



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 363 958**

② Número de solicitud: 201030175

⑤ Int. Cl.:
A23L 1/314 (2006.01)
A23L 3/3472 (2006.01)
A61K 36/738 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **09.02.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.08.2011

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Extremadura
Campus Universitario
Avda. de Elvas, s/n
06071 Badajoz, ES**

⑦ Inventor/es: **Morcuende Sánchez, David;
Ventanas Barroso, Jesús;
Ganhao, Rui Maneta y
Estévez García, Mario**

⑦ Agente: **Carpintero López, Mario**

⑤ Título: **Empleo de un extracto de *Rosa canina* L. en la elaboración de productos alimenticios.**

⑤ Resumen:

Empleo de un extracto de *Rosa canina* L. en la elaboración de productos alimenticios.

La invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto con propiedades antioxidantes a partir del fruto de la *Rosa canina* L que comprende las etapas: (a) extracción a partir del fruto triturado de la *Rosa canina* L con un disolvente seleccionado entre agua, etanol o sus mezclas y obtención de un sobrenadante (b) concentración del sobrenadante resultante de la etapa (a) mediante destilación a vacío. La invención se refiere asimismo dicho extracto y a composiciones alimenticias como por ejemplo productos cárnicos que lo contienen.

ES 2 363 958 A1

DESCRIPCIÓN

Empleo de un extracto de *Rosa canina* L. en la elaboración de productos alimenticios.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del sector de la alimentación y más particularmente dentro del sector de los aditivos antioxidantes para alimentos en general. En concreto la invención se refiere a un extracto con propiedades antioxidantes obtenido a partir del fruto de la *Rosa canina* L y a su empleo en la elaboración de composiciones alimenticias como por ejemplo productos cárnicos que presentan propiedades mejoradas.

Antecedentes de la invención

Los antioxidantes sintéticos se han utilizado durante años como aditivos alimentarios para prolongar la vida útil, especialmente de las grasas y de productos con alto contenido en lípidos, retrasando el proceso de oxidación de los mismos. Sin embargo, su uso es cada vez más restringido debido a los riesgos y toxicidad potenciales de estas sustancias y el rechazo de los consumidores (Nawar W. W. (1996). Lipids. In Food Chemistry, O.R. Fennema (ed.), pp 225-319, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong). Así, hoy en día la tendencia de la industria alimentaria está enfocada hacia el reemplazo de estos antioxidantes sintéticos por antioxidantes de origen natural especialmente los provenientes de plantas. Hace unos años, el término antioxidante de origen natural se asociaba principalmente con compuestos tales como el ácido ascórbico - vitamina C -, la vitamina E y eventualmente con la vitamina A. Sin embargo, en los últimos años numerosas investigaciones han ampliado el número de especies químicas con actividad antioxidante, entre las que destaca especialmente, los denominados “polifenoles” debido a la presencia en su estructura química de uno o más anillos fenólicos (Heinonen, M. (2007). Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics: a Finnish perspective- Review, *Mol. Nutr. Food Res.*, 51, 684 - 691).

Estos compuestos fenólicos y, en particular los presentes en frutas y vegetales, han ganado interés entre los consumidores y en la comunidad científica porque además de sus uso como antioxidantes en los alimentos, numerosos ensayos han encontrado evidencias de que esos compuestos presentan, en determinadas condiciones, propiedades antibacterianas, así como efectos beneficiosos frente a determinadas patologías cardiovasculares o frente a determinados tipos de cáncer.

Sin embargo, también existen un buen número de publicaciones y ensayos científicos en los que la utilización de polifenoles como agentes antioxidantes no reportaron resultados beneficiosos o incluso se mostraron como agentes pro-oxidantes, es decir que promueven la oxidación, en ensayos de estabilidad oxidativa (Estévez, M.; Kylli, P.; Puolanne, E.; Kivikari, R.; & Heinonen, M. (2008) Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10933-10940; Salminen, H. & Heinonen, M. (2008). Plant phenolics affect oxidation of tryptophan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56, 7472-81). En la actualidad se conoce que esta aparente contradicción de los resultados obtenidos puede atribuirse a varios factores que deben siempre tenerse en cuenta cuando se plantea el uso de estos compuestos como antioxidante en alimentos.

Bajo el término “polifenoles” se engloban una gran variedad de compuestos fenólicos que se clasifican en: 1.-) *flavonoideos*, formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado, y entre los que se encuentran los flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, proantocianidinas, flavanonas, etc. y 2.-) *no flavonoideos*, comúnmente llamados ácidos fenólicos, que contienen un anillo aromático con diferentes grupos funcionales. La distribución de estos compuestos en los vegetales, su polaridad y solubilidad, así como su actividad antioxidante varía notablemente entre las distintas familias químicas, por lo que se requiere un amplio conocimiento de que compuestos fenólicos y en qué concentración están presentes en un extracto dado, con el fin de poder predecir su potencial uso como antioxidante.

De manera general a los compuestos fenólicos se le atribuyen características reductoras ya que actúan como agentes donadores de electrones demostrando su potencial como neutralizadores de radicales libres, y por tanto actuando así como antioxidantes. Sin embargo, en sistemas más complejos como en un producto cárnico, los compuestos fenólicos están integrados en reacciones redox mucho más complejas y su potencial reductor es dependiente de muchos factores tales como el pH, su concentración o la presencia de otros compuestos tales como metales u otros antioxidantes, pudiendo un mismo compuesto actuar como antioxidante o pro-oxidante en función de los factores anteriormente descritos. Además, los compuestos fenólicos de las plantas pueden también regenerar otros antioxidantes o actuar sinérgicamente o antagonicamente con otros compuestos fenólicos u otros antioxidantes endógenos como la vitamina E.

Por lo tanto a la vista de lo expuesto es evidente que sigue existiendo la necesidad de proporcionar nuevos extractos naturales eficaces con capacidad antioxidante, a la vez que no pro-oxidante, para poder ser utilizados en el sector alimenticio y alargar la vida media de los mismos. En este sentido los inventores han descubierto un nuevo extracto obtenido a partir del fruto de *Rosa canina* L. útil para su empleo en la elaboración en general de productos alimenticios, y productos cárnicos en particular. Este extracto que ha demostrado su eficacia como agente antioxidante en productos cárnicos crudos y tratados térmicamente, mejorando la vida útil y estabilidad oxidativa

de los mismos, siendo además un producto que no produce modificaciones significativas en el color o sabor de los alimentos.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1. Evolución del contenido en TBA-RS de hamburguesas frescas sometidas a refrigeración y elaboradas con una fórmula base (Control) y con la adición de un extracto obtenido de la fruta *Rosa canina* L.

