

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 041 496**

21 Número de solicitud: 202430359

51 Int. Cl.:

**A23B 2/733** (2015.01)

**A23L 33/105** (2006.01)

**C12G 3/055** (2009.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**07.05.2024**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**12.11.2025**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (50.00%)  
Pazo de San Xerome s/n  
15520 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y  
I-GRAPE LABORATORY, S.L. (50.00%)**

72 Inventor/es:

**LORES AGUÍN, Marta;  
DE MIGUEL BOUZAS, Trinidad;  
CELEIRO MONTERO, María;  
CASTILLO ZAMORA, Aly Jesús;  
GONZÁLEZ IGLESIAS, Diego;  
VERDE GÓMEZ, Juan José;  
ALONSO GÓMEZ, David;  
FACORRO SOUTO, Rocío y  
RUBIO LAREU, Laura**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **EXTRACTO DE UVA BLANCA Y USOS DEL MISMO**

57 Resumen:

Extracto de uva blanca y usos del mismo.

La presente invención se relaciona con un extracto de uva blanca rico en polifenoles y un procedimiento para la obtención de dicho extracto. El extracto presenta actividad antimicrobiana y antioxidante, por lo que la invención se relaciona además con un aditivo conservante para la industria alimentaria que comprende dicho extracto.

ES 3 041 496 A1

## DESCRIPCIÓN

### EXTRACTO DE UVA BLANCA Y USOS DEL MISMO

#### Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de conservantes, en particular  
5 antioxidantes y antimicrobianos útiles en la conservación de alimentos.

#### Antecedentes de la invención

Más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de  
microorganismos. Los alimentos en mal estado pueden llegar a ser extremadamente  
10 venenosos y perjudiciales para la salud de los consumidores, un ejemplo de esto es la toxina  
botulínica generada por la bacteria *Clostridium botulinum* que se encuentra presente en las  
conservas mal esterilizadas y embutidos, así como en otros productos envasados.

Los conservantes utilizados como aditivos alimentarios ayudan a mantener los alimentos en  
buen estado de conservación. Entre los conservantes existen los antimicrobianos y los  
15 antioxidantes. Los antimicrobianos inhiben el crecimiento de bacterias, levaduras o mohos,  
alteran la permeabilidad de las membranas o paredes celulares, o directamente destruyen el  
material genético. Los conservantes antioxidantes retardan la oxidación de grasas por el aire,  
o inhiben los procesos enzimáticos que continúan ocurriendo en los alimentos después de la  
cosecha, procesado o envasado.

20 Ejemplos de antimicrobianos incluyen el ácido propiónico, los benzoatos, los parabenos, y los  
nitritos y nitratos. El ácido propiónico se encuentra de manera natural, entre otras fuentes, en  
las fresas, las manzanas, las hojas de violeta, los cereales o el queso. Este ácido es eficaz  
contra los mohos del pan y las esporas de la bacteria *Bacillus mesentericus*. Los benzoatos  
se encuentran de manera natural, entre otras fuentes, en los arándanos. No obstante, estos  
25 compuestos funcionan mejor a un pH bajo, en un rango que excluye el crecimiento bacteriano,  
y por eso se usan principalmente como antifúngicos. Los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico,  
también conocidos como parabenos, son similares al ácido benzoico pero eficaces a un pH  
más alto. Por esta razón, muchas bebidas, mermeladas, productos encurtidos, ensaladas,  
quesos, carnes y margarinas contienen benzoatos o sorbatos. Los nitritos y nitratos son la  
30 principal defensa química de la industria alimentaria contra la bacteria *Clostridium botulinum*.  
Sin embargo, los nitritos reaccionan con los aminoácidos para formar agentes cancerígenos,  
las nitrosaminas.

El dióxido de azufre es un conservante de uso común. Sus compuestos relacionados, los sulfitos, se encuentran en alimentos, bebidas alcohólicas (especialmente vinos) e incluso en medicamentos. Además de su acción antimicrobiana, el dióxido de azufre inhibe las reacciones de degradación en las frutas, al bloquear tanto reacciones enzimáticas (p.e., polifenol oxidasa, responsable del color oscuro en la superficie recién cortada de una manzana) como reacciones no enzimáticas entre los azúcares reductores y los aminoácidos. Sin embargo, aproximadamente entre el 1% y el 2% de las personas tendrán una reacción alérgica a los sulfitos, que puede consistir en congestión nasal y estornudos, urticaria o sibilancias y dificultad para respirar. Las personas que tienen asma y/o alergias a la aspirina son particularmente sensibles a los sulfitos e incluso podrían tener una reacción anafiláctica grave.

Ácidos como el ácido cítrico y el ácido ascórbico (vitamina C) y el ácido eritórbito también inhiben la polifenol oxidasa al hacer que el pH sea demasiado bajo para la enzima. Por otro lado, existen agentes quelantes de metales como el AEDT que pueden eliminar los cofactores metálicos que muchas enzimas necesitan. Los quelantes también dificultan el funcionamiento de las enzimas bacterianas y fúngicas de las plantas.

Las grasas y aceites en contacto con el aire, humedad y a cierta temperatura sufren cambios con el tiempo en su naturaleza química y en sus características organolépticas. La peroxidación lipídica es una forma de deterioro de los alimentos en general y se debe a la degradación oxidativa de los lípidos, conocida también como enranciamiento.

Dichos procesos de degradación oxidativa son causados por la interacción entre radicales libres y los lípidos presentes en los alimentos. Esto desencadena una reacción en cadena que conduce al proceso de oxidación en las grasas. Este proceso es acelerado en presencia de la luz, calor, humedad, otros ácidos grasos libres y ciertos catalizadores inorgánicos como las sales de hierro y cobre. Las grasas que han experimentado oxidación son de sabor y olor desagradable y parecen ser ligeramente tóxicas para algunas personas. El enranciamiento oxidativo, además destruye las vitaminas liposolubles, particularmente las vitaminas A y E (tocoferoles). El uso de antioxidantes en productos susceptibles a la peroxidación lipídica permite la interrupción o el control de este proceso. Al estabilizar los radicales libres, los antioxidantes detienen o reducen el proceso de peroxidación lipídica. La adición de antioxidantes a un sustrato susceptible de oxidación es un procedimiento eficaz para interrumpir o reducir considerablemente el proceso de peroxidación lipídica.

Otros antioxidantes que pueden añadirse incluyen hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), tert-butilhidroquinona (TBHQ) y galato de propilo (PG). Sin embargo, la legislación reguladora de los aditivos alimentarios ha establecido límites estrictos del uso de

dichos antioxidantes; además, existe un debate acerca de su seguridad, ya que parece que pueden ser cancerígenos, por ejemplo.

Por este motivo, el desarrollo de productos conservantes para alimentos con principios activos de origen natural se presenta como un enfoque de gran interés. Así, el uso de antioxidantes como los polifenoles (metabolitos secundarios de las plantas) para mejorar la conservación y la calidad de los alimentos es deseable y, por consiguiente, existe la necesidad de identificar fuentes baratas de polifenoles que puedan aplicarse a escala industrial. Concretamente, el orujo o bagazo de uva, el prensado de uvas que comprende principalmente la piel, pulpa residual, semillas y tallos, es una fuente importante de fitoquímicos naturales (WO2014013122A1). Estos fitoquímicos son metabolitos secundarios que juegan un importante papel en los mecanismos de defensa de las plantas, entre los que se incluyen los polifenoles. Los polifenoles tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, resultando útiles en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Además, el cultivo de uva es uno de los más abundantes en el mundo, generando gran cantidad de residuos que deben ser tratados, eliminados o reutilizados.

Como puede verse, existe una necesidad en la técnica de otros conservantes de alimentos, preferiblemente aquellos que derivan de productos naturales. Un objeto de la presente invención es proporcionar un conservante natural eficaz y seguro que sea estable y no afecte negativamente al sabor de los productos alimenticios, a base de extractos naturales de fuentes abundantes y sostenibles como las de origen vitivinícola, de seguridad alimentaria contrastada.

### **Breve descripción de la invención**

Los inventores de la presente invención han descubierto de manera sorprendente que es posible obtener, de manera sencilla, extractos de orujo de uva blanca empleando acetona como disolvente de extracción que, tras volatilización de la acetona, pueden emplearse como extractos acuosos que exhiben actividad conservante. Los inventores han desarrollado así formulaciones para aditivos alimentarios que comprenden extractos de uva blanca.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca, caracterizado porque comprende ácido gálico, ácido 2-4-6-trihidrobenczoico, ácido caftárico, procianidina B1, procianidina B2, procianidina C1, catequina, galato de epigallocatequina, epicatequina, galato de epicatequina, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol y quercetina.

Un segundo aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento para la obtención de un extracto de uva blanca caracterizado porque comprende las etapas de:

- a) Proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y opcionalmente un dispersante;
- 5      b) Someter la mezcla a una elución con acetona;
- c) Recoger el extracto de uva blanca obtenido tras la elución; y
- d) Eliminar la acetona.

Un tercer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca caracterizado porque es un extracto obtenible según el procedimiento de la invención.

- 10      Un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a un aditivo alimentario caracterizado porque comprende el extracto de uva blanca de la invención.

Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a un alimento que comprende el extracto de uva blanca de la invención, o que comprende el aditivo alimentario de la invención.

- 15      Un sexto aspecto de la presente invención se dirige al uso del extracto de uva blanca de la invención como conservante alimentario.

## **Descripción detallada de la invención**

### Extracto de uva blanca

- 20      Los extractos de orujo de uva blanca son ricos en polifenoles, presentando propiedades antimicrobianas y antioxidantes que pueden utilizarse como conservantes en la industria alimentaria. El principio activo de la invención es por tanto un extracto de uva blanca.

- 25      Así, un primer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca, caracterizado porque comprende ácido gálico, ácido 2-4-6-trihidrobenczoico, ácido caftárico, procianidina B1, procianidina B2, procianidina C1, catequina, galato de epigallocatequina, epicatequina, galato de epicatequina, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol y quercetina.

- 30      En una realización particular, el extracto de uva blanca es un extracto de orujo de uva blanca. El orujo de uva, o bagazo de uva, es el principal subproducto de la vinificación: el prensado de uvas que comprende principalmente la piel, pulpa residual, semillas y tallos. El extracto empleado en la presente invención se obtiene sometiendo el orujo (y opcionalmente orujos agotados) a un procedimiento de extracción, que es el procedimiento de la invención.

