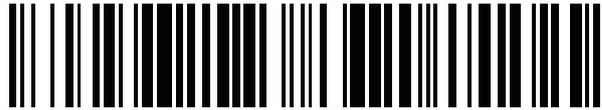


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 632**

21 Número de solicitud: 201031390

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)

A23L 1/314 (2006.01)

A23L 3/3472 (2006.01)

A61K 36/54 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **17.09.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.04.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
CAMPUS UNIVERSITARIO
AVDA. DE ELVAS S/N
06071 BADAJOZ, ES**

72 Inventor/es:
**ESTÉVEZ GARCÍA, MARIO;
MORCUENDE SÁNCHEZ, DAVID;
VENTANAS BARROSO, JESÚS y
RODRÍGUEZ CARPENA, JAVIER GERMÁN**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

54 Título: **EMPLEO DE UN EXTRACTO DE PIEL DE AGUACATE EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS.**

57 Resumen:

Empleo de un extracto de piel de aguacate en la elaboración de productos alimenticios.

La invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto con propiedades antioxidantes a partir de la piel del aguacate (fruto del *Persea americana* Mill.) que comprende las etapas: (a) extracción a partir del fruto triturado 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 2 378 632 A1

DESCRIPCIÓN

EMPLEO DE UN EXTRACTO DE PIEL DE AGUACATE EN LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS

CAMPO DE LA INVENCION

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 procedimiento para obtener un extracto rico en antioxidantes naturales a partir de piel de aguacate, al extracto con propiedades antioxidantes obtenido a partir de la piel o cáscara del fruto del aguacate (*Persea americana* Mill.) y a su empleo en la elaboración de composiciones alimenticias como por ejemplo productos cárnicos que presentan propiedades mejoradas en cuanto a su vida útil y características sensoriales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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, 1996). 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, 2007).

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 (Estevez y cols. 2008; Salminen y cols. 2008). 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 antagónicamente 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 de la piel del fruto de diversas variedades de aguacate (*Persea americana* Mill.) útil para su empleo en la elaboración en general de productos alimenticios, y productos cárnicos en particular. Este extracto 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

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 piel del fruto del *Persea americana* Mill.

Figura 2. Evolución del contenido en TBA-RS de hamburguesas frescas, cocinadas y sometidas a refrigeración, elaboradas con una fórmula base (Control) y con la adición de un extracto obtenido de la piel del fruto del *Persea americana* Mill.

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 piel del fruto del *Persea americana* Mill.

Figura 4. Evolución del valor a^* del sistema CIE $L^*a^*b^*$ de hamburguesas cocinadas sometidas a refrigeración y elaboradas con una fórmula base (Control) y con la adición de un extracto obtenido de la piel del fruto del *Persea americana* Mill.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

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

(a) extracción a partir de la piel triturada con un disolvente seleccionado entre agua, etanol de uso alimentario o sus mezclas y obtención de un sobrenadante

(b) concentración del sobrenadante resultante de la etapa (a) mediante

destilación a vacío.

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una planta de la familia de las Lauráceas oriundo de Centroamérica y México. El comercio internacional del fruto del aguacate ha crecido en los últimos años dejando de ser una fruta exótica para incorporarse en la dieta de muchos países, gracias a sus amplias posibilidades para el consumo en fresco y para procesamiento. La parte comestible del fruto es la pulpa, que según nuestras investigaciones representa un 68%-75% del peso total del fruto en función de la variedad de aguacate; en la actualidad el resto de partes no comestibles, la piel y la semilla, no se someten a ningún tipo de aprovechamiento industrial.