10 Figura 2. Evolución del contenido en TBA-RS de hamburguesas cocinadas sometidas a refrigeración y elaboradas con una fórmula base (Control) y con la adición de un extracto obtenido de la fruta *Rosa canina* L.

Figura 3. Evolución del contenido en carbonilos de hamburguesas cocinadas sometidas a refrigeración y elaboradas con una fórmula base (Control) y con la adición de un extracto obtenido de la fruta *Rosa canina* L.

15 Figura 4. Evolución del valor a* del sistema CIELa*b* de hamburguesas cocinadas sometidas a refrigeración y elaboradas con una fórmula base (Control) y con la adición de un extracto obtenido de la fruta *Rosa canina* L.

Descripción de la invención

20 La presente invención se relaciona por tanto con un extracto con actividad antioxidante obtenido a partir del fruto de *Rosa canina* L. útil para su empleo en la elaboración en general de productos alimenticios, y productos cárnicos en particular.

25 El extracto es obtenible mediante un procedimiento, en adelante procedimiento de la invención, que comprende las siguientes etapas:

(a) extracción a partir del fruto triturado de la *Rosa canina* L con un disolvente seleccionado entre agua, etanol o sus mezclas y obtención de un sobrenadante

30 (b) concentración del sobrenadante resultante de la etapa (a) mediante destilación a vacío.

35 La *Rosa canina* L. (nombre común escaramujo) es un arbusto de amplia distribución en el ecosistema Mediterráneo. El procedimiento de la invención comprende en primer lugar la recolección de los frutos, su lavado y cortado. A continuación los frutos cortados se ponen en contacto con el disolvente seleccionado, que en una realización particular es una mezcla de etanol y agua, preferentemente en la proporción de 7:3. La cantidad relativa de fruto y disolvente puede variar entre amplios márgenes dependiendo en parte de la necesidad de obtener un extracto más o menos concentrado en función de la aplicación posterior a la que se destine. En una realización particular la proporción fruto: disolvente siendo el disolvente una mezcla de etanol agua de en la proporción 7:3, es de 1:5. El disolvente preferentemente es de uso alimentario ya que el extracto obtenido es útil en elaboración de productos alimenticios.

40 El tipo de disolvente utilizado condiciona el tipo de compuestos fenólicos extraídos en cada caso y su concentración por una cuestión evidente de polaridad o afinidad química. No obstante los inventores han demostrado que la extracción de compuestos fenólicos con agua, o etanol o con mezclas de ambos, conduce a extractos con capacidad antioxidante similar y eficacia contrastada, aunque la mezcla de etanol: agua y en particular en proporción 7:3 se ha probado como el disolvente que proporciona mayor grado de extracción. La elección del tipo de disolvente en particular de la cantidad de etanol viene determinado en gran medida por el uso al que se destine el extracto de la invención como se expone más adelante.

45 La etapa a) del procedimiento se lleva a cabo en un sistema de homogeneización convencional provisto de cuchillas y provisto de medios que permitan mantener la temperatura igual o inferior a 35°C, tal como un baño de agua fría. Se obtiene un homogeneizado, que generalmente se separa a continuación, en un sólido y un sobrenadante. Dicha separación puede hacerse mediante cualquier procedimiento convencional por ejemplo por centrifugación seguido de filtración o decantación.

55 El sobrenadante resultante de la etapa a) generalmente se filtra y puede someterse a continuación a la siguiente etapa b) o alternativamente puede almacenarse refrigerado después de la filtración hasta el momento de llevar a cabo dicha etapa b).

60 La etapa b) comprende someter el sobrenadante de la etapa a) a una destilación a vacío que puede llevarse a cabo de forma convencional mediante por ejemplo columna de vacío o en un evaporador rotativo. El sobrenadante se concentra por eliminación del disolvente a baja temperatura como consecuencia del vacío lo cual permite preservar la actividad antioxidante de los compuestos extraídos. El tipo de disolvente utilizado en el procedimiento de la invención influye en el tiempo necesario para la etapa b) (mayor cuanto mayor sea el contenido en agua o si es únicamente agua).

65 El procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de caracterización y titulación de la actividad antioxidante según la determinación de los compuestos fenólicos totales llevada a cabo según el método Folin-Ciocalteu (ver Ejemplos 1 y 2).

ES 2 363 958 A1

El procedimiento de la invención presenta la ventaja de ser eficaz, rápido, y de bajo costo además de respetuoso con el medio ambiente por el tipo de disolventes utilizados, y permite la obtención de un extracto de *Rosa canina* L. con propiedades antioxidantes, que constituye otro aspecto de la presente invención, en adelante extracto de la invención.

El extracto de la presente invención ha demostrado su eficacia como agente antioxidante en particular en productos cárnicos crudos y tratados térmicamente ensayados (ver ejemplo 4 y Figuras 1 a 4). Los resultados obtenidos han demostrado que además el extracto mejora la apariencia visual de los productos cárnicos durante su conservación, como consecuencia de una mejor estabilidad del color en comparación con un lote control así como una inhibición efectiva frente a los procesos oxidativos de los lípidos y/o de las proteínas de los productos cárnicos, mejorando la vida útil y estabilidad oxidativa de los mismos, todo esto, sin que el extracto produzca modificaciones significativas en el color o sabor de los alimentos debido a su incorporación en los productos. Por lo tanto una ventaja adicional del extracto de la invención es la capacidad de no alterar las propiedades organolépticas, de color, y sabor de las composiciones alimenticias a las que se incorpora lo que potencia evidentemente su aceptación por parte del consumidor.

Por tanto en otro aspecto la invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición alimenticia que comprende la adición a la misma del extracto de la invención.

La adición se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica convencional. La forma de incorporación depende por ejemplo del tipo de composición alimenticia, y en particular del tipo de producto cárnico sobre el que se adiciona. Así en una realización preferente la adición se lleva a cabo por incorporación directa del extracto en la composición de un producto cárnico. En otra realización particular la adición se lleva a cabo por incorporación directa a la superficie del producto cárnico mediante micro-pulverización con spray. Típicamente antes de la micro-pulverización el extracto se filtra con un filtro de membrana adecuado (0.65 micras). La incorporación directa puede hacerse por ejemplo en el caso de productos cárnicos no picados tales como carne fresca o marinada envasadas en atmósferas modificadas.

