

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2015/114186 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
6 de agosto de 2015 (06.08.2015) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A01G 16/00 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)  
A23L 1/172 (2006.01) A01C 1/02 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070025

(22) Fecha de presentación internacional:

16 de enero de 2015 (16.01.2015)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201430115 30 de enero de 2014 (30.01.2014) ES

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];  
C/ Serrano; 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **FRIAS AREVALILLO, Maria Juana**; Instituto De Ciencia Y Tecnologia De Alimentos Y Nutricion (ICTAN), C/ Jose Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES). **MARTINEZ VILLALUENGA, Cristina**; Instituto De Ciencia Y Tecnologia De Alimentos Y Nutricion (ICTAN), C/ Jose Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES). **CACERES COSTALES, Patricio Javier**; Instituto De Ciencia Y Tecnologia De Alimentos Y Nutricion (ICTAN), C/ Jose Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES). **PEÑAS POZO, Elena**; Instituto De Ciencia Y Tecnologia De Alimentos Y Nutricion (ICTAN), C/ Jose Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES). **AMIGO GARRIDO, Lourdes**; Instituto De Ciencia Y Tecnologia

De Alimentos Y Nutricion (ICTAN), C/ Jose Antonio Novais, 10, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD OF OBTAINING GERMINATED WHOLE RICE GRAINS AND PRODUCTS DERIVED THEREFROM AND COMPRISING BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GRANOS DE ARROZ INTEGRAL GERMINADO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS MISMOS QUE COMPRENEN COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

(57) Abstract: The invention relates to a simple and economic method of germination which, using light, enables germinated whole rice grains and/or products which are derived therefrom and have high contents of biologically active compounds, preferably  $\gamma$ -oryzanol and GABA, to be obtained. The germinated whole rice grains obtained or the products derived therefrom are used to produce cosmetic or food compositions, which, in addition to their nutritional value, have a high content of healthy bioactive compounds, rendering them useful both as a wholefood and for preventing and/or reducing the risk of the onset of chronic degenerative diseases.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un procedimiento sencillo y económico de germinación que, utilizando luz, permite obtener granos de arroz integral germinado y/o productos derivados de los mismos con altos contenidos de compuestos biológicamente activos, preferentemente  $\gamma$ -orizanol y GABA. Los granos de arroz integral germinado obtenidos o los productos derivados de los mismos se utilizan en la elaboración de composiciones alimentarias o cosméticas, que adicionalmente a su valor nutricional, comprenden un alto contenido en compuestos bioactivos saludables, que los hacen recomendables tanto para una alimentación completa, como para la prevención y/o disminución del riesgo de aparición de patologías crónicas degenerativas.



WO 2015/114186 A1

# PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE GRANOS DE ARROZ INTEGRAL GERMINADO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE LOS MISMOS QUE COMPRENDEN COMPUESTOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

## DESCRIPCIÓN

### SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con el sector agro-alimentario ya que específicamente se refiere, tanto a un procedimiento de obtención de granos de arroz integral germinado con altos contenidos de compuestos biológicamente activos, como a los granos de arroz integral germinado o a productos derivados de los mismos que se obtienen a partir de dicho procedimiento, como al uso de los mismos para obtener composiciones alimentarias saludables y/o cosméticas, y a las composiciones directamente obtenidas.

### ESTADO DE LA TECNICA

La germinación mejora la textura y propiedades organolépticas de los granos integrales de arroz y los nutrientes son más fácilmente digeridos y absorbidos. El interés actual que suscita al arroz integral germinado se debe principalmente al efecto positivo que tiene el proceso de germinación en ciertos compuestos bioactivos que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas, entre los que se encuentran el  $\gamma$ -orizanol y el ácido gamma-aminobutírico (GABA).

