

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 590**

21 Número de solicitud: 201530237

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 cascabello de bellota, extracto obtenido y su uso**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de un extracto de cascabello de bellota.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de cascabello de bellota, al extracto de cascabello 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 2 581 590 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de un extracto de cascabullo de bellota, extracto obtenido y su
5 uso

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

Los antioxidantes pueden actuar de diversas formas durante la oxidación, como por ejemplo
20 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.

25 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
30 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
35 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 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.

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 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 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, cuya cría en la dehesa se centra 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, partes del fruto como el cascabullo son despreciados al carecer de aporte nutritivo. El cascabullo de la bellota es la cúpula que sujeta el fruto a la rama, cuya composición es principalmente lignina y cuya composición apenas ha sido estudiada.

Con todo ello adquiere un interés especial la obtención de un extracto que englobe todas estas características, que sea natural, que se obtenga de una parte no aprovechada de un fruto 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 oxidativo.

Objeto de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de

un extracto de cascabello de bellota (procedimiento de la invención), que comprende las siguientes etapas:

a) Triturar el cascabello de bellota,

b) Añadir al triturado del cascabello de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, agua acidificada, alcohol C₁-C₆ 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.

Asimismo, en un segundo aspecto, la presente la invención, se refiere a un extracto de cascabello 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 cascabello de bellota según el segundo aspecto de la invención como antioxidante.

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

Descripción detallada de la invención

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

a) Triturar el cascabello de bellota,

b) Añadir al triturado del cascabello de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, agua acidificada, alcohol C₁-C₆ 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.

Así, la primera etapa del procedimiento de la invención consiste en el triturado del cascabello de la bellota. El cascabello de bellota puede separarse del resto de partes de la bellota mediante medios manuales o mecánicos. En la etapa a), el triturado del cascabello de bellota se lleva a cabo mediante medios manuales o mecánicos. En una realización

particular, en la etapa a), el triturado del cascabullo se lleva a cabo hasta la obtención de partículas de un tamaño comprendido en 0,1 mm y 10 mm.

En la etapa b), las proporciones utilizadas de cascabullo:disolvente pueden modificarse a fin de obtener extractos con mayor o menos concentración y por tanto con diferente actividad antioxidante. Preferentemente, la relación entre el cascabullo de bellota triturado y el disolvente (cascabullo:disolvente) está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen). En una realización preferente, la proporción cascabullo: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 una mezcla de agua y un alcohol C₁-C₆.

En el contexto de la presente invención, el término “alcohol C₁-C₆” 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 C₁-C₆ y la relación agua:alcohol C₁-C₆ 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 C₁-C₆ 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.

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.

El sobrenadante recogido en la etapa d), que comprende el extracto de cascabullo 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). 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.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un extracto de cascabullo 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 35 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. Preferentemente entre 23 y 31 mg equivalentes de ácido

gálico por gramo de muestra. En una realización preferente el extracto de la invención tiene un contenido en compuestos flavonoides comprendido entre 6 y 13 mg equivalentes de catequina por gramo de muestra. Preferentemente entre 8 y 12,1 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, resulta 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 del cascabullo 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 según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención.

10

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 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 alimentario.

15

20

Ejemplos

25

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

Ejemplo 1. Obtención del extracto de cascabullo de bellota mediante la utilización de mezcla de disolventes.

30

Para obtener el extracto se partió del cascabullo de bellotas (*Gen. Quercus*) obtenido en la propia dehesa. Los cascabullos fueron desmenuzados 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 dos mezclas de agua:etanol en proporción 50:50 y 70:30 (vol:vol), que dieron lugar a cuatro extractos distintos. Una proporción 1:10 (g:mL) de cascabullo y

35

disolvente empleado, presentó los mejores resultados en experiencias previas por lo que fue la que se utilizó. Las mezclas de disolvente y cascabello 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.

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

La cuantificación de fenoles totales de los extractos de cascabello 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.

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

La cuantificación del contenido en flavonoides de los extractos obtenidos del cascabello 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 equivalentes de catequina por gramo de muestra y quedan reflejados en la Tabla 1.

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 cascabello 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		
Compuestos fenólicos totales	22,66 ^b	18,24 ^c	30,51 ^a	23,22 ^b	0,27	***
Flavonoides	6,67 ^b	8,68 ^b	12,05 ^a	8,53 ^b	1,13	***

n=5 determinaciones

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

5

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de cascabello 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 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).

15

Ejemplo 4. Evaluación de la capacidad antioxidante de cuatro extractos de cascabello 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 μ 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 μ 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.

25

Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad antioxidante de cuatro extractos de cascabello de bellota mediante el método FRAP.

30

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 μL 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 cascabello 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		
ABTS	32,82 ^b	48,09 ^a	32,86 ^b	31,67 ^b	2,54	***
FRAP	31,62 ^b	61,71 ^a	46,52 ^b	42,43 ^b	3,78	***

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 cascabello de bellota, que comprende las siguientes etapas:

5 a) Triturar el cascabello de bellota,

b) Añadir al triturado del cascabello de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, agua acidificada, alcohol C₁-C₆ 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 del sobrenadante recogido en la etapa d) o del filtrado obtenido en la etapa e).

15 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) el cascabello 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 cascabello de bellota : disolvente está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen).

25 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el disolvente seleccionado es una mezcla de agua y un alcohol C₁-C₆.