Como se ha mencionado anteriormente la elección del tipo de disolvente, y en particular de la cantidad de etanol en el caso de una mezcla etanol:agua, viene determinado en gran medida por el tipo de composición alimenticia al que se vaya a adicionar posteriormente el extracto de la invención así como por la técnica con la que la adición del extracto se lleva a cabo. En general para obtener productos cárnicos en los que se añade agua en la elaboración de su composición, como por ejemplo: salchichas cocidas, o fiambre de jamón, se usa preferentemente un extracto acuoso diluido en la propia agua de formulación del producto, con lo que en el procedimiento de obtención del extracto se utiliza preferentemente agua. Sin embargo, para obtener productos cárnicos en cuya elaboración no se añade agua en la composición, es preferible el empleo de etanol o de una mezcla de etanol: agua con mayor proporción de etanol en el procedimiento de la invención facilitando así la etapa de concentración a vacío. Cabe señalar no obstante que cualquier disolvente puede utilizarse en el procedimiento de la invención independientemente de la aplicación concreta y el modo de la misma. Las posibles variaciones en el grado de extracción de compuestos bioactivos en función del uso de una mayor o menor proporción de agua:etanol quedan minimizadas mediante la etapa adicional del procedimiento de la invención de caracterización y titulación del la actividad antioxidante en la que los extractos obtenidos son ajustados hasta presentar la concentración en polifenoles antioxidantes requerida en cada caso. Del mismo modo, otros parámetros, como la variabilidad intrínseca en la composición de las frutas silvestres (causada por año de cosecha, localización, tipo de suelo, estado de maduración...) hacen igualmente que esta etapa de caracterización y titulación de la actividad antioxidante se deba llevar a cabo de forma previa a su uso en productos alimenticios.

En otro aspecto adicional la invención se refiere a una composición alimenticia que comprende el extracto de la invención. Dicha composición alimenticia puede ser cualquier tipo de alimento, ingrediente alimenticio, o bebida, sin ningún tipo de limitación, tales como por ejemplo, entre otros, salsas, alimentos precocinados, sopas, leche, yogurt, quesos, pan, bizcochos, galletas, etc. En una realización particular dicha composición es producto cárnico, tal como por ejemplo un producto cárnico crudo, un producto cárnico tratado térmicamente, un producto cárnico crudo curado, un producto cárnico adobado, entre otros.

La cantidad adecuada de extracto para cada composición alimenticia y en particular para cada producto cárnico, puede variar dentro de amplios márgenes, y ser determinada en cada caso fácilmente por el experto en la materia. Dicha cantidad depende sobre todo de la naturaleza de la composición alimenticia, y en particular del producto cárnico al que va destinado, en concreto de la composición, tratamiento tecnológico, contenido y tipo de grasa presente en el mismo, etc., En una realización preferente el extracto está presente en la composición alimenticia, y en particular en un producto cárnico, en una cantidad caracterizada por ser capaz de inhibir los procesos oxidativos de los lípidos y/o proteínas. En una realización particular la cantidad de extracto en un producto cárnico es tal que el contenido de polifenoles totales que presenta es de 200-400 mg de equivalentes de ácido gálico por Kg de producto cárnico, habiéndose determinado dicho contenido de los compuestos fenólicos según el método Folin-Ciocalteu (ver Ejemplo 1).

Los inventores han llevado a cabo ensayos comparativos que muestran la eficacia antioxidante del extracto de la invención incorporado a productos cárnicos (ver Ejemplo 4). Así en las figuras 1 y 2 se muestran los resultados de la evolución del contenido en TBA-RS de hamburguesas frescas y cocinadas sometidas a refrigeración. La

determinación del contenido en TBA-RS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) es uno de los métodos más extendidos para el estudio de la oxidación de los lípidos en los alimentos (Raharjo, S. & Sotos, J. N. (1993). Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscles tissues: a review. *Meat Science*, 35: 145-169; Estévez, M., Morcuende, D. & Ventanas, S. (2009). Determination of oxidation. In "Handbook of Muscle Foods Analysis" 13, 221-239. CRC Press. Taylor & Francis Groups). Esta determinación se realizó siguiendo el método descrito por Tarladgis y cols. (Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T. & Dugan, L. Jr. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 37, 44-48). El fundamento de este método reside en que el malondialdehído (un producto resultante de la oxidación lipídica) reacciona con el ácido tiobarbitúrico en medio ácido dando lugar a un pigmento coloreado que es medible espectrofotométricamente a 532 nm; por tanto un incremento del contenido en TBA-RS está relacionado con un incremento en el desarrollo de los procesos oxidativos de los lípidos de los alimentos.

En la figura 3 se muestra los resultados de la evolución del contenido en carbonilos de hamburguesas cocinadas sometidas a refrigeración. El incremento de los carbonilos es una medida que nos indica el desarrollo de los procesos oxidativos de las proteínas de los alimentos. La medida de contenido en carbonilos es uno de los métodos más utilizados y extendido para determinación de la oxidación de las proteínas la carne y los productos cárnicos (Estévez, M., Morcuende, D. & Ventanas, S. (2009). Determination of oxidation. In "Handbook of Muscle Foods Analysis" 13, 221-239. CRC Press. Taylor & Francis Groups). Esta determinación del contenido en carbonilos mostrado en este ejemplo del ensayo de la actividad antioxidante del extracto de *Rosa canina* L. se realizó según el método descrito por Oliver y cols. (Oliver, C.N.; Ahn, B.- W.; Moerman, E.J.; Goldstein, S.; & Stadtman, E.R. (1997) Aged-related changes in oxidized proteins, *J. Biol. Chem.*, 262, 5488) cuyo fundamento consiste en que los carbonilos (productos resultantes de la oxidación de las proteínas) reaccionan con el reactivo DNPH (2,4-dinitrofenilhidracina) produciendo de manera proporcional a su concentración un pigmento medible espectrofotométricamente.

