

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 760**

21 Número de solicitud: 201530242

51 Int. Cl.:

A61K 36/73 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

25.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.08.2016

Fecha de concesión:

30.06.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.07.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e
Innovación. Avda. de Elvas, s/n
06006 Badajoz (Badajoz) ES**

72 Inventor/es:

**CAVA LÓPEZ, Ramón;
CANTERO MENA, Victor Jesús y
LADERO GARCÍA, Luis**

54 Título: **Procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero, extracto así obtenido y usos dados al mismo**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero, extracto así obtenido y usos dados al mismo.

Se describe un procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero mediante un disolvente, al extracto obtenido por dicho procedimiento con características antioxidantes y a los usos dados al mismo en por ejemplo la conservación de alimentos.

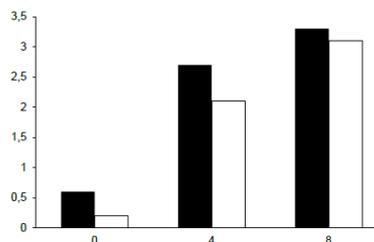


FIG. 1

ES 2 580 760 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero, extracto así obtenido y usos dados al mismo

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero, al extracto obtenido por dicho procedimiento y a los usos dados al mismo.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Son conocidos varios antioxidantes utilizados como protectores de alimentos. La protección frente al deterioro oxidativo de diversos tipos de alimentos es una preocupación patente en la industria alimentaria.

15 Como antioxidantes se vienen empleando en la industria alimentaria compuestos sintéticos como el butilhidroxitolueno o el butilhidroxianisol. Sin embargo, existe un creciente interés en la sustitución de estos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturales, que presentan idénticos mecanismos de acción. La demanda a nivel mundial de antioxidantes naturales ha aumentado debido a las dudas sobre la seguridad de la comida. Además sustituir los aditivos sintéticos por aditivos alimentarios naturales puede presentar la ventaja de que estos últimos presentan ciertos beneficios para la salud. La mayor parte de los compuestos naturales con actividad antioxidante se encuentran en plantas y muchos de ellos son de naturaleza polifenólica.

20 Merecen particular atención las materias primas de origen residual de procesos agroindustriales que puedan servir como fuentes de antioxidantes. En este campo, se han considerado como materias primas algunos materiales como residuos de piel de patata, orujo de oliva, alpechines, pepitas de uva y bagazo de vino y pieles de uva.

30 El níspero (*Eryobotria japonica*) es un fruto cuyo peso varía de 10g a 100g con forma redondeada-ovalada, de piel delgada de color anaranjado, cuenta con pulpa carnosa que guarda en el centro del fruto de 2 a 4 semillas alargadas, de gran porte que puede coincidir con el 50% del níspero. Perteneciente a la familia Rosaceae, se distingues dos especies, *Eryobotria japonica* (níspero japonés) y *Mespilus germánica* (níspero europeo). En la actualidad, son varios los países productores de níspero a nivel mundial, destacando China, Japón, India, Pakistán, Estados Unidos, Brasil, Venezuela, Australia y en países del

Mediterráneo como Argelia, Marruecos, España, Italia, Turquía, Grecia, Israel y Portugal. A pesar de esta amplia distribución, este cultivo tiene mayor importancia en China, Japón y en el área mediterránea donde son más apreciados los sabores ácidos.

5 La industria de procesado del níspero está en pleno auge ya que ha permitido comercializar el producto en formas distintas a la habitual como futo fresco, utilizándose alternativas como zumos, pulpas, etc.

10 Con todo ello adquiere un interés especial la obtención de un extracto que englobe todas estas características, que sea natural, que pertenezca a un cultivo industrializado, que se obtenga de una parte no aprovechada dentro de industria del mismo, que presente actividad antioxidante, que pueda ser aplicado en alimentos y que preserve a los alimentos en los que se incluye, de un deterioro oxidativo.

DESCRIPCIÓN

15 Los inventores han desarrollado un procedimiento para preparar un extracto de níspero con un alto contenido en polifenoles el cual comprende una etapa de extracción con un disolvente. El extracto obtenido con el procedimiento de la invención presenta una alta actividad como antioxidante.