El procedimiento de la invención comprende en primer lugar la recolección de los frutos, obtención de la piel (también llamada cáscara) y cortado; en la presente invención, se han evaluado diferentes variedades de aguacates presentes en el mercado nacional e internacional, entre las que destacan la variedades Hass (la más frecuente en el mercado internacional), Fuerte y Criolla, sin que se obtuvieran grandes diferencias en el contenido y efecto antioxidante. A continuación la piel de aguacate triturada se ponen en contacto con el disolvente seleccionado, que en una realización particular es una mezcla de etanol de uso alimentario y agua en la proporción de 7:3. La cantidad relativa del triturado de piel 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 triturado de piel: disolvente, siendo el disolvente una mezcla de etanol agua de en la proporción 7:3, es de 1:5. El disolvente es de uso alimentario ya que el extracto obtenido es útil en elaboración de productos alimenticios.

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.

5 La etapa a) del procedimiento se lleva preferiblemente 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
10 procedimiento convencional, por ejemplo, por centrifugación seguido de filtración o
decantación.

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).

15 La etapa b) comprende someter el sobrenadante de la etapa a) a una destilación a
vacío que puede llevarse a cabo por cualquier método convencional preferiblemente
por 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
20 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).

25 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)

30 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 la piel del fruto del *Persea
americana* Mill. con propiedades antioxidantes, que constituye otro aspecto de la
presente invención, en adelante extracto de la invención.

35 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 un producto alimenticio que comprende la adición al producto alimenticio base 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 producto alimenticio base, y en particular, en el caso de productos cárnicos, 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 producto alimenticio base 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 de 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 un producto alimenticio que comprende el extracto de la invención. Dicho producto alimenticio 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 un 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 producto alimenticio 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 el producto alimenticio, 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
5 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
10 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 mas extendidos para el estudio de la oxidación de los lípidos en los alimentos (Raharjo y Sofos, 1993; Estévez y cols.,
15 2009). Esta determinación se realizó siguiendo el método descrito por Tarladgis y cols. (1960). 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 532nm; por tanto un incremento del contenido en TBA-RS
20 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 frescas sometidas a refrigeración. El incremento de los carbonilos es
25 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 utilizado y extendido para determinación de la oxidación de las proteínas la carne y los productos cárnicos (Estévez y cols., 2009). Esta determinación del contenido en carbonilos mostrado en este ejemplo del ensayo de la actividad antioxidante del
30 extracto de la piel del fruto del *Persea americana* Mill. se realizó según el método descrito por Oliver y cols. (1997) 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.

35 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 y Cassen, 1990). 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 8mm. 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 de un fruto comercial de amplia distribución y accesibilidad, y del que España es la 9ª productora mundial y la primera en el ámbito europeo.

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: Caracterización *in vitro* del potencial antioxidante de la piel del fruto del *Persea americana* Mill 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 la piel del fruto del *Persea americana* Mill. se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por

Singleton y Rossi (1965) con modificaciones Pantelidis y cols. (2007). 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 0,5mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo; posteriormente se añadieron 2.5 mL de 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 piel del fruto de *Persea americana* Mill. fue determinada mediante la técnica del radical DPPH descrita por Kähkönen y Heinonen (2003); los resultados se muestran en la tabla 1. Previamente a la realización de esta prueba se llevaron a cabo determinaciones previas con el fin de ajustar la concentración de los extractos a las condiciones del ensayo. Los extractos de la piel de *Persea americana* Mill. se diluyeron en una proporción de 1:20. Una vez preparados los extractos a las distintas concentraciones, en cubeta VIS se agregaron 33 µL de cada muestra y se adicionaron 2000 µL del radical libre DPPH (ABS 1.200), se mezclaron con pipeta Pasteur, se dejaron reposar durante 6 minutos en oscuridad y se leyeron a una longitud de onda de 517 nm. La actividad

antioxidantes de las muestras se calculó por medio de una curva patrón Trolox, los resultados se expresaron en mM Trolox por gramo de muestra (mM Trolox/g de muestra).

5 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 la piel del fruto de *Persea americana* Mill. fue realizada usando el método del radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) – ABTS- según el método descrito por Re y cols. (1999).

