

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 585**

21 Número de solicitud: 201530240

51 Int. Cl.:

**A61K 36/49** (2006.01)

**A23L 33/105** (2006.01)

**A61K 8/97** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**25.02.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**06.09.2016**

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, Víctor Jesús y  
LADERO GARCÍA, Luis**

54 Título: **Procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota, extracto obtenido y su uso**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota, al extracto de pulpa de bellota obtenible por dicho procedimiento, a su uso, en particular como antioxidante, y a un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende dicho extracto.

ES 2 581 585 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota, extracto obtenido y su uso

5

### **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la obtención de antioxidantes naturales. En concreto, se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota, al extracto obtenible por dicho procedimiento y a su uso, en particular como antioxidante.

10

### **Antecedentes de la invención**

La protección frente al deterioro oxidativo de diversos tipos de alimentos es una preocupación patente en la industria alimentaria.

15

Los antioxidantes pueden actuar de diversas formas durante la oxidación, como por ejemplo secuestrando iones metálicos, captando radicales libres, actuando como agentes reductores, descomponiendo peróxidos, etc.. En sistemas alimentarios la oxidación implica la oxidación de los lípidos, mientras que en sistemas in vivo los radicales libres pueden dañar además proteínas, ADN y otras moléculas.

20

Como antioxidantes se vienen empleando en la industria alimentaria compuestos sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) o butilhidroxianisol (BHA). 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 los alimentos y aditivos alimentarios sintéticos y la sensación del público de que los alimentos y los aditivos alimentarios naturales proporcionan 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. El término polifenoles se refiere a compuestos aromáticos que contienen al menos dos grupos hidroxifenólicos en la molécula. Dentro de este grupo de compuestos se incluyen los flavonoides, grupo heterogéneo de polifenoles vegetales (existen más de 4000) que comparten una estructura de benzopirano. Los flavonoides constituyen pigmentos (colores naranja, rojo y azul) de diversos vegetales (flores, frutos, hojas) y son importantes factores para el crecimiento, desarrollo y protección

30

35

de las plantas. Los principales flavonoides con actividad antioxidante presentes en vegetales son: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y los correspondientes ésteres del ácido gálico: galato de (-)-epicatequina y galato de (-)-epigallocatequina.

5 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. Se han realizado estudios que incluyen la identificación de compuestos polifenólicos activos en bagazo de  
10 manzana, semillas y pieles de cítricos, subproductos del coco.

La bellota es el fruto característico de las especies del género *Quercus*. Dentro de este género hay numerosas especies que dan bellotas, como pueden ser la encina, el roble o el alcornoque. Este tipo de árbol es común en el oeste de la península ibérica donde se  
15 concentra la mayor superficie de dehesa. La maduración de la bellota se produce en otoño-invierno proporcionando un importante recurso alimentario a la fauna silvestre y doméstica. Especial atención requiere la utilización de bellotas como alimento para ganado porcino, especie que ha sabido obtener mayor aprovechamiento de los valores nutricionales de la bellota al pelarla antes de su consumo. Esta peculiaridad ha hecho que la bellota se reserve  
20 preferentemente para el cerdo ibérico y que su cría en la dehesa se centre en su engorde con bellota (montanera), fundamentalmente de encina (*Quercus ilex*). La composición de la bellota varía de unos géneros a otros y a lo largo de su maduración. La utilización de bellota en la formulación de piensos así como su importancia en el engorde animal, ha situado a este fruto dentro de los más apreciados en el sector de la alimentación animal. Sin embargo,  
25 menor es su uso en el sector de la alimentación humana.

Con todo ello adquiere un interés especial la obtención de un extracto que englobe todas estas características, que sea natural, que presente actividad antioxidante, que pueda ser aplicado en alimentos y que preserve a los alimentos en los que se incluya de un deterioro  
30 oxidativo.

### **Objeto de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de  
35 un extracto de pulpa de bellota (procedimiento de la invención), que comprende las siguientes etapas:

a) Triturar la pulpa de bellota,

b) Añadir al triturado de la pulpa de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, agua acidificada, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y mezclas de los mismos,

5 c) Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases,

d) Separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

10 Asimismo, en un segundo aspecto, la presente la invención, se refiere a un extracto de pulpa de bellota obtenible por el procedimiento según el primer aspecto de la invención.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del extracto de pulpa de bellota según el segundo aspecto de la invención como antioxidante.