En la figura 4 se muestra la evolución del valor a^* del sistema CIELa*b* de hamburguesas cocinadas sometidas a refrigeración. La medida de color instrumental está ampliamente difundida en el estudio de las características visuales de la carne y los productos cárnicos (Faustman, C. & Cassen, R.G. (1990). The biochemical basis for discoloration in fresh meat: A review. *Journal of Muscle Food*, 1: 217-243). En el presente ensayo el color instrumental de las hamburguesas se determinó mediante un colorímetro Minolta modelo Chroma Meter CR-300 equipado con iluminación difusa de lámpara de xenón y con un área de medición de 8 mm. Se empleó un iluminante D65 con geometría de observación con ángulo de 0°. El aparato fue calibrado mediante una placa de calibración de color blanco modelo CR-A43. Las mediciones se hicieron en el espacio de color CIEL*a*b* (CIE, 1976) del que se obtienen las coordenadas de cromaticidad L^* (luminosidad), a^* (eje rojo-verde) y b^* (eje amarillo-azul). Los resultados de la figura 4 muestran la evolución del valor a^* (intervalo -60, verde puro; +60, rojo puro) del sistema CIELa*b* que es una medida que nos indica principalmente la evolución del color rojo de los alimentos, siendo este hecho de especial interés en los productos cárnicos. La reducción de la coloración roja de la carne y productos cárnicos durante la refrigeración está relacionada con la oxidación de los pigmentos presentes en la carne (mioglobina).

Por último una ventaja adicional de la presente invención reside en que el extracto se obtiene a partir del fruto de un arbusto de amplia distribución y accesibilidad en el ecosistema Mediterráneo.

A continuación se presentan ejemplos ilustrativos de la invención que se exponen para una mejor comprensión de la invención y en ningún caso deben considerarse una limitación del alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

1.- Caracterización *in vitro* del potencial antioxidante de los frutos de *Rosa canina* L. así como sus componente funcionales mediante técnicas de determinación de compuestos fenólicos totales

Se caracterizó el potencial antioxidante de los frutos mediante técnicas que cuantifican el contenido en compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante *in vitro*:

1.1. Determinación de polifenoles totales

La determinación de compuestos fenólicos en los extractos de *Rosa canina* L. se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (Singleton, V. L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 144-158) con modificaciones Pantelidis y cols. (Pantelidis, G. E., Vasilakakis, M., Manganaris, G. A., & Diamantidis, Gr. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, 777-783). Los resultados se muestran en la tabla 1. El fundamento de esta determinación se basa en los compuestos fenólicos de las frutas se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu, dando una coloración azul directamente proporcional al contenido de polifenoles. Brevemente, se tomó una alícuota de 0,5 mL del extracto etanólico de la *Rosa canina* L. en un tubo de ensayo; posteriormente se añadieron 2.5 mL de

ES 2 363 958 A1

reactivo de Folin-Ciocalteu al 10% (en agua) y 2,0 mL de carbonato de sodio al 7,5% (p/v). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente a oscuridad durante 60 minutos. Tras este periodo de tiempo la absorbancia fue medida inmediatamente a 740 nm, contra un blanco en el que la muestra se sustituyó por la misma cantidad de agua. Las medidas cuantitativas fueron realizadas contrastando los resultados con una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de fruta.

1.2 Ensayos de actividad antioxidante *in vitro* mediante técnicas “radical scavenging”

La determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de las frutas se llevó a cabo mediante el ensayo con el radical, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo -DPPH- y con la determinación de la capacidad antioxidante equivalente de TROLOX (TEAC) utilizando el radical ABTS. Estas técnicas se basan en la capacidad de las sustancias con actividad antioxidante en reducir un radical sintético que presenta una coloración medible espectrofotométricamente, siendo su actividad antioxidante *in vitro* proporcional a la decoloración producida al radical.

1.2.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método radical - 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad antioxidante del extracto etanólico de la *Rosa canina* L fue determinada mediante la técnica del radical DPPH descrita por Turkmen y cols., (Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, 835-841); los resultados se muestran en la tabla 1. Se preparó una solución de DPPH 6×10^{-5} M en metanol. Esta disolución de color violeta intenso presenta un máximo de absorción a 517 nm. Se prepararon disoluciones con concentraciones crecientes del extracto etanólico de la *Rosa canina* L. Así, se mezcló una alícuota de cada una de las disoluciones con 1,950 mL del radical DPPH en metanol. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 90 minutos. La absorbancia de la disolución violeta del radical DPPH fue medida a 517 nm contra un blanco de metanol (Absorbancia del DPPH inicial) presentando valores próximos a 0.700. Para calcular el porcentaje de inhibición del radical DPPH para cada concentración de extracto se usó a siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [(\text{Abs DPPH inicial} - \text{Abs DPPH remanente}) / \text{Abs DPPH inicial}] * 100$$

La capacidad antioxidante de cada muestra fue expresada como la cantidad de muestra (concentración de antioxidante) necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50% (EC50). Para calcular este parámetro es necesario elaborar una curva patrón para cada extracto de fruta donde se enfrentan concentraciones crecientes del antioxidante (extracto de fruta) con el porcentaje de inhibición del radical obtenido para dicha concentración.

1.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) mediante radical ABTS

El análisis de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) del extracto de *Rosa canina* L. fue realizada usando el método del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) - ABTS- según el método descrito por Re y cols. (Re R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 26, 1231-1237).

En primer lugar, el radical catión ABTS+ fue generado *in vitro* mediante la reacción de iguales cantidades (5 mL) de 7 mM ABTS (en agua) y 2,45 mM de persulfato del potasio (en agua). A continuación la mezcla fue incubada a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 horas (se obtiene una solución azul marino oscuro). Esta solución fue diluida posteriormente con etanol hasta que la absorbancia alcanzó (Abs ABTS+ inicial).

Un mililitro de la solución diluida de ABTS+ (absorbancia inicial: 0.700 a 734 nm) se mezcló con 10 μ L de un extracto diluido (1:10) de *Rosa canina* L. La mezcla reactiva fue incubada en oscuridad a temperatura ambiente durante 6 minutos. Las absorbancias de la disolución del radical ABTS+ y de las muestras problema (extractos de frutas + ABTS+) fueron medidas inmediatamente a 734 nm, contra un blanco de etanol. Se calculó en porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(\text{Abs ABTS} + \text{ inicial} - \text{Abs ABTS} + \text{ remanente}) / \text{Abs ABTS} + \text{ inicial}] * 100$$

Los porcentajes de inhibición obtenidos para las muestras problema se extrapolan en la curva de calibración lo que nos permite presentar los resultados como TEAC (Trolox equivalent antioxidant activity) es decir, la actividad antioxidante equivalente a la que tiene el Trolox (mM Trolox/miligramo extracto fruta fresca).

ES 2 363 958 A1

TABLA 1

Contenido en compuestos fenólicos totales (CFT) y actividad antioxidante frente a los radicales DPPH y ABTS del extracto etanólico procedente de la fruta Rosa canina L.

