de tungsteno en copas de tejido de vidrio con 10mL de KHS. El montaje se conectó a unos sensores de fuerza isométricos modelo Pioden UF-1 (Lom  
25 Systems, Reino Unido).

Para el estudio de la funcionalidad de los vasos de resistencia (arteria mesentérica de rata), se utilizó un miógrafo isométrico modelo Multi Myograph System-610M (DMT A/S, Dinamarca), en los que los segmentos arteriales se sitúan entre dos alambres de tungsteno y sumergen en 8 mL de KHS.

30 Los baños recibieron una entrada constante de carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) y se mantuvieron a una temperatura constante de 37°C.

Un sistema de registro modelo Powerlab® acoplado al software informático Chart v5.0 se utilizó para la digitalización de los registros.

Finalmente, las arterias se sometieron a un periodo de acondicionamiento de 45  
35 minutos, sometidas a una tensión basal de 2g para la aorta de rata y 0.2g para la mesentérica de rata.

Transcurrido este tiempo, se comprobó la funcionalidad de los fragmentos arteriales, así como la presencia de endotelio en los mismos.

Las arterias con y sin endotelio funcional fueron precontraídas al 80% de su máxima contracción con fenilefrina 0,3  $\mu$ M y 10  $\mu$ M para la aorta y la arteria mesentérica, respectivamente. Cuando la contracción alcanzó la meseta, dosis acumulativas del extracto (0,0001 a 0,3 g L<sup>-1</sup>) fueron añadidas.

Para devolver el órgano a su estado basal y poder iniciar el procedimiento experimental, se le somete a lavados sucesivos con solución Krebs-Henseleit, cada 20 minutos durante una hora.

10

Estudio de la influencia de los factores liberados por el endotelio en el efecto de EE-OU.

Con la finalidad de estudiar la influencia del óxido nítrico (NO) en el efecto relajante del extracto, las preparaciones arteriales se incubaron durante 20 min con N $\omega$ -nitro-Larginina metil éster (L-NAME) (300 $\mu$ M). Este compuesto es un análogo de L-Arginina que bloquea la enzima NO-sintasa, quedando así inhibida la síntesis de NO.

Tras un período de incubación de 20 minutos con el inhibidor, el órgano se contrajo hasta un nivel submaximal por adición de fenilefrina sobre el que se estudió el efecto de la adición acumulativa del extracto (0,0001 a 0,3 g L<sup>-1</sup>).

20

*RESULTADOS*

El extracto fue capaz de inducir un efecto relajante en los dos tipos de arterias con endotelio funcional E(+) precontraídas con fenilefrina, consiguiendo un mayor % de relajación máxima en arterias mesentéricas. Los valores de concentración del extracto necesarios para producir un 50% de relajación de las arterias EC<sub>50</sub> (g/L) fueron:

EC<sub>50</sub>= 0,010  $\pm$  0,001 g/L (pD<sub>2</sub>=2,101  $\pm$  0,073) para aorta (Fig. 1) y EC<sub>50</sub>= 0,034  $\pm$  0,012 g/L (pD<sub>2</sub>=1,935  $\pm$  0,239) para arterias mesentéricas (Fig. 2).

En presencia de L-NAME, la respuesta relajante al extracto fue significativamente inhibida.

En la figura 3 se puede observar un trazado representativo real del efecto relajante tras la adición de dosis acumulativas del EE-OU (0,0001 a 0,3 g L<sup>-1</sup>) sobre anillos de aorta aislada de rata con endotelio funcional precontraídos con fenilefrina y en la figura 4, en arterias mesentéricas.

Los resultados obtenidos sugieren que la vasorelajación inducida por el extracto tanto en aorta (vaso de capacitancia) como arteria mesentérica (vaso de resistencia) de rata es dependiente de endotelio y que el óxido nítrico es partícipe en el mecanismo de la vasodilatación producida. Por lo tanto, este extracto podría tener un efecto

vasodilatador relacionado con el óxido nítrico endotelial que podría constituir la base para ser utilizado en la prevención y/o tratamiento de ciertas patologías cardiovasculares.

*Reactivos utilizados*

- 5 Los siguientes productos químicos empleados en las experiencias fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): fenilefrina hidrocloreto (Phe), acetilcolina cloruro (ACh), y N $\omega$ -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME). Tanto el extracto como los agentes químicos utilizados fueron disueltos en agua bidestilada, para preparar una solución stock de 10<sup>-2</sup> M. Todas las concentraciones
- 10 fueron expresadas como la concentración final de cada agente en el baño de órgano.

