

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 591**

21 Número de solicitud: 201530238

51 Int. Cl.:

A61K 36/49 (2006.01)

A23L 33/105 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.09.2016

71 Solicitantes:

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

72 Inventor/es:

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

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un extracto natural de cáscara de bellota, extracto obtenido y su uso**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de un extracto de cáscara de bellota, extracto obtenido y su uso.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de cáscara de bellota que comprende a) triturar la cáscara, b) añadir al triturado de la cáscara obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos, c) agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases, y d) separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto. Asimismo, se refiere al extracto de cáscara de bellota obtenible por dicho procedimiento y a su uso como antioxidante.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de un extracto natural de cáscara de bellota, extracto obtenido y su uso.

5 Objeto 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 cáscara de bellota, al extracto obtenido por ese 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. Los antioxidantes pueden actuar de
15 diversas formas durante la oxidación (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 (Moure, A., Cruz, J. Franco, D., Domínguez, J.M., Sineiro, J. Domínguez, H., Núñez, M.J. y
20 Parajó, J.J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72:145-171).

Como antioxidantes se vienen empleando en la industria alimentaria compuestos sintéticos como butilhidroxitolueno (BHT) o butilhidroxianisol (BHA). Sin embargo existe un creciente
25 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 y aditivos alimentarios sintéticos y la sensación del público de que la comida y los aditivos alimentarios naturales proporcionan ciertos beneficios para la salud. La mayor parte de los compuestos
30 naturales con actividad antioxidante se encuentran en plantas, y muchos de ellos son de naturaleza polifenólica. El término polifenoles representa un nombre colectivo para compuestos aromáticos que contienen al menos dos grupos hidroxifenólicos en la molécula

(Römpp Lexikon Chemie, 10ª edición, 1999, editorial Georg Thieme, Stuttgart, página 3491). Dentro de este grupo de compuestos se incluyen los flavonoides, grupo heterogéneo de polifenoles vegetales (más de 4000) que comparten una estructura de benzopirano. Constituyen pigmentos (colores naranja, rojo y azul) de diversos vegetales (flores, frutos, 5 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 [Blot et al. Am. J. Cancer Prevention 62:1477-82, 1992].

10

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 15 realizado estudios que incluyen la identificación de compuestos polifenólicos activos en bagazo de manzana (Lu, Y. & Foo, L. Y.(1997). Identification and quantitation of mayor polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, 59, 187-194), semillas y pieles de cítricos (Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food* 20 *Chemistry*, 46, 2123-2129), subproductos del coco (Azizah, A. H., Nik Ruslawati, N. M., & Swee Tee, T. (1999). Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry*, 64, 199-202).

La bellota es el fruto característico de las especies del género *Quercus*. Dentro de este 25 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, 30 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 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 rotundifolia*). 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. La composición de la bellota varía de unos géneros a otros y a lo largo de su maduración. Alrededor del 25% en peso del fruto corresponde a la cáscara cuya composición aporta un sabor amargo que hace que esta parte de la bellota sea despreciada convirtiéndola en un subproducto que no es aprovechado.

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 cáscara de bellota (procedimiento de la invención), que comprende las siguientes etapas:

- a) Triturar la cáscara de bellota,
- b) Añadir al triturado de la cáscara de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos,
- c) Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases, y
- 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 cáscara 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 cáscara 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 cáscara de bellota según el segundo aspecto de la invención.

5 **Descripción de la invención**

En base a las necesidades del estado de la técnica, los inventores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para la obtención de un extracto de cáscara de bellota con un alto contenido en polifenoles el cual comprende una etapa de extracción con un
10 disolvente. El extracto obtenido con el procedimiento de la invención presenta una alta actividad como antioxidante.

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

- 15 a) Triturar la cáscara de bellota,
- b) Añadir al triturado de la cáscara obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua (acidificada o no), alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos,
- c) Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases,
- 20 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 de la cáscara de bellota. La separación de la cáscara de la bellota se lleva a cabo mediante medios
25 manuales o mecánicos. En la etapa a), el triturado de la cáscara se lleva a cabo mediante medios manuales o mecánicos hasta la obtención de partículas de pequeño tamaño, preferiblemente comprendido entre 0,1 y 10 mm.

En la etapa b), las proporciones utilizadas de cáscara o disolvente pueden modificarse a fin
30 de obtener extractos con mayor o menor concentración y por tanto con diferente actividad antioxidante. Preferentemente, la relación entre la cáscara triturada y el disolvente (cáscara:disolvente) está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen). En

una realización particular, la proporción cáscara:disolvente es de 1:10 (g:mL).