20 Por lo tanto un aspecto de la invención es el procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero que comprende las etapas de:

- a) triturar semillas de níspero;
- b) añadir las semillas de níspero trituradas obtenidas en la etapa a) en un disolvente
25 seleccionado entre: agua, agua acidificada, un alcohol C₁₋₆ o mezclas de ellos;
- c) agitar la mezcla de semillas de níspero trituradas y el disolvente;
- d) separar las dos fases formadas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

30 El segundo aspecto de la invención se refiere a un extracto de semillas de níspero obtenido por el procedimiento de la invención.

Debido al alto contenido de polifenoles que comprende el extracto obtenido por el procedimiento de la invención el mismo es adecuado para su uso como antioxidante. Por

tanto un tercer aspecto de la invención es el uso del extracto de la invención como antioxidante.

5 Como el origen es natural, el extracto de la invención con propiedades antioxidante es especialmente útil para su uso en un producto alimentario cosmético o farmacéutico, para favorecer su conservación. Por ello un cuarto aspecto de la invención es un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La FIG. 1 representa mg de malondialdehído (MDA)/ kg de muestra frente a días de almacenamiento, del control (columna negra), de la muestra en extractos de semilla de níspero en agua:etanol 50:50 v/v (columna blanca).

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se ha dicho el primer aspecto de la invención es el procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero que comprende las etapas de:

- a) triturar semillas de níspero;
- 20 b) añadir las semillas de níspero trituradas obtenidas en la etapa a) en un disolvente seleccionado entre: agua, agua acidificada, un alcohol C₁₋₆ y mezclas de ellos;
- c) agitar la mezcla de semillas de níspero trituradas y disolvente;
- d) separar las dos fases formadas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

25 La primera etapa es el triturado de las semillas de níspero hasta la obtención de partículas de un tamaño comprendido en 0,1 y 10 mm. Estas semillas pueden ser el subproducto de una industria dedicada al níspero o se puede partir del propio níspero en cuyo caso la semilla se obtendrá mediante medios manuales o mecánicos a partir como hemos dicho del
30 fruto del níspero, tras su pelado, diferenciación del hueso y la pulpa, extracción de la semilla tras la fragmentación del hueso y retirada de las partes fibrosas.

El término "alcohol C₁₋₆" como se utiliza aquí se refiere a un alcohol que puede tener de un
35 carbono a seis carbonos en una cadena lineal o ramificada, con al menos una función hidróxido.

El término “polifenoles” se refiere a compuestos aromáticos que comprenden al menos dos grupos hidroxifenólicos en la molécula. Dentro de este grupo de compuestos se incluyen los flavonoides, grupo heterogéneo de polifenoles vegetales que comparten una estructura de benzopirano. Los principales flavonoides con actividad antioxidantes son (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y los correspondientes ésteres del ácido gálico, galato de (-)-epicatequina y galato de (-)-epigallocatequina.

10 El sobrenadante que comprende el extracto de semillas de mango puede presentar alguna impureza y por lo tanto en una realización preferente el sobrenadante obtenido en la etapa d) se filtra, en la etapa e).

En una materialización particular el procedimiento comprende una etapa f) de destilación del sobrenadante obtenido en la etapa d) o tras la etapa e) del filtrado.

En una materialización particular el procedimiento comprende una etapa de liofilización del sobrenadante obtenido en la etapa d) o el filtrado de la etapa e) o el destilado de la etapa f).

20 Las proporciones utilizadas de semilla:disolvente pueden modificarse a fin de obtener extractos con mayor o menor concentración y por tanto con diferente actividad antioxidante. Preferentemente la relación entre las semillas de níspero picadas y el disolvente está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen). En una materialización particular la proporción semilla:disolvente es de 1:10 (peso:volumen) .

25 Igualmente la utilización de uno u otro disolvente influye en la cantidad de compuestos extraídos así como en el tipo de compuestos con actividad antioxidante que se obtiene debido a las características de los mismos y su afinidad por el disolvente. Preferentemente el disolvente seleccionado en la etapa c) es una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₆. En una materialización particular el disolvente seleccionado en la etapa b) es una mezcla de agua y etanol.