El  $\gamma$ -orizanol es un potente antioxidante de relevante interés farmacológico, alimenticio y cosmético por sus efectos antioxidantes, hipolipidémicos y su capacidad de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Ghatak y Pamchal. Gamma-oryzanol – A multi-purpose steryl ferulate. Curr Nutr & Food Sci; 2011; 7:10-20), por paliar los síntomas menopáusicos (Ishihara y col. Clinical effect of gamma-oryzanol on climacteric disturbance on serum lipid

peróxidos. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*; 1982; 34:243-51), y como agente antidiabético (Imam y col. Antidiabetic properties of germinated Brown rice: a systematic review, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012; DOI: 10.1155/2012/816501), al que también se le han asociado propiedades anticancerígenas (Hirose y col. Modifying effects of phytic acid and gamma-oryzanol on the promotion stage of rat carcinogenesis. *Anticancer Res*; 1999; 9:3665-70).

Por su parte, el GABA es un potente neurotransmisor y ejerce efectos beneficiosos para la salud como la regulación de la presión sanguínea y ritmo cardíaco, estimula la secreción de insulina contribuyendo a la prevención de la diabetes, alivia el dolor, la ansiedad y el insomnio (Patil y Khan. Germinated Brown rice as a value added rice product: A review. *J. Food Sci. Technol*; 2011;48:661-667). Se le ha asignado un papel importante en el aprendizaje y la memoria y se le ha asociado con la reducción del riesgo de enfermedad de Alzheimer (Mamiya y col. Effects of pre-germinated Brown rice on depression-like behaviour in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav*; 2007;86:62-67).

Por todo lo anteriormente expuesto, existe un interés creciente por conseguir alimentos y/o preparados alimenticios o cosméticos enriquecidos en  $\gamma$ -orizanol y GABA y la bibliografía científica muestra que el arroz integral germinado es una excelente fuente natural de estos compuestos, de fácil preparación y de atractivo consumo (Wu y col. Germinated brown rice and its role in human health. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr*; 2013;53:451-463).

Las referencias científicas referentes a las variaciones en el contenido en  $\gamma$ -orizanol durante la germinación de arroz integral no son coincidentes. Esto parece principalmente debido a las diferencias entre variedades y entre los principales parámetros de germinación, a saber, tiempo, temperatura y cantidad de agua utilizada durante el proceso, encontrándose trabajos en los que el contenido de este compuesto aumenta, se mantiene e incluso disminuye como consecuencia del proceso (Moongngarm y Saetung. Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rice and Brown

rice. Food Chem; 2010; 122:782-88; Jayadeep y Malleshi. Nutrients, composition of tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol, and antioxidant activity in brown rice before and after biotransformation. CyTA. Journal of Food. 2011; 9:82-87; Kim y col. Chemical and functional components in different parts of rough rice (*Oryza sativa* L.) before and after germination. Food Chem; 2012;134:288-293). En cambio, los datos encontrados en la bibliografía hasta la fecha sobre el efecto de la germinación en el contenido en GABA de arroz integral son bastante coincidentes e indican que generalmente este compuesto se incrementa con el tiempo de germinación (Cáceres y col. Maximizing the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. Food Chem; DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.156.).

La germinación del arroz comienza con la hidratación de la semilla, momento en el que se produce la reactivación del metabolismo y la hidrólisis de proteínas y carbohidratos de reserva, a la vez que se sintetizan y acumulan nuevos metabolitos, algunos de ellos beneficiosos para la salud. El contenido de estos compuestos bioactivos, por tanto, va a depender de las condiciones de germinación.

## **EXPLICACION DE LA INVENCION**

El primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener granos de arroz integral y/o productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos, caracterizado por que comprende:

a) en presencia de luz, germinar granos de arroz integral durante un período de tiempo de entre 20 y 120 h y a una temperatura de entre 25 y 34 °C.

Los compuestos biológicamente activos se eligen de entre compuestos con actividad antioxidante y/o compuestos con actividad antihipertensiva y/o

antidiabética y/o antidepresiva, que preferentemente son  $\gamma$ -orizanol y ácido gamma-aminobutírico (GABA).

En una realización particular, en el paso a) el tiempo es 24 horas, la temperatura es 28° C y el  $\gamma$ -orizanol comprende un contenido superior a 14 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado y un contenido de GABA superior a 23 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado.