La utilización de uno u otro disolvente influye en la cantidad de compuestos extraídos así como el tipo de compuesto con actividad antioxidante que se obtiene debido a las características de los mismos y 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 particular, en la etapa b), el disolvente seleccionado es una mezcla de agua destilada 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.

El término “compuestos fenólicos” 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.

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 se 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 entre 30 y 210 minutos, preferentemente entre 100 y 150 minutos, y en condiciones de luminosidad reducida, preferentemente oscuridad. En una realización particular, la etapa c) se lleva a cabo en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 25°C y durante un

tiempo de 2 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
5 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 cáscara de bellota,
10 puede comprender algún resto del triturado o impurezas, por lo que en una realización particular, el procedimiento de la invención comprende una etapa e) de filtración del sobrenadante recogido en la etapa d). Asimismo, el sobrenadante recogido en la etapa d) o filtrado en la etapa e) puede concentrarse mediante destilación o transformarse mediante liofilización o cualquier otra modificación que permita obtener un extracto que se adecue a
15 las necesidades de aplicación. Así, en otra realización particular, el procedimiento de la invención comprende una etapa f) de destilación del sobrenadante obtenido en la etapa d) o filtrado en la etapa e). Y en otra realización particular, el sobrenadante recogido en la etapa d), filtrado en la etapa e) o concentrado en la etapa f) es liofilizado (etapa g). Dependiendo del extracto final, su conservación podrá realizarse en condiciones ambientales o requerirá
20 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 cáscara de bellota obtenible por el procedimiento de la invención según una cualquiera de las realizaciones según el
25 primer aspecto de la invención. En una realización preferente el extracto tiene un contenido en compuestos fenólicos comprendido entre 27,5 y 45,0 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. Preferentemente entre 41,6 y 44,7 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 6,7 y 15,1 mg equivalentes de
30 catequina por gramo de muestra. Preferentemente entre 12,32 y 14,3 mg equivalentes de catequina por gramo de muestra.

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, con importantes aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Así, un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del extracto de cáscara 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 el 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 concentración de extracto a utilizar viene determinada por factores propios del extracto, como la capacidad antioxidante, así como los atribuibles al producto 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. Dependiendo del producto final, su conservación podrá realizarse en condiciones ambientales o requerirá almacenamiento a temperatura controlada en envase adecuado.

Ejemplos

A continuación se detalla a modo de ejemplo la obtención de cuatro extractos a partir de cáscara de bellota y su caracterización mediante contenido en fenoles totales y su contenido en flavonoides en dos estados madurativos de la bellota (verde y madura).

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

Para obtener el extracto se partió de la cáscara de bellotas (Gen. *Quercus*) obtenidas en la propia dehesa en dos etapas de maduración de la bellota, verde y madura. Las cáscaras fueron obtenidas con la ayuda de un cuchillo separándolas de la pulpa de la bellota. Posteriormente se desmenuzaron mediante picado 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 para las distintas etapas de maduración. Una proporción 1:10 (g:mL) de cáscara y disolvente empleado, presentó los mejores resultados en experiencias previas por lo que fue la que se utilizó. Las mezclas de disolvente y cáscara 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 cáscara de bellota en dos etapas de maduración mediante la cuantificación de su contenido en fenoles totales.

La cuantificación de fenoles totales de los extractos de cáscara de bellota se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Singleton y cols., (1999). 50uL de cada uno de los extractos fueron depositados en un pocillo de placa microtiter al que se añadieron 20uL del reactivo de Folin-Cicalteau y 50uL 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 realizadas 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.

Ejemplo 3. Caracterización de cuatro extractos de cáscara de bellota en dos etapas de maduración mediante la cuantificación de su contenido en flavonoides.

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

5

Tabla 1. Contenido en compuestos fenólicos (mg Eq ácido gálico/g de muestra) y contenido en flavonoides (mg Eq. catequina/g de muestra) de extractos (agua, etanol, mezcla agua:etanol 50:50 v/v y mezcla agua:etanol 70:30 v/v) de cáscara de bellota.

	Método de extracción				SEM	Sig.
	Agua	Etanol	50:50	70:30		
Compuestos fenólicos	41.60 b	28.21 d	44.71 a	39.20 c	0.33	***
Flavonoides	12.32 ab	7.46 c	14.31 a	11.88 b	0.75	***

10

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)

15 La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de bellota se realizaron siguiendo dos metodologías de reducción de radicales sintéticos, método FRAP y método ABTS, 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
20 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 cáscara de bellota mediante la utilización del radical ABTS.

