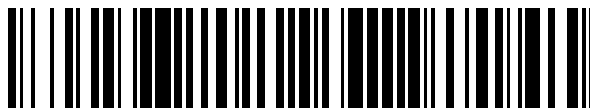


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 547**

21 Número de solicitud: 201331413

51 Int. Cl.:

A23L 3/349 (2006.01)

A61K 36/87 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.03.2015

71 Solicitantes:

BODEGA MATARROMERA, S.L. (100.0%)
Ctra. San Bernardo, s/n
47359 Valbuena de Duero (Valladolid) ES

72 Inventor/es:

MORO GONZÁLEZ, Luis Carlos;
GUADARRAMA RODRÍGUEZ, Alberto;
VILLANUEVA SÁNCHEZ, Sonia;
GARCÍA ÁLVAREZ, Ángela y
SANZ BUENHOMBRE, María Luisa

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

54 Título: **Extracto polifenólico sólido de uva o de un subproducto del proceso de vinificación, y su uso como agente antibacteriano y/o antifúngico**

57 Resumen:

Extracto polifenólico sólido de uva o de un subproducto del proceso de vinificación, y su uso como agente antibacteriano y/o antifúngico.

La invención se refiere a un extracto de uva que contiene compuestos polifenólicos naturales de la vid. También se refiere a la utilización de dicho extracto como agente antibacteriano y/o antifúngico empleándolo como ingrediente en el procesado de alimentos o para evitar infecciones cutáneas.

ES 2 532 547 A1

DESCRIPCIÓN

Extracto polifenólico sólido de uva o de un subproducto del proceso de vinificación, y su uso como agente antibacteriano y/o antifúngico.

5

Campo de la técnica

La presente invención se encuadra en el campo de la tecnología de los alimentos, así como en el sector farmacéutico. De manera particular, se refiere a un extracto de uva con poder
10 antibacteriano y/o antifúngico que puede utilizarse para preservar los alimentos o para evitar infecciones cutáneas.

Estado de la técnica

15 La creciente preocupación en relación con la calidad y seguridad de los alimentos está provocando una serie de cambios: en el sector industrial, tiende a desarrollarse y a adoptar nuevos procesos más seguros; en el ámbito científico, se están desarrollando nuevas técnicas de evaluación analítica más sensibles; y a nivel institucional, se está implementando una legislación más estricta en el cumplimiento de las demandas. Estos
20 cambios van encaminados a ofrecer al consumidor productos frescos y saludables en los que se preserven sus propiedades originales.

Pero la vía de acceso al organismo para los microorganismos potencialmente patógenos, no sólo es la digestiva. Muchos microorganismos se encuentran en la superficie de la piel
25 humana y de los animales, y pueden provocar una infección cutánea en circunstancias concretas; por lo que resulta de interés la búsqueda de productos que sean eficaces contra dichos microorganismos, ya sea para incorporarlos a distintos alimentos y así asegurar su inocuidad y prolongar su vida útil, como para incorporarlos a productos que se apliquen por vía tópica.

30

La tendencia reciente es el uso de productos naturales para controlar esos microorganismos, lo cual requiere la exploración de fuentes alternativas de principios activos naturales seguros, eficaces y aceptables. Las plantas o sus extractos estandarizados altamente concentrados pueden proporcionar oportunidades ilimitadas para el control del

crecimiento microbiano, debido a su diversidad química. Muchos extractos de plantas poseen actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias, levaduras y mohos.

- Algunos usos de extractos naturales que se han detectado se citan a continuación. En el documento US 2009/0191294 A1 [Law Office of Terry L. Miller. *Grape cane product, and method of making*. Alkayali; Ahmad; (Murrieta, CA). 31-03-2009] se ha identificado un extracto obtenido de los sarmientos de la vid para su aplicación tópica de cara a mejorar la retención de humedad de la piel humana, y para prolongar la vida útil y el almacenamiento de productos, entre otros usos. Además, en un reciente estudio de la Universidad de Ghent (Bélgica), se ha demostrado que un extracto de semilla de uva puede reducir la ineffectividad del *Norovirus*, causante de la principal fuente de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en la Unión Europea. Dicho extracto actúa mediante la desnaturalización de la proteína de la cápside del virus, lo que produce su desactivación.
- Pero no se han detectado patentes o publicaciones que manifiesten el empleo de un extracto de uva con efecto antifúngico y antibacteriano.

Descripción de la invención:

- El primer objeto de esta invención es un extracto polifenólico de uva (*Vitis vinifera*) o de un subproducto del proceso de vinificación, caracterizado porque es un extracto sólido, preferiblemente en polvo, y comprende entre 5 y 70 % en peso de uno o más compuestos polifenólicos respecto al total del extracto. Estos pueden ser identificados a partir de un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Debe tenerse en cuenta que cuando se cita un intervalo de valores en la presente memoria, sus límites inferior y superior están siempre incluidos en el ámbito de la invención, como realizaciones concretas de la misma.

- En una realización preferida de la presente invención, el extracto polifenólico sólido, preferiblemente en polvo, presenta una capacidad antioxidante entre 0,3 y 15 μmol eq Trolox/g; un contenido en polifenoles entre 50 y 700 mg/g equivalentes de ácido gálico; y un pH entre 2 y 4.