El segundo objeto de la invención se refiere al producto obtenido por el procedimiento, preferentemente, granos de arroz integral germinado o una harina obtenida a partir de los granos de arroz.

El tercer objeto de la invención se refiere al uso del producto obtenido por el procedimiento, en la elaboración de composiciones alimentarias saludables.

El cuarto objeto de la invención se refiere al uso del producto obtenido por el procedimiento, en la elaboración de composiciones cosméticas.

El quinto objeto de la invención se refiere a las composiciones alimentarias saludables y/o a las composiciones cosméticas directamente obtenidas.

## **DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION**

El problema técnico que resuelve la presente invención es conseguir la obtención de granos de arroz integral germinado y/o productos derivados de los mismos que presenten altos contenidos de compuestos biológicamente activos, notablemente incrementados con respecto al contenido de estos mismos compuestos en granos de arroz integral obtenidos por los procedimientos actualmente conocidos en el estado de la técnica.

Los inventores de la presente solicitud de invención han descubierto que la presencia de luz durante la germinación de granos de arroz integral es un parámetro de germinación que, sorprendentemente, permite obtener granos de

arroz integral germinados con contenidos incrementados de  $\gamma$ -orizanol y GABA, que son notablemente superiores a los de los mismos granos de arroz germinados en ausencia de luz y a los de los mismos granos sin germinar (ver Ejemplos 3 y 4).

Las principales ventajas técnicas que presenta la invención que aquí se plantea son:

a) con respecto al procedimiento:

- es económico, sencillo y respetuoso con el medio ambiente,

-

b) con respecto al producto obtenido por el procedimiento: en el caso de los granos de arroz germinado, éstos pueden ser incluidos fácilmente en la dieta de los consumidores bien directamente en su estado natural fresco, o transformarse en harinas para su incorporación en la formulación de nuevos alimentos o en forma de alimentos de preparación instantánea.

Tal y como se indica en el apartado del estado de la técnica, es conocido el uso de procedimientos de germinación para aumentar el contenido de compuestos biológicamente activos. Sin embargo, y en el conocimiento de los inventores de la presente solicitud de patente, de entre los parámetros involucrados en la germinación, hasta la fecha no se había considerado el uso de la luz durante la germinación de las semillas de arroz integral para incrementar el contenido de compuestos biológicamente activos.

Constituye el primer objeto de la invención, un procedimiento para obtener granos de arroz integral y/o productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos, en adelante procedimiento de obtención de la invención, que comprende:

a) en presencia de luz, germinar granos de arroz integral durante un período de tiempo de entre 20 y 120 h, a una temperatura de entre 25 y 34 °C.

En la presente invención por “compuestos biológicamente activos” se entiende cualquier sustancia eficaz para el mantenimiento de la salud o para disminuir el riesgo de padecer enfermedades.

En un aspecto de la invención, el compuesto biológicamente activo es un antioxidante, y preferentemente es el  $\gamma$ -orizanol.

Por “ $\gamma$ -orizanol” se entiende la mezcla de esteres de alcoholes triterpénicos del ácido ferúlico que se encuentran mayoritariamente en la cascarilla integral del arroz, y al que se le han asociado propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud.

En otro aspecto de la invención, el compuesto biológicamente activo es un compuesto con actividad, a título indicativo y no limitativo, antihipertensiva y/o antidiabética y/o antidepresiva, y preferentemente es el ácido gamma-aminobutírico.

Por “ácido gamma-aminobutírico o GABA” se entiende un aminoácido no proteico de relevante importancia como neurotransmisor cerebral, que se considera beneficioso para el buen mantenimiento de la salud y que actúa también como compuesto hipotensor, antidiabético y antidepresivo.

En el ámbito del procedimiento de la invención se incluye cualquier variedad de granos de arroz integral. Ejemplos de variedades de arroz que se utilizan en la invención son, aunque sin limitarse, variedades comerciales de *Oryza sativa* como, PRONACA SFL09, INIAP 14, INIAP 15, INIAP 17 y cultivar experimental GO39839.