En una realización particular, la uva blanca se selecciona del grupo que consiste en albariño, albillo, arinto, chardonnay, chenin blanc, garnacha blanca, gewürztraminer, godello o gouveio, loureira, macabeo (o viura), malvasía, moscatel, müller-thurgau, riesling, roussanne, palomino, parellada, pedro ximénez, pinot blanc, sauvignon blanc, silvaner, semillón, tocai, trebbiano, treixadura, verdejo, viognier, xarel-lo, o mezclas. En una realización preferida, la uva se selecciona del grupo que consiste en albariño, arinto, godello o gouveio, loureira, treixadura, o mezclas. En una realización aún más preferida, la uva es albariño.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende un índice de polifenoles totales de entre 7000 y 45000 miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L), preferiblemente entre 10000 y 45000 miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L).

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende al menos una de las siguientes:

- una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenzoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto;
- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epigallocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto; y/o
- una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto, preferiblemente entre 10 y 20 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico igual o superior a 11, más preferiblemente igual o superior a 13 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido gálico igual o inferior a 19, más preferiblemente igual o inferior a 17 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto, preferiblemente entre 2 y 30 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico igual o superior a 3, más preferiblemente igual o superior a 4 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico igual o inferior a 10, más preferiblemente igual o inferior a 8 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,10 y 3,50 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico igual o superior a 0,20, más preferiblemente igual o superior a 0,40 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de ácido caftárico igual o inferior a 3,00, más preferiblemente igual o inferior a 2,00 mg/L de extracto.

En una realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto, preferiblemente entre 100 y 270 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 igual o superior a 105, más preferiblemente igual o superior a 110 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de procianidinas B1+B2+C1 igual o inferior a 230, más preferiblemente igual o inferior a 200 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto, preferiblemente entre 50 y 125 mg/L de extracto.

En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina igual o superior a 55, más preferiblemente igual o superior a 60 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de catequina igual o inferior a 120, más preferiblemente igual o inferior a 115 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,05 y 1,00 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epigallocatequina igual o superior a 0,10, más preferiblemente igual o superior a 0,20 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de

galato de epigallocatequina igual o inferior a 0,70, más preferiblemente igual o inferior a 0,50 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto, preferiblemente entre 10 y 140 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina igual o superior a 30, más preferiblemente igual o superior a 60 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de epicatequina igual o inferior a 130, más preferiblemente igual o inferior a 125 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto, preferiblemente entre 5 y 45 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina igual o superior a 10, más preferiblemente igual o superior a 13 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de galato de epicatequina igual o inferior a 40, más preferiblemente igual o inferior a 35 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto, preferiblemente entre 28 y 60 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido igual o superior a 30, más preferiblemente igual o superior a 32 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucurónido igual o inferior a 55, más preferiblemente igual o inferior a 45 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto, preferiblemente entre 2 y 5 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido igual o superior a 3 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-rutinósido igual o inferior a 4 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto, preferiblemente entre 30 y 120 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido igual o superior a 35, más



preferiblemente igual o superior a 40 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina-3-glucósido igual o inferior a 100, más preferiblemente igual o inferior a 60 mg/L de extracto.

- 5 En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,2 y 2,0 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una concentración de kaempferol igual o superior a 0,3, más preferiblemente igual o superior a 0,5 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de
- 10 uva blanca comprende una concentración de kaempferol igual o inferior a 1,5, más preferiblemente igual o inferior a 1,0 mg/L de extracto.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto, preferiblemente entre 0,3 y 15,0 mg/L de extracto. En una realización preferida de la anterior, el extracto de uva blanca comprende una

15 concentración de quercetina igual o superior a 0,4, más preferiblemente igual o superior a 0,5 mg/L de extracto. En otra realización preferida, compatible con las anteriores, el extracto de uva blanca comprende una concentración de quercetina igual o inferior a 12, más preferiblemente igual o inferior a 5 mg/L de extracto, aún más preferiblemente igual o inferior a 2 mg/L de extracto.

- 20 En una realización preferida, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto; y
- una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto.

- 25 En otra realización preferida, compatible con la anterior, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto; y
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto.

- 30 En una realización más preferida, el extracto de uva blanca comprende:

- una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto;
- una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto;

- una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
- una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de galato de epigallocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto;
- una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto;
- 5    - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
- una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto;
- una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto; y
- 10   - una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto.

En la presente invención, la expresión de transición “comprende” se emplea como expresión de tipo abierto, cuya interpretación es más amplia que cuando se emplea la expresión de tipo cerrado “consiste en”. Una reivindicación que incluya la expresión “consiste en” se limita únicamente a los elementos técnicos definidos en dicha reivindicación y no cabe interpretarla como englobando cualquier otro elemento. Por otro lado, una reivindicación que contiene la

15    expresión de tipo abierto “comprende”, debe interpretarse en el sentido más amplio, y puede incluir (o no) otros elementos técnicos que no se mencionen explícitamente, además de los definidos explícitamente, que son los elementos técnicos esenciales de la invención.

En una realización particular de todos los aspectos descritos en la presente memoria, y salvo

20    indicación expresa en contrario, el término “comprende” puede sustituirse por “consiste en”, en cuyo caso aplicarían las consideraciones del párrafo anterior.

En una realización particular, el extracto de uva blanca se caracteriza por la ausencia de antocianos. “Antocianos” se refiere a un grupo de polifenoles flavonoides que comprende el conjunto formado por antocianinas y antocianidinas, que también incluye las combinaciones

25    osídicas de una antocianidina con un azúcar. Son los responsables del color rojo azulado de la piel de las uvas tintas.

En otra realización particular, el extracto de uva blanca se caracteriza por un pH de entre 2 y 8 medido en disolución acuosa, preferiblemente entre 2 y 6, más preferiblemente entre 3 y 5 y aún más preferiblemente entre 4 y 5.

30    El extracto de uva de la invención tiene aplicación como conservante, preferiblemente como conservante alimentario debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Así, en una realización particular, el extracto se encuentra en disolución, en suspensión, en emulsión, o en forma sólida, como un polvo o una pasta (obtenible por ejemplo mediante liofilizado o secado por pulverización).

En una realización particular, el extracto exhibe una actividad antioxidante (mmol TE/L) igual o superior a 40, preferiblemente igual o superior a 50. En otra realización particular, compatible con la anterior, el extracto exhibe una actividad antioxidante (mmol TE/L) igual o inferior a 100, preferiblemente igual o inferior a 95. En una realización preferida, el extracto exhibe una actividad antioxidante (mmol TE/L) comprendida entre 40 y 100, preferiblemente entre 45 y 95, más preferiblemente entre 50 y 90, y aún más preferiblemente entre 55 y 85. En el contexto de la presente invención "TE" significa equivalentes del reactivo "Trolox", y la actividad expresada en mmol TE/L se determina utilizando el reactivo DPPH siguiendo el método descrito en la bibliografía (Symes, A.; Shavandi, A.; Zhang, H.; Ahmed, I. A. M.; Al-Juhaimi, F. Y.; Bekhit, A. E. D. A. *Antioxidant Activities and Caffeic Acid Content in New Zealand Asparagus (Asparagus Officinalis) Roots Extracts*. Antioxidants (Basel, Switzerland) 2018, 7 (4)).

En el procedimiento de extracción con acetona se puede añadir opcionalmente agua, pero el bagazo de uva empleado como materia prima para la extracción ya contiene humedad residual. Así, en una realización preferida, el extracto de uva de la invención es un extracto acuoso. El disolvente orgánico empleado en la extracción puede evaporarse, dejando como resultado un extracto de uva blanca que comprende agua. El experto en la materia entenderá que el disolvente orgánico puede evaporarse en su totalidad o parcialmente. En este contexto, en una realización particular de la anterior, el extracto comprende no más de un 20% de disolvente orgánico, no más de un 10% de disolvente orgánico, no más de un 5% de disolvente orgánico, no más de un 1% de disolvente orgánico, y preferiblemente no más de un 0,5% de disolvente orgánico. En una realización más preferida, el extracto de uva de la invención es un extracto que no contiene disolventes orgánicos. En una realización aún más preferida, el extracto de uva de la invención es un extracto que solo contiene agua como disolvente. En el caso de que no se añada agua durante el proceso, el extracto acuoso comprende agua que procede de la humedad residual del propio bagazo.

#### Procedimiento de obtención

El segundo aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento para la obtención de un extracto de uva blanca caracterizado porque comprende las etapas de:

- a) Proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y opcionalmente un dispersante;
- b) Someter la mezcla a una elución con acetona;
- c) Recoger el extracto de uva blanca obtenido tras la elución; y
- d) Eliminar la acetona.

El procedimiento de extracción que permite la obtención del extracto de la invención se lleva a cabo a partir del método descrito en WO 2014013122 A1, pero empleando acetona. Esta adaptación exhibe dos ventajas principales. Por un lado, el extracto obtenido comprende una composición polifenólica distinta, de gran utilidad como conservante. Por otro lado, el extracto  
5 obtenido puede ser fácilmente volatilizado, resultando en un extracto acuoso que puede emplearse directamente como aditivo alimentario.

En la presente invención, “dispersante” es un material sólido que puede mezclarse opcionalmente con el bagazo. El mezclado con una muestra biológica (como el bagazo) permite su disrupción y su dispersión en su superficie, de modo que la mezcla mecánica  
10 perturba la arquitectura de la muestra, rompiendo el material en pedazos de menor tamaño e incrementando la liberación de los compuestos químicos presentes en el interior de las células vegetales de la muestra.

En una realización particular de la etapa (a), el orujo de uva blanca se proporciona previamente triturado.

En una realización particular, la etapa (a) del procedimiento comprende proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y un dispersante. Preferiblemente, el dispersante se selecciona de entre el grupo constituido por arena, florisil, C18, alúmina y sílica gel. Más preferiblemente, el dispersante es arena, aún más preferiblemente arena de origen natural. En una realización particular el tamaño del grano del dispersante se selecciona de entre 100  
20  $\mu\text{m}$  y 1 mm, preferiblemente de entre 250  $\mu\text{m}$  y 320  $\mu\text{m}$ .