El extracto polifenólico sólido de la presente invención puede obtenerse directamente de uva tinta, blanca o mezcla de las anteriores. Adicionalmente, también puede obtenerse a partir de subproductos del proceso de vinificación, por ejemplo, lías, orujos, hollejos, etc. así como de cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente el extracto polifenólico sólido se obtiene a partir de los hollejos, es decir, la piel que envuelve la pulpa de la uva tras su prensado. Esta materia prima es sometida a un proceso de extracción con disolventes líquidos con un contenido preferido de alcohol entre 40-60 %, un pH entre 2 y 4 y a una temperatura entre 60-75 °C durante, al menos, 2 horas.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al extracto polifenólico sólido de uva o de un subproducto del proceso de vinificación, preferiblemente hollejos, que comprende uno o más polifenoles seleccionados del grupo que consiste en antocianos, flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos, así como cualquiera de sus combinaciones.

Preferiblemente, los antocianos comprendidos en el extracto polifenólico sólido de la presente invención se seleccionan del grupo consistente en malvidina, petunidina, cianidina y delphinidina y cualquier combinación de los mismos. Por otro lado, los ácidos fenólicos comprendidos en el extracto se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en ácido elágico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido vanílico y ácido coumárico. Adicionalmente, los flavonoles comprendidos en el extracto se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en mirecitina, quercitina y kaempferol. Concretamente el ácido elágico es un polifenol que no se ha descrito como un compuesto comúnmente presente en la uva, por lo que este compuesto hace único al extracto objeto de la presente invención.

Más preferentemente todavía, cualquier flavan-3-ol presente en el extracto se selecciona del grupo que consiste en catequina, epicatequina, epigallocatequina, catequina galato y cualquier combinación de los mismos.

En una realización aún más preferida de la invención, el extracto polifenólico sólido de uva o subproducto del proceso de vinificación, preferiblemente de hollejos, tal como se describe en esta solicitud de patente comprende entre 0 y 10 mg/g de antocianos, entre 0,02 y 20 mg/g de flavonoles, entre 0,2 y 25 mg/g de flavan-3-oles; y entre 0,01 y 10 mg/g de ácidos fenólicos.

En otra realización aún más preferida de la presente invención, el extracto polifenólico sólido de uva o subproducto del proceso de vinificación tal como se describe en esta solicitud de patente comprende la siguiente concentración en peso de polifenoles, todas ellas expresadas respecto al peso total del extracto seco:

5

Ácido elágico: entre 0,01 y 10 mg/g;
Mirecitina: entre 0,01 y 10 mg/g;
Quercitina: entre 0,01 y 10 mg/g; y
Flavan-3-oles: entre 0,22 y 25 mg/g.

10

Preferentemente, los flavan-3-oles que comprende el extracto son los siguientes, cantidades expresadas en peso respecto al peso total del extracto seco:

Catequina: entre 0,1 y 10 mg/g;
15 Epicatequina: entre 0,01 y 2 mg/g;
Epigallocatequina: entre 0,1 y 10 mg/g; y
Catequina galato: entre 0,001 y 2 mg/g.

En una realización particularmente más preferida de la invención, el extracto polifenólico sólido de uva o subproducto del proceso de vinificación, preferiblemente hollejos, tal como se describe en esta solicitud de patente comprende la siguiente concentración en peso de polifenoles, todas ellas expresadas respecto al peso total del extracto seco:

20

Ácido elágico: entre 0,1 y 5 mg/g de composición del extracto;
25 Mirecitina: entre 0,1 y 5 mg/g de composición del extracto;
Quercitina: entre 0,1 y 5 mg/g de composición del extracto; y
Flavan-3-oles: entre 0,4 y 12 mg/g de composición del extracto.

Preferentemente, en dicha realización, los flavan-3-oles comprendidos en la composición del extracto son los siguientes, cantidades expresadas en peso respecto al peso total del extracto seco:

30

Catequina: entre 0,1 y 5 mg/g;
Epicatequina: entre 0,05 y 1 mg/g;
35 Epigallocatequina: entre 0,2 y 5 mg/g; y

Catequina galato: entre 0,01 y 1 mg/g.

En una realización todavía más preferida, el extracto polifenólico sólido de uva o subproducto del proceso de vinificación, preferiblemente hollejos, tal como se describe en esta solicitud
5 de patente comprende la siguiente concentración en peso de polifenoles, todas ellas expresadas respecto al peso total del extracto seco:

Ácido elágico: entre 1 y 5 mg/g;
Mirecitina: entre 0,5 y 4 mg/g;
10 Quercitina: entre 0,5 y 4 mg/g; y
Flavan-3-oles: entre 1,2 y 10 mg/g.

Preferiblemente, en esta realización los flavan-3-oles que comprende el extracto polifenólico sólido de la presente invención son preferentemente los siguientes, cantidades expresadas
15 en peso respecto al peso total del extracto seco:

Catequina: entre 0,5 y 5 mg/g;
Epicatequina: entre 0,1 y 1 mg/g;
Epigallocatequina: entre 0,5 y 4 mg/g; y
20 Catequina galato: entre 0,05 y 1 mg/g

En otra realización preferida, el extracto polifenólico sólido tal como se describe en esta solicitud de patente puede comprender otros componentes o moléculas presentes en la uva o subproducto del proceso de vinificación a partir del cual se obtienen. Estos compuestos
25 pueden ser, por ejemplo, fibra alimentaria o proteínas vegetales.