*Análisis estadístico*

- Los resultados han sido expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar. La
- 15 relajación a ACh y la contracción a fenilefrina se expresaron como porcentaje de la respuesta máxima. La valoración de significación de las diferencias se realizó utilizando un ANOVA de dos factores para comparar las curvas concentración-respuesta seguido del test de comparación de Bonferroni.
- La diferencia entre los valores obtenidos se consideró significativa a partir de  $P < 0.05$ .
- 20 El análisis estadístico se realizó utilizando los programas informáticos StatView (SAS Institute Inc., NY, EEUU) y GraphPad Prism versión 3.0 (San Diego, CA, EEUU).

## Reivindicaciones

1- Procedimiento de obtención de extractos enzimáticos con actividad farmacológica a partir de orujo de uva, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

5

a) Molienda y homogenización de los orujos de uva

b) Obtener mediante la adición de agua una suspensión entre 10-25% de materia seca y ajustar el pH al óptimo de la enzima proteolítica. Añadir una base concentrada para ajustar el pH de los mismos;

10

c) Someter la mezcla obtenida en (b) a una hidrólisis enzimática, mediante el uso de enzimas hidrolíticas para obtener un extracto enzimático orgánico. Las enzimas hidrolíticas a utilizar serán proteasas, específicamente endoproteasas, entre ellas se encuentran las proteasas alcalinas, y neutras producidas por Bacillus, las proteasas ácidas (pepsina, papaína) etc.

15

d) Un ejemplo de este proceso es la Hidrólisis enzimática utilizando proteasas alcalinas, caracterizado por concentraciones de enzima utilizadas entre el 0,1-0.5%, el rango de temperatura usado entre 40-70°C, rango de pH 8-10 y tiempo de operación entre 2 y 48 horas

20

2 - Procedimiento de obtención de extractos enzimáticos con actividad farmacológica a partir de orujo de uva, según reivindicación 1, caracterizado porque comprende una etapa posterior a la etapa (d) en la que el extracto enzimático orgánico obtenido se somete a concentración para obtener un extracto enzimático orgánico concentrado con al menos un 40% en peso de materia seca.

25

3- Procedimiento de obtención de extractos enzimáticos con actividad farmacológica a partir de orujo de uva, según reivindicación 1, que comprende una etapa posterior a la concentración (reivindicación 5) en la que el extracto enzimático orgánico obtenido se somete a liofilización para obtener un extracto enzimático orgánico en forma de polvo.

30

4- Procedimiento de obtención de extractos enzimáticos con actividad farmacológica a partir de orujo de uva, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por el uso del extracto debido al efecto vasodilatador para ser utilizado en la prevención y/o tratamiento de ciertas patologías cardiovasculares.