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 µL de un extracto diluido (1:10) de la piel del fruto de *Persea americana* Mill. 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:

$$25 \quad \% \text{ inhibición} = [(Abs \text{ ABTS}^+ \text{ inicial} - Abs \text{ ABTS}^+ \text{ remanente}) / Abs \text{ ABTS}^+ \text{ inicial}] * 100$$

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).

30 1.3 Determinación de la capacidad antioxidante mediante la reducción de Cobre (II) (CUPRAC):

Este método consiste en medir la capacidad antioxidante para reducir el ion cobre y es aplicable para evaluar la capacidad antioxidante tanto de polifenoles de alimentos

como de la vitamina C y E (Apak et al., 2004).

Los resultados se muestran en la tabla 1. En un tubo de ensayo con rosca se agregó 1 mL de cada reactivo (cloruro de cobre 0.2M, Neocuproine 7.5 mM en etanol y acetato amónico), 0.1 mL de cada extracto de la piel diluido previamente (1:150). Se mezcló y se dejó reposar durante 30 minutos en oscuridad. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una absorbancia de 450 nm. Para expresar los resultados se preparó una curva patrón con 5 puntos de Trolox (0.25, 0.5, 1, 1.5, y 2 mM). La capacidad antioxidante se estableció en equivalentes Trolox (TEAC) expresados en mM Trolox por gramo de muestra (mM Trolox/g muestra).

Tabla 1. Contenido en compuestos fenólicos totales (CFT), actividad antioxidante frente a los radicales DPPH y ABTS y actividad antioxidante según el método CUPRAC del extracto etanólico procedente de la piel del fruto de *Persea americana*.

	CFT ¹		DPPH ²		ABTS ³		CUPRAC ⁴	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Extracto de la piel de <i>Persea americana</i>	8997	3104	88	48	104	45	218	42

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

² Prueba inhibición del radical DPPH (ver Ejemplo 1.2.1) Resultados expresados como mM TEAC/g fruta

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

⁴ Capacidad antioxidante según el método CUPRAC (ver Ejemplo 1.3) Resultados expresados como mM TEAC/g fruta

D.E.: desviación estándar

Ejemplo 2: Procedimiento de obtención de un extracto con actividad antioxidante a partir de *Persea americana* Mill

El procedimiento comenzó con el lavado y obtención por pelado de la de la piel del fruto de *Persea americana* Mill. obtenidos de un distribuidor nacional (Eurobanan S.L.) en su momento óptimo de maduración y procedentes de las variedades Hass (la más frecuente en el mercado internacional), Fuerte y Criolla. Las pieles

precortadas se mezclaron con una mezcla agua:etanol 7:3 en una proporción 1:5 en un bote para centrífuga de nalgene.

5 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 centrífuga 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.

10

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

15

Una vez obtenidos el sobrenadante hidro-alcohólico del aguacate 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.

20

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)

25

30

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 la piel del fruto de *Persea americana* Mill. Por otra parte, debido a la naturaleza de la fuente de extracción de los compuestos activos (frutas) 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 la piel del fruto de *Persea americana* Mill. 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.

5

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 la piel del fruto de *Persea americana* Mill. varió en función de tipo de producto cárnico al que fue destinado.

10

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

15

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

20

Los datos mostrados en las Figuras 1 a 4 corresponden a un ejemplo de la utilización del extracto de la piel del fruto de *Persea americana* Mill. realizado en hamburguesas (lotes control y con adicción 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

25

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

600 gramos de lomo de cerdo

30

125 gramos de tocino de cerdo

250 gramos de agua

25 gramos de sal

35

El procesado del producto comenzó con un troceado grosero de la carne. En el bol de una cúter se añadieron la carne troceada, el tocino, la sal y el extracto concentrado

(salvo en el lote control) de la piel del fruto de *Persea americana* Mill. (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 15 días, a una temperatura de 2°C bajo iluminación 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, 5, 10 y 15 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.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto con propiedades antioxidantes a partir de la piel del fruto de *Persea americana* Mill. que comprende las siguientes etapas:
 - 5 (a) extracción a partir de la piel triturada con un disolvente seleccionado entre agua, etanol de uso alimentario o sus mezclas y obtención de un sobrenadante
 - (b) concentración del sobrenadante resultante de la etapa (a) mediante destilación a vacío.
- 10 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.
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.
- 15 4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración 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 la piel del fruto de *Persea americana* Mill. con propiedades antioxidantes obtenible mediante el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 30 7. Procedimiento para preparar un producto alimenticio que comprende la adición a un producto alimenticio base de un extracto según la reivindicación 6.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el producto alimenticio 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.