El extracto de uva o subproducto del proceso de vinificación aquí descrito se obtiene preferentemente a partir de una composición líquida extraída de la uva o de al menos un subproducto derivado del proceso de vinificación, sometiéndose dicha composición líquida
30 posteriormente a un proceso de secado.

En una realización aún más preferida, dicha composición líquida se obtiene a partir de los hollejos, es decir, la piel que envuelve la pulpa de la uva tras su prensado. Esta materia prima es sometida a un proceso de extracción con disolventes líquidos con un contenido

preferido de alcohol entre 40-60 %, un pH entre 2 y 4 y a una temperatura entre 60-75 °C durante, al menos, 2 horas.

5 El secado de la composición líquida que proviene de la uva o del subproducto del proceso de vinificación, preferiblemente hollejos, para obtener el extracto sólido de la presente invención se lleva a cabo preferentemente mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en liofilización, atomización o secado en spray, secado en lecho fluidizado de dicha composición líquida y combinación de las anteriores. Preferiblemente, el extracto polifenólico de la invención se encuentra en forma de polvo. Más preferiblemente, con un contenido de
10 humedad inferior a 8 % en peso.

En una realización especialmente preferida, el extracto polifenólico de la presente invención procede de uva tinta o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva tinta, y comprende entre 3 y 3,5 mg/g de antocianos, entre 0,4 y 3,6 mg/g de flavonoles, entre 5 y
15 20 mg/g de flavon-3-oles; y entre 2,2 y 6 mg/g de ácidos fenólicos. Aún más preferiblemente este extracto se puede obtener a partir de hollejos de uva tinta Tempranillo del valle del Duero.

En otra realización especialmente preferida, el extracto polifenólico de la presente invención
20 procede de uva blanca o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva blanca, y comprende entre 0,2 y 0,3 mg/g de flavonoles, entre 2,6 y 6,8 mg/g de flavon-3-oles; y entre 0,05 y 0,2 mg/g de ácidos fenólicos. Aún más preferiblemente este extracto se puede obtener a partir de hollejos de uva blanca de la variedad Verdejo del valle del Duero.

25 Un segundo objeto de la presente invención es una composición que comprende el extracto polifenólico sólido tal como se describe en el primer objeto de esta solicitud de patente. Esta composición puede comprender uno o más excipientes habituales en el sector de la alimentación para facilitar su fabricación, su estabilidad o su aplicación posterior al alimento.

30 Preferiblemente, la composición de la presente invención es una composición sólida. Más preferiblemente, la composición que comprende el extracto polifenólico de la presente invención se encuentra en forma de polvo.

Diluyentes que pueden estar comprendidos en la composición de la presente invención son, entre otros, maltodextrina, el dióxido de silicio, la goma xantana, almidón, lecitina de soja o dextrosa.

5 La composición sólida descrita en esta solicitud de patente se puede obtener por métodos habituales en la industria alimentaria, en particular en la industria de la fabricación de complementos alimentarios. Preferiblemente, la composición que comprende el extracto polifenólico de la presente invención puede obtenerse mediante secado por una técnica seleccionada del grupo que consiste en liofilización, atomización, secado en lecho
10 fluidificado y una combinación de las anteriores.

En vista de lo anterior, la presente invención cubre asimismo un proceso de obtención del extracto de uva aquí descrito, que comprende someter a secado una composición líquida extraída de la uva o de al menos un subproducto del proceso de vinificación que comprende
15 uno o más compuestos polifenólicos, hasta obtener un producto sólido que comprende al menos uno de los compuestos polifenólicos en un porcentaje en peso del total comprendido entre 5% y 70%, incluidos ambos límites. Como ya se ha afirmado, dicho proceso de secado se lleva a cabo preferentemente mediante liofilización y/o atomización (secado en spray) y/o lecho fluidizado de la composición líquida. En dicho secado se puede emplear un excipiente,
20 un diluyente o un portador, como pueden ser por ejemplo la maltodextrina, el dióxido de silicio, la goma xantana, almidón, lecitina de soja, dextrosa, etc.

Un tercer objeto de la presente invención es la utilización del extracto polifenólico de uva o de subproducto del proceso de vinificación tal como se describe en el primer objeto de la
25 invención, o una composición de éste tal como se describe en el segundo objeto de esta solicitud de patente, como agente antibacteriano, antifúngico o una combinación de ambos.

En una realización preferida, el extracto polifenólico de uva o de subproducto del proceso de vinificación tal como se describe en el primer objeto de la invención, o una composición de
30 éste tal como se describe en el segundo objeto de la invención, se utiliza para inhibir la formación de al menos un hongo responsable del deterioro en alimentos. Preferiblemente, el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Botrytis cinerea*, *Penicillium sp.* y *A. flavus*.