Figura 1

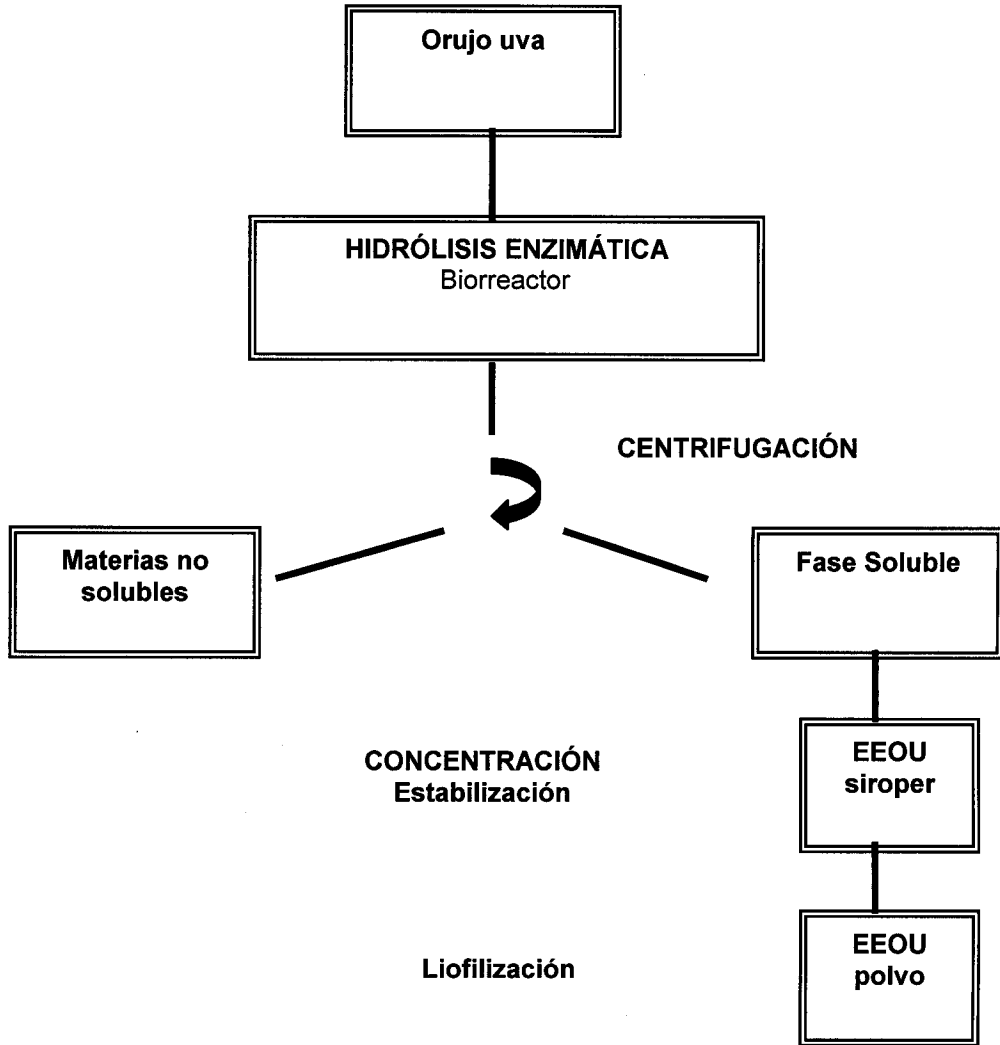


Figura 2

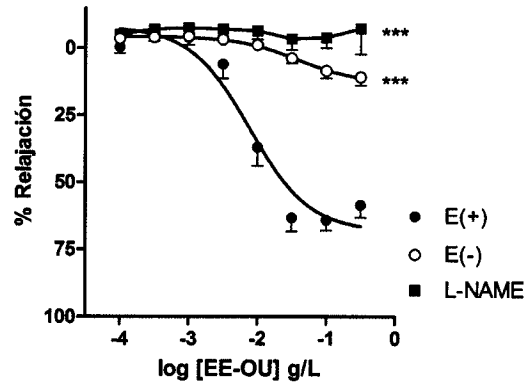


Figura 3

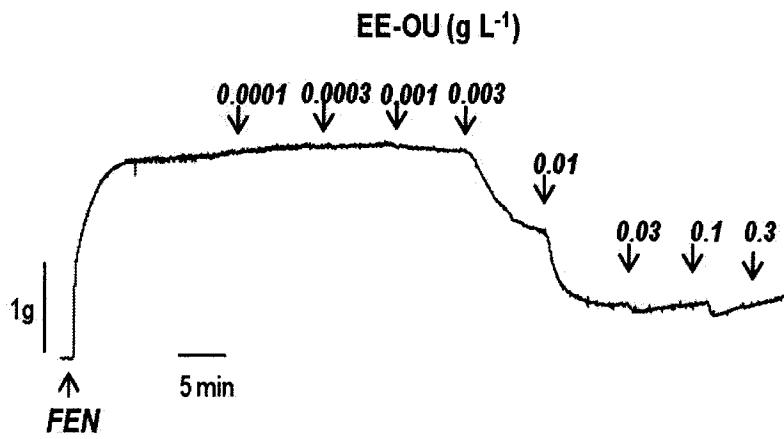
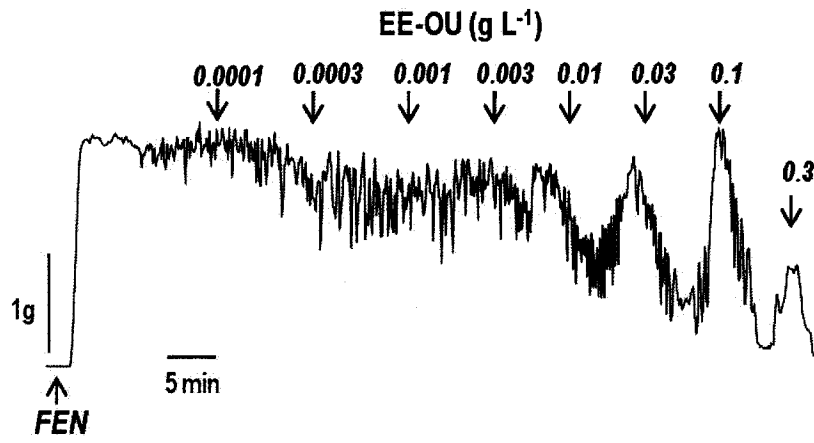