5

	CFT ¹		DPPH ²		ABTS ³	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Extracto <u>Rosa canina</u> L.	1175	222	0.63	0.11	94	14

10

15

¹ Compuesto Fenólicos totales (ver Ejemplo 1.1.) Resultados expresados como mg GAE / 100 g fruta

20

² Prueba inhibición del radical DPPH (ver Ejemplo 1.2.1) Resultados expresados como EC₅₀: concentración necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%

25

³ Prueba inhibición del radical ABTS (ver Ejemplo 1.2.2) Resultados expresados como µM TEAC/g fruta

30

D.E.: desviación estándar

1.3 Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC

35

Una vez contrastada la capacidad antioxidantes *in vitro* del extracto se determinó el perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC con el fin de poder conocer los principales compuestos determinar su potencial uso.

40

Para ello se realizó un análisis según los métodos descritos por Kähkönen y cols. (Kähkönen, M., Hopia, A. & Heinonen, M. 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4076-4082) y Kylli y cols (Kylli, P., Nousiainen, P., Biely, P., Sipilä, J., Tenkanen, T & Heinonen, M. 2008. Antioxidant Potential of Hydroxycinnamic Acid Glycoside Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:4797-4805) mediante HPLC acoplado a detectores diode array y de fluorescencia. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 2.

45

TABLA 2

Perfil de compuestos fenólicos de los frutos de Rosa canina L. obtenidos mediante HPLC. Contenido expresado en mg de equivalentes/100 gramos de fruta (materia seca)

50

Cate quinas	Ácidos hidroxi- benzoicos	Ácidos hidroxi- cinámicos	Flavo- noles	Ácido Elágico	Anto- cianos	Pro- cianidinas
1178.87	9.27	47.72	22.46	17.14	1.64	4624.92

55

Ejemplo 2

Procedimiento de obtención de un extracto con actividad antioxidante a partir de Rosa canina L.

60

El procedimiento comenzó con el lavado y precortado de los frutos de Rosa canina L recolectados en su momento óptimo de maduración. Los frutos precortados se mezclaron con una mezcla agua:etanol 7:3 en una proporción 1:5 en un bote para centrifuga de nalgene®.

65

La extracción se llevó a cabo en un sistema de homogenización de cuchillas Sorvall Omni Mixer durante 5 minutos a 3000 r.p.m. Durante el procedimiento de picado el bote para centrifuga se introdujo en agua helada para evitar que la temperatura del contenido ascendiera de 35°C. Tras el proceso de picado el bote con el homogeneizado se sometió a centrifugación (2000 r.p.m. 5 minutos) para separar los sólidos resultantes del proceso de homogeneizado.

ES 2 363 958 A1

El sobrenadante obtenido se pasó a través de un papel de filtro y fue refrigerado hasta su concentración mediante destilado a vacío.

Una vez obtenidos el sobrenadante hidro-alcohólico de los frutos de *Rosa canina* L. de la fase anterior éste se sometió a una concentración mediante destilación a vacío. La concentración a vacío y bajas temperaturas permite preservar la actividad antioxidante de los compuestos extraídos. El proceso de concentración se llevó a cabo en un evaporador rotativo de vacío (Heidolph modelo W2000) acoplado a una bomba de vacío Büchi V-700 con controlador de vacío Büchi V-850.

A continuación se llevó a cabo la caracterización y titulación de la actividad antioxidante hasta el nivel determinado para su aplicación en productos cárnicos mediante la determinación de los compuestos fenólicos totales (método Folin-Ciocalteu).

Como se ha descrito apartado “estado de la técnica” de esta memoria, la eficacia de los extractos antioxidantes en sistemas cárnicos depende de múltiples factores como la matriz del producto, la concentración de los compuestos fenólicos o la presencia de otros antioxidantes. Por este motivo se realizaron una serie de pruebas iniciales para determinar el nivel óptimo de incorporación del extracto con actividad antioxidante obtenido de *Rosa canina* L. Por otra parte, debido a la naturaleza de la fuente de extracción de los compuestos activos (frutos silvestres) se hace necesario caracterizar la eficacia de los extractos obtenidos, pues pueden existir variaciones en función del lugar o momento de recolección de los mismos. Tras una serie de pruebas experimentales iniciales en diversos productos cárnicos se determinó que el óptimo de utilización del extracto de *Rosa canina* L. se sitúa entre 200-400 ppm (partes por millón; mg/kg de producto cárnico), expresado en equivalentes de ácido gálico según se describe en el Ejemplo 1.1.

Ejemplo 3

Aplicación en productos cárnicos mediante incorporación en la fórmula o mediante micro pulverización de aplicación directa

La forma de aplicación del extracto de *Rosa canina* L. varió en función de tipo de producto cárnico al que fue destinado.

Se ha testado la eficacia del extracto de *Rosa canina* L. mediante aplicación directa en superficie mediante micro-pulverización con spray previa filtración con filtro de membrana de 0.65 micras; este método de aplicación se ha testado en productos no picados tales como carne fresca o marinada envasadas en atmósferas modificadas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos mediante en un producto cárnico fresco y tratado térmicamente incorporados directamente en la masa del producto a una concentración de 300 ppm.

Ejemplo 4

Condiciones del ensayo de los datos presentados en las figuras 1 a 4

Los datos mostrados en las Figuras 1 a 4 corresponden a un ejemplo de la utilización del extracto de *Rosa canina* L. realizado en hamburguesas (lotes control y con adición del extracto de la presente invención) frescas y cocinadas que fueron sometidas a un periodo de refrigeración. A continuación se describe brevemente el procedimiento de fabricación y almacenamiento.

Elaboración de las hamburguesas: La composición inicial de las hamburguesas por kilo de masa fresca fue la siguiente:

725 gramos de lomo de cerdo

250 gramos de agua

25 gramos de sal.

El procesado del producto comenzó con un troceado grosero de la carne. En el bol de una cúter se añadieron la carne troceada, la sal y el extracto concentrado (salvo en el lote control) de *Rosa canina* L. (300 ppm respecto al producto final) diluido en el agua de la fórmula del producto. La masa se sometió a un proceso de picado fino durante 6 minutos en una cúter a vacío hasta obtener una pasta fina y homogénea; posteriormente se realizaron hamburguesas (peso 100 gramos) mediante un aparato al efecto.

Cocinado de las hamburguesas: Parte de las hamburguesa obtenidas (lotes control y con extracto de la invención) se sometieron a un proceso de cocinado en horno de convección (180°C/15 minutos).