En otra realización preferida, el extracto polifenólico de uva o de subproducto del proceso de
35 vinificación tal como se describe en el primer objeto de la invención, o una composición de

éste tal como se describe en el segundo objeto de la invención, se utiliza para inhibir la formación de al menos una bacteria responsable del deterioro en alimentos. Preferiblemente, donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *S. aureus*, *M. luteus*, *L. innocua*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*.

5

Preferiblemente, el alimento es un producto de panificación.

La presente invención también se refiere al uso del extracto polifenólico de uva o de subproducto del proceso de vinificación tal como se describe en el primer objeto de la invención, para fabricar una composición farmacéutica, preferiblemente para administración tópica, para prevenir una infección cutánea provocada por al menos un hongo, al menos una bacteria o una combinación de ambos.

Preferiblemente, el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Botrytis cinerea*, *Penicillium sp.* y *A. flavus*; y la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *S. aureus*, *M. luteus*, *L. innocua*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*.

Debe entenderse que también forma parte de la presente solicitud de patente cuando se refiere al extracto polifenólico de uva o de subproducto del proceso de vinificación tal como se describe en el primer objeto de la invención, o una composición farmacéutica que comprende este extracto, preferiblemente una composición para administración tópica, de uso para prevenir una infección cutánea provocada por al menos un hongo, al menos una bacteria o una combinación de ambos.

También debe entenderse que forma parte de esta solicitud de patente, un método para prevenir una infección cutánea provocada por al menos un hongo, al menos una bacteria o una combinación de ambos que comprende administrar una cantidad efectiva del extracto polifenólico de uva o de subproducto del proceso de vinificación tal como se describe en el primer objeto de la invención, o de una composición farmacéutica que comprende este extracto. Preferiblemente la composición se administra de forma tópica.

Esta composición farmacéutica puede obtenerse mediante procedimientos ampliamente conocidos por el experto galénico. Preferiblemente es una composición adecuada para administración tópica como gel, crema, ungüento, etc. Dependiendo de la forma elegida,

puede comprender diferentes excipientes también ampliamente conocidos por el experto galénico.

Breve descripción de las figuras:

5

Figura 1: Actividad del extracto tinto frente a *Botritis spp* a distintas concentraciones de extracto. 1A: concentración: 1/500, 1B: concentración 1/100 y 1C: concentración 1/50.

Figura 2: Placa control de *Botritis cinerea*

10

Ejemplos:

Ejemplo 1. Preparación del extracto polifenólico de uva blanca y tinta.

15 Como materia prima del extracto se utilizó uva tinta Tempranillo y uva blanca Verdejo, del valle del Duero. Se emplearon los hollejos concretamente, es decir, la piel que envuelve la pulpa de la uva tras su prensado.

20 Para la obtención de una composición líquida que se va a emplear como materia prima del extracto de uva seco; se someten los hollejos a un proceso de extracción con disolventes líquidos, con un contenido preferido de alcohol entre 40-60 %, un pH entre 2 y 4 y a una temperatura entre 60-75 °C durante, al menos, 2 horas.

25 El extracto polifenólico obtenido también comprende otros componentes y moléculas procedentes de la uva de origen como fibras, proteínas vegetales, azúcares.

Posteriormente la composición líquida de la uva es sometida a un proceso de atomización de secado (secado en spray) y/o liofilización y/o lecho fluidizado, para obtener el extracto en polvo de uva de la presente invención.

30

Ejemplo 2. Caracterización del extracto sólido de uva tinta obtenido a partir del método descrito en el ejemplo 1.

La composición polifenólica del extracto de uva tinta en polvo se detalla a continuación:

35

Antocianos 300-350 mg/100 g

Ácido gálico 20-350 mg/100 g

Ácido elágico: 200-250 mg/100 g

Mirecitina: 20-150 mg/100 g

5 Quercitina: 20-310 mg/100 g

Flavan-3-oles:

Catequina: 230-640 mg/100 g

Epicatequina: 70-560 mg/100 g

Epigallocatequina 160-370 mg/100 g

10 Catequina galato: 20-240mg/100 g

Ejemplo 3. Caracterización del extracto sólido de uva blanca obtenido a partir del método descrito en el ejemplo 1.

15 La composición polifenólica del extracto de uva tinta en polvo se detalla a continuación:

Ácido gálico 300-350 mg/100 g

Ácido elágico: 5-20 mg/100g

Quercitina: 20-30 mg/100 g

20 Flavan-3-oles:

Catequina: 200-550 mg/100 g

Epicatequina: 40-100 mg/100 g

Catequina galato: 20-30 mg/100 g

25 **Ejemplo 4. Ensayos de actividad del extracto sólido de uva tinta y de uva blanca obtenido a partir del método descrito en el ejemplo 1 y caracterizado en los ejemplos 2 y 3 frente a bacterias.**

30 Se han realizado ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos polifenólicos frente a las siguientes bacterias:

Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Proteus mirabilis* (aislada de una muestra de agua residual), *Salmonella sp.* (aislada de una muestra de agua residual), *Pseudomonas aeruginosa* (CECT 532).

35

Gram positivas: *Bacillus subtilis* (aislada de la superficie de una poyata de laboratorio), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240, CECT 245), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria innocua* (ATCC 33090).

- 5 Los cultivos bacterianos para los ensayos preliminares de actividad, en placa Petri, se obtuvieron en Caldo Nutritivo durante 24 horas a 30°C. La concentración del inóculo se comprobó midiendo la densidad óptica de los cultivos (dilución 1/10).