30 En una materialización preferente la relación entre el agua y el alcohol C₁₋₆ está comprendida entre 40:60 v/v y 60:40 v/v.

Las condiciones de temperatura, tiempo, y exposición de la luz en la etapa c) pueden ajustarse en un rango en el que la obtención de compuestos con actividad antioxidante sea óptima evitando la degradación. Preferentemente la etapa c) se realiza a una temperatura comprendida entre los 20°C y los 28°C y en condiciones de oscuridad y durante un tiempo de 30 min a 210 min. En una materialización particular la temperatura es de 25°C y el tiempo es de dos horas.

Como se ha dicho un segundo aspecto de la invención se refiere a un extracto de semillas de níspero obtenido por el procedimiento de la invención. En una materialización preferente el extracto de la invención presenta un contenido en compuestos fenólicos totales comprendido entre 1 mg Eq ácido gálico/g de muestra y 3,5 mg Eq ácido gálico/g de muestra. Preferentemente entre 2,5 y 3 mg Eq ácido gálico/g de muestra. En una materialización preferente el extracto de la invención presenta un contenido en compuestos flavonoides comprendido entre 0,3 mg Eq catequina /g de muestra y 2 mg Eq catequina /g de muestra. Preferentemente entre 1,5 y 2 mg Eq catequina /g de muestra.

Como ya se ha dicho el cuarto aspecto de la invención es un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de la invención. La aplicación del extracto de la invención se realiza por incorporación directa en la formulación o mediante dispersión del extracto sobre el producto alimentario, cosmético o farmacéutico o cualquier otro método que permita la correcta distribución del extracto y su acción antioxidante. La concentración de extracto a utilizar vendrá determinada por factores propios del extracto (capacidad antioxidante) así como los atribuibles al producto tales como tipo de producto, contenido y tipo de grasa, concentración en anti y prooxidantes, etc. Igualmente se deberá tener en cuenta los procesos tecnológicos que puedan llevarse a cabo tras la adición del extracto así como las características de conservación del producto.

EJEMPLOS

30

Ejemplo 1. Obtención del extracto de la semilla de níspero (*Eryobotria japonica*) mediante la utilización de mezcla de disolventes.

Para obtener el extracto se partió de fruto de níspero de venta al público adquiridos en una superficie comercial. Con la ayuda de un cuchillo se procedió a la separación de la semilla situada en el centro del fruto tras desprejar la pulpa. Las semillas obtenidas fueron desmenuzadas mediante triturado en picadora convencional. La extracción de compuestos con propiedades antioxidantes se realizó mediante la utilización de dos disolventes y la mezcla de ambos. Así, se utilizó agua destilada, etanol y una mezcla de agua:etanol en proporción 50:50 (vol:vol), que dieron lugar a tres extractos distintos. La proporción 1:10 (g:mL) de semilla y disolvente presentó los mejores resultados en experiencias previas por lo que fue la que se utilizó. Las mezclas de disolvente y semilla se mantuvieron en agitación durante dos horas a una temperatura controlada de 25°C en condiciones de luminosidad reducida. Una vez transcurrido el tiempo de agitación se procedió a la separación de las fases mediante centrifugación obteniéndose dos fases perfectamente diferenciadas. La fase sobrenadante fue filtrada a través de filtro de papel Whatman nº 54 y conservada en recipiente opaco a temperatura de refrigeración.

15

Ejemplo 2. Caracterización de tres extractos de la semilla de níspero (*Eryobotria japonica*) mediante la cuantificación de su contenido en fenoles totales.

La cuantificación de fenoles totales de los extractos de semilla de níspero se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Singleton y cols., (1999). 50µL de cada uno de los extractos fueron depositados en un pocillo de placa microtiter al que se añadieron 20µL del reactivo de Folin-Cicalteau y 50µL de carbonato de sodio al 20% (p/v). La mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente, tras lo cual se midió la absorbencia a 765nm frente a un blanco donde se sustituyó la muestra por agua destilada. La cuantificación de las medidas se realizó frente a una curva patrón de ácido gálico. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico y quedan reflejados en la tabla 1.