Periodo de refrigeración de las hamburguesas: Posteriormente a la elaboración de las hamburguesas (frescas y cocinadas) se sometieron a un proceso de refrigeración comercial de 12 días, a una temperatura de 2°C bajo iluminación

ES 2 363 958 A1

fluorescente con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. El objetivo de este procedimiento fue el simular las condiciones de almacenamiento de un lineal comercial. Durante los días 1, 4, 8 y 12 del periodo de refrigeración se extrajeron hamburguesas y se almacenaron a -80°C hasta su análisis para poder realizar un seguimiento de los fenómenos oxidativos durante el periodo de refrigeración.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 363 958 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de un extracto con propiedades antioxidantes a partir del fruto de la *Rosa canina* L que comprende las siguientes etapas:
- (a) extracción a partir del fruto triturado de la *Rosa canina* L con un disolvente seleccionado entre agua, etanol o sus mezclas y obtención de un sobrenadante
- 10 (b) concentración del sobrenadante resultante de la etapa (a) mediante destilación a vacío.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el disolvente utilizado es una mezcla de etanol y agua en la proporción de 7:3.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa (a) se lleva a cabo en un sistema de homogeneización y a temperatura igual o inferior a 35°C.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la destilación del extracto se lleva a cabo en una columna de vacío o en evaporador rotativo.
- 20 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una etapa adicional de caracterización y titulación de la actividad antioxidante según la determinación de los compuestos fenólicos totales llevada a cabo según el método Folin-Ciocalteu.
- 25 6. Extracto de *Rosa canina* L. con propiedades antioxidantes obtenible mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. Procedimiento para preparar una composición alimenticia que comprende la adición al mismo de un extracto según la reivindicación 6.
- 30 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la composición alimenticia es un producto cárnico.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la adición se lleva a cabo por incorporación directa del extracto en la composición del producto cárnico.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la adición se lleva a cabo por incorporación directa a la superficie del producto cárnico mediante micro-pulverización con spray.
11. Composición alimenticia que comprende el extracto según la reivindicación 6.
- 40 12. Composición alimenticia según la reivindicación 11, **caracterizada** por ser un producto cárnico.
13. Composición alimenticia según la reivindicación 12, en el que el producto cárnico se selecciona del grupo formado por un producto cárnico crudo, un producto cárnico tratado térmicamente, un producto cárnico crudo curado, un producto cárnico adobado y sus mezclas.
- 45 14. Composición alimenticia según la reivindicación 12 o 13, en la que el extracto está presente en una cantidad **caracterizada** por ser capaz de inhibir los procesos oxidativos de los lípidos y/o las proteínas en un producto cárnico.
- 50 15. Composición alimenticia según la reivindicación 14, en el que dicha cantidad es tal que el contenido de polifenoles totales que presenta es de 200-400 mg de equivalentes de ácido gálico por Kg de producto cárnico, habiéndose determinado dicho contenido de los compuestos fenólicos según el método Folin-Ciocalteu.