Los ensayos preliminares de actividad antibacteriana se llevaron a cabo en placas de Agar Mueller Hinton. 0,1 ml de cada uno de los cultivos bacterianos. La inoculación se realizó mediante hisopo estéril sobre la superficie del agar y se dejaron secar durante 10 minutos. Sobre los cultivos se colocaron los discos con los controles y 4 pocillos de acero estériles donde se depositaron 100 µL de diluciones 1/5 de cada uno de los extractos. Las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la difusión del compuesto problema. Como control positivo se utilizaron discos impregnados en Gentamicina. Después de 18 horas de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición. Los resultados se presentan en la Tabla I.

20 Tabla I. Actividad antibacteriana de los extractos en dilución 1/5. (Ø halo de inhibición en mm)

Producto	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Extracto Blanco 1	12	25	21	14	0	11	0	0
Extracto Tinto	12,5	23,5	19,5	14,5	0	4,5	4,5	5,5
CONTROLES								
CN (Gentamicina)	16	27	14	21	19	18	14	16
NV (Novobiocina)	13	-	-	14	12	12	0	0
CFP (Cefoperaone)	-	-	12	-	-	-	-	-

25 El Extracto Blanco caracterizado en el ejemplo 3 (dilución 1/5) produce halos de inhibición frente a las 4 bacterias Gram positivas ensayadas y frente a una de las Gram negativas (*P. mirabilis*).

El Extracto Tinto caracterizado en el ejemplo 2 (dilución 1/5) produce halos de inhibición frente a las 4 bacterias Gram positivas ensayadas y frente a 3 de las Gram negativas (*P.mirabilis*, *P.aeruginosa* y *Salmonella sp.*)

5

Posteriormente se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante ensayos en cultivo líquido (1ml) y posterior recuento de colonias. En el caso de los microorganismos se partió de un cultivo puro en Caldo Nutritivo obtenido por incubación a 37°C en agitación durante 24h. Para el inóculo, distintas diluciones de los extractos fueron inoculadas con 1 mL de cada cultivo microbiano (hasta concentración comprendida entre 10³-10⁴ /mL). Se ensayaron las diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500 en caldo Mueller-Hinton de las extractos. Las muestras se incubaron durante 24 h en agitación a 37°C. El recuento de microorganismos se realizó por siembra en agar Mueller-Hinton por extensión en superficie del microorganismo, incubación a 37°C, lectura a las 18-24h. Como control positivo se utilizó Gentamicina (CN 10 µg).

10

15

Ejemplo 5. Ensayos de actividad frente a hongos filamentosos del extracto sólido de uva tinta y de uva blanca obtenido a partir del método descrito en el ejemplo 1 y caracterizado en los ejemplos 2 y 3.

20

Se han realizado ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos polifenólicos frente a las siguientes hongos filamentosos: *Botrytis cinerea* B98 (aislada de fresas), *Penicillium spp.* (aislada de piel de naranja), *Aspergillus flavus* (CECT 2686).

25

Los hongos se cultivaron en Agar Patata Dextrosa durante 7 días a temperatura entre 20-25 °C. Los ensayos de actividad se realizaron con las esporas. Se partió de cultivos puros en placa de agar Patata Dextrosa (PDA) que se habían dejado los días suficientes (>7) para que el microorganismo cubriese toda la superficie y el cultivo estuviera esporulado.

30

Los ensayos de actividad antifúngica se realizaron por triplicado, en placa, en medio de cultivo agar PDA Cloranfenicol adicionado de distintas concentraciones de los extractos. Se prepararon placas de medio de cultivo que contenían concentraciones 1/50, 1/100 y 1/500 de cada extracto.

Las distintas placas se inocularon con una misma cantidad del hongo diana esporulado en agar PDA, para ello se recortaron cilindros en condiciones estériles de 0,5 cm de diámetro con la ayuda de un sacabocados y se depositaron boca abajo en el centro de cada una de las distintas placas preparadas con medio de cultivo adicionado de extracto. Los controles se incubaron en agar PDA Cloranfenicol sin extracto añadido. Las placas se incubaron a 25 °C hasta que el control (o cualquier otro de los cultivos) cubriese toda la superficie (8,5 cm de diámetro), en ese punto se anotaron las mediciones del resto de placas. Se calcularon los porcentajes de inhibición o aumento del crecimiento midiendo el diámetro de la zona de crecimiento y comparándola con el control. Las mediciones se presentan en la tabla II y los resultados de actividad en la tabla III.

En las figura 1a, 1b y 1c se presentan imágenes donde se observa el efecto de los extractos caracterizados en los ejemplos 2 y 3; diluidos 1/50, 1/100 y 1/500 veces frente a *Botrytis cinerea*, así como el crecimiento del hongo sin extracto (figura 2).