25

Tabla 1. Contenido en compuestos fenólicos totales (mg Eq ácido gálico/g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de semilla de níspero.

30

Solvente de extracción	Compuestos fenólicos totales
Agua	3,0 a ±0,7
Agua:etanol 50:50 v/v	2,8 b ±1,2
Etanol	1,2 c ±1,4

$p < 0,001$; $N=8$ determinaciones; a, b, c: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$).

Ejemplo 3. Caracterización de tres extractos de la semilla de níspero (*Eryobotria japonica*) mediante la cuantificación de su contenido en flavonoides.

La cuantificación del contenido en flavonoides de los extractos obtenidos de la semilla de níspero (*Eryobotria japonica*) se realizó siguiendo el método propuesto por Zhishen y cols., (1999). Este procedimiento se basa en la formación de quelatos entre $AlCl_3$ y flavonoides de la muestra, que presentan una coloración rosada. Así, 400 μ L de muestra se depositaron en tubo de ensayo a los que se añadieron 60 μ L de $NaNO_2$ al 10%, 60 μ L de $AlCl_3$ al 20% y 400 μ L de NaOH 1M. Tras agitación se midió su absorbencia a 510 nm.

La cuantificación de las medidas realizadas se realizó frente a una curva patrón de catequina. Los resultados se expresaron en mg de catequina equivalente por gramo de muestra y quedan reflejados en la tabla 2.

Tabla 2. Contenido en flavonoides (mg Eq. catequina /g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de semilla de níspero.

Solvente de extracción	Compuestos fenólicos
Agua	1,3 b \pm 0,1
Agua:etanol 50:50 v/v	1,7 a \pm 0,1
Etanol	0,4 c \pm 0,0

$p < 0,001$; $N=8$ determinaciones; a, b, c: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$)

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de semilla de níspero se realizaron siguiendo dos metodologías de reducción de radicales sintéticos, método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) y método ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*), como se muestra en los ejemplos 4 y 5. En estas pruebas se evidencia el poder antioxidante de la muestra mediante cambios en la coloración de una solución que contenga un radical susceptible de ser reducido. En ambos casos, la respuesta obtenida se

extrapola a una curva de calibración con Trolox por lo que los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

Ejemplo 4. Evaluación de la capacidad antioxidante de tres extractos de semilla de níspero mediante la utilización del radical ABTS

Se siguió el método propuesto por Re y cols. (1999). Así, se obtuvo el radical ABTS a partir de la mezcla a partes iguales de una solución de ABTS 7mM y persulfato potásico 2,45mM. Esta solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas en condiciones de oscuridad para la generación del radical. La solución se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de 0,7 ($\pm 0,1$) a 734nm. 245 μ L de la disolución con el radical ABTS se depositaron en un pocillo de una placa microtiter y se midió su absorbancia a 734nm. A continuación se añadieron 5 μ L del extracto a ensayar y, transcurrido un minuto, se repitió la medida a 734nm. Los resultados obtenidos se enfrentaron a una curva de calibración de Trolox. Los resultados se expresaron como mg TEAC/g muestra y quedan reflejados en la tabla 3.

Tabla 3. Capacidad antioxidante medida por el método ABTS (mg TEAC/g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de semilla de níspero.

Solvente de extracción	ABTS
Agua	3,1 b $\pm 0,2$
Agua:etanol 50:50 v/v	5,6 a $\pm 0,2$
Etanol	1,8 c $\pm 0,3$

$p < 0,001$; N=8 determinaciones; a, b, c: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$).

Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad antioxidante de tres extractos de semilla de níspero mediante el método FRAP

Este método propuesto por Benzie y Strain (1996), determina la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra a pH bajo, transformando el complejo de tripiridiltriazina (TPTZ) con hierro (III) a su forma ferrosa. Así, se preparó el reactivo FRAP a partir de 2,5ml de una solución TPTZ 10mM junto con 2,5mL de una solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20mM y 25 mL de tampón acetato 0,3mM y pH 3,6. Se realizó una lectura de absorbancia a 593nm de

200mL del reactivo FRAP a los que se añadieron posteriormente 7µL de muestra realizándose medidas de absorbencia transcurridos 4 y 30 minutos. Los resultados obtenidos se enfrentaron a una curva de calibración de Trolox. Los resultados se expresaron como mg TEAC/g muestra y quedan reflejados en la tabla 4.