5 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. Producto alimenticio que comprende el extracto según la reivindicación 6.

10 12. Producto alimenticio según la reivindicación 11, caracterizado por ser un producto cárnico.

15 13. Producto alimenticio 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.

20 14. Producto alimenticio según las reivindicaciones 12 o 13, en el que la cantidad del extracto 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.

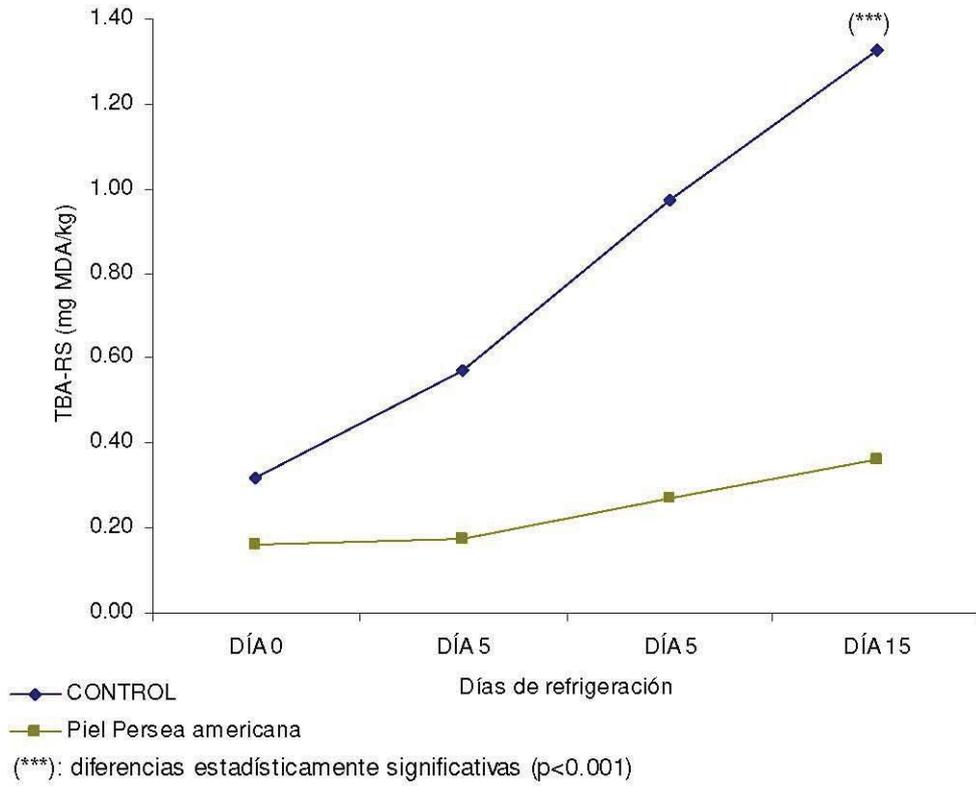


Figura 1

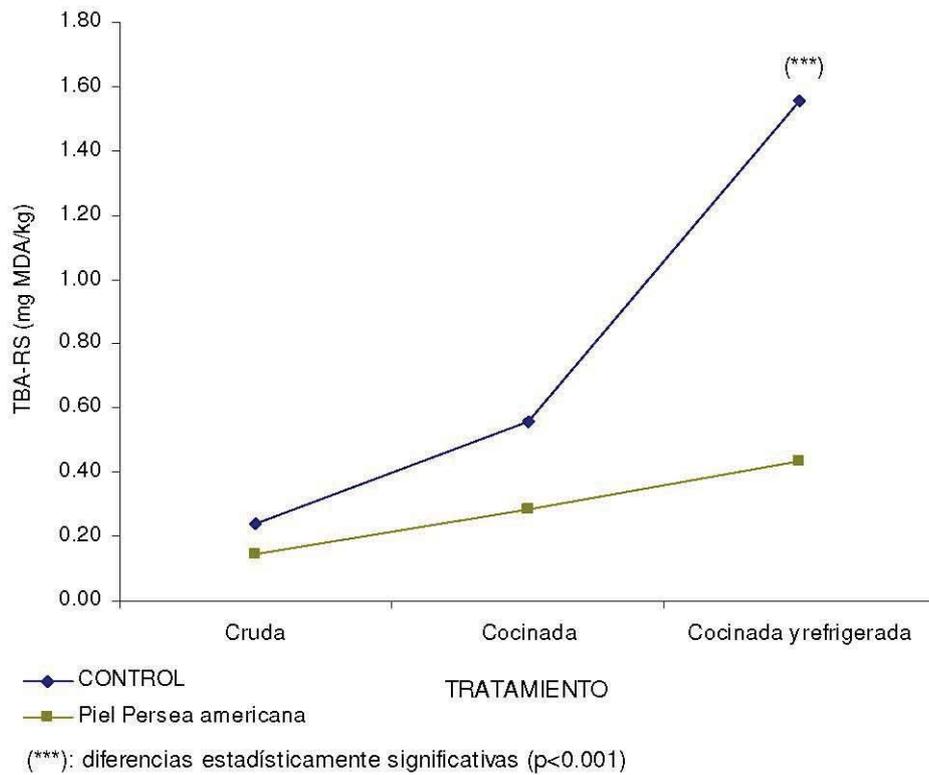


Figura 2

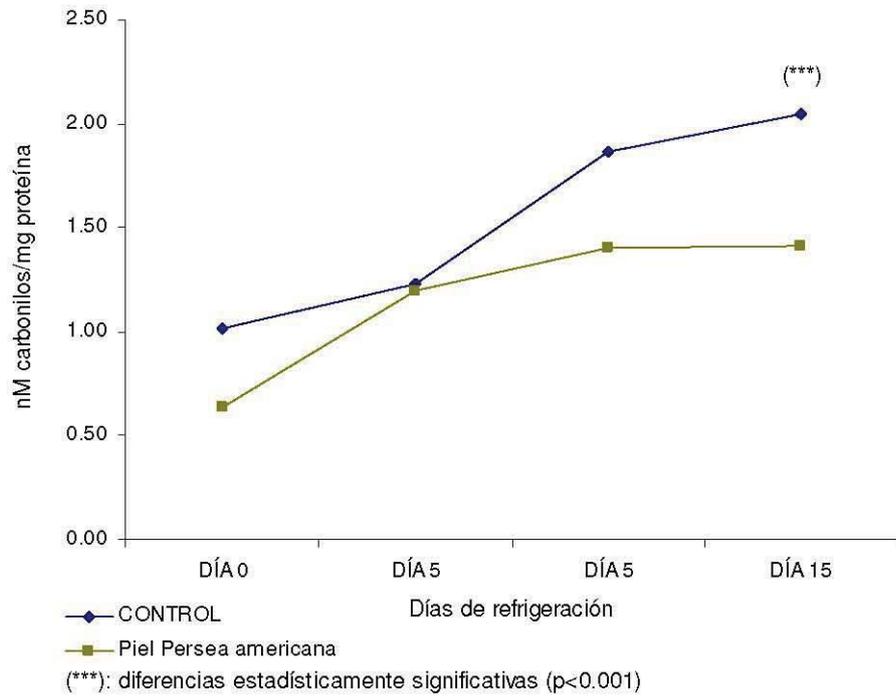


Figura 3

5

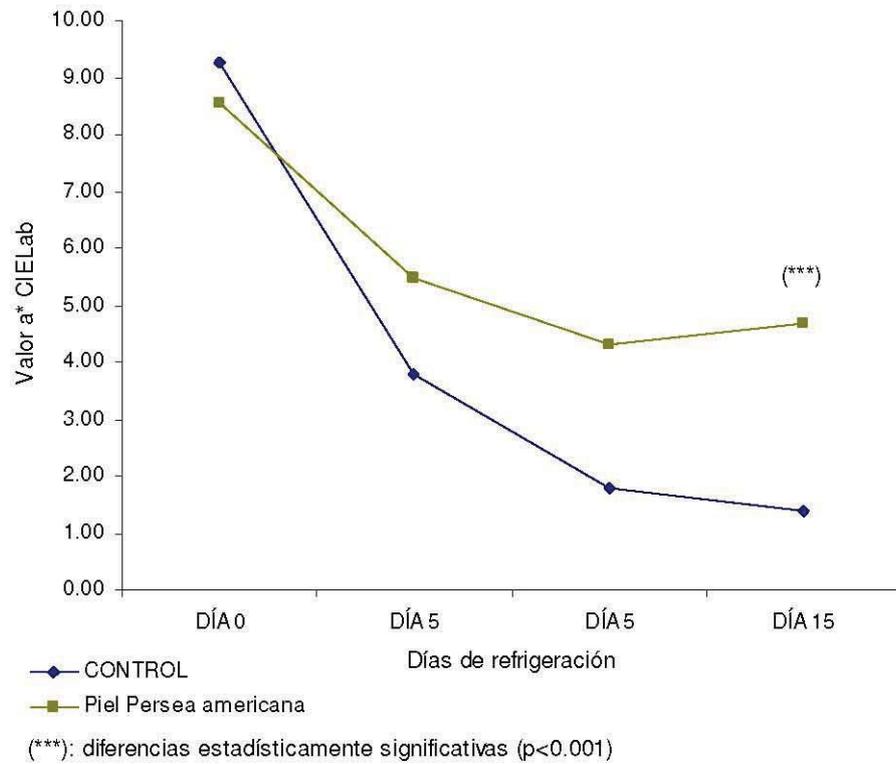


Figura 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031390

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.09.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MX JL05000056 A (CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO) 01.06.2007, páginas 4,6,7.	1,3,4,6,7,11