Tabla II. Ensayos de actividad antifúngica. Medidas del crecimiento de hongos

Hongos filamentosos	Control (diámetro en cm)	diámetro en cm					
		Extracto Blanco			Extracto Tinto		
		1/50	1/100	1/500	1/50	1/100	1/500
<i>Botrytis cinerea</i>	5	6	6,8	8,5	7	7,5	7,5
% RC vs C		-	-	-	60	40	
% AC vs C		20	36	70	40	50	50
<i>Penicillium</i> sp.	6,5	4,4	5	8,5	1,9	1,9	5
% RC vs C		32,3	23,1	-	70,8	70,8	23,1
% AC vs C		-	-	30,1	-	7,7	30,1
<i>A. flavus</i>	2,5	2,8	2,6	4	1,6	1,8	2,9
% RC vs C		-	-	-	64	72	-
% AC vs C		12	4	60	-	-	16

% RC vs C=

Porcentaje de reducción de crecimiento frente al control

% AC vs C=

Porcentaje de aumento de crecimiento frente al control

Tabla III. Actividad frente a Hongos filamentosos (Concentración de los extractos y % de inhibición del crecimiento).

	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>A. flavus</i>
Concentración del extracto	% RC vs C=Porcentaje de reducción de crecimiento frente al control		
EXTRACTO BLANCO			
1/50		32,3	
1/100		23,1	
1/500			
EXTRACTO TINTO			
1/50	60	70,8	64
1/100	40	70,8	72
1/500		23,1	

- 5 Se confirma el efecto inhibitorio del extracto tinto sobre los hongos filamentosos ensayados a concentraciones 1/50 y 1/100 para el extracto tinto.

Tabla V. Ensayos de actividad antibacteriana frente a bacterias

Microorganismo inoculado	Media de colonias/placa a las 24 h							
	Extracto Blanco				Extracto Tinto			
	1/10	1/50	1/100	1/500	1/10	1/50	1/100	1/500
	Ensayos de actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas							
S. aureus 2,6x104 ufc/mL	130	150	150	césped	0	0	2	césped
CMI	>1/10				1/100 -1/500			
M. luteus 0,7x103 ufc/mL	0	0	0	césped	0	300	césped	césped
CMI	<1/500				1/10 -1/50			
L. innocua 0,7x103 ufc/mL	0	0	300	césped	0	0	0	césped
CMI	1/100 -1/500				1/100 -1/500			
Ensayos de actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram negativas								
P. mirabilis 1x103 ufc/mL	0	30	0	césped	0	0	0	césped
CMI	<1/500				1/10 -1/50			
P. aeruginosa 2,0x103 ufc/mL	45	150	césped	césped	0	0	0	césped
CMI	1/100 -1/500				1/100 -1/500			

Tabla VI. Resumen de los resultados de CMI de los extractos frente a las Bacterias ensayadas

Microorganismos	EXTRACTO BLANCO	EXTRACTO TINTO
<i>S. aureus</i>	>1/10	1/100-1/500
<i>M. luteus</i>	>1/500	1/10-1/50
<i>L. innocua</i>	1/100-1/500	1/100-1/500
<i>P. mirabilis</i>	1/10-1/50	1/100-1/500
<i>P. aeruginosa</i>	>1/10	1/100-1/500

En el caso del extracto blanco puede observarse que tiene efecto inhibitorio del crecimiento de *M. luteus* y *L. innocua*. El extracto tinto inhibe el crecimiento las bacterias resaltadas en la tabla VI., donde se engloban bacterias tanto gram positivas como gram negativas.

REIVINDICACIONES

1. Extracto polifenólico de uva o de un subproducto del proceso de vinificación, caracterizado porque es un extracto sólido y comprende entre 5 y 70 % en peso de uno o
5 más compuestos polifenólicos respecto al total del extracto.
2. Extracto polifenólico de acuerdo a la reivindicación 1, que presenta una capacidad antioxidante entre 0,3 y 15 $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$; un contenido en polifenoles entre 50 y 700 mg/g equivalentes de ácido gálico; y un pH entre 2 y 4.
10
3. Extracto polifenólico de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el extracto comprende uno o más polifenoles seleccionados del grupo que consiste en antocianos, flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos, así como cualquiera de sus combinaciones.
15
4. Extracto polifenólico de acuerdo a la reivindicación 3, que comprende entre 0 y 10 mg/g de antocianos, entre 0,02 y 20 mg/g de flavonoles, entre 0,2 y 25 mg/g de flavon-3-oles; y entre 0,01 y 100 mg/g de ácidos fenólicos.
- 20 5. Extracto polifenólico de acuerdo a la reivindicación 4, donde dicho extracto procede de uva tinta o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva tinta, y comprende entre 3 y 3,5 mg/g de antocianos, entre 0,4 y 3,6 mg/g de flavonoles, entre 5 y 20 mg/g de flavon-3-oles; y entre 2,2 y 6 mg/g de ácidos fenólicos.
- 25 6. Extracto polifenólico de acuerdo con la reivindicación 5, obtenido a partir de hollejos de uva tinta Tempranillo del valle del Duero.
7. Extracto polifenólico de acuerdo a la reivindicación 4, donde dicho extracto procede de uva blanca o de un subproducto del proceso de vinificación de dicha uva blanca, y
30 comprende entre 0,2 y 0,3 mg/g de flavonoles, entre 2,6 y 6,8 mg/g de flavon-3-oles; y entre 0,05 y 0,2 mg/g de ácidos fenólicos.
8. Extracto polifenólico de acuerdo a la reivindicación 7, obtenido a partir de hollejos de uva blanca de la variedad Verdejo del valle del Duero.