En una realización particular, la etapa (a) del procedimiento comprende proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y un dispersante, en donde la proporción (en masa) de dispersante:orujo está comprendida entre 0,5:1 y 1:10, preferiblemente entre 0,5:1 y 1:7, más preferiblemente entre 0,5:1 y 1:5 y aún más preferiblemente entre 0,8:1 y 1:5.

En el caso de comprender un dispersante, la preparación de la mezcla en la etapa (a), que comprende residuo de uva blanca y un dispersante, se puede llevar a cabo utilizando un mortero (vidrio, porcelana, ágata), un disruptor de cuchillas, un equipo de molienda, un triturador, un tambor rotatorio o cualquier otro dispositivo que permita triturar y homogeneizar la mezcla mecánicamente.

En una realización particular, la etapa (a) transcurre en un rango de temperaturas de entre 10 °C y 40 °C. En otra realización particular, la etapa (a) transcurre a presión atmosférica. Estas realizaciones permiten evitar riesgos de degradación de los compuestos a extraer.

En una realización particular, el dispersante y el orujo se mezclan a una temperatura de entre 10 y 40 °C y/o a una presión de entre 0,8-1,2 atm.

En una realización particular, el disolvente de la etapa (b) está en una proporción de entre 0,2 y 10 volúmenes de disolvente respecto al peso de la mezcla que comprende orujo de uva blanca y, si está presente, el dispersante, preferiblemente de entre 0,2 y 6.

5 En una realización particular, la etapa (b) incluye mantener el disolvente en contacto con la mezcla entre 1 y 72 horas, preferiblemente entre 24 y 72 horas, más preferiblemente entre 48 y 72 horas. En otra realización particular, esta etapa se lleva a cabo a una temperatura de entre 10 °C y 40 °C.

En otra realización particular, el disolvente de extracción que comprende acetona comprende además un disolvente seleccionado del grupo que consiste en agua, alcohol alquílico, glicoles, 10 o sus mezclas, preferiblemente disolventes cuyo punto de ebullición no sea superior a 80 °C.

En la presente invención “alcohol alquílico” se refiere a una sustancia con una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene un grupo hidroxilo, de entre 1 y 12 átomos de carbono, preferiblemente de entre 1 y 6 átomos de carbono. En una realización particular el alcohol alquílico se selecciona entre metanol, etanol, isopropanol, y sus mezclas.

15 En la presente invención “glicoles” se refiere a una sustancia con una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que contiene dos o más grupos hidroxilo, de entre 2 y 12 átomos de carbono, preferiblemente de entre 2 y 8 átomos de carbono, y opcionalmente puede contener uno o más grupos éter. En una realización particular, el glicol se selecciona de entre 1,2-etanodiol (etilenglicol), propano-1,2-diol (propilenglicol), butano-1,4-diol (1,4-butilenglicol), 20 butano-1,3-diol, 1,5-pentanodiol (pentilenglicol), 2-metil-2,4-pentanodiol (hexilenglicol), 2-(2-etoxietoxi)etanol (dietilenglicol monoetil éter), éter 2,2'-dihidroxidipropilo (dipropilenglicol) y 1,2-octanodiol (caprilil glicol).

En una realización particular, el disolvente de la etapa (b) puede tener un pH modificado de entre 0,5 y 3. Así, en una realización particular, el disolvente de la etapa (b) comprende 25 además un ácido orgánico o inorgánico, preferiblemente un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido fórmico y mezclas de los mismos.

En otra realización particular, los eluatos recogidos en la etapa (c) se utilizan para repetir la elución del extracto. La recirculación de los eluatos recogidos en la etapa (c) permite disminuir 30 el volumen total de disolvente utilizado en el proceso. Si bien no es una característica necesaria para el correcto funcionamiento de la invención, una ventaja adicional asociada a la recirculación de los eluatos está en el eventual aumento de la cantidad de polifenoles totales extraídos de los orujos de uva blanca.

Así, en una realización particular la etapa (c) comprende, además de recoger los eluatos, recircular dichos eluatos por la mezcla que comprende el orujo de uva blanca, repitiéndose la elución con el disolvente entre 1 y 7 veces, preferiblemente 3, 4 o 5 veces. En otras palabras, en una realización particular, el procedimiento de la invención está caracterizado porque, tras recoger el extracto de uva blanca, la etapa (c) comprende además la recirculación del eluato obtenido, por la mezcla de la etapa (a). Esta realización se corresponde a la repetición del método de la etapa (b), pero en donde la mezcla de la etapa (a) comprende el orujo de uva sometido previamente por lo menos una vez a una elución con disolvente, y empleando un disolvente que ya ha sido utilizado por lo menos una vez en la elución. Esta realización se repite de manera que el disolvente se recircula por la mezcla.

La combinación de las etapas de maceración y de recirculación de los eluatos permite un procedimiento más optimizado en cuanto a rendimiento del extracto obtenido y el bajo consumo de disolventes.

El procedimiento de extracción comprende además una etapa (d), caracterizada por ser una etapa de eliminación de la acetona. Esta eliminación puede ser parcial, o completa. En esta etapa, el extracto de uva blanca obtenido tras la elución, o las eluciones, se somete a una concentración, es decir, un procedimiento para reducir la cantidad de acetona. En una realización particular, la etapa (d) comprende la eliminación de acetona hasta una cantidad final de no más de un 20% de acetona, no más de un 10% de acetona, no más de un 5% de acetona, preferiblemente no más de un 1% de acetona, y aún más preferiblemente no más de un 0,5% de acetona. En una realización preferida, la etapa (d) es una etapa de evaporación de acetona, preferiblemente una etapa de evaporación completa de la acetona, de manera que la acetona se elimina en su totalidad o esencialmente en su totalidad. En el contexto de la presente invención, la evaporación de acetona es sinónimo de volatilización de acetona. En una realización aún más preferida, en la etapa (d) se evapora la acetona en su totalidad, obteniéndose así como producto un extracto acuoso. El proceso para eliminar la acetona es conocido por el experto en la materia, por ejemplo simplemente dejando el extracto a temperatura ambiente y presión atmosférica, bajo una corriente de nitrógeno, con aporte de temperatura, bajo vacío, en un rotavapor a vacío, en evaporador de película fina, entre otros.

Los extractos también pueden obtenerse como un producto sólido. Así, en otra realización particular, el procedimiento de extracción comprende además una etapa de liofilización o una etapa de secado por pulverización (spray-drying). Esta etapa puede ser una etapa adicional tras llevarse a cabo la etapa (d), es decir, la liofilización o el secado por pulverización requieren como etapa previa la eliminación de la acetona, o puede ser la propia etapa (d), en cuyo caso la liofilización o el secado por pulverización eliminan directamente la acetona. En una

realización preferida de la anterior, cuando el procedimiento comprende una etapa de liofilización, esta se lleva a cabo tras la etapa (d), es decir, la liofilización requiere como etapa previa la eliminación de la acetona.

En la liofilización es posible congelar previamente los eluatos recogidos o bien los eluatos tras la evaporación del disolvente. En una realización particular la liofilización se lleva a cabo entre -50 °C y -20 °C, preferiblemente entre -45 °C y -35 °C. En una realización particular la liofilización se lleva a cabo entre  $1,31 \times 10^{-6}$  atm y  $6,6 \times 10^{-6}$  atm (0,001 a 0,005 mmHg), preferiblemente entre  $1,31 \times 10^{-6}$  atm y  $1,31 \times 10^{-5}$  atm (0,001 a 0,01 mmHg). El extracto es estable y no es necesaria la adición de estabilizantes en la etapa de liofilización. Sin embargo, es posible añadir pequeñas cantidades de azúcares a una concentración que oscila desde un 1 hasta un 5% u otras moléculas que actúen como crioprotectores y/o lioprotectores. En una realización particular, los azúcares se seleccionan del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, trehalosa, maltodextrina, goma arábica y goma xantana. El extracto de la invención después de la liofilización no se altera de ningún modo.

En el secado por pulverización, los eluatos recogidos o bien los eluatos tras la evaporación del disolvente se transforman en un polvo seco mediante secado rápido con aire, o un gas inerte, caliente. Este método permite obtener materiales de tamaño de partícula fino y consistente. En una realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo con un flujo de aire comprendido entre 15000 y 60000 L/h. En otra realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo con un flujo de alimentación comprendido entre 1 L/h y 500 L/h, preferiblemente entre 1 L/h y 100 L/h, más preferiblemente entre 1 L/h y 20 L/h. En otra realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo con una presión de aire comprendida entre 2 y 10 bar. En otra realización particular, el secado por pulverización se lleva a cabo a una temperatura de secado comprendida entre 150 y 200 °C y una temperatura de entrada comprendida entre 15 y 35 °C.

En una realización particular, la eliminación de la acetona comprende recuperar el disolvente para su posterior reutilización en la etapa (b), de extracción.

El procedimiento de la invención permite obtener un extracto de orujo de uva blanca que comprende polifenoles. Así, un tercer aspecto de la presente invención se dirige a un extracto de uva blanca caracterizado porque es un extracto obtenible según el procedimiento de la invención. “Extracto obtenible” o “extracto obtenido”, significa el producto que se obtiene como resultado de aplicar el procedimiento de la invención, con los elementos técnicos inherentes al procedimiento.

El extracto se obtiene mediante empleo de acetona como disolvente de extracción. Así, en una realización particular, el extracto de uva blanca obtenible según el procedimiento de la invención es un extracto que comprende acetona. En una realización preferida de la anterior, la acetona se evapora en su totalidad y el extracto de uva obtenible según el procedimiento de la invención es un extracto acuoso.

Todas las realizaciones descritas arriba para el procedimiento, y también para el extracto, son aplicables a este tercer aspecto de la invención.

#### Aditivo alimentario

El procedimiento de la invención permite la fácil eliminación del disolvente de extracción, ya que la acetona es un disolvente de bajo punto de ebullición. Al evaporarse la acetona, el extracto resultante es un extracto acuoso, compatible con la ingestión oral.

Así, un cuarto aspecto de la presente invención se dirige a un aditivo alimentario caracterizado porque comprende el extracto de uva blanca de la invención. En una realización preferida, el aditivo alimentario es caracterizado porque comprende el extracto de uva blanca de la invención como conservante alimentario.

En una realización particular, el extracto de uva blanca presente en el aditivo alimentario es el extracto de uva blanca de la invención, o el extracto de uva blanca obtenido según el procedimiento de la invención.