Figura 4





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201300226

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.02.2013

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A23L1/025** (2006.01)  
**A61K36/00** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RODRIGUEZ-RODRIGUEZ R et al. Endothelium-dependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. Food Chemistry. 01/12/2012. Vol. 135 No: 3 Pags: 1044 - 1051 ISSN 0308-8146 (print) ISSN 1873-7072 (electronic).	1-4
Y	US 6544581 B1 (SHRIKHANDE ANIL J ET AL.) 08/04/2003, todo el documento.	1-4
Y	PASSOS C P et al. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. FOOD CHEMISTRY. 01/07/2009. Vol. 115 No: 1. Pags: 48 - 53. ISSN 0308-8146.	1-4
A	TOBAR P et al. Winery solid residue revalorization into oil and antioxidant with nutraceutical properties by an enzyme assisted process. Water Science and Technology 2005. VOL: 51 No: 1 Pags: 47-52. ISSN 0273-1223	1-4
A	MUNOZ O et al. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. FOOD CHEMISTRY. 01/10/2004 VOL: 87 No: 4 Pags: 487 - 490. ISSN 0308-8146.	1-4
A	ES 8404413 A1 (UNITED VINTNERS INC) 16/07/1984, todo el documento.	1-4

#### 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  
30.05.2013

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4



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

A61K

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, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.05.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<b>NO</b>

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	RODRIGUEZ-RODRIGUEZ R et al. Endothelium-dependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. Food Chemistry. 01/12/2012. Vol. 135 No: 3 Pags: 1044 - 1051 ISSN 0308-8146 (print) ISSN 1873-7072 (electronic).	01.12.2012
D02	US 6544581 B1 (SHRIKHANDE ANIL J et al.)	08.04.2003
D03	PASSOS C P et al. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. FOOD CHEMISTRY. 01/07/2009. Vol. 115 No: 1. Pags: 48 - 53. ISSN 0308-8146.	01.07.2009
D04	TOBAR P et al. Winery solid residue revalorization into oil and antioxidant with nutraceutical properties by an enzyme assisted process. Water Science and Technology 2005. VOL: 51 No: 1 Pags: 47-52. ISSN 0273-1223	2005
D05	MUNOZ O et al. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from Chilean wine. FOOD CHEMISTRY. 01/10/2004 VOL: 87 No: 4 Pags: 487 - 490. ISSN 0308-8146.	01.10.2004
D06	ES 8404413 A1 (UNITED VINTNERS INC)	16.07.1984

**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 presente solicitud divulga un sistema de extracción de compuestos funcionales contenidos en el orujo de uva y su aplicación farmacológica en patologías cardiovasculares como agente vasodilatador.

El procedimiento de las reivindicaciones 1-3 comprende una extracción enzimática en condiciones de bajas temperaturas (40 - 70 °C). La reivindicación 4 reivindica el uso del extracto obtenida en la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

D01 divulga un procedimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos de uva, para evaluar sus efectos vasculares, que comprende la utilización de enzimas hidrolíticas en condiciones de baja temperatura (60°C) y presión. Por tanto, las reivindicaciones 1-4 carecen de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Las reivindicaciones 1-4 tampoco parecen cumplir el requisito de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la Ley 11/1986. Tomando en consideración D02 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención a la hora de valorar la actividad inventiva, la diferencia entre este documento y el objeto de las reivindicaciones 1-4 sería las condiciones de temperatura utilizadas. El efecto técnico producto de esta diferencia sería la mayor estabilidad de los principios activos extraídos. D03 divulga un método de extracción enzimática de aceites a partir de semillas de uvas donde se evalúan la influencia de distintas variables, entre ellas la temperatura, llegando a la conclusión de que la temperatura óptima de trabajo estaría entre los 30-40 °C (figura 3, página 52, apartado 3.4). Por tanto, para el experto en la materia sería obvia la combinación de lo divulgado en estos documentos para la elaboración del método reivindicado, teniendo muchas probabilidades de éxito en la obtención del efecto técnico.