9. Composición que comprende el extracto polifenólico sólido tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5 10. Utilización del extracto polifenólico de uva tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición tal como se describe en la reivindicación 9, como agente antibacteriano, antifúngico o una combinación de ambos.

10 11. Utilización según la reivindicación 10, para inhibir la formación de al menos un hongo o una bacteria responsable del deterioro en alimentos.

12. Utilización del extracto polifenólico de uva tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para fabricar una composición farmacéutica para prevenir una infección cutánea provocada por al menos un hongo, al menos una bacteria o una combinación de ambos.

15 13. Utilización según la reivindicación 11 o 12, donde el hongo se selecciona del grupo que consiste en *Botrytis cinerea*, *Penicillium sp.* y *A. flavus*.

20 14. Utilización según la reivindicación 11 o 12, donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *S. aureus*, *M. luteus*, *L. innocua*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa*.

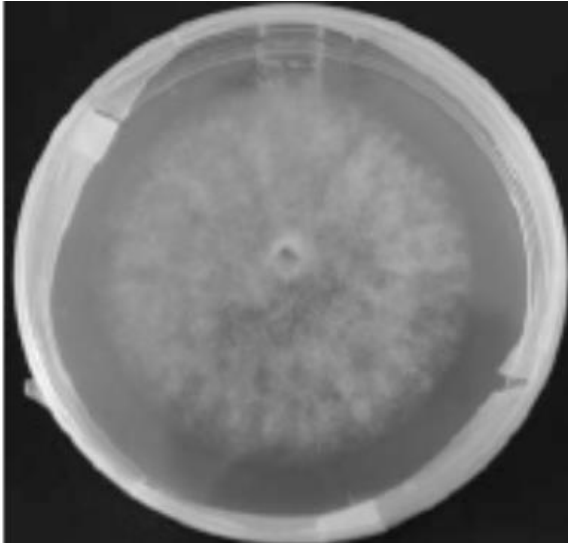


Fig. 1A

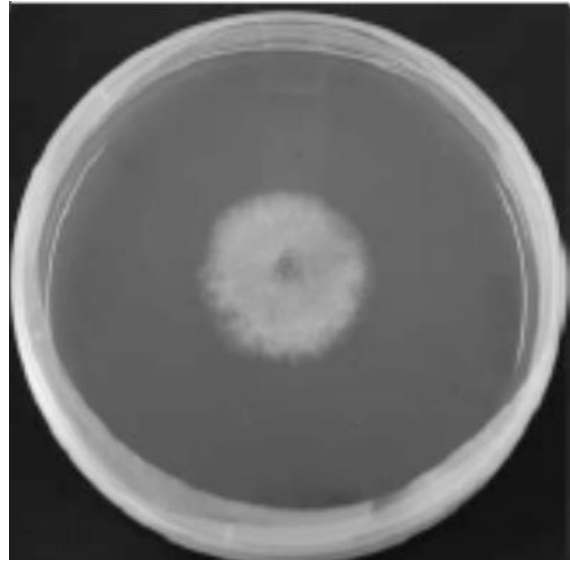


Fig. 1B

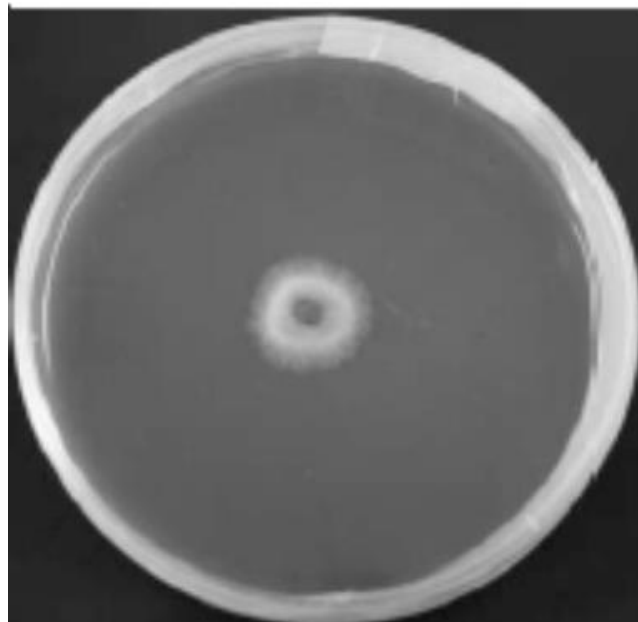


Fig. 1C

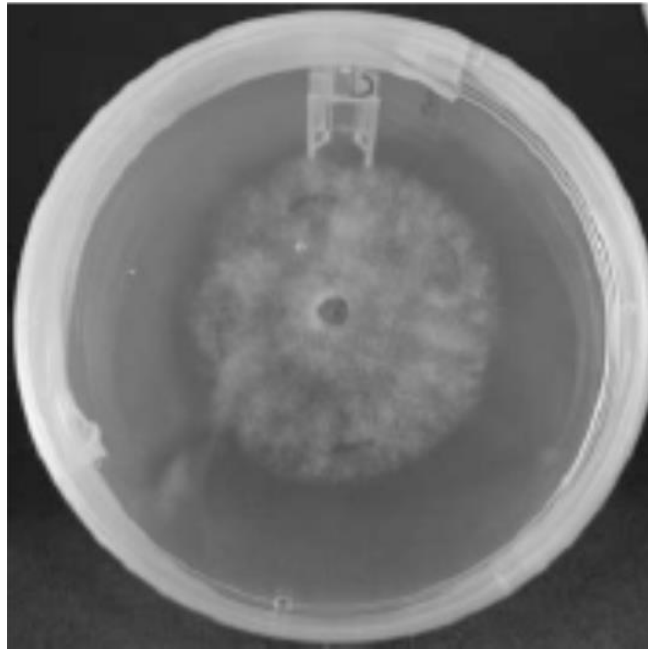


Fig. 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201331413

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.09.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2013021076 A1 (ABRO BIOTEC S L et al.) 14.02.2013, todo el documento; en particular ver p. ej.: reivindicaciones 1-8.	1-9
X	ES 2406858 A1 (ESDOR COSMETICOS S L) 10.06.2013, todo el documento; en particular, ver p. ej.: reivindicaciones 1-4.	1-9
A	US 2009191294 A1 (ALKAYALI AHMAD) 30.07.2009, todo el documento.	1-14
A	US 6099854 A (HOWARD ALAN NORMAN et al.) 08.08.2000, todo el documento.	1-14
A	US 2009117057 A1 (SHANBROM EDWARD) 07.05.2009, todo el documento.	10-14
A	WO 02092028 A2 (PROCTER & GAMBLE) 21.11.2002, todo el documento.	10-14

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
21.02.2014

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23L3/349 (2006.01)

A61K36/87 (2006.01)

A61P17/00 (2006.01)

A61P31/02 (2006.01)

A61P31/10 (2006.01)

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

A23L, A61K, A61P

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, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2, 10-14	SI
	Reivindicaciones 1, 3-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 10-14	SI
	Reivindicaciones 1-9	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	WO 2013021076 A1 (ABRO BIOTEC S L et al.)	14.02.2013
D02	ES 2406858 A1 (ESDOR COSMETICOS S L)	10.06.2013
D03	US 2009191294 A1 (ALKAYALI AHMAD)	30.07.2009
D04	US 6099854 A (HOWARD ALAN NORMAN et al.)	08.08.2000
D05	US 2009117057 A1 (SHANBROM EDWARD)	07.05.2009
D06	WO 02092028 A2 (PROCTER & GAMBLE)	21.11.2002