En el contexto de la presente invención, el término “conservante” ha de interpretarse como una sustancia o composición que exhiba actividad antioxidante y/o antimicrobiana.

En el contexto de la presente invención, el término “conservante alimentario” se refiere a un conservante que es compatible con cualquier tipo de alimento sólido o líquido, para uso humano y/o animal.

El término “alimento” se refiere normalmente a cualquier sustancia consumida oralmente para proporcionar apoyo nutricional a un ser vivo. Los alimentos suelen ser de origen vegetal, animal o fúngico y contienen nutrientes esenciales, como carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas o minerales. La sustancia es ingerida por un organismo y asimilada por las células del organismo para proporcionar energía, mantener la vida o estimular el crecimiento.

No obstante, en la presente invención, “alimento” ha de interpretarse de manera más amplia de modo que cubra también sustancias que se ingieren pero que no aportan un valor nutritivo. Esto es así porque, además de los fines nutricionales, la alimentación humana se asocia a aspectos sociales y culturales, de salud y psicológicos. Por ejemplo, las bebidas alcohólicas en la alimentación humana no tienen interés nutricional, pero sí tienen un interés frutivo. Por



ello, en el contexto de la presente invención, también han de considerarse como alimento aquellas sustancias que se ingieren pero que no aportan un valor nutritivo.

Así, en una realización particular, alimento significa cualquier sustancia que se ingiera, incluyendo de manera general cualquier comida y/o bebida. En una realización preferida, el extracto de la invención se emplea como aditivo alimentario en vinos.

Como se menciona arriba, el extracto puede proporcionarse como un extracto acuoso o como un sólido. Así, el aditivo alimentario del cuarto aspecto de la invención, que comprende el extracto de la invención, puede proporcionarse como un aditivo alimentario líquido o sólido. En el contexto de la presente invención, tal como se describe arriba, el extracto acuoso puede comprender trazas de disolvente orgánico, preferiblemente acetona. En una realización particular de la anterior, el extracto comprende no más de un 20% de disolvente orgánico, no más de un 10% de disolvente orgánico, no más de un 5% de disolvente orgánico, no más de un 1% de disolvente orgánico, y preferiblemente no más de un 0,5% de disolvente orgánico.

Dependiendo del producto final deseado, el experto en la materia sabrá qué forma será la más conveniente. Ejemplos no limitantes de la forma en la cual se puede proporcionar el aditivo alimentario de la invención serían líquida, gel, sólido, pasta, comprimido, polvo, entre otros. Además, también está contemplado que el aditivo alimentario pueda formularse como disolución, emulsión, suspensión, dispersión, o cualquier otra forma adecuada para usarse como aditivo alimentario.

El extracto de la invención es estable, y también lo es si formulado como aditivo alimentario, al menos durante 6 meses, preferiblemente al menos durante 12 meses. Estable significa que el principio activo (el extracto) y los excipientes (si están presentes) no sufren degradación significativa y el efecto conservante se mantiene, al menos en un 80% del efecto en el momento de preparación del aditivo, preferiblemente al menos en un 90% del efecto en el momento de preparación del aditivo, y más preferiblemente al menos en un 95% del efecto en el momento de preparación del aditivo.

En una realización particular, el aditivo alimentario comprende conservantes adicionales. Ejemplos no limitantes de conservantes, antimicrobianos y/o antioxidantes, son cloruro de benzoato, cloruro de benetonio, ácido benzoico, clorobutanol, m-cresol, metilparabeno (E-218), propilparabeno (E-216), butilparabeno, nisina, natamicina, BHA, sulfito de sodio, bisulfito de sodio, otras sales de ácido sulfuroso (bisulfito, metabisulfito), Vitamina E, BHT, Terbutilhidroquinona (TBHQ), Galato de propilo, ácido ascórbico, acetilcisteína, palmitato de ascorbilo, ascorbato de sodio, hidroxitolueno butilado, butilhidroxianisol, ácido cítrico, monotioglicerol, metionina, metabisulfito de sodio, metabisulfito de potasio, clorhidrato de

cisteína, ditionito de sodio, ácido gentísico, glutamato de sodio, glutatión, tioglicerol, formaldehído sulfoxilato de sodio, tiourea, alfa tocoferol y mezclas de los mismos. Un conservante adicional preferido es el dióxido de azufre, que al disolverse en agua da lugar a sulfitos (que comprenden  $\text{SO}_3^{2-}$ ). En el contexto de la presente invención, salvo indicación

5 contraria, cualquier referencia a dióxido de azufre ha de entenderse como sinónimo de los sulfitos empleados como conservantes en la industria alimentaria.

En una realización preferida, el aditivo alimentario de la invención no comprende otros conservantes adicionales.

En una realización particular, el aditivo alimentario es para alimentación humana. En otra

10 realización particular, el aditivo alimentario es para alimentación animal.

En otra realización particular, el aditivo alimentario es caracterizado porque es un conservante para vinos. El proceso de elaboración del vino requiere la adición de conservantes. Un ejemplo es el uso de dióxido de azufre como agente antimicrobiano (para reducir el crecimiento de levaduras y bacterias) y como antioxidante.

15 En una realización particular, el aditivo alimentario de la invención puede emplearse para sustituir la totalidad, o una parte, de los conservantes presentes en el vino, por ejemplo el dióxido de azufre.

#### Aspectos adicionales

Un quinto aspecto de la presente invención se dirige a un alimento que comprende el extracto

20 de uva blanca de la invención, o que comprende el aditivo alimentario de la invención. En una realización preferida, dicho alimento es un vino. El experto en la materia sabrá que todas las realizaciones anteriores son compatibles con este quinto aspecto de la invención.

Un sexto aspecto de la presente invención se dirige al uso del extracto de uva blanca de la invención como conservante alimentario. Un redactado alternativo de este aspecto es: Método

25 para conservar un alimento que comprende la adición del extracto de uva blanca de la invención a dicho alimento.

En una realización particular, el uso según la invención es caracterizado porque es un uso como conservante en un proceso de vinificación de un vino, o para conservar un vino en botella. En una realización preferida, el uso según la invención es caracterizado porque es un

30 uso como conservante en un proceso de vinificación de un vino, en donde el extracto no se encuentra en combinación con otros conservantes adicionales. En otra realización preferida, el uso según la invención es caracterizado porque es un uso para conservar un vino en botella, en donde el extracto sustituye al menos una parte de los sulfitos presentes en un vino.

La expresión “sulfitos presentes en un vino” debe interpretarse como los sulfitos que normalmente están presentes debido a una adición de este conservante durante el proceso de vinificación, o antes del embotellamiento.

5 En una realización particular, el uso según la invención es caracterizado porque dicho extracto es antioxidante.

En otra realización particular, el uso según la invención es caracterizado porque dicho extracto es antimicrobiano.

En otra realización particular, el uso según la invención es caracterizado porque dicho extracto no comprende polifenoles sintéticos.

10 En otra realización particular, el uso según la invención es caracterizado porque sustituye al menos una parte de los sulfitos presentes en un vino.

El experto en la materia sabrá que todas las realizaciones anteriores para los aspectos anteriores también son compatibles con este aspecto de la invención.

#### Parte experimental

15 Estos ejemplos sirven para ilustrar realizaciones de la invención, pero que en ningún caso se deben considerar limitativos.

#### Ejemplo 1. Preparación y análisis de los extractos.

En este ejemplo, se llevó a cabo una extracción de los residuos de uva blanca de la variedad Albariño mediante una adaptación a mayor escala del procedimiento descrito en  
20 WO2014013122A1. Se utilizó acetona como disolvente y se sometió el extracto líquido obtenido a un proceso de volatilización de la acetona, para obtenerse así un extracto acuoso.

Utilizando arena como dispersante, se mezcló y trituró con bagazo de uva blanca de la variedad Albariño en una relación 1:5. Esta mezcla se introdujo en una columna de acero inoxidable de dimensiones apropiadas con una capa de dispersante en el fondo, que actúa a  
25 modo de filtro, y se compactó ligeramente. La cantidad de acetona utilizada como disolvente de extracción fue de 0,75 volúmenes respecto al volumen de mezcla extractiva. Tras 48 h de maceración, se procede a la obtención del eluato correspondiente. Posteriormente, dicho eluato se concentró a vacío hasta tener un valor de acetona residual inferior al 0,5%.

#### Ejemplo 2. Caracterización analítica

##### 30 **Índice de polifenoles totales (IPT)**

El contenido polifenólico total de varios extractos de orujo de uva blanca obtenidos según el método descrito en el Ejemplo 1 se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu siguiendo el protocolo para la microtitulación en placas de 96 pocillos adaptado de Zhang et

al. (Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ. *A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds*. J Appl Phycol. (2006) 18:445–50). Así, 20 µL de extracto diluido se mezclaron con 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) y 80 µL de una disolución de carbonato de sodio (7,5% p/p). La mezcla se agitó en oscuridad durante 30 minutos, para ser posteriormente medida a 760 nm en el lector de microplacas SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany), que realiza mediciones de absorbancia en el rango de longitudes de onda 220-1000 nm. Las mediciones se realizaron en microplacas de polipropileno de 96 pocillos con un volumen de 300 µL. Para expresar el índice polifenólico total se utilizó el ácido gálico como patrón, en un rango de concentración con 12 niveles comprendidos entre 30 y 200 mg/L (0,2-0,8 UA). El contenido en polifenoles totales de las muestras se expresa así como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mgGAE/L).

Se realizó el análisis y el rango obtenido de IPT fue de entre 7000 y 10000 mgGAE/L en el caso de los extractos sin volatilizar (12 muestras, promedio de 8699 mgGAE/L), y de entre 11000 y 43000 mgGAE/L en el caso de los extractos volatilizados (33 muestras, promedio de 27866 mgGAE/L).

#### **Identificación de polifenoles objetivo por Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)**

El extracto volatilizado se filtró a través de filtros de jeringa de PTFE de 0,22 µm sobre un vial de vidrio de 2 mL para realizar los análisis correspondientes.