15 Por último, un cuarto aspecto de la invención se refiere a un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de pulpa de bellota según el segundo aspecto de la invención.

### **Descripción detallada de la invención**

20 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota, que comprende las siguientes etapas:

a) Triturar la pulpa de bellota,

25 b) Añadir al triturado de la pulpa de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, agua acidificada, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y mezclas de los mismos,

c) Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases,

d) Separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

30 Así, la primera etapa del procedimiento de la invención consiste en el triturado de la pulpa de la bellota. La pulpa de bellota puede separarse del resto de partes de la bellota, en particular de la cáscara, mediante medios manuales o mecánicos. En la etapa a), el triturado de la pulpa de bellota se lleva a cabo mediante medios manuales o mecánicos. En una  
35 realización particular, en la etapa a), el triturado de la pulpa se lleva a cabo hasta la obtención de partículas de un tamaño comprendido en 0,1 y 10 mm.

En la etapa b), las proporciones utilizadas de pulpa:disolvente pueden modificarse a fin de obtener extractos con mayor o menos concentración y por tanto con diferente actividad antioxidante. Preferentemente, la relación entre la pulpa de bellota triturada y el disolvente (pulpa:disolvente) está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen). En una realización preferente, en la etapa b) la proporción pulpa:disolvente es de 1:10 (peso:volumen).

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 a su afinidad por el disolvente. En una realización preferente, en la etapa b) el disolvente seleccionado es agua y de manera más preferente una mezcla de agua y un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

En el contexto de la presente invención, el término "alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un alcohol que puede tener de un carbono a seis carbonos en una cadena lineal o ramificada, con al menos una función hidróxido.

En una realización preferente del procedimiento de la invención, el disolvente es una mezcla de agua y un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y la relación agua:alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> está comprendida entre 20:80 y 80:20 (v:v), de manera más preferente está comprendida entre 30:70 y 70:30 (v:v) y de manera más preferente aún la relación agua:alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> es 50:50 (v:v).

En una realización particular del procedimiento de la invención según una cualquiera de las realizaciones particulares descritas en los párrafos anteriores, en la etapa b), el disolvente seleccionado es una mezcla de agua y etanol, donde la relación agua:etanol está comprendida entre 20:80 y 80:20 (v:v), de manera más preferente entre 30:70 y 70:30 (v:v) y de manera más preferente aún es 50:50 (v:v). La extracción llevada a cabo con una mezcla de agua y etanol en una proporción 50:50 es la que resulta en un extracto con un mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.

Las condiciones de temperatura, tiempo y exposición a la luz en la etapa c) pueden ajustarse en un rango en el que la obtención de compuestos con actividad antioxidante sea óptima evitando su degradación. Preferentemente la etapa c) se realiza a una temperatura comprendida entre 20°C y 28°C, preferentemente entre 22°C y 26°C, durante un tiempo de entre 30 y 210 minutos, preferentemente entre 100 y 150 minutos, y en condiciones de

luminosidad reducida, preferentemente oscuridad. En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones particulares descritas en los párrafos anteriores, la etapa c) se lleva a cabo en oscuridad, a una temperatura de 25°C y durante un tiempo de dos horas.

5 Mediante la agitación de la etapa c) se obtienen dos fases de la que se utiliza la fase sobrenadante que se separa de la fase sólida. En la etapa d), la separación de las dos fases formadas en la etapa c) para recoger el sobrenadante que comprende el extracto, se realiza mediante decantación o centrifugación o cualquier otro método que permita la diferenciación de las fases.