Y	KR 20090055387 A (IND ACADEMIC COOP) 02.06.2009, (resumen) [en línea] [recuperado el 17.11.2011] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1-7,11
Y	GB 2371545 A (SUPERVITAMINS SDN BHD) 31.07.2002, página 3, líneas 8-17; página 15, línea 14; página 6, líneas 15-20; página 7, líneas 1-2,25-28; página 12, Ejemplo IV; reivindicaciones 1,7.	1-7,11
A	JP 11246425 A (SHISEIDO CO LTD) 14.09.1999, (resumen) [en línea] [recuperado el 17.11.2011] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1-7,11

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
18.11.2011

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23L1/30 (2006.01)

A23L1/314 (2006.01)

A23L3/3472 (2006.01)

A61K36/54 (2006.01)

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, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA CROPU, SCISEARCH, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 8 - 10, 12 - 14	SI
	Reivindicaciones 1 - 7, 11	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 de la piel del fruto de *Persea americana* Mill que comprende (reivindicación 1):

- extracción a partir de la piel triturada con un disolvente seleccionado entre agua, etanol de uso alimentario, 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 concentración 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 totales y lleva a cabo según el método de Folin-Ciocalteu (reiv. 5).

También es objeto de protección el extracto de la piel del fruto de *Persea americana* con propiedades antioxidantes obtenible por el procedimiento anterior (reiv. 6) así como el procedimiento para preparar un producto alimenticio que comprende la adición del extracto (reiv. 7), en que el producto alimenticio es un producto cárnico (8), en que la incorporación del extracto es directa en la composición del producto cárnico (reiv. 9) o es indirecta en la superficie de éste por micro-pulverización con spray (reiv. 10).