Se identificaron los principales polifenoles presentes en el extracto del Ejemplo 1 mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, triple cuadrupolo (LC-MS/MS\_QqQ). Las condiciones instrumentales óptimas para la detección de los polifenoles objetivo se adaptaron de Celeiro, M.; Lamas, J.P.; Arcas, R.; Lores, M. *Antioxidants Profiling of By-Products from Eucalyptus Greenboards Manufacture*, Antioxidants. 2019, 8(8), 263. El análisis LC-MS/MS se realizó empleando un instrumento Thermo Scientific (San José, CA, EE.UU.) basado en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum Ultra™ equipado con una fuente HESI-II (ionización por electrospray calentado) y un automuestreador Accela Open con un bucle de 20 µL. La separación cromatográfica se logró en una columna Kinetex C18 (2,6 µm, 100 × 2,1 mm) con una precolumna (SecurityGuard™ ULTRA Holder) obtenida de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.). El volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura de la columna se fijó en 50 °C. La fase móvil consistió en agua (A) y metanol (B), ambas con un 0,1 % de ácido fórmico. El gradiente cromatográfico fue del 5% B al 90% B en 11 min y se mantuvo constante durante 3 min. Las condiciones iniciales se alcanzaron en 6 min. El caudal de fase móvil fue de 200 µL min<sup>-1</sup>. El tiempo total de ejecución de cada inyección

fue de 20 min. El espectrómetro de masas y la fuente HESI-II trabajaron simultáneamente en modo positivo y negativo (véase el modo de ionización para cada compuesto objetivo en la Tabla 1). Se implementó el modo de adquisición Selected Reaction Monitoring (SRM) monitorizando 2 o 3 transiciones por compuesto (ver Tabla 1), para una identificación inequívoca de los compuestos objetivo. El sistema se gestionó con los programas informáticos Xcalibur 2.2 y Trace Finder™ 3.2.

**Tabla 1.** Compuestos estudiados por cromatografía. Modo de ionización, número CAS, tiempo de retención y transiciones MS/MS.

| Modo de ionización | Compuesto                     | CAS         | Tiempo retención (min) | Transiciones MS/MS (energía colisión, eV)                            |
|--------------------|-------------------------------|-------------|------------------------|--|
| -                  | Ácido gálico                  | 149-91-7    | 2.25                   | 169.02 → 125.04 (17)<br>169.02 → 153.1 (15)                          |
| +                  | Ácido 2-4-6-trihidrobenczoico | 487-70-7    | 3.23                   | 168.98 → 150.99 (17)<br>168.98 → 83.02 (23)<br>168.98 → 107.02 (22)  |
| -                  | Ácido caftárico               | 67879-58-7  | 4.21                   | 310.96 → 178.97 (17)<br>310.96 → 148.96 (14)                         |
| -                  | Procianidina B1               | 20315-25-7  | 4.76                   | 577.03 → 407.06 (26)<br>577.03 → 288.93 (25)<br>577.03 → 424.97 (26) |
| +                  | Catequina                     | 225937-10-0 | 5.02                   | 289.00 → 245.02 (17)<br>289.00 → 203.11 (22)                         |
| -                  | Procianidina B2               | 29106-49-8  | 5.50                   | 577.03 → 407.06 (26)<br>577.03 → 288.93 (25)<br>577.03 → 424.97 (26) |
| +                  | Galato de epigallocatequina   | 989-51-5    | 6.00                   | 457.15 → 169.05 (21)<br>457.15 → 125.09 (42)<br>457.15 → 305.09 (21) |
| -                  | Procianidina C1               | 37064-30-5  | 6.01                   | 577.03 → 288.93 (25)<br>577.03 → 407.06 (26)<br>577.03 → 424.97 (26) |
| +                  | Epicatequina                  | 490-46-0    | 6.11                   | 289.00 → 245.02 (17)<br>289.00 → 203.11 (22)                         |
| +                  | Galato de epicatequina        | 1257-08-5   | 7.13                   | 441.13 → 289.13 (30)<br>441.13 → 125.08 (42)<br>441.13 → 169.05 (24) |
| +                  | Quercetina-3-glucurónido      | 22688-79-5  | 9.21                   | 479.09 → 461.50 (14)<br>479.09 → 302.96 (18)                         |
| -                  | Quercetina-3-rutinósido       | 207671-50-9 | 9.39                   | 609.18 → 270.92 (96)<br>609.18 → 178.87 (44)<br>609.18 → 300.01 (37) |
| +                  | Quercetina-3-glucósido        | 482-35-9    | 9.41                   | 465.07 → 256.90 (41)<br>465.07 → 302.97 (14)                         |
| -                  | Kaempferol                    | 520-18-3    | 12.27                  | 285.07 → 184.91 (30)<br>285.07 → 239.12 (35)                         |

Se han determinado los principales polifenoles presentes en los extractos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, triple cuadrupolo (LC-MS/MS\_QqQ) mediante el método descrito arriba. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

- 5 **Tabla 2.** Rangos de polifenoles presentes en extractos de uva blanca obtenidos tras extracción de 12 muestras con acetona. Valores expresados en ppm (mg/L).

| Polifenoles                   | Extracto de acetona |
|-------------------------------|---------------------|
| Ácido gálico                  | 8-30                |
| Ácido 2-4-6-trihidrobenczoico | 1-30                |
| Ácido caftárico               | 0,1-4               |
| Procianidinas B1+B2+C1        | 100-280             |
| Catequina                     | 60-130              |
| Galato de epigallocatequina   | 0,1-1,2             |
| Epicatequina                  | 10-150              |
| Galato de epicatequina        | 15-50               |
| Quercetina-3-glucurónido      | 30-65               |
| Quercetina-3-rutinósido       | 2-5                 |
| Quercetina-3-glucósido        | 30-120              |
| Kaempferol                    | 0,1-2,5             |
| Quercetina                    | 0,1-15              |

### Ejemplo 3. Actividad Antioxidante

#### **Metodología**

- 10 La actividad antioxidante (AA) de extractos de orujo de uva blanca obtenidos según el Ejemplo 1, así como su concentración inhibitoria media IC50 (cantidad de extracto necesaria para neutralizar la mitad de los radicales libres presentes), se determinaron utilizando el reactivo DPPH siguiendo el método descrito en la bibliografía (Symes, A.; Shavandi, A.; Zhang, H.; Ahmed, I. A. M.; Al-Juhaimi, F. Y.; Bekhit, A. E. D. A. *Antioxidant Activities and Caffeic Acid*
- 15 *Content in New Zealand Asparagus (Asparagus Officinalis) Roots Extracts*. Antioxidants (Basel, Switzerland) 2018, 7 (4)).

En breve, el extracto volatilizado del Ejemplo 1 fue filtrado (filtro PTFE de 0.22 µm) y diluido con agua ultrapura (MiliQ®) de manera secuencial en una placa de micropozos. Este procedimiento de diluciones seriadas, genera diluciones de entre 40 y 5120.

- 20 Asimismo, para la elaboración de la curva trolox patrón, se prepararon puntos de concentración de trolox entre 3 y 31 mg/L. En la determinación del blanco de DPPH, se

añadieron 100 µL de agua ultrapura en una columna de 8 pozos. Posteriormente, en cada pozo (muestra, patrón y blanco), se agregaron 100 µL del reactivo de DPPH a una concentración de 140 mg/L en metanol. La placa se agitó y se resguardó en la oscuridad durante 10 minutos, luego se midió su absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

## Resultados

La actividad antioxidante obtenida para un promedio de 23 extractos fue de 67 mmolTE·L<sup>-1</sup>, para un rango de valores comprendido entre 49 y 95 mmolTE·L<sup>-1</sup>. Como comparación, los antioxidantes habituales BHA, bisulfito, Vitamina E y BHT exhiben esta misma actividad antioxidante a una concentración (en mg/L) de 9,8, 17,5, 27,6 y 257,5, respectivamente.

También se midió la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) de las muestras y se refirió al contenido polifenólico total (mgGAE·L<sup>-1</sup>) presente en el extracto. El IC<sub>50</sub> obtenido para el extracto del Ejemplo 1 fue de 7,75 mg/L (valor referido al contenido polifenólico, por lo que se expresa en mgGAE·L<sup>-1</sup>). Como comparación, los antioxidantes BHA, bisulfito, Vitamina E y BHT exhiben el IC<sub>50</sub> a una concentración (en mg/L) de 13, 28, 41 y 345, respectivamente. Los datos indican que el extracto acuoso de la invención neutraliza el 50% de los radicales libres de DPPH con una concentración polifenólica de 7,75 mgGAE/L. Para el caso del bisulfito se obtiene el IC<sub>50</sub> a una concentración de 28 mg/L. Si se compara el contenido global del extracto, para una inhibición del 50% de los radicales libres es necesaria una concentración de 480 mg/L de extracto. La densidad del extracto es muy próxima a la del agua (1 g/mL), por lo que aproximadamente, con añadir 0,48 mL de extracto de la invención en un litro de agua se consigue el IC<sub>50</sub>.

## Ejemplo 4. Actividad antimicrobiana

El objetivo de este ensayo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de bagazo de uva de la invención descrito en el Ejemplo 1, rico en polifenoles, frente a 4 grupos de microorganismos presentes en el proceso de vinificación, compararlo con la capacidad antimicrobiana del bisulfito sódico y evaluar la sinergia entre dicho extracto y la concentración de bisulfito habitualmente utilizada por la bodega, para reducir o eliminar las cantidades de esta sustancia química en el proceso de elaboración de los vinos.

## Metodología

Las pruebas antimicrobianas se realizaron de acuerdo con las recomendaciones EUCAST, utilizando el método colorimétrico/fluorométrico Alamar-Blue y leyendo las placas por

fluorometría. La metodología implica la incubación de las células en caldo Müller-Hinton suplementado con diferentes concentraciones (que van del 0,625 al 20%) de la sustancia antimicrobiana que se desea evaluar y la cantidad adecuada de resazurina. Esta molécula no fluorescente se convierte en la molécula fluorescente resorufina en presencia de células metabólicamente activas. Esta reacción permite cuantificar la cantidad de células vivas midiendo la fluorescencia liberada por la resorufina producida durante el proceso.

Este protocolo ofrece valores de Concentraciones Bactericidas Mínimas (Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)), por lo que se calcula la Concentración Inhibitoria Mínima (Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) como el valor medio entre la MBC y la concentración inmediatamente anterior ensayada. Los valores de IC50 (la concentración de extracto que inhibe el crecimiento de la mitad de un inóculo de la bacteria ensayada) se han obtenido utilizando el programa IC50 calculator (AAT Bioquest).