10

El sobrenadante recogido en la etapa d), que comprende el extracto de pulpa de bellota, puede comprender algún resto del triturado o impurezas, por lo que en una realización particular, el procedimiento de la invención según una cualquiera de las realizaciones particulares descritas en los párrafos anteriores, comprende una etapa e) de filtración del sobrenadante recogido en la etapa d). Asimismo, el sobrenadante recogido en la etapa d) o el filtrado obtenido en la etapa e) puede concentrarse mediante destilación y/o puede transformarse mediante liofilización o cualquier otra modificación que permita obtener un extracto que se adecue a las necesidades de aplicación. Así, en otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones particulares descritas en los párrafos anteriores, el procedimiento de la invención comprende una etapa f) de destilación del sobrenadante recogido en la etapa d) o del filtrado obtenido en la etapa e). Y en otra realización particular, el procedimiento de la invención según una cualquiera de las realizaciones particulares descritas anteriormente, comprende una etapa g) de liofilización del sobrenadante recogido en la etapa d) o del filtrado obtenido en la etapa e) o del destilado obtenido en la etapa f).

15

20

25 Dependiendo del extracto final, su conservación podrá realizarse en condiciones ambientales o requerirá almacenamiento a temperatura controlada en envase adecuado. En una realización particular, el extracto se conserva en condiciones de oscuridad y refrigeración.

30 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un extracto de pulpa de bellota obtenible por el procedimiento de la invención según una cualquiera de las realizaciones según el primer aspecto de la invención. En una realización preferente el extracto tiene un contenido en compuestos fenólicos comprendido entre 16 y 28 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. Preferentemente entre 23 y 28 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. En una realización preferente el extracto de la invención tiene un

35 contenido en compuestos flavonoides comprendido entre 1 y 3,1 mg equivalentes de

catequina por gramo de muestra. Preferentemente entre 2 y 3,1 mg equivalentes de catequina por gramo de muestra.

5 El extracto de la presente invención, obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, es eficaz como agente antioxidante y en la conservación de productos alimentarios, cosméticos y farmacéuticos. Así, un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del extracto de la pulpa de bellota según el aspecto segundo de la invención como antioxidante. Además, un cuarto aspecto de la invención, se refiere a un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto  
10 según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención.

La incorporación del extracto a un producto se realiza de múltiples formas, como mediante adición dentro de una formulación, mediante pulverización sobre el producto o cualquier otro método que permita la correcta distribución del extracto y su acción antioxidante. La  
15 concentración de extracto a utilizar viene determinada por factores propios del extracto, como la capacidad antioxidante, así como los atribuibles al producto alimentario tales como tipo de producto, contenido y tipo de grasa, concentración en anti- y pro-oxidantes, etc. Igualmente se deben tener en cuenta los procesos tecnológicos que puedan llevarse a cabo tras la adición del extracto así como las características de conservación de producto  
20 alimentario.

### **Ejemplos**

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que  
25 sirven para ilustrar la invención.

#### **Ejemplo 1. Obtención del extracto de la pulpa de bellota mediante la utilización de mezcla de disolventes.**

30 Para obtener el extracto se partió de la pulpa de bellotas (*Gen. Quercus*) obtenidas en dos etapas de maduración, verde y madura. La pulpa se obtuvo con la ayuda de un cuchillo separándolas de la cáscara de la bellota. Posteriormente se desmenuzaron 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.  
35 Así, se utilizó agua destilada, etanol y dos mezclas de agua:etanol en proporción 50:50 y 70:30 (vol:vol), que dieron lugar a cuatro extractos distintos para las distintas etapas de

5 maduración. Una proporción 1:10 (g:mL) de pulpa y disolvente empleado, presentó los mejores resultados en experiencias previas por lo que fue la que se utilizó. Las mezclas de disolvente y pulpa 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.

10 Ejemplo 2. Caracterización de cuatro extractos de pulpa de bellota mediante la cuantificación de su contenido en fenoles totales.

15 La cuantificación de fenoles totales de los extractos de pulpa de bellota se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Singleton y cols., (1999). 50 µL de cada uno de los extractos fueron depositados en un pocillo de placa microtiter al que se añadieron 20 µL del reactivo de Folin-Cicalteau y 50 µL 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 765 nm 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 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra y quedan reflejados en la Tabla 1.

20 Ejemplo 3. Caracterización de cuatro extractos de pulpa de bellota mediante la cuantificación de su contenido en flavonoides.