8.- Procedimiento según la reivindicación 7, donde la relación agua: alcohol C₁-C₆ está comprendida entre 20:80 y 80:20 (v:v).

9.- Procedimiento según la reivindicación 7 ó 8, donde el disolvente seleccionado en la 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 cascabello 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 35 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 6 y 13 mg equivalentes de catequina por gramo de muestra.

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



- ②① N.º solicitud: 201530237
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.02.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	LEE J, HONG Y J et al. Inhibitory effects of Acorn extract on glutamate-induced calcium signaling in cultured rat hippocampal neurons. Biol. Pharm. Bull., 2013, Vol. 36, nº 3, páginas 331-338. ISSN 0918-6158. Doi: 10.1248/bpb.b12-00263. Recuperado de Internet: <URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/36/3/36_b12-00263/_pdf	1-11,14,15
Y	CANTOS E., ESPIN J C et al. Phenolic Compounds and Fatty Acids from Acorns (Quercus spp.), the Main Dietary Constituent of Free-Ranged Iberian Pigs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, Vol. 51, nº 21, páginas 6248-6255. ISSN 0021-8561. Doi: 10.1021/jf030216v	1-11,14,15
A	YARANI, R. MANSOURI K. et al. In vitro inhibition of angiogenesis by hydroalcoholic extract of oak (Quercus infectoria) acorn shell via suppressing VEGF, MMP-2 and MMP-9 secretion. Pharmaceutical Biology, 2013, Vol. 51, nº 3, páginas 361-368. ISSN 1388-0209. Doi:10.3109/13880209.2012.729147	1-15
A	TEJERINA D., GARCIA-TORRES, S. et al. Acorns (Quercus rotundifolia Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montanera" feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. Food Chemistry, 2011, Vol. 124, nº 3, páginas 997-1004. ISSN: 0308-8146. Doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.058	1-14

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
11.12.2015

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: 11.12.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Reivindicaciones 1 - 15
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 12, 13
Reivindicaciones 1 - 11, 14, 15

SI
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.

Consideraciones:

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

- triturar el cascabullo,
- añadir al triturado un disolvente seleccionado de agua, agua acidificada, alcohol C1-C6 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 el cascabullo 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 C1-C6 (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 cascabullo de bellota obtenible por el procedimiento (reiv. 11) que tiene un contenido en compuestos fenólicos comprendido entre 16 y 35 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (reiv. 12) y un contenido en compuestos flavonoides entre 6 y 13 mg equivalentes de catequina por gramos de muestra (reiv. 13).

Por último, es objeto de protección el uso del extracto de cascabullo de bellota como antioxidante (reiv. 14) y el producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de cascabullo 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	LEE J, HONG Y J et al. Inhibitory effects of Acorn extract on glutamate-induced calcium signaling in cultured rat hippocampal neurons. Biol. Pharm. Bull., 2013, Vol. 36, nº 3, páginas 331-338.	2013
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. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, Vol. 51, nº 21, páginas 6248-6255.	2003
D03	YARANI, R. MANSOURI K. et al. In vitro inhibition of angiogenesis by hydroalcoholic extract of oak (<i>Quercus infectoria</i>) acorn shell via suppressing VEGF, MMP-2, and MMP-9 secretion. Pharmaceutical Biology, 2013, Vol. 51, nº 3, páginas 361-368.	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. Food Chemistry, 2011, Vol. 124, nº 3, páginas 997-1004.	2011

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 **D04** se refieren a extractos de bellota, siendo el más relevante **D01** que comprende todas las etapas del procedimiento si bien, no hace alusión a la preparación de un extracto partiendo del cascabullo de la bellota, por lo que **D01** no anticipa la invención.

Los otros documentos citados se refieren la preparación de un extracto de distintas partes (*endocarp, skin, shell*) de la bellota (**D02**), o al procedimiento de preparar un extracto de la cáscara de bellota (**D03**) o de la pulpa de bellota (**D04**), pero ninguno de ellos divulga la utilización del cascabullo.

Por ello, a la vista del documento D01 a D04, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 15** tienen novedad de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El procedimiento de obtención de un extracto de cascabullo de bellota objeto de la invención resulta evidente para el experto en la materia a la vista de los documentos **D01** y **D02**. En efecto:

- **D01** 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) y que contiene compuestos fenólicos como taninos, ácido gálico y muestra efectos antioxidantes, antibacterianos, etc. (página 331, columna 2), como se refiere al extracto de bellota en general se considera un documento relevante para el examen de la actividad inventiva del procedimiento reivindicado si, además, se tiene en cuenta el documento **D02**, así:

- **D02** divulga varias etapas del procedimiento para la extracción de compuestos fenólicos de distintas partes de bellotas (*endosperm, skin, shell*) del género *Quercus* (página 6250) 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 treinta y dos compuestos fenólicos 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).

Todas las etapas del procedimiento reivindicado están divulgadas para el caso general de preparar extracto de bellota (**D01**) y varias etapas del procedimiento para distintas partes de la bellota (**D02**) así como la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos obtenidos.

Para el experto en la técnica para obtener un extracto del cascabullo de la bellota resulta obvio utilizar las mismas etapas del procedimiento divulgado en **D01** y evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos obtenidos en **D02** así como la utilización en productos alimentarios, cosméticos o farmacéuticos.

Por ello, a la vista de los documentos D01 y D02, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 11, 14, 15** carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.