Los tres grupos de microorganismos utilizados fueron:

- *Saccharomyces cerevisiae*, cepa utilizada para iniciar la fermentación;
- Levaduras no *Saccharomyces*: *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Debaromyces hansenii*; y
- Bacterias ácido lácticas: *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 y *Lactocaseibacillus rhamnosus* CECT 275.

Para fines comparativos, se ha ensayado también la actividad antimicrobiana del bisulfito sódico, como referencia del aditivo alimentario que se pretende sustituir o complementar.

Además, la actividad antimicrobiana del extracto de la invención, combinado con 50 ppm de sulfito, también fue evaluada. Los valores se han comparado con los valores de CMI del extracto solo (*M. pulcherrima* necesitó concentraciones de 250 ppm de sulfito combinadas con el extracto para lograr la CMI).

## Resultados

La actividad antimicrobiana del extracto de la invención comparada con la del bisulfito sódico se resume en la Tabla 3. Esta tabla también describe la actividad antimicrobiana de una formulación que comprende el extracto de la invención en combinación con bisulfito sódico.

**Tabla 3.** Actividad antimicrobiana (valores expresados en ppm) del extracto de la invención, del bisulfito sódico, y de la combinación de los mismos frente a diferentes microorganismos. IC50 es la concentración de extracto responsable del 50% de la inhibición bacteriana. MIC (concentración inhibitoria mínima) es la concentración más baja de extracto que inhibe el crecimiento de las bacterias, después de su incubación.



|                                      | Bisulfito sódico |        | Extracto de la invención |         | Extracto de la invención (E) + Bisulfito sódico (S) |
|--------------------------------------|------------------|--------|--------------------------|---------|---|
|                                      | IC50             | MIC    | IC50                     | MIC     | MIC   |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>      | 817,51           | > 2000 | < 6250                   | ≤ 6250  | 12500 (E) + 50 (S)                                  |
| <i>Lachancea thermotolerans</i>      | 360,52           | ≤ 2000 | < 6250                   | ≤ 6250  | 6250 (E) + 50 (S)                                   |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i>     | 412,09           | ≤ 2000 | 40800                    | ≤ 50000 | 50000 (E) + 250 (S)                                 |
| <i>Debaromyces hansenii</i>          | 635,28           | > 2000 | < 6250                   | ≤ 6250  | 12500 (E) + 50 (S)                                  |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> | 564,33           | ≤ 2000 | 11600                    | ≤ 12500 | 6250 (E) + 50 (S)                                   |
| <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>  | 525,62           | ≤ 2000 | < 6250                   | ≤ 6250  | 6250 (E) + 50 (S)                                   |

La levadura *M. pulcherrima* no responde bien al tratamiento con el extracto ni con el bisulfito, pero este dato es favorable ya que su actividad es deseable en el proceso de vinificación.

Aunque las cantidades de extracto necesarias para controlar las poblaciones de bacterias y levaduras de la vinificación son superiores a las de sulfito, la columna de la derecha enseña que el empleo del extracto de la invención permite disminuir significativamente la cantidad de bisulfito sódico (o incluso la eliminación del mismo, como se desprende de la Tabla 3).

Estos resultados ponen de manifiesto que el extracto de la invención permite reducir los efectos negativos asociados al uso de bisulfitos, por ejemplo su efecto en la salud, como aditivo en la vinificación.

#### Ejemplo 5. Vinificación a partir de uva de variedad Tempranillo

El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad del extracto de la invención para sustituir los sulfitos como conservante en el proceso de vinificación de un vino obtenido empleando uva de vinificación de la variedad Tempranillo.

Tras controles semanales de maduración, se vendimiaron las uvas de la variedad Tempranillo con un grado probable de 11,24. La vendimia se realizó en cajas en la Finca de Valdegón (Agoncillo, La Rioja) del Gobierno de la Rioja y se transportaron a la Bodega Experimental del ICVV (Logroño, La Rioja). Una vez en bodega, se descargaron y pesaron cada una de las cajas, siendo el peso total de unos 300 Kg de uva de la variedad Tempranillo.

Las uvas se despalillaron y estrujaron, y posteriormente se repartieron en 9 depósitos de 30 L cada uno, para llevar a cabo cada uno de los tres ensayos por triplicado. Una vez

homogéneo el mosto, se sembró la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, SafØEno™ SC-22, en la dosis recomendada por el fabricante de 20 g/hL, por siembra directa sobre el mosto.

Una hora después se añadieron los aditivos a ensayar: SO<sub>2</sub> y el extracto líquido (EL) según la invención. Se llevaron a cabo 3 ensayos, todos ellos por triplicado:

- 5        - Control (añadiendo SO<sub>2</sub>, 50 mg/L)
- Extracto líquido (EL) (adicionando 1,7 mL/L)
- SO<sub>2</sub>+EL (añadiendo 25 mg/L de SO<sub>2</sub> + 0,85 mL/L de EL)

Los depósitos se dejaron fermentando en bodega a una temperatura constante de unos 21-22 °C.

10        Diariamente se realizó un control de fermentación para seguir la fermentación alcohólica, registrando el valor de densidad y temperatura de cada depósito. Tras siete días, con una concentración menor de 2,5 g/L de glucosa + fructosa, se prensaron los vinos. Al día siguiente, se volvió a analizar el contenido de glucosa + fructosa, y una vez secos, se dio por terminada la fermentación alcohólica.

15        A continuación, los vinos se trasvasaron a 9 depósitos de 12 L para realizar la fermentación maloláctica, inoculándose la bacteria *Oenococcus oeni*, Viniflora CH11, a una dosis de 1 g/hL. Los depósitos se metieron en cámara a una temperatura de 20 °C. Semanalmente se fueron controlando las fermentaciones, analizando el ácido málico y el ácido láctico de los vinos. Dos semanas después, los vinos terminaron la fermentación maloláctica (concentración de ácido

20        málico < 0,25 g/L), y se tomaron muestras para el análisis de los parámetros generales de los vinos.

Para cada uno de ellos se han tomado muestras a 5 tiempos a lo largo del proceso de vinificación. Al inicio tras inoculación del mosto (T0), a las 24h de fermentación (T1), a la semana de fermentación (T2), al inicio de la fermentación maloláctica (T3) y al final de la

25        fermentación maloláctica (T4).

El ADN genómico de las muestras a estudiar ha sido obtenido empleando el Kit *E.Z.N.A.*® *Stool DNA* siguiendo las instrucciones del fabricante (volumen final de elución 100 µL). Volumen procesado por muestra 1 mL.

En la determinación por grupos de los microorganismos se han empleado las parejas AAB

30        (para acetobacterias), SC (para *S. cerevisiae*), Lac (para *Lactobacillus*) y WLAB (para bacterias lácticas, principalmente *Oenococcus oeni*).

**Tabla 4.** Secuencias y condiciones de PCR empleadas (annealing a 60 °C).

| Nombre | Secuencia                 | Ciclo     |
|--------|---------------------------|-----------|
| AAB-F  | TGAGAGGATGATCAGCCACACT    |           |
| AAB-R  | TCACACACGCGGCATTG         |           |
| SC1    | GAAAACTCCACAGTGTGTTG      | 95°C 5s,  |
| SC2    | GCTTAAGTGCGCGGTCTTG       | 60°C 15s, |
| Lac1   | AGCAGTAGGGAATCTTCCA       | 72°C 50s, |
| Lac2   | ATTTACCGCTACACATG         | 40 ciclos |
| WLAB1  | TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGA |           |
| WLAB2  | TCGAATTAAACCACATGCTCCA    |           |

Los valores de Ct han sido obtenidos empleando el equipo RT qPCR SLAN-96P Sansure y su software asociado. Como molde para la qPCR se ha utilizado 1 µL de una dilución 1/3 de las extracciones en un volumen final de reacción de 15 µL y la master mix Forget-Me-Not EvaGreen qPCR (Low ROX). El resto de las condiciones se han ajustado en función de las especificaciones del fabricante de la master mix.

El estudio de la concentración relativa de microorganismos en las muestras de vino mediante las técnicas indicadas arriba reveló que no se observan diferencias significativas entre los tratamientos para *S. cerevisiae*, *Lactobacillus* y bacterias lácticas (principalmente la especie *Oenococcus oeni*). Por último, a partir del inicio de la fermentación maloláctica (T3) no se detectaron acetobacterias para ninguno de los 3 tratamientos.

La caracterización físico-química de los vinos constó del análisis del grado alcohólico (% v/v), pH, acidez total (g/L), acidez volátil (g/L) y SO<sub>2</sub> libre y total, según los métodos oficiales de la OIV (2003). Para la determinación del ácido acético, ácido málico, ácido láctico y las fracciones nitrogenadas (amoniacal, amínica y fácilmente asimilable (NFA)), se utilizó el autoanalizador enzimático Miura One (Tecnología Difusión Ibérica (TDI), Barcelona).

El estudio de los parámetros enológicos de los vinos al final de la fermentación maloláctica reveló asimismo que el empleo del extracto de la invención no afectó a las propiedades del vino en el proceso de vinificación, como se observa de los valores expresados en la tabla a continuación:

**Tabla 5.** Caracterización físico-química de los vinos.

|                          | Control      | EL           | SO <sub>2</sub> +EL |
|--------------------------|--------------|--------------|---------------------|
| Grado alcohólico (% v/v) | 11,87 ± 0,50 | 12,12 ± 0,53 | 11,90 ± 0,17        |
| pH                       | 4,18 ± 0,06  | 4,16 ± 0,04  | 4,16 ± 0,03         |
| Acidez total (g/L)*      | 4,21 ± 0,03  | 4,31 ± 0,07  | 4,23 ± 0,30         |
| Acidez volátil (g/L)**   | 0,48 ± 0,05  | 0,52 ± 0,02  | 0,50 ± 0,02         |
| Ácido acético (g/L)      | 0,29 ± 0,03  | 0,33 ± 0,02  | 0,29 ± 0,01         |
| Ácido málico (g/L)       | 0,04 ± 0,01  | 0,03 ± 0,02  | 0,05 ± 0,02         |

|                              |              |              |              |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Ácido láctico (g/L)          | 1,66 ± 0,12  | 1,70 ± 0,02  | 1,78 ± 0,03  |
| Nitrógeno amoniacal (mg N/L) | 31,46 ± 1,19 | 34,06 ± 1,62 | 32,76 ± 2,06 |
| Nitrógeno amínico (mg N/L)   | 37,84 ± 4,40 | 33,44 ± 0,88 | 36,08 ± 4,03 |
| NFA (mg N/L)                 | 69,30 ± 3,24 | 67,50 ± 2,48 | 68,84 ± 5,91 |

\*Expresada como g/L de ácido tartárico. \*\*Expresada como g/L de ácido acético. NFA: Nitrógeno fácilmente asimilable. Los valores se expresan como el promedio de tres repeticiones y su desviación estándar (n = 3).