25 La cuantificación del contenido en flavonoides de los extractos obtenidos de la pulpa de bellota 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 µL de muestra se depositaron en tubo de ensayo a los que se añadieron 60 µL de  $NaNO_2$  al 10%, 60 µL de  $AlCl_3$  al 20% y 400 µL 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 1.

35 **Tabla 1.** Contenido en compuestos fenólicos totales (mg Eq ácido gálico/g de muestra) y contenido en flavonoides (mg Eq. catequina/g de muestra) de extractos de pulpa de bellota

obtenidos usando como disolvente: agua, etanol, mezcla agua:etanol 50:50 y mezcla agua:etanol 70:30.

	Método de extracción				SEM	Sig.
	Agua	Etanol	50:50	70:30		
<b>Compuestos fenólicos totales</b>	17,00 <sup>c</sup>	16,15 <sup>d</sup>	27,51 <sup>a</sup>	23,69 <sup>c</sup>	0,26	***
<b>Flavonoides</b>	2,15 <sup>b</sup>	1,19 <sup>c</sup>	3,04 <sup>a</sup>	1,41 <sup>b</sup>	0,21	***

n=5 determinaciones

Sig.: Nivel de significación prueba ANOVA; \*\*\*:  $p < 0,001$ . a, b, c, d: En la misma fila medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey,  $p < 0,05$ )

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de pulpa de bellota se realizaron siguiendo dos metodologías de reducción de radicales sintéticos, método FRAP (poder antioxidante reductor del hierro, del inglés *Ferric ion Reducing Antioxidant Power*) y método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), 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 contiene 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 cuatro extractos de pulpa de bellota 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 7nM y persulfato potásico 2,45 nM. 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 734 nm. 245  $\mu$ L de la disolución con el radical ABTS se depositaron en un pocillo de una placa microtiter y se midió su absorbancia a 734 nm. A continuación se añadieron 5 $\mu$ L del extracto a ensayar y, transcurrido un minuto, se repitió la medida a 734 nm. 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 2.

Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad antioxidante de cuatro extractos de pulpa de bellota 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 2,5 mL de una solución TPTZ 10 mM junto con 2,5 mL de una solución  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM y 25 mL de tampón acetato 0,3 mM y pH 3,6. Se realizó una lectura de absorbencia a 593 nm de 200 mL del reactivo FRAP a los que se añadieron posteriormente 7  $\mu\text{L}$  de extracto a ensayar realizándose medidas de absorbencia transcurridos 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 2.

**Tabla 2.** Capacidad antioxidante medida por el método ABTS y por el método FRAP (mg TEAC/g de muestra) de extractos de pulpa de bellota obtenidos usando como disolvente: agua, etanol, mezcla agua:etanol 50:50 y mezcla agua:etanol 70:30.

	<b>Método de extracción</b>				<b>SEM</b>	<b>Sig.</b>
	<b>Agua</b>	<b>Etanol</b>	<b>50:50</b>	<b>70:30</b>		
<b>ABTS</b>	25,33 <sup>b</sup>	24,67 <sup>b</sup>	44,07 <sup>a</sup>	29,45 <sup>b</sup>	2,31	***
<b>FRAP</b>	32,83 <sup>b</sup>	35,02 <sup>b</sup>	62,67 <sup>a</sup>	49,61 <sup>b</sup>	2,83	***

n=5 determinaciones

Sig.: Nivel de significación prueba ANOVA; \*\*\*:p<0,001. a, b: En la misma fila medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, p<0,05).

## REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) Tritura la pulpa de bellota,  
b) Añadir al triturado de la pulpa de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, agua acidificada, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y mezclas de los mismos,  
c) Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases,  
10 d) Separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende una etapa e) de filtración del sobrenadante recogido en la etapa d).

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende una etapa f) de destilación  
15 del sobrenadante recogido en la etapa d) o del filtrado obtenido en la etapa e).

4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una etapa g) de liofilización del sobrenadante recogido en la etapa d) o del filtrado obtenido en la etapa e) o del destilado obtenido en la etapa f).

5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde en la etapa a)  
20 la pulpa de bellota se tritura hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 0,1 mm y 10 mm.