En una realización particular, en el paso a) el tiempo es 24 horas, la temperatura es 28 °C y el  $\gamma$ -orizanol comprende un contenido superior a 14 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado y un

contenido de GABA superior a 23 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado (ver FIG 1 y 2).

El procedimiento de obtención de la invención, cuando utiliza granos de arroz integral de la variedad SFL 09 y se lleva a cabo durante 24 horas a 28 °C, permite un incremento del  $\gamma$ -orizanol del 30 % con respecto al mismo arroz sin germinar y del 57 % con respecto al mismo arroz germinado en ausencia de luz, y un incremento de GABA del 2500 % con respecto al mismo arroz sin germinar y del 92% con respecto al mismo arroz germinado en oscuridad.

Constituye el segundo objeto de la invención, el producto obtenido por el procedimiento de obtención de la invención, en adelante producto de la invención.

En un aspecto de la invención, el producto de la invención son los granos de arroz integral germinado, en adelante granos de arroz integral germinado de la invención, y/o los productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos.

Los granos de arroz integral germinado de la invención se consumen directamente como vegetal fresco lavado y limpio hasta tal punto que no requieren lavado adicional cuando se cocinan y admiten cualquier tipo de envasado, para venta de producto fresco, conservas (enlatados, encurtidos, entre otros), congelados o cualquier otra presentación de alimentos vegetales comestibles.

En la presente invención por "productos derivados" se entiende los granos de arroz integral germinado de la invención que sufren alguna transformación física o química, pero también a los extractos que comprenden los compuestos bioactivos presentes en los granos de arroz integral germinado o modificados.



Los granos de arroz germinado de la invención se deshidratan y se convierten en harinas siguiendo cualquier procedimiento convencional de los que se recogen en el estado de la técnica, y se utilizan como alimentos de preparación instantánea, harinas para rebozar o preparar alimentos de panadería o repostería, que adicionalmente son aptos para celíacos.

Los granos de arroz integral germinados de la invención y las harinas obtenidas a partir de los mismos, constituyen una fuente de compuestos bioactivos que se extraen de los mismos utilizando técnicas apropiadas, como las que por ejemplo se indican a título indicativo en los documentos CN102464696 A, CN103082171 A, JP2006111583 A2, JP5070361 B1.

En otro aspecto de la invención, el producto de la invención es un extracto que se obtiene a partir de los granos de arroz integral germinado de la invención o de las harinas obtenidas a partir de los mismos, que comprende  $\gamma$ -orizanol y/o GABA.

Constituye el tercer objeto de la invención, el uso del producto de la invención, en la elaboración de composiciones alimentarias saludables que lo comprenden.

Se entiende por "composiciones alimentarias saludables" aquellas preparaciones alimenticias sólidas o líquidas, incluyendo los suplementos alimenticios, ricas en compuestos biológicamente activos, preferentemente  $\gamma$ -orizanol y/o GABA, que adicionalmente al valor nutricional propio del arroz, promueven el buen estado de salud y bienestar de los consumidores, por su participación en la prevención y en el retraso en la aparición de patologías crónicas degenerativas como las hiperlipidemias, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, demencia, menopausia, depresión y cáncer.

El efecto saludable de los compuestos bioactivos  $\gamma$ -orizanol y/o GABA se recoge suficientemente en el apartado del estado de la técnica.

Ejemplos de composiciones alimentarias saludables son, aunque sin limitarse, platos preparados que comprenden carnes, vegetales, verduras, ensaladas y guarniciones; bebidas energéticas y fortalecedoras destinadas a poblaciones con necesidades específicas con el fin de conseguir su revalorización nutricional y funcional; productos cotidianos de rebozado, tempura, bollería, repostería, barritas energéticas, snacks, masas panarias, pastas y productos relacionados; y sopas, purés y bebidas instantáneas.

Cuando las composiciones alimentarias saludables, son suplementos alimenticios, se presentan en forma de cápsulas, en forma liofilizada, en forma líquida, en forma de píldoras o en forma de geles que comprenden los compuestos bioactivos, que preferentemente son  $\gamma$ -orizanol y/o GABA.