- 5 Estas conclusiones también son aplicables al estudio de los parámetros colorimétricos de los vinos al final de la fermentación maloláctica, como se observa de los valores expresados en la tabla a continuación. En cuanto a los parámetros de color, fenoles y antocianos totales, se cuantificaron también con el autoanalizador Miura One de TDI. El índice de polifenoles totales (IPT) se determinó mediante una dilución de la muestra 1:100, midiendo la absorbancia a 280
- 10 nm con un espectrofotómetro (Cary 60, Agilent, Palo Alto, EE. UU.). Se registraron las señales a las longitudes de onda de 420 nm (color amarillo), 520 nm (color rojo) y 620 nm (color azul) utilizando el mismo espectrofotómetro, y su suma dio como resultado la intensidad colorante (IC). Por último, se empleó un programa especial para medir las coordenadas CIELab en el espectrofotómetro (Cary 60). CIEL\*a\*b y CIE\*C\*h son espacios de color definidos por la
- 15 Comisión Internacional de Iluminación (CIE) para comunicar y expresar el color objetivamente. En el espacio de color L\*a\*b\*, también referido como CIELAB, L\* indica luminosidad, a\* indica coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde) y b\* indica coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul). En el espacio de color L\*C\*h, L\* indica luminosidad, C\* representa croma o saturación, y h\* es el ángulo de matiz.

20

**Tabla 6.** Parámetros de color, fenoles y antocianos totales cuantificados por Miura One de TDI.

|                           | Control                   | EL                         | SO <sub>2</sub> +EL       |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Fenoles totales (mg/L)    | 2553,23 ± 150,06          | 2598,83 ± 326,08           | 2552,30 ± 191,65          |
| Antocianos totales (mg/L) | 534,67 ± 50,72            | 478,33 ± 32,62             | 525,67 ± 38,00            |
| IPT                       | 49,99 ± 3,78              | 47,19 ± 1,39               | 49,13 ± 2,94              |
| A 420 nm                  | 0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 0,30 ± 0,01 <sup>ab</sup>  | 0,32 ± 0,05 <sup>b</sup>  |
| % Color amarillo          | 35,28 ± 0,63 <sup>a</sup> | 37,41 ± 0,41 <sup>ab</sup> | 38,36 ± 2,18 <sup>b</sup> |
| A 520 nm                  | 0,36 ± 0,02               | 0,39 ± 0,02                | 0,40 ± 0,02               |
| % Color rojo              | 50,79 ± 0,47 <sup>b</sup> | 48,72 ± 0,59 <sup>ab</sup> | 48,06 ± 1,84 <sup>a</sup> |
| A 620 nm                  | 0,10 ± 0,01               | 0,11 ± 0,01                | 0,11 ± 0,01               |
| % Color azul              | 13,93 ± 0,66              | 13,87 ± 0,25               | 13,58 ± 0,46              |
| IC                        | 0,71 ± 0,05 <sup>a</sup>  | 0,80 ± 0,04 <sup>ab</sup>  | 0,84 ± 0,08 <sup>b</sup>  |

| CIELab |                           |                            |                           |
|--------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| L      | 17,48 ± 2,27              | 14,93 ± 0,93               | 14,34 ± 1,12              |
| a      | 47,85 ± 2,23 <sup>b</sup> | 45,01 ± 0,74 <sup>ab</sup> | 44,61 ± 1,09 <sup>a</sup> |
| b      | 24,52 ± 2,25              | 23,83 ± 1,16               | 22,97 ± 1,67              |
| C      | 53,77 ± 3,00              | 50,93 ± 1,20               | 50,18 ± 1,73              |
| h      | 27,09 ± 1,08              | 27,89 ± 0,77               | 27,21 ± 1,14              |
| Global | Tonalidad rojo violáceo   | Tonalidad rojo violáceo    | Tonalidad rojo violáceo   |

IPT: índice de polifenoles totales; IC: intensidad colorante. Los valores se expresan como el promedio de tres repeticiones y su desviación estándar (n = 3). Para cada parámetro, las letras minúsculas diferentes (“a”, o “b”) indican diferencias significativas entre las muestras (p ≤ 0,05), siendo que “ab” significa que no existen diferencias significativas entre esa muestra y las demás.

#### Ejemplo 5. Vino en botella

El objetivo de este ensayo fue evaluar la capacidad del extracto de la invención para sustituir los sulfitos como conservante en un vino ya en botella, obtenido con uva de vinificación de la variedad Tempranillo.

Tras terminar la fermentación maloláctica del ejemplo anterior, de nuevo en bodega, se añadió a los vinos que se habían preparado como se describe en dicho ejemplo anterior, la mitad de concentración de los aditivos previamente adicionados (SO<sub>2</sub> y EL) antes de ser introducidos en la cámara fría (10 °C) para la etapa de estabilización. Un mes después del fin de la fermentación maloláctica, se embotellaron 7 botellas de cada tratamiento y repetición, que se colocaron en el botellero de la Bodega Experimental del ICVV, en condiciones de 16 °C y 50-60 % de humedad. Se realizó el análisis completo de los vinos tras 7 semanas del embotellado, analizándose todos los parámetros físico-químicos previamente descritos en la caracterización de los vinos tras la fermentación maloláctica.

Las botellas permanecerán 6 meses y 12 meses en el botellero de la bodega del ICVV en condiciones controladas, anteriormente descritas, hasta que se realicen los análisis físico-químicos y sensoriales de los vinos.

Se llevaron a cabo 3 ensayos, todos ellos por triplicado:

- Control (añadiendo 50 mg/L SO<sub>2</sub> en el mosto inicial, seguido de 25 mg/L SO<sub>2</sub> tras fermentación maloláctica)

- Extracto líquido (EL) (adicionando 1,7 mL/L en el mosto inicial, seguido de 850 µL/L tras fermentación maloláctica)
- SO<sub>2</sub>+EL (añadiendo 25 mg/L de SO<sub>2</sub> + 850 µL/L de EL en el mosto inicial, seguido de 12,5 mg/L SO<sub>2</sub> + 0,425 mL/L SO<sub>2</sub> tras fermentación maloláctica)

5 Para cada uno de ellos se han tomado muestras tras 7 semanas en botella (2 botellas por tratamiento y repetición).

El estudio de los parámetros enológicos de los vinos al final de las 7 semanas en botella reveló que el empleo del extracto de la invención permite reducir a la mitad la necesidad de emplear el conservante SO<sub>2</sub>, como se observa de los valores expresados en la tabla a continuación:

10

**Tabla 7.** Caracterización físico-química de los vinos al final de 7 semanas en botella.

|                              | Control                  | EL                       | SO <sub>2</sub> +EL       |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Grado alcohólico (% v/v)     | 4,30 ± 0,05 <sup>b</sup> | 4,22 ± 0,04 <sup>a</sup> | 4,25 ± 0,03 <sup>ab</sup> |
| pH                           | 4,47 ± 0,11 <sup>a</sup> | 5,41 ± 0,86 <sup>b</sup> | 4,34 ± 0,13 <sup>a</sup>  |
| Acidez total (g/L)*          | 0,57 ± 0,05 <sup>a</sup> | 2,04 ± 1,10 <sup>b</sup> | 0,55 ± 0,02 <sup>a</sup>  |
| Acidez volátil (g/L)**       | 0,27 ± 0,04 <sup>a</sup> | 0,77 ± 0,23 <sup>b</sup> | 0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>  |
| Ácido acético (g/L)          | 1,75 ± 0,10 <sup>b</sup> | 1,43 ± 0,21 <sup>a</sup> | 1,81 ± 0,07 <sup>b</sup>  |
| Ácido málico (g/L)           | 27,30 ± 12,97            | 34,19 ± 15,81            | 32,24 ± 14,89             |
| Ácido láctico (g/L)          | 91,96 ± 23,78            | 79,93 ± 14,99            | 88,88 ± 17,85             |
| Nitrógeno amoniacal (mg N/L) | 119,26 ± 24,60           | 114,12 ± 21,54           | 121,12 ± 22,20            |
| Nitrógeno amínico (mg N/L)   | 4,30 ± 0,05 <sup>b</sup> | 4,22 ± 0,04 <sup>a</sup> | 4,25 ± 0,03 <sup>ab</sup> |
| NFA (mg N/L)                 | 4,47 ± 0,11 <sup>a</sup> | 5,41 ± 0,86 <sup>b</sup> | 4,34 ± 0,13 <sup>a</sup>  |

\*Expresada como g/L de ácido tartárico. \*\*Expresada como g/L de ácido acético. NFA: Nitrógeno fácilmente asimilable. Los valores se expresan como el promedio de tres repeticiones y dos botellas de cada repetición y su desviación estándar (n = 6). Para cada parámetro, las letras minúsculas diferentes (“a”, o “b”) indican diferencias significativas entre las muestras (p ≤ 0,05), siendo que “ab” significa que no existen diferencias significativas entre esa muestra y las demás.

15

Estas conclusiones también son aplicables al estudio de los parámetros colorimétricos de los vinos al final de las 7 semanas en botella, como se observa de los valores expresados en la tabla a continuación.