5

Tabla 4. Capacidad antioxidante medida por el método FRAP (4min y 30min) (mg TEAC/g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de semilla de níspero.

Solvente de extracción	FRAP 4min	FRAP 30min
Agua	1,8 b ±0,1	2,5 b ±0,1
Agua:etanol 50:50 v/v	3,8 a ±0,2	4,6 a ±0,3
Etanol	1,6 b ±0,1	1,9 c ±0,1

p<0,001; N=8 determinaciones; a, b, c: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, p<0,05)

10

El extracto obtenido siguiendo lo dispuesto en la presente invención ha mostrado su eficacia como agente antioxidante en la incorporación sobre productos alimentarios.

La incorporación de tres extractos de semilla de níspero, obtenidos mediante tres disolventes, sobre un producto cárnico de pollo, se mostró eficaz frente a fenómenos oxidativos como la cocción. El ejemplo 6 muestra el estudio comparativo que evaluó la evolución del contenido mediante el método del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) en un producto de pollo con extracto añadido frente a un producto sin extracto en su formulación.

20

Ejemplo 6. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de semilla de níspero (*Eryobotria japonica*) incorporados en la formulación de un producto cocido de pollo.

Se preparó un producto de pollo a partir de pechugas obtenidas en un establecimiento de venta al público. La formulación utilizada contenía 79% de carne picada, 18% de agua, 1% de sal y 2% de cada uno de los extractos con respecto al peso final. Se utilizaron los extractos de agua, etanol y agua:etanol (50:50 v/v) y un control sin extracto añadido. La mezcla se distribuyó en tubos de plástico con aproximadamente 30g en cada tubo. Los tubos se introdujeron en agua caliente hasta obtener una temperatura en el centro de la

25

mezcla de 72°C y se mantuvieron durante 30min para obtener un producto cocido. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo y se almacenaron a 4°C durante 8 días.

5 La cuantificación de los procesos oxidativos se realizó mediante el método del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) descrito por Salih y cols. (1987) que mide el contenido en ciertos productos secundarios derivados de la oxidación lipídica como el malondialdehído (MDA). Así, se tomaron 2g de muestra y se homogenizaron con 7,5mL de ácido perclórico 3,86%. 2mL de homogenizado se mezclaron con 2mL de TBA 0,02M y se calentó la mezcla a 90°C durante 30 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota para medir su absorbencia 10 a 532nm frente a un blanco. Los resultados obtenidos se enfrentaron a una curva de calibración de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Los resultados se expresaron como mg de MDA/Kg muestra y quedan reflejados en la figura 1.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero que comprende las etapas de:
- 5 a) triturar semillas de níspero;
- b) añadir las semillas de níspero trituradas obtenidas en la etapa a) en un disolvente seleccionado entre: agua, agua acidificada, un alcohol C₁₋₆ y mezclas de ellos;
- c) agitar la mezcla de semillas de níspero trituradas y disolvente;
- 10 d) separar las dos fases formadas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el sobrenadante obtenido en la etapa d) se filtra en una etapa e).
- 15 3. Procedimiento según reivindicaciones 1-2, que comprende una etapa f) de destilación del sobrenadante obtenido en la etapa d) o tras la etapa e) del filtrado.
4. Procedimiento según reivindicaciones 1-3, que comprende una etapa de liofilización g) del sobrenadante obtenido en la etapa d) o el filtrado de la etapa e) o el destilado de la etapa f).
- 20 5. Procedimiento según reivindicaciones 1-4 donde en la etapa a) las semillas de níspero se tritura hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 0,1mm y 10mm.
6. Procedimiento según reivindicaciones 1-5 donde la relación entre las semillas de níspero trituradas y el disolvente está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen).
- 25 7. Procedimiento según reivindicaciones 1-6 donde el disolvente seleccionado en la etapa b) es una mezcla de agua y un alcohol C₁₋₆.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7 donde la relación entre el agua y el alcohol C₁₋₆ está comprendida entre 40:60 v/v y 60:40 v/v
9. Procedimiento según las reivindicaciones 7-8 donde el disolvente seleccionado en la etapa b) es una mezcla de agua y etanol.