55

60

65

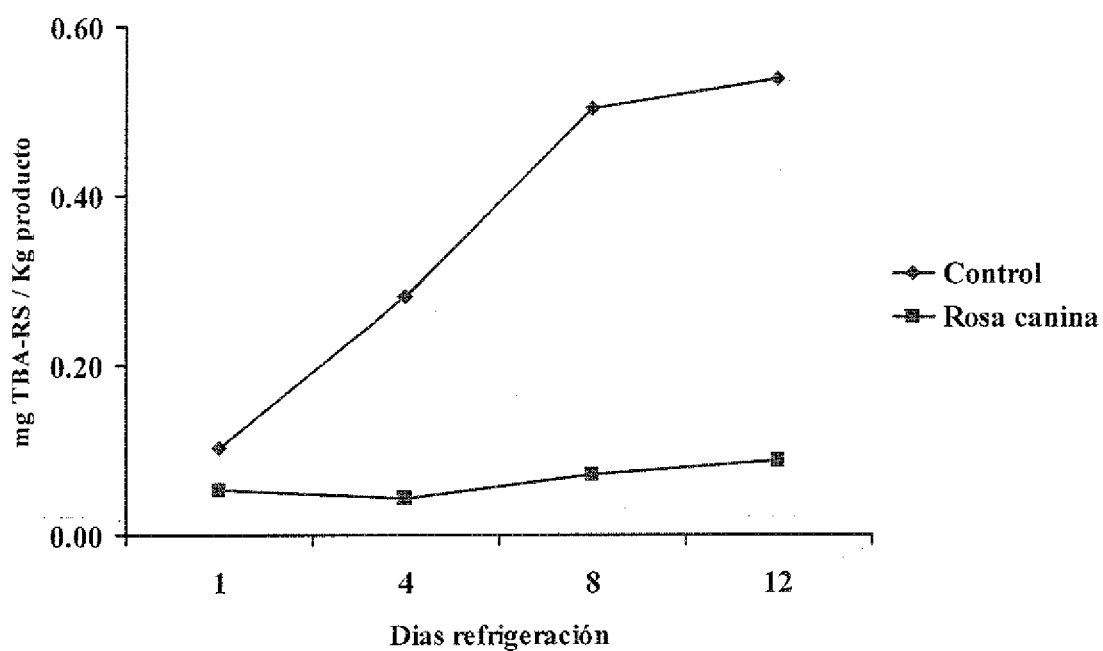


Figura 1

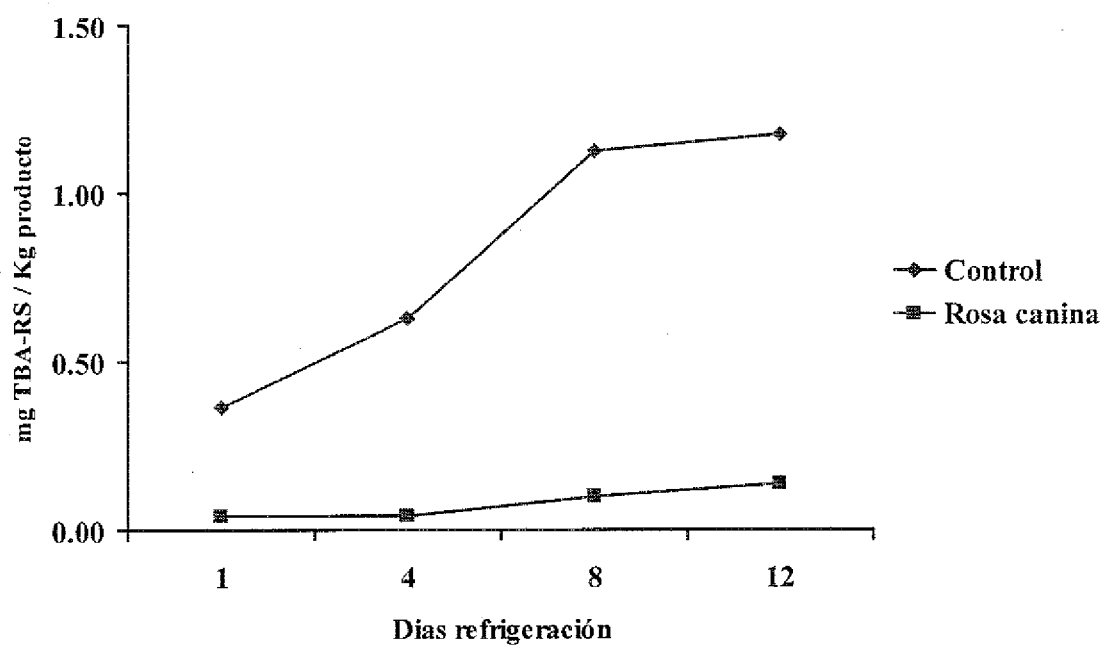


Figura 2

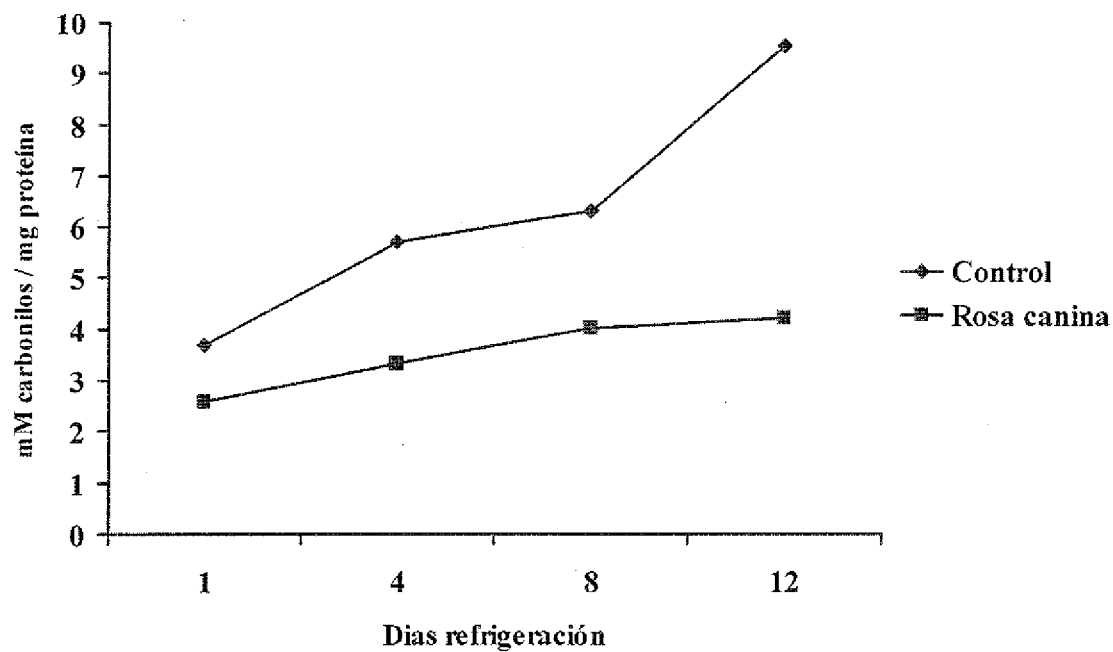


Figura 3

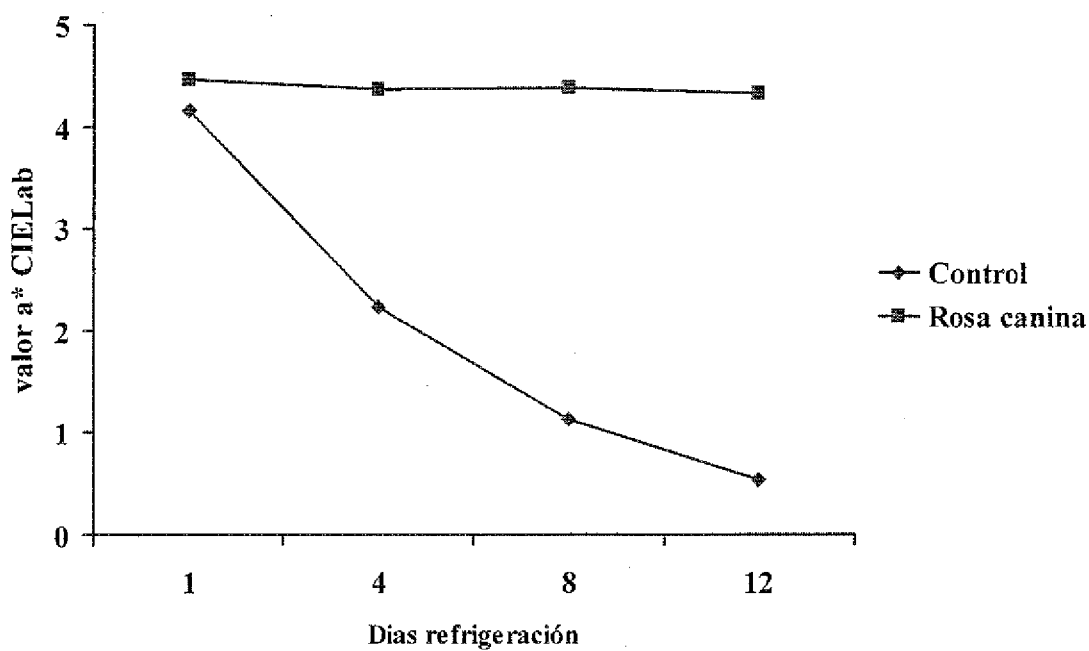


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030175

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.02.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	SALMINEN, J. P. et al. Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C. Journal of Chromatography A, 2005. Vol. 1077, nº 2, páginas 170-180. ISSN: 0021-9673. Doi:10.1016/j.chroma.2005.04.073.	1-15
Y	MORCUENDE, D., GANHAO, R., ESTEVEZ, M. Análisis del potencial antioxidante de ocho frutas silvestres mediterráneas seleccionadas. Alimentaria, 2008. Vol. Especial-invierno, páginas 132-139. ISSN: 0300-5755.	1-15
A	RU 2186506 C2 (VOSTOCHNO-SIBIRSKIJ GOSUDARSTVENNYJ TEKHNOLOGICHESKIJ UNIVERSITET) 10.08.2002, (resumen en inglés, página 2) [en línea] [recuperado el 10.02.2011] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1-15
A	DELIORMAN ORHAN, HARTEVIOGLU, KUPELI, YESILADA. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from <i>Rosa canina</i> L. fruits. Journal of Ethnopharmacology, 2007. Vol. 112, nº 2, páginas 394-400. ISSN: 0378-8741. doi:10.1016/j.jep.2007.03.029.	1-6
A	EP 1889616 A2 (FARMATEC S. r. l.) 20.02.2008, páginas 2,3.	1-6
A	RO 117504 B1 (SC CT DE CERCETARE SI PRELUCRA) 30.04.2002, (resumen) [en línea] [recuperado el 10.02.2011] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
11.02.2011