Constituye el cuarto objeto de la invención, el uso del producto de la invención, en la elaboración de composiciones cosméticas que lo comprenden.

Finalmente, constituye el quinto objeto de la invención, las composiciones alimentarias saludables y/o a las composiciones cosméticas que comprenden al producto de la invención.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1. Contenido en  $\gamma$ -orizanol (mg/100g).** (A) harina seca de granos de arroz integral crudo; (B) harina seca de granos de arroz integral germinado

obtenidos por el procedimiento de obtención de la invención durante 24 h a 28 °C; (C) harina seca de granos de arroz integrado germinado obtenidos en ausencia de luz.

**Figura 2. Contenido en GABA (mg/100g).** (A) harina seca de granos de arroz integral crudo; (B) harina seca de granos de arroz integral germinado obtenidos por el procedimiento de obtención de la invención durante 24 h a 28 °C; (C) harina seca de granos de arroz integral germinado obtenidos en ausencia de luz.

## **MODOS DE REALIZACION DE LA INVENCION**

### **Ejemplo 1. Obtención de granos de arroz integral germinado de la invención utilizando el procedimiento de obtención de la invención**

Para la obtención de los granos de arroz integral germinado de la invención se utilizó un arroz integral certificado comercial cultivar SFL 09 comercializado y distribuido por INDIA – PRONACA (Ecuador).

50 g de arroz integral se lavaron con agua destilada y a continuación se higienizaron con 250 mL de hipoclorito sódico al 0,1% durante 30 min. Después se escurrieron y se lavaron con agua destilada hasta pH neutro. Posteriormente, el arroz se sometió a germinación en la misma cantidad de agua destilada (relación 1:5 p/v) y se mantuvo durante 24 horas a 28 °C en presencia de luz.

Transcurrido ese tiempo, los granos de arroz integral germinado de la invención se escurrieron y se liofilizaron.

### **Ejemplo 2. Obtención de granos de arroz integral germinado utilizando un procedimiento de germinación en ausencia de luz.**

Se reprodujeron idénticas condiciones a las indicadas en el Ejemplo 1, pero en este caso la germinación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad.

**Ejemplo 3. Análisis de  $\gamma$ -orizanol por HPLC en los granos de arroz integral germinado obtenidos según los Ejemplos 1 y 2, y en el mismo arroz integral sin germinar**

La extracción de  $\gamma$ -orizanol de muestras obtenidas según los Ejemplos 1 y 2 se realizó con metanol 100% (relación 1:10, p/v), como control se utilizó el arroz integral sin germinar, en adelante crudo. Para ello, 2 g de la harina seca de arroz correspondiente obtenida mediante liofilización se combinaron con 20 mL de metanol y se agitaron en vortex durante 2 min. Posteriormente se centrifugaron a 4500xg, 10 min, a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante y el residuo se sometió a extracción en las mismas condiciones dos veces más. Los sobrenadantes se unieron y se concentraron a sequedad en rotavapor, a 35 °C. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de metanol, se filtró a través de membranas de 0,22  $\mu$ m y se analizó su contenido por HPLC. El sistema cromatográfico consistió en un módulo de separación Alliance 2695 (Waters, Milford, USA) equipado con una columna C18 (150 x 3,9 mm id, 5  $\mu$ m) (Waters) termostaticada a 25 °C y un detector de diodos alineados 2996 (Waters) a 325 nm. Se inyectaron 20  $\mu$ L de muestra y la separación se realizó a un flujo de 1 mL/min mediante la elución del siguiente gradiente formado por fase móvil A acetonitrilo grado HPLC, fase móvil B metanol grado HPLC y fase móvil C agua bi-distilada con el gradiente que se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente de elución para el análisis de  $\gamma$ -orizanol por HPLC

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)
0	60	35	5
5	60	35	5
8	60	40	0

10	60	40	0
20	22	78	0
35	22	78	0
45	60	35	5
50	60	35	5

La identificación se realizó comparando la longitud de onda de máxima absorción y espectro de masas con un patrón comercial de  $\gamma$ -orizanol (Cymit, España). La cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado con el mismo patrón comercial en un rango de concentraciones entre 5-150  $\mu\text{g/mL}$  ( $r^2 > 0.990$ ).