10. Procedimiento según las reivindicaciones 1-6 donde la etapa c) de agitación se realiza a una temperatura comprendida entre los 20°C y los 28°C, en condiciones de oscuridad y durante un tiempo de 30 min a 210 min.

5

11. Extracto de semillas de níspero obtenido por el procedimiento descrito en las reivindicaciones 1-10.

10 12. Extracto de semillas de níspero según reivindicación 11, que tiene un contenido en fenoles totales comprendido entre 1 y 3,5 mg Eq ácido gálico/g de muestra.

13. Extracto de semillas de níspero según las reivindicaciones 11-12 que tiene un contenido en flavonoides comprendido entre 0,3 y 2 mg Eq catequina /g de muestra.

15 14. Uso del extracto según cualquiera de las reivindicaciones 11-13 como antioxidante.

15. Producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de la reivindicación 11-13.

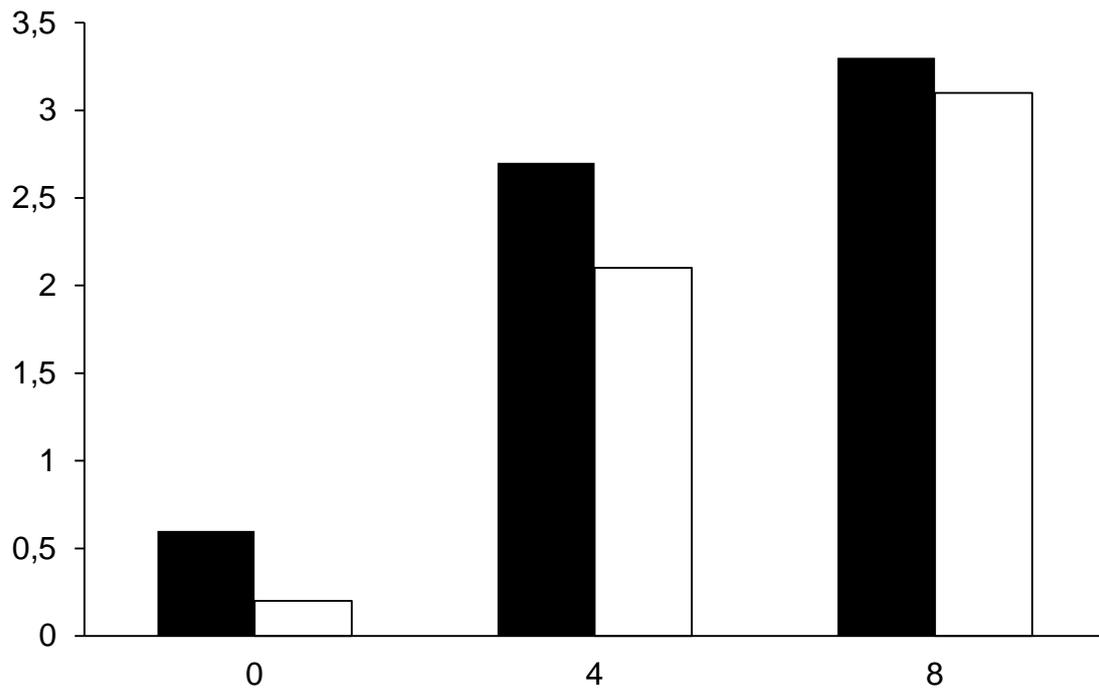


FIG. 1



- ②¹ N.º solicitud: 201530242
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 25.02.2015
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61K36/73** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GRUZ J et al. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (<i>Mespilus germanica L.</i>) fruit at different stages of ripening. FOOD CHEMISTRY, 2011. Elsevier VOL: 124 No: 1 Págs: 271-277, resumen, materiales y métodos.	1-5,7,9,11,14,15
X	GULCIN I et al. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (<i>Mespilus germanica L.</i>). Records of Natural Products. 2011. VOL: 5 No: 3 Págs: 158-175, resumen, materiales y métodos.	1,2,5,11,14,15
A	DINCER BARBAROS et al. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (<i>Mespilus germanica L.</i> , <i>Rosaceae</i>). Food Chemistry. 2002. VOL: 77 No: 1 Págs:1-7, resumen.	1-15