Por último, es objeto de protección el producto alimenticio 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), siendo la cantidad del extracto tal que el contenido de polifenoles es de 200 a 400 mg de equivalentes de ácido gálico por kg de producto cárnico (reiv. 14).

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	MX JL05000056 A (CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO)	01.06.2007
D02	KR 20090055387 A (IND ACADEMIC COOP)	02.06.2009
D03	GB 2371545 A (SUPERVITAMINS SDN BHD)	31.07.2002
D04	JP 11246425 A (SHISEIDO CO LTD)	14.09.1999

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**

De los documentos citados **D01** a **D04**, solo **D01** divulga la extracción de antioxidantes provenientes de la piel de aguacate pero la extracción se hace con metanol. Los documentos **D02** y **D04** se refieren a polifenoles extraídos de semilla de *Persea americana*, y, por su parte, **D03** divulga procedimientos de obtención a partir de plantas que comprenden etapas de extracción con alcohol/agua seguido de destilación.

En ninguno de los documentos citados se divulga el proceso reivindicado a partir de la piel del fruto del aguacate de extracción con agua/etanol, o sus mezclas, y concentración del sobrenadante mediante destilación al vacío, puestos que en los documentos citados se emplean disolventes apolares o polares tipo metanol; o cuando se refieren a etanol, no se hace la extracción de antioxidante de la piel del fruto del aguacate.

Por ello, a la vista del documento D01 a D04, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 14** tienen novedad de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de obtener un extracto con propiedades antioxidantes a partir de la piel del fruto de *Persea americana* que comprende la extracción con agua, etanol 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**, **D02** y **D03**. En efecto,

- **D01** se refiere al proceso de obtención de extracto de polifenoles a partir de la semilla de aguacate y sus usos en alimentación y cosmética (páginas 4, 6, 7). El proceso implica etapas de extracción con disolventes apolares y polares, y etapa de evaporación del solvente en un evaporador rotativo, características técnicas similares a las reivindicaciones 1, 3, 4 de la solicitud en estudio. También está divulgado el extracto obtenido y su uso en un producto alimenticio así como el producto alimenticio que contiene el extracto obtenido, por ello, este documento afecta a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6, 7, 11. Pero además,

- **D02** se refiere a una composición de alimento que comprende extractos de aguacate preparados a partir de piel, semilla o pulpa y que muestra una excelente actividad antioxidante, y son extraídos con metanol (resumen). Si bien, divulga la obtención de extractos de aguacate a partir de la piel, no sigue el procedimiento reivindicado. Pero, éste si está divulgado en el documento **D03**, Así:

- **D03** divulga un proceso para recuperar componentes de plantas, sin destruirlos, que comprende entre otras etapas la extracción de componentes polares con alcoholes bajos o mezclas de éstos con agua seguido de una destilación que puede ser al vacío (página 3, líneas 8-17; página 6, líneas 15-20; reivindicación 1); la extracción se hace a temperatura ambiente (página 5, línea 14); el disolvente se puede eliminar por destilación al vacío o con evaporador (página 7, líneas 1-2, 25-28) y como disolvente también cita el etanol (página 12, Ejemplo IV). Los componentes se pueden extraer del aguacate (reivindicación 7).

A la vista de estos tres documentos, el experto en la técnica podría llegar, sin ningún esfuerzo inventivo, a extraer antioxidantes de la piel triturada de aguacate, tras una extracción con etanol/agua y concentrar el sobrenadante por destilación al vacío o con evaporador, puesto que la extracción de antioxidantes de la semilla del aguacate y posterior concentración ya sea por destilación o con evaporador ya está divulgado en los documentos citados **D01** a **D03**.

La proporción de etanol/agua o la determinación de los compuestos fenólicos totales según el método de Folin-Ciocalteu también resultan obvias en este sector de la técnica.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D03, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 7, 11** carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86