25

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 /nM y persulfato potásico 2,45nM. 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. 245uL 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 5uL 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 2.

Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad antioxidante de cuatro extractos de cáscara 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 2,5ml 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 absorbencia a 593nm de 200mL del reactivo FRAP a los que se añadieron posteriormente 7uL 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 (mg TEAC/g de muestra) de extractos (agua, etanol, mezcla de agua:etanol 50:50 v/v, y mezcla de agua:etanol 70:30 v/v) de cáscara de bellota.

	Método de extracción				SEM	Sig.
	Agua	Etanol	50:50	70:30		
ABTS	58.14 b	42.33 c	80.22 a	73.34 a	2.71	***
FRAP	146.76 a	115.66 b	159.71 a	157.1 a	7.89	***

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, $p < 0,05$)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto de cáscara de bellota que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. Triturar la cáscara de bellota,
 - b. Añadir al triturado de la cáscara de bellota obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua (acidificada o no), alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos,
 - c. Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases, y
 - 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
15 destilación 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 cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde, en la etapa a),
20 la cáscara se tritura hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 0,1 y 10 mm.
6. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la relación triturado de cáscara:disolvente está comprendido entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen).
7. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el
25 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 u 8 donde el disolvente seleccionado en la etapa b) es una mezcla de agua y etanol.
- 30 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la etapa c) se lleva a cabo a entre 20 y 28°, durante 30 y 210 minutos.
11. Extracto de cáscara de bellota obtenible por el procedimiento según una cualquiera

de las reivindicaciones 1-10.

12. Extracto de cáscara de bellota según la reivindicación 11, caracterizado porque tiene un contenido en fenoles totales comprendido entre 27,5 y 45,0 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra.

5 13. Extracto de cáscara de bellota según la reivindicación 11 ó 12 caracterizado porque tiene un contenido en flavonoides comprendido entre 6,7 y 15,1 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra.

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

10 15. Producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de cáscara de bellota de las reivindicaciones 11-13.



- ②① N.º solicitud: 201530238
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
X	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.	1,2,4,6-9,11,14,15
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.	1-15
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	1-15
A	CN 102660290 A (UNIV NORTHEAST FORESTRY) 12.09.2012 & Resumen de base de datos EPODOC. Recuperado de EPOQUE; Número de acceso CN-201210127288-A.	1-6,11,14,15

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
16.12.2015

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: 16.12.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Reivindicaciones 3, 5, 10, 12, 13

SI

Reivindicaciones 1, 2, 4, 6 - 9, 11, 14, 15

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1 - 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.

Consideraciones:

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

- triturar la cáscara de bellota,
- 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 la cáscara 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 cáscara de bellota obtenible por el procedimiento (reiv. 11) que tiene un contenido en compuestos fenólicos comprendido entre 27,5 y 45 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (reiv. 12) y un contenido en compuestos flavonoides entre 6,7 y 15,1 mg equivalentes de catequina por gramos de muestra (reiv. 13).

Por último, es objeto de protección el uso del extracto de cáscara de bellota como antioxidante (reiv. 14) y el producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de cáscara 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	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
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	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
D04	CN 102660290 A (UNIV NORTHEAST FORESTRY)	12.09.2012

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**. En efecto:

- **D01** divulga la preparación de un extracto hidroalcohólico de la corteza de bellota de *Quercus* con triturado, extracción hidroalcohólica con 50% de etanol, agitación, filtración, concentración de sobrenadante y liofilizado (página 362, columna 2) y su efecto antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano, citotóxico (páginas 362, 364, 365, 367), coincidiendo las etapas reivindicadas por lo que anticipa el procedimiento y la utilización de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6-9, 11, 14, 15 de la solicitud en estudio.

Los otros documentos citados se refieren a extracto de cáscara 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 cáscara (**D03**) o es del estado de la técnica (**D04**), por lo que no anticipan la invención.

Por ello, a la vista del documento D01, se puede concluir que las reivindicaciones **1, 2, 4, 6 - 9, 11, 14, 15** carecen de novedad de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El procedimiento de obtención de un extracto de cáscara 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 no solo para la novedad sino 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. Así,

- **D02** divulga varias etapas del procedimiento para la extracción de compuestos fenólicos de cáscara (*skin, shell*) 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 (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 y que contiene compuestos fenólicos (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.