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 solicitud reivindica un extracto polifenólico de uva o de un subproducto del proceso de vinificación. Este extracto es sólido y tiene un contenido en polifenoles de entre el 5 y el 70% en peso. Los compuestos polifenólicos que puede incluir el extracto son antocianos, flavonoles, flavan-3-oles, ácidos fenólicos y combinaciones de los mismos. Se pueden obtener del hollejo de uva la tinta o de la uva blanca (reivindicado).

La solicitud reivindica también el uso del extracto para inhibir la presencia de hongos y/o bacterias en los alimentos. Asimismo, reivindica la utilización del extracto en la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir infecciones cutáneas provocadas por hongos y/o bacterias.

D01-D06 representan el estado de la técnica anterior. De ellos, se consideran D01 y D02 los documentos más cercanos.

D01 se refiere a un extracto seco obtenido a partir de uva que comprende uno o más compuestos polifenólicos en una concentración de entre 5 y 70% en peso, su uso como complemento nutricional y como ingrediente en composiciones cosméticas.

D02 divulga un extracto polifenólico procedente de uva que contiene pigmentos, flavonoles, flavan-3-oles, ácidos fenólicos y combinaciones de los mismos. Describe, también, su uso en la elaboración de cremas cosméticas.

Al estudiar la descripción y los ejemplos de D01, se observa que los polifenoles que contienen estos extractos son los mismos que se reivindican en la solicitud y aparecen en concentraciones similares: ácido eleágico, mirecitina, quercitina, catequina, epicatequina, epicalocatequina, catequina galato, etc. En el caso de D02, no se detalla el compuesto, sino su naturaleza: flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos. Por otro lado, las unidades que expresan la concentración de los principios activos, que se utilizan en este documento son muy distintas de las que se utilizan en la solicitud y hacen que sea muy difícil comparar las proporciones de uno y otro caso.

Desde el punto de vista del extracto y su composición, así como de su origen, queda claro que D01 y D02 anticipan el contenido de la solicitud.

Por otro lado, ni el estudio de estos documentos (D01 y D02) ni la búsqueda que se ha llevado a cabo, han dado por resultado referencia alguna a la utilización de un extracto polifenólico como el que se reivindica en la solicitud, como biocida, antifúngico o antibacteriano para la conservación de alimentos o para prevenir las infecciones cutáneas. Tampoco se considera que a partir del estado de la técnica podría resultar obvio para un experto en la materia utilizar un extracto de estas características para los fines reivindicados en la solicitud.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1, 3-9 de la solicitud no cumplen los requisitos de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 ni las reivindicaciones 1-9 el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986. Por otro lado, las reivindicaciones 10-14 sí que cumplen ambos requisitos.