6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la relación triturado de pulpa de bellota : disolvente está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen).

7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el disolvente  
25 seleccionado es una mezcla de agua y un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

8.- Procedimiento según la reivindicación 7, donde la relación agua: alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> está comprendida entre 20:80 y 80:20 (v:v).

9.- Procedimiento según la reivindicación 7 ó 8, donde el disolvente seleccionado en la  
30 etapa b) es una mezcla de agua y etanol.

10.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la etapa c) se lleva a cabo a entre 20 y 28°C, durante entre 30 y 210 minutos.

11.- Extracto de pulpa de bellota obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

35 12.- Extracto según la reivindicación anterior, que tiene un contenido en compuestos fenólicos comprendido entre 16 y 28 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

13.- Extracto según la reivindicación 11 ó 12, que tiene un contenido en compuestos flavonoides comprendido entre 1 y 3,1 mg equivalentes de catequina por gramo de muestra.

14.- Uso del extracto de pulpa de bellota según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 como antioxidante.

5 15.- Producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de pulpa de bellota según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201530240

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.02.2015

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	JP 2004359664 A (KOTOBUKI CHEM KK) 24.12.2004 & Resumen de base de datos WPI. Recuperado de EPOQUE; Número de acceso 2005-068433.	1,2,6-9,11
Y		12-15
Y	CANTOS E., ESPIN J C et al. Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns ( <i>Quercus</i> spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 2003, Vol. 51, nº 21, páginas 6248-6255. ISSN 0021-8561. Doi: 10.1021/jf030216v	1-15
Y	LEE J, HONG Y J et al. Inhibitory effects of Acorn extract on glutamate-induced calcium signaling in cultured rat hippocampal neurons. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> , 2013, Vol. 36, nº 3, páginas 331-338. ISSN 0918-6158. Doi: 10.1248/bpb.b12-00263. Recuperado de Internet: <URL: <a href="https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/3/36_b12-00263/_pdf">https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/3/36_b12-00263/_pdf</a>	1-11
A	TEJERINA D., GARCIA-TORRES, S. et al. Acorns ( <i>Quercus rotundifolia</i> Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. <i>Food Chemistry</i> , 2011, Vol. 124, nº 3, páginas 997-1004. ISSN: 0308-8146. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.058.	1,2,5-14
A	US 6667026 B1 (GOLDMAN G, LAPIDUS, M.) 23.12.2003, columna 4, líneas 45-61; columna 5, líneas 9-25.	1,2,7-9,11,14,15

#### 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:

Fecha de realización del informe  
21.12.2015

Examinador  
A. Sukhwani

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K36/49** (2006.01)

**A23L1/30** (2006.01)

**A61K8/97** (2006.01)

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

A61K, A23L

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

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, KOSMET, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.12.2015

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 3 - 5, 10, 12 - 15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 2, 6 - 9, 11	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1 - 15	<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.

#### Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota, que comprende las etapas (reivindicación 1):

- triturar la pulpa de bellota,
- añadir al triturado un disolvente seleccionado de agua, agua acidificada, alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y mezclas de los mismos,
- agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases,
- separar las dos fases y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

El procedimiento comprende una etapa e) de filtración del sobrenadante (reiv. 2), una f) de destilación del sobrenadante o del filtrado (reiv. 3), y una g) de liofilización del sobrenadante, filtrado o destilado (reiv. 4).

En la etapa a) se tritura la pulpa de bellota hasta tamaño de partícula de 0,1 mm y 10 mm (reiv. 5); la relación triturado: disolvente está comprendida entre 1:50 y 1:2 (peso: volumen) (reiv. 6). El disolvente es una mezcla de agua y un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (reiv. 7), en relación 20:80 y 80:20 (reiv. 8), siendo una mezcla de agua y etanol (reiv. 9).

La etapa c) se lleva a cabo entre 20 y 28°C, durante 30 a 210 minutos (reiv. 10).

También es objeto de protección el extracto de pulpa de bellota obtenible por el procedimiento (reiv. 11) que tiene un contenido en compuestos fenólicos comprendido entre 16 y 28 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (reiv. 12) y un contenido en compuestos flavonoides entre 1 y 3,1 mg equivalentes de catequina por gramos de muestra (reiv. 13).