**Ejemplo 4.- Análisis de GABA en los granos de arroz integral germinado obtenidos según los Ejemplos 1 y 2, y en el mismo arroz integral sin germinar**

La extracción de GABA de las muestras obtenidas según los Ejemplos 1 y 2 se realizó en agua destilada (relación 1:20, p/v), como control se utilizó el arroz integral crudo. Para ello, 500 mg de la harina seca de arroz correspondiente obtenida mediante liofilización se combinaron con 12 mL de agua y la mezcla se mantuvo en agitación a 4 °C durante la noche. Posteriormente se centrifugaron a 32500xg, 10 min, a 5 °C. Del sobrenadante se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se liofilizaron, a los que se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de patrón interno allil-glicina (1,2 mg/mL) y 20  $\mu\text{L}$  del reactivo mezcla metanol:agua:trietilamina (1:1:0,5). La mezcla se agitó vigorosamente en vortex y se concentró a sequedad. A continuación se añadieron 30  $\mu\text{L}$  del reactivo mezcla formado por MetOH: fenilisotiocianato:trietilamina:agua (7:1:1:1) y se dejó reaccionar 20 min a temperatura ambiente. A continuación se procedió a su concentración a sequedad y su posterior disolución en fase móvil A formada por acetato amónico 0.1 M, pH 6.5, mezcla vigorosa en vortex y centrifugación a 32500xg durante 5 min. Posteriormente, la muestra se filtró a través de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  y se analizó su contenido por HPLC. El sistema cromatográfico

consistió en un módulo de separación Alliance 2695 (Waters, Milford, USA) equipado con una columna Columna Alltima C18 (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm) precedida por una Precolumna Alltima C18 (5  $\mu$ m, 7.5 x 4.6 mm) termostaticada a 43 °C y un detector de diodos alineados 2996 (Waters) a 242 nm. Se inyectaron 20  $\mu$ L de muestra y la separación se realizó a un flujo de 0,7 mL/min mediante la elución del siguiente gradiente formado por fase móvil A acetato amónico 0,1 M, pH 6.5 y fase móvil B acetato amónico 0,1 M-acetonitrilo-metanol pH 6.5 con el gradiente que se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Gradiente de elución para el análisis de GABA por HPLC

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
15	90	100
40	60	40
42	0	100
48	0	100
49	100	0
53	100	0

La identificación se realizó comparando la longitud de onda de máxima absorción y espectro de masas con un patrón comercial de GABA (Sigma, España). La cuantificación se realizó mediante una recta de calibrado interna y externa con el mismo patrón comercial (alil-glicina y GABA, respectivamente) en un rango de concentraciones entre 15-240  $\mu$ g/mL ( $r^2 > 0.990$ ).

## REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para obtener granos de arroz integral y/o productos derivados de los mismos que comprenden compuestos biológicamente activos, caracterizado por que comprende:

a) en presencia de luz, germinar granos de arroz integral durante un período de tiempo de entre 20 y 120 h y a una temperatura de entre 25 y 34°C.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los compuestos biológicamente activos se eligen de entre un compuesto con actividad antioxidante y/o un compuesto con actividad antihipertensiva y/o antidiabética y/o antidepresiva.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el compuesto con actividad antioxidante es  $\gamma$ -orizanol.

4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, caracterizado por que el compuesto con actividad antihipertensiva y/o antidiabética y/o antidepresiva es ácido gamma-aminobutírico.

5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en el paso a) el tiempo es 24 horas y la temperatura 28 °C.

6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que el  $\gamma$ -orizanol comprende un contenido superior a 14 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado y un contenido de ácido gamma-aminobutírico superior a 23 mg por cada 100 g de harina seca de granos de arroz integral germinado.