20

**Tabla 8.** Parámetros de color, fenoles y antocianos totales cuantificados por Miura One de TDI de los vinos al final de 7 semanas en botella.

|                           | Control                     | EL                          | SO <sub>2</sub> +EL         |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Fenoles totales (mg/L)    | 2552,00 ± 369,31            | 2519,40 ± 67,94             | 2751,78 ± 273,68            |
| Antocianos totales (mg/L) | 481,50 ± 41,97 <sup>b</sup> | 401,67 ± 23,15 <sup>a</sup> | 463,83 ± 26,54 <sup>b</sup> |
| IPT                       | 47,46 ± 3,29                | 44,45 ± 1,33                | 45,90 ± 2,71                |
| A 420 nm                  | 0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>    | 0,30 ± 0,01 <sup>b</sup>    | 0,29 ± 0,02 <sup>b</sup>    |
| % Color amarillo          | 36,33 ± 0,25 <sup>a</sup>   | 37,14 ± 0,49 <sup>b</sup>   | 37,00 ± 0,32 <sup>b</sup>   |
| A 520 nm                  | 0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>    | 0,39 ± 0,02 <sup>b</sup>    | 0,37 ± 0,02 <sup>b</sup>    |
| % Color rojo              | 49,22 ± 0,31 <sup>b</sup>   | 48,06 ± 0,59 <sup>a</sup>   | 48,24 ± 0,41 <sup>a</sup>   |
| A 620 nm                  | 0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>    | 0,12 ± 0,00 <sup>b</sup>    | 0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>    |
| % Color azul              | 14,45 ± 0,43                | 14,80 ± 0,15                | 14,76 ± 0,25                |
| IC                        | 0,64 ± 0,04 <sup>a</sup>    | 0,81 ± 0,04 <sup>b</sup>    | 0,77 ± 0,05 <sup>b</sup>    |
| CIELab                    |                             |                             |                             |
| L                         | 18,82 ± 2,01 <sup>b</sup>   | 13,17 ± 0,69 <sup>a</sup>   | 14,25 ± 1,47 <sup>a</sup>   |
| a                         | 48,01 ± 1,58 <sup>b</sup>   | 42,75 ± 0,37 <sup>a</sup>   | 43,83 ± 1,38 <sup>a</sup>   |
| b                         | 24,68 ± 1,09 <sup>b</sup>   | 21,13 ± 0,79 <sup>a</sup>   | 21,97 ± 1,63 <sup>a</sup>   |
| C                         | 53,99 ± 1,86 <sup>b</sup>   | 47,69 ± 0,67 <sup>a</sup>   | 49,03 ± 1,96 <sup>a</sup>   |
| h                         | 27,20 ± 0,48                | 26,30 ± 0,68                | 26,58 ± 1,00                |
| Global                    | Tonalidad rojo violáceo     | Tonalidad rojo violáceo     | Tonalidad rojo violáceo     |

IPT: índice de polifenoles totales; IC: intensidad colorante. Los valores se expresan como el promedio de tres repeticiones y dos botellas de cada repetición y su desviación estándar (n = 6). Para cada parámetro, las letras minúsculas diferentes (“a”, o “b”) indican diferencias significativas entre las muestras (p ≤ 0,05).

## REIVINDICACIONES

1. Extracto de uva blanca, caracterizado porque comprende ácido gálico, ácido 2-4-6-trihidrobenczoico, ácido caftárico, procianidina B1, procianidina B2, procianidina C1, catequina, galato de epigalocatequina, epicatequina, galato de epicatequina, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-glucósido, kaempferol y quercetina.
2. Extracto según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto;
  - una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto;
  - una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto;
  - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
  - una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
  - una concentración de galato de epigalocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto;
  - una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto;
  - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto;
  - una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto; y/o
  - una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto.
3. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto.
4. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto.
5. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto.
6. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto.
7. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto; y
  - una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto.



8. Extracto según la reivindicación 7, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
  - una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
  - una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto; y
  - 5       - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto.
9. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque comprende:
  - una concentración de ácido gálico de entre 8 y 30 mg/L de extracto;
  - una concentración de ácido 2-4-6-trihidrobenczoico de entre 1 y 35 mg/L de extracto;
  - una concentración de ácido caftárico de entre 0,05 y 4,00 mg/L de extracto;
  - 10       - una concentración de procianidinas B1+B2+C1 de entre 90 y 280 mg/L de extracto;
  - una concentración de catequina de entre 50 y 130 mg/L de extracto;
  - una concentración de galato de epigallocatequina de entre 0,05 y 1,20 mg/L de extracto;
  - una concentración de epicatequina de entre 10 y 150 mg/L de extracto;
  - 15       - una concentración de galato de epicatequina de entre 5 y 50 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-glucurónido de entre 25 y 65 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-rutinósido de entre 1 y 5 mg/L de extracto;
  - una concentración de quercetina-3-glucósido de entre 25 y 130 mg/L de extracto;
  - una concentración de kaempferol de entre 0,1 y 2,5 mg/L de extracto; y
  - 20       - una concentración de quercetina de entre 0,1 y 15,0 mg/L de extracto.
10. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque es un extracto acuoso.
11. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque es un extracto acuoso que comprende no más del 20% de disolventes orgánicos,  
25       preferiblemente no más del 5%, aún más preferiblemente no más del 1%.
12. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque exhibe una actividad antioxidante (mmol TE/L) igual o superior a 40.
13. Procedimiento para la obtención de un extracto de uva blanca caracterizado porque comprende las etapas de:  
30       a) Proporcionar una mezcla que comprende orujo de uva blanca y opcionalmente un dispersante;
- b) Someter la mezcla a una elución con acetona;
- c) Recoger el extracto de uva blanca obtenido tras la elución; y
- d) Eliminar la acetona.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque en la etapa (a) se emplea un dispersante.
15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, caracterizado porque en la etapa (a) se emplea un dispersante seleccionado de entre el grupo  
5 constituido por arena, florisil, C18, alúmina y sílica gel.
16. Procedimiento según la reivindicación 13 a 15, caracterizado porque en la etapa (b) también se emplea agua.
17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, caracterizado porque, tras recoger el extracto de uva blanca, la etapa (c) comprende además la  
10 recirculación del eluato obtenido, por la mezcla de la etapa (a).
18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, caracterizado porque la etapa (d) comprende un paso de evaporación, liofilización y/o secado por pulverización.
19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, caracterizado porque la etapa (d) comprende la eliminación de acetona hasta una cantidad final de no  
15 más de un 20% de acetona preferiblemente no más de un 1% de acetona.
20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, caracterizado porque la etapa (d) comprende un paso de evaporación de acetona, seguido de un paso de liofilización y/o secado por pulverización produciendo así el extracto sólido.
- 20 21. Extracto de uva blanca caracterizado porque es un extracto obtenible según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.
22. Aditivo alimentario caracterizado porque comprende el extracto de uva blanca definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o definido en la reivindicación 21.
23. Aditivo alimentario según la reivindicación 22, caracterizado porque es un conservante  
25 alimentario.
24. Aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23, caracterizado porque es un conservante para vinos.
25. Aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, caracterizado porque también comprende un conservante adicional.
- 30 26. Aditivo alimentario según la reivindicación 25, caracterizado porque dicho conservante adicional es un sulfito.
27. Alimento que comprende el extracto de uva blanca definido en cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 12, o 21, o que comprende el aditivo alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26.

28. Alimento según la reivindicación 27, caracterizado porque es un vino.

29. Uso del extracto de uva blanca definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o  
5 21, caracterizado porque es un uso como conservante alimentario.

30. Uso según la reivindicación 29, caracterizado porque es un uso como conservante en un proceso de vinificación de un vino, o para conservar un vino en botella.

31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 29 o 30, caracterizado porque dicho extracto es antioxidante.

10 32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 29 o 30, caracterizado porque dicho extracto es antimicrobiano.

33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 32, caracterizado porque dicho extracto no comprende polifenoles sintéticos.

15 34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 33, caracterizado porque sustituye al menos una parte de los sulfitos presentes en un vino.



21 N.º solicitud: 202430359  
22 Fecha de presentación de la solicitud: 07.05.2024  
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         | MANSO, T. et al.: "Antibacterial activity against clinical strains of a natural polyphenolic extract from <i>Albariño</i> white grape marc", Pharmaceuticals, 2023, vol. 16, nº 7, artículo nº 950 ISSN 1424-8247 (Print), DOI:10.3390/ph16070950, todo el documento; en particular: tercer párrafo de la discusión; apartado 4.6. <i>Characterization of Polyphenols Using Liquid Chromatography Coupled to a Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS)</i> ; tablas 8 y 9.  | 1-21                       |
| X         | MANSO GÓMEZ, T.: "Evaluación de la actividad antibacteriana frente a cepas clínicas de un extracto natural rico en polifenoles procedente de bagazo de uva blanca <i>Albariño</i> ". Tesis doctoral. Escuela de Doctorado Internacional de la Universidad de Santiago de Compostela, 2023, todo el documento; en particular: apartado 1.7.3.6 <i>Extracción mediante un sistema a mediana escala y temperatura ambiente (MSAT)</i> ; apartado 1.7.3.7.1. <i>Disolventes GRAS</i> ; apartado 3.1.4.1 <i>Bagazo de uva</i> ; apartado 3.2.1 <i>Procedimiento de extracción MSAT</i> ; dos últimos párrafos de la pág. 74; apartado 3.2.5 <i>Métodos in vitro para la evaluación de la capacidad antibacteriana del extracto natural procedente de bagazo de uva blanca Albariño</i> y tercer punto del apartado <i>Conclusiones</i> . | 1-21                       |
| X         | ES 2443547 A1 (UNIV SANTIAGO COMPOSTELA) 19/02/2014, todo el documento; en particular: reivindicaciones 1-16  | 1-23, 25-27, 29, 31-33     |
| A         | GONZALEZ-ROMPINELLI, E.M. et al.: "A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels", Food Control, 2013, vol. 33, Nº 2, Páginas 440 - 447, ISSN 0956-7135 (print), DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.03.026, todo el documento; en particular: resumen; apartado 2.2. <i>Winemaking process and treatments</i> ; último párrafo del apartado 3.5. <i>Triangle tests during ageing in oak barrels</i> .   | 22-34                      |

|   |   |
|---|---|
| <p>Categoría de los documentos citados</p> <p>X: de particular relevancia</p> <p>Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría</p> <p>A: refleja el estado de la técnica</p> | <p>O: referido a divulgación no escrita</p> <p>P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud</p> <p>E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p> |
|---|---|

|  |
|--|
| <p><b>El presente informe ha sido realizado</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones</p> <p><input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</p> |
|--|

|  |  |                                 |
|--|--|---------------------------------|
| <p><b>Fecha de realización del informe</b></p> <p>27.09.2024</p> | <p><b>Examinador</b></p> <p>A. Maquedano Herrero</p> | <p><b>Página</b></p> <p>1/2</p> |
|--|--|---------------------------------|

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A23L3/3472** (2006.01)  
**A23L33/105** (2016.01)  
**C12G3/055** (2019.01)

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

A23L, C12G

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, NPL, TXTE, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, INSPEC, INTERNET