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:

<p>Fecha de realización del informe 27.08.2015</p>	<p>Examinador I. Rueda Molíns</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

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, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.08.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-5, 7, 9, 11, 14 y 15	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	GRUZ J et al. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (<i>Mespilus germanica L.</i>) fruit at different stages of ripening. FOOD CHEMISTRY. VOL: 124 No: 1 Págs: 271-277	2011
D02	GULCIN I et al. Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (<i>Mespilus germanica L.</i>). Records of Natural Products. VOL: 5 No: 3 Págs: 158-175	2011
D03	DINCER BARBAROS et al. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (<i>Mespilus germanica L.</i> , Rosaceae). Food Chemistry. VOL: 77 No: 1 Págs: 1-7	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**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 LP11/86)**

En las reivindicaciones 1-10, de la solicitud de patente, se reivindica un procedimiento de obtención de un extracto de semillas de níspero que comprende las siguientes etapas: a) triturar las semillas de níspero hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 0,1 mm y 10 mm; b) añadir al triturado de semillas obtenido en la etapa a) un disolvente (seleccionado entre: agua, agua acidificada, un alcohol C1-C6 y mezcla de los mismos); c) agitar la mezcla del triturado y del disolvente a una temperatura comprendida entre los 20°C y los 28°C durante un tiempo de 30 min a 210 min; d) separar las dos fases formadas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto; e) filtrar el sobrenadante obtenido en la etapa anterior; f) destilar el sobrenadante obtenido en la etapa d) o tras la etapa e) del filtrado; g) liofilizar el sobrenadante obtenido en la etapa d) o el filtrado de la etapa e) o el destilado de la etapa f). La relación entre el triturado de hoja y el disolvente está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen) y la relación entre el agua y el alcohol C1-C6 está comprendida entre 40:60 v/v y 60:40 v/v.

En las reivindicaciones 11-13, de la solicitud de patente, se reivindica un extracto de semillas de níspero obtenido por el procedimiento anteriormente mencionado que presenta un contenido en fenoles totales comprendidos entre 1 y 3,5 mg Eq ácido gálico/g de muestra y un contenido en flavonoides comprendido entre 0,3 y 2 mg Eq catequina/g de muestra.

En la reivindicación 14, de la solicitud de patente, se reivindica el uso del extracto de semillas de níspero anteriormente mencionado como antioxidante.

En la reivindicación 15, de la solicitud de patente, se reivindica un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto reivindicado.

El documento D01 divulga (ver resumen y apartado de materiales y métodos) un procedimiento de obtención de un extracto de níspero que comprende las etapas de: triturar la fruta, añadir metanol como disolvente, agitar la mezcla obtenida y concentrarla. El extracto obtenido por dicho procedimiento es rico en antioxidantes. La diferencia fundamental entre el procedimiento reivindicado en la solicitud de patente y el procedimiento que refleja el documento D01, reside en que en el procedimiento que muestra el documento D01, el extracto que se realiza es partiendo de la fruta completa, en cambio en el procedimiento reivindicado en la solicitud de patente, lo que se quiere realizar es un extracto únicamente de las semillas de níspero, por ello solamente emplea esta parte del fruto y realiza las mismas etapas que comprende el procedimiento que muestra el documento D01, lo cual resultaría evidente para un experto en la materia.

El documento D02 refleja (ver resumen y apartado de materiales y métodos) otro procedimiento de obtención de un extracto de níspero, que comprende las mismas etapas que el procedimiento objeto de la invención, pero que, también emplea la fruta completa. El extracto obtenido por este procedimiento es acuoso y presenta propiedades antioxidantes. Por ello, teniendo en cuenta la información reflejada en el documento D02, el procedimiento reivindicado en la solicitud de patente es nuevo, pero no presenta actividad inventiva, ya que resultaría evidente para un experto en la materia.

Por tanto, teniendo en cuenta los documentos D01 y D02 las reivindicaciones 1-5, 7, 9, 11, 14 y 15 de la solicitud de patente presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.