7.- Producto obtenido por el procedimiento tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8.- Producto según la reivindicación 7, que son granos de arroz integral germinado.

9.- Producto según la reivindicación 7, que es una harina que se obtiene a partir de los granos de arroz integral germinado según la reivindicación 8.

10.- Uso del producto tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la elaboración de composiciones alimentarias saludables.

11.- Uso del producto tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la elaboración de composiciones cosméticas.

12.- Composiciones alimentarias saludables y/o composiciones cosméticas obtenidas tal y como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.



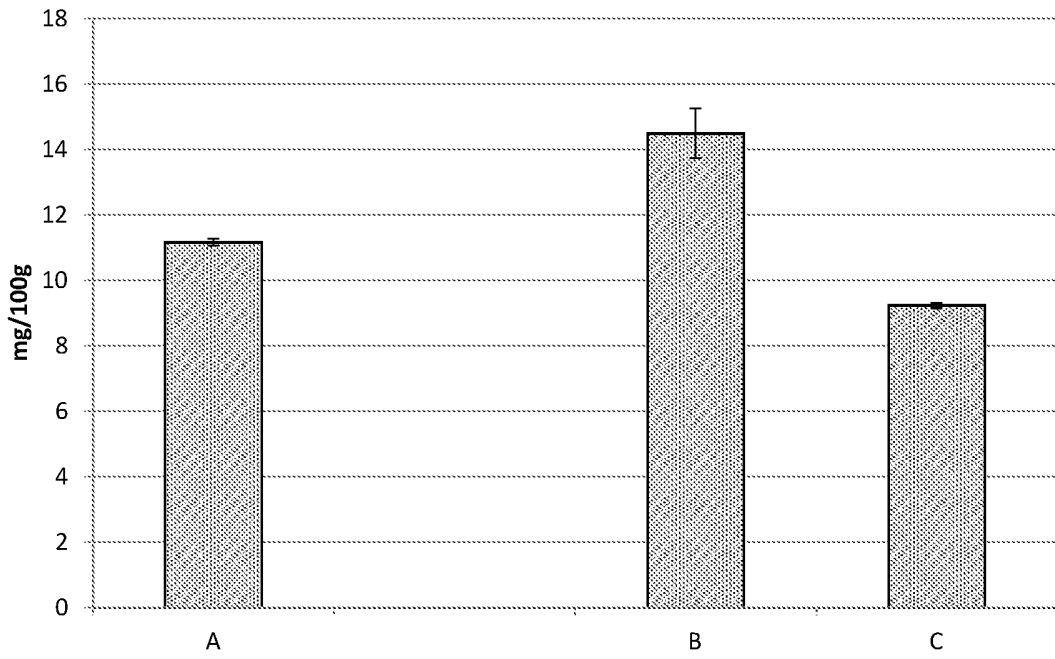


FIG 1

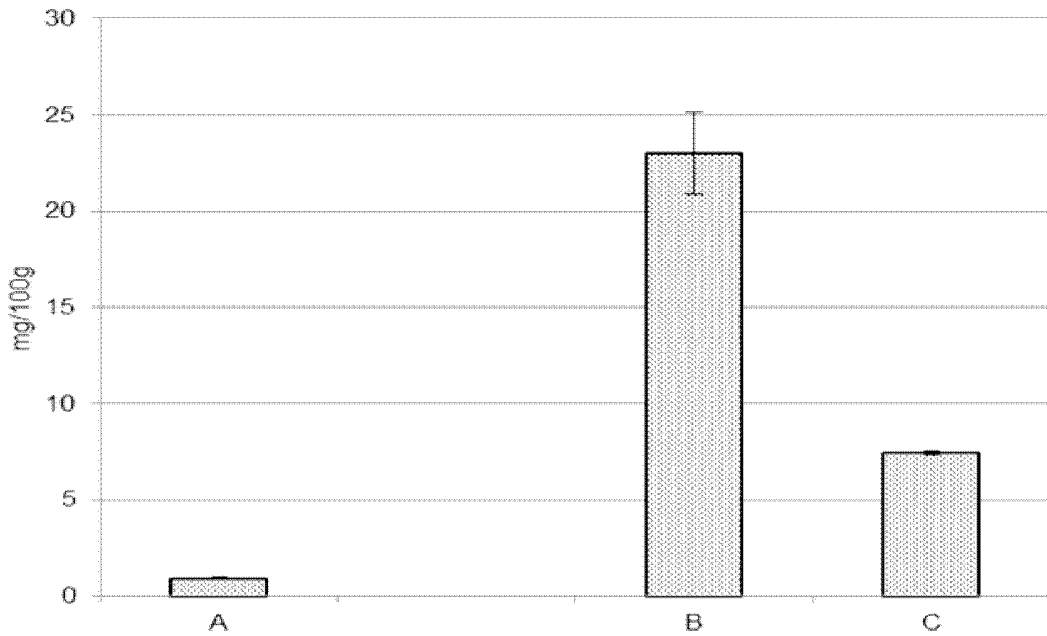


FIG 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2015/070025

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A01G, A23L, A01C, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BD-TXTE, FSTA, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2009106700 A (PANASONIC CORP) 21/05/2009, (abstract) Retrieved from Internet [on line] [retrieved on 03.03.2015]	1-12
X	JP 2009039087 A (PLANT GENOME CT CO LTD) 26/02/2009, (abstract) Retrieved from Internet [on line] [retrieved on 03.03.2015]	1-12
A	ES 2136580 A1 (PROVITAL S A) 16/11/1999, column 5, lines 26-68; claims 1, 2.	1, 7, 8, 11, 12
A	JP H10215800 A (YAMAUCHI SATOKO) 18/08/1998, (abstract) Retrieved from Internet [on line] [retrieved on 03.03.2015]	1
A	JP 2006020565 A (MORI SANGYO KK) 26/01/2006, (abstract) Retrieved from Internet [on line] [retrieved on 16.03.2015]	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
18/03/2015

Date of mailing of the international search report  
(24/03/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
A. Polo Diez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495524

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2015/070025

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP2009106700 A	21.05.2009	NONE	