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23L1/314 (01.01.2006)

A23L3/3472 (01.01.2006)

A61K36/738 (01.01.2006)

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

A23L, A61K

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, XPTK, X-FULL, HCAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA, CROPU, SCISEARCH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de un extracto con propiedades antioxidantes a partir del fruto de *Rosa canina* L. que comprende (reivindicación 1):

- extracción a partir del fruto triturado con un disolvente seleccionado entre agua, etanol o sus mezclas y obtención de un sobrenadante.
- concentración del sobrenadante resultante de la etapa a) mediante destilación al vacío.

El disolvente utilizado es una mezcla de etanol y agua en la proporción de 7:3 (reiv. 2).

La etapa a) se lleva a cabo en un sistema de homogeneización y a temperatura igual o inferior a 35 °C (reiv. 3).

La destilación del extracto se lleva a cabo en una columna de vacío o en evaporador rotativo (reiv. 4).

La actividad antioxidante se determina según los compuestos fenólicos y lleva a cabo según el método de Folin-Ciocalteu (reiv. 5).

También es objeto de protección el extracto de *Rosa canina* L. con propiedades antioxidantes obtenido por el procedimiento anterior (reiv. 6) así como el procedimiento para preparar una composición alimenticia que comprende la adición del extracto (reiv. 7), en que la composición es un producto cárnico (8) en que la incorporación es directa en la composición del producto cárnico (reiv. 9) o en la superficie de éste por micro-pulverización con spray (reiv. 10).

Por último, es objeto de protección la composición alimenticia que comprende el extracto (reiv. 11) y que es un producto cárnico (reiv. 12), seleccionado entre crudo, tratado térmicamente, curado, adobado o sus mezclas (reiv. 13), en que el extracto está presente en la composición en una cantidad capaz de inhibir los procesos oxidativos de los lípidos y/o las proteínas en un producto cárnico (reiv. 14) siendo la cantidad de contenido de polifenoles de entre 200 a 400 mg de equivalentes de ácido gálico por kg de producto (reiv. 15).

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SALMINEN, J. P. et al. Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C. Journal of Chromatography A, 2005. Vol. 1077, nº 2, páginas 170-180. ISSN: 0021-9673.	2005
D02	MORCUENDE, D., GANHAO, R., ESTEVEZ, M. Análisis del potencial antioxidante de ocho frutas silvestres mediterráneas seleccionadas. Alimentaria, 2008. Vol. Especial-invierno, páginas 132-139. ISSN: 0300-5755.	2008
D03	RU 2186506 C2 (VOSTOCHNO-SIBIRSKIJ GOSUDARSTVENNYJ TEKHNOLOGICHESKIJ UNIVERSITET)	10.08.2002
D04	DELIORMAN ORHAN, HARTEVIOGLU, KUPELI, YESILADA. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from <i>Rosa canina</i> L. fruits. Journal of Ethnopharmacology, 2007. Vol. 112, nº 2, páginas 394-400. ISSN: 0378-8741.	2007
D05	EP 1889616 A2 (FARMATEC S. R. L.)	20.02.2008
D06	RO 117504 B1 (SC CT DE CERCETARE SI PRELUCRA)	30.04.2002

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD**

Los documentos citados **D01** a **D06** se refieren a extracto de *Rosa canina* L., ya sean de frutos o pétalos u hojas, algunos divulgan la capacidad antioxidantes de dichos extractos, siendo el más relevante el **D01**. En efecto,

- **D01** se refiere a agliconas proantocianidinas y glucósidos de pétalos de rosas y menciona que los frutos y los pétalos de las rosas son fuentes de antioxidantes (página 170, columna 2). Divulga un proceso de extracción a partir de polvo de pétalos de rosa con distintos solventes entre ellos etanol y agua, a 40 °C y que la evaporación se realiza con evaporador rotativo. Pero no divulga que este procedimiento se aplique a los frutos de *Rosa canina*, ni la temperatura ni la proporción 7:3.

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

ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de obtener un extracto con propiedades antioxidantes a partir del fruto de *Rosa canina* L. que comprende la extracción con agua, alcohol o mezclas y concentración del sobrenadante mediante destilación al vacío o en evaporador rotativo, resulta evidente para el experto en la técnica a la vista de los documentos **D01** y **D02**. En efecto,

- **D01** divulga el proceso de extracción con etanol y agua a partir de pétalos de rosa y la utilización del evaporador rotativo. Para el experto en la técnica, aplicar este procedimiento de extracción a los frutos de la *Rosa canina* resulta evidente, además de hacer las variaciones de temperatura o la proporción de etanol y agua.

- **D02** se refiere al potencial antioxidante de ocho frutas silvestres mediterráneas siendo el extracto de fruto de *Rosa canina* el que presentó el mayor potencial antioxidante. Divulga entre otras extracciones las acuosas y etanólicas y las determinaciones de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu. En cuanto a su uso divulga que "el uso de antioxidantes se hace necesario para la preservación de la estabilidad oxidativa, especialmente en los alimentos ricos en grasa y proteína" (Introducción) y concluye que "estas frutas podrían jugar un papel importante como ingredientes funcionales en productos cárnicos, mejorando su estabilidad oxidativa y por lo tanto, su calidad" (Conclusiones).

A la vista del procedimiento de extracción con etanol, agua y concentración, anticipado en **D01** y al potencial antioxidante de los extractos de frutos de *Rosa canina* y a su uso en productos cárnicos, divulgado en **D02**, el experto en la materia podría sin ningún esfuerzo inventivo llegar al procedimiento de extracción partiendo de frutos de *Rosa canina* L. y a preparar una composición alimenticia, adicionando el extracto obtenido a productos cárnicos. El hecho de adicionarlo directamente o por micro-pulverización en su superficie ya sea en productos cárnicos crudos, curados o adobados, resulta evidente en este sector de la técnica.

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