Por último, es objeto de protección el uso del extracto de pulpa de bellota como antioxidante (reiv. 14) y el producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de pulpa de bellota (reiv. 15).

**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	JP 2004359664 A (KOTOBUKI CHEM KK)	24.12.2004
D02	CANTOS E., ESPIN J C et al. Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns ( <i>Quercus</i> spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 2003, Vol. 51, nº 21, páginas 6248-6255	2003
D03	LEE J, HONG Y J et al. Inhibitory effects of Acorn extract on glutamate-induced calcium signaling in cultured rat hippocampal neurons. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> , 2013, Vol. 36, nº 3, páginas 331-338	2013
D04	TEJERINA D., GARCIA-TORRES, S. et al. Acorns ( <i>Quercus rotundifolia</i> Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. <i>Food Chemistry</i> , 2011, Vol. 124, nº 3, páginas 997-1004	2011
D05	US 6667026 B1 (GOLDMAN G, LAPIDUS, M.)	23.12.2003

**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**

Los documentos **D01** a **D05** se refieren a extractos de bellota siendo el más relevante **D01**. En efecto:

- **D01** divulga una composición para la piel que comprende un extracto de la semilla de bellota, una vez que se le quita la cáscara y se somete a triturado, extracción con solución de etanol agua al 50%, agitado, centrifugado, se obtiene un sobrenadante que se filtra y se seca (resumen, ver ejemplo), coincidiendo las etapas del procedimiento de preparación del extracto de pulpa de bellota de la solicitud en estudio por lo que anticipa las reivindicaciones 1, 2, 6 - 9, 11.

Los otros documentos citados se refieren a extracto de endospermo (pulpa) de bellota pero no divulgan todas las etapas del procedimiento (**D02**) o bien divulgan las etapas para preparar un extracto de bellota sin especificar que sea la pulpa (**D03**) o son del estado de la técnica (**D04**, **D05**), por lo que no anticipan la invención.

Por ello, a la vista del documento D01, se puede concluir que las reivindicaciones **1, 2, 6 - 9, 11** carecen de novedad de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

**ACTIVIDAD INVENTIVA**

El procedimiento de obtención de un extracto de pulpa de bellota objeto de la invención, resulta evidente para el experto en la materia a la vista de los documentos **D01** a **D03**. En efecto:

- **D01** es relevante tanto para la novedad como para la actividad inventiva de las reivindicaciones afectadas. Pero además, los documentos **D02** y **D03** también son relevantes para el examen de la actividad inventiva de las otras reivindicaciones,

- **D02** divulga varias etapas del procedimiento para la extracción de compuestos fenólicos de pulpa (*endocarp*) de bellota como son el triturado, el disolvente metanol/agua en un 80:20, concentrado, filtrado así como la evaluación de la actividad antioxidante y cantidades de fenoles (página 6249) y la identificación de los compuestos fenólicos de la piel y endospermo de bellotas del género *Quercus* (página 6250); treinta y dos compuestos fenólicos se distinguen en los extractos metanólicos de bellotas de tres especies de *Quercus* (página 6251, columna 1; página 6252, Tablas 2, 3) y la capacidad antioxidante de estos polifenoles (página 6254). Las etapas no divulgadas sí están en el documento **D03**.

- **D03** menciona que el extracto de bellota contiene compuestos fenólicos como taninos, ácido gálico y muestra efectos antioxidantes, antibacterianos, etc. (página 331, columna 2), asimismo, sin especificar la parte de la bellota divulga las etapas del procedimientos de preparación del extracto de bellota que comprende triturado, extracción con etanol al 80%, filtrado del sobrenadante, liofilizados (página 332, columna 1).

A la vista de estos documentos citados el procedimiento reivindicado, el extracto y su utilización en productos alimentarios, cosméticos o farmacéuticos resulta obvio para el experto en la técnica. La variación del tamaño de partículas o los intervalos de fenoles y flavonoides son evidentes en este sector de la técnica.

Por ello, a la vista de los documentos D01-D03, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 15** carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.