-----	-----	-----	-----
JP2009039087 A	26.02.2009	NONE	
-----	-----	-----	-----
ES2136580 A1	16.11.1999	WO9956712 A1	11.11.1999
-----	-----	AU3333799 A	23.11.1999
-----	-----	-----	-----
JPH10215800 A	18.08.1998	NONE	
-----	-----	-----	-----
JP2006020565 A	26.01.2006	NONE	
-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070025

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A01G16/00* (2006.01)

*A23L1/172* (2006.01)

*A61K8/97* (2006.01)

*A01C1/02* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070025

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A01G, A23L, A01C, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, BD-TXTE, FSTA, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	JP 2009106700 A (PANASONIC CORP) 21/05/2009, (resumen) Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 03.03.2015]	1-12
X	JP 2009039087 A (PLANT GENOME CT CO LTD) 26/02/2009, (resumen) Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 03.03.2015]	1-12
A	ES 2136580 A1 (PROVITAL S. A) 16/11/1999, columna 5, líneas 26-68; reivindicaciones 1, 2.	1, 7, 8, 11, 12
A	JP H10215800 A (YAMAUCHI SATOKO) 18/08/1998, (resumen) Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 03.03.2015]	1
A	JP 2006020565 A (MORI SANGYO KK) 26/01/2006, (resumen) Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 16.03.2015]	1

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
18/03/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**24 de marzo de 2015 (24/03/2015)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
A. Polo Diez  
Nº de teléfono 91 3495524

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070025

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
JP2009106700 A	21.05.2009	NINGUNO	
JP2009039087 A	26.02.2009	NINGUNO	
ES2136580 A1	16.11.1999	WO9956712 A1 AU3333799 A	11.11.1999 23.11.1999
JPH10215800 A	18.08.1998	NINGUNO	
JP2006020565 A	26.01.2006	NINGUNO	

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*A01G16/00* (2006.01)

*A23L1/172* (2006.01)

*A61K8/97* (2006.01)

*A01C1/02* (2006.01)