

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 315**

21 Número de solicitud: 201230114

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.01.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.08.2013

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (33.3%)

Avda. Teniente Flomesta, 5

30003 Murcia ES;

INSTITUTO MURCIANO DE INVESTIGACIÓN Y

DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO

(IMIDA) (33.3%) y

NUTRAFUR, S.A. (33.3%)

72 Inventor/es:

JORDÁN BUESO, María José;

SOTOMAYOR SÁNCHEZ, José Antonio;

CASTILLO SÁNCHEZ, Julián;

BENAVENTE-GARCÍA GARCÍA, Obdulio y

BAÑÓN ARIAS, Sancho José

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Extracto de romero y su uso en alimentación animal**

57 Resumen:

Extracto de romero y su uso en alimentación animal.
La presente invención se refiere a un extracto vegetal procedente de hoja de romero que comprende los diterpenos ácido carnósico y carnosol con una relación de concentraciones (ácido carnósico)/(carnosol) comprendida entre 0.7 y 1.2. Asimismo, se refiere al empleo de dicho extracto en la fabricación de un pienso para alimentación animal, así como al pienso suplementado con dicho extracto. Finalmente, se contempla el método de obtención del extracto vegetal de la invención.

ES 2 421 315 A1

DESCRIPCIÓN

Extracto de romero y su uso en alimentación animal.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención pertenece al sector de la agroalimentación, en el campo de la producción de materias primas cárnicas. Más concretamente, la invención se refiere a un extracto de romero y su empleo, como suplemento, en la elaboración de piensos para alimentación animal.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Legislación Alimentaria no permite el uso de aditivos conservantes en la carne cruda fragmentada, y, por tanto, una de las opciones para mejorar su capacidad de conservación pasa por la incorporación de sustancias activas no consideradas aditivos a través de la dieta animal. Este hecho, junto con la creciente demanda por los consumidores de alimentos más seguros y naturales, ha fomentado el interés por incorporar antioxidantes naturales a la carne a través de la dieta animal, tanto para mejorar las características productivas de los animales (O'Connell, J.E.; Fox, P.F. "Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review". *International Dairy Journal*. 2001.11, 3: 103-120; Ronchi, B.; Nardone, A. Contribution of organic farming to increase sustainability of Mediterranean small ruminants livestock systems. *Livestock Production Science*. 2003. 80,1, 17-31; Sancho, P. et al. "Microbiological characterization of food residues for animal feeding". *Waste Management*. 2004. 24, 9, 919-926; Mahgoub, O. et al. "The use of a concentrate containing Meskit (pods and date palm by-products to replace commercial concentrate in diets of Omani sheep. *Animal Feed Science and Technology*". 2005. 120, 1-2, 33-41; Pinacho, A. et al. "Study of drying systems for the utilization of biodegradable municipal solid wastes as animal feed". *Waste Management*. 2006. 26,5: 495-503; Schmidt, Ty B et al. "The Effects of Nutritional Management on Carcass Merit of Beef Cattle and on Sensory Properties of Beef". *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2007. 23,1:151-163; Vázquez-Añón et al. "Effects of Feeding a Dietary Antioxidant in Diets with Oxidized Fat on Lactation Performance and Antioxidant Status of the Cow. *Journal of Dairy Science*. 2008. 91 (8): 3165-3172; Trenzado, C.E.; et al "Antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2009. 149: 440-447; Karami, M.; et al. "Effects of dietary antioxidants on the quality, fatty acid profile, and lipid

oxidation of longissimus muscle in Kacang goat with aging time". *Meat Science*. 2011. 88 :102–108; Liu, H. et al "Influence of chestnut tannins on welfare, carcass characteristics, meat quality, and lipid oxidation in rabbits under high ambient temperature". *Meat Science*. 2012. 90:164–169) como para transmitir las cualidades derivadas de dichos componentes a las producciones de carne (Botsoglou et al. "The effect of feeding rosmariny, oregano, saffron and α -tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs" *S. Afr. J. An. Sci.* 2005, 35, 143–151; Moñino et al. "Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves". *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 3363–3367; Descalzo, A.M. et al. "Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle". *Meat Science*. 2007. 75, 299–307; Nieto, G. et al. "Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality" *Meat Science*, 2010. 84, 23–29; Trefan, L. et al. "Meta-analysis of the effects of dietary vitamin E supplementation on α -tocopherol concentration and lipid oxidation in pork". *Meat Science*. 2011. 87: 305–314).

Así, se ha ensayado la suplementación de la dieta con diferentes principios activos, como ácido ascórbico, carotenos, tocoferoles, así como plantas aromático-medicinales, que aportan a la dieta compuestos activos antioxidantes y/o antimicrobianos capaces de aumentar la estabilidad oxidativa y microbiológica de la carne sin emplear aditivos (Bou, R. et al. "Influence of dietary fat source, alpha-tocopherol, and ascorbic acid supplementation on sensory quality of dark chicken meat". *Poultry Science*. 2001. 80, 6, 800–807; Moñino et al., 2008; Nieto et al., 2010). Entre todos ellos, la vitamina E es el suplemento dietético utilizado con mayor frecuencia en nutrición animal para este fin, debido a su probada actividad antioxidante sobre la carne, aunque no actúa sobre bacterias alterantes o patógenas que proliferan en esta matriz.

El extracto de romero, de forma general, ya está incluido en las listas positivas de aditivos de alimentación animal, de hecho, su venta en esta industria requiere de registro específico. La introducción de extractos de romero en el pienso animal ha sido abordada por diversos investigadores, aunque aún no ha sido resuelta. El principal problema técnico radica en optimizar ciertos factores, entre los que se incluyen: la dosis mínima efectiva de extracto, la etapa idónea de su administración (gestación, lactación, cebo), y las relaciones de concentración entre principios activos, con el fin de conseguir una adecuada transmisión de componentes antioxidantes, en concentraciones activas, a los productos alimenticios que de ellas se derivan; así como mejorar la calidad y seguridad de la carne, con el consiguiente beneficio para la salud pública.

El empleo de subproductos de romero como suplemento en la alimentación de pequeños rumiantes ha proporcionado resultados desiguales (*Moñino et al., 2008, Jordán et al., 2010, Nieto et al., 2010*). Un dato importante a considerar es la variabilidad en la composición química de estos extractos dependiendo de su tipo genético, procedencia geográfica, estacionalidad (*Jordán, M. J. et al. "Chemical intraspecific variability and chemotypes determination of Rosmarinus Officinalis L. in the Region of Murcia". 28th International Horticultural Congress. Lisbon 2010*)) y/o tecnología de extracción aplicada. En la bibliografía científica se encuentran algunos trabajos exitosos sobre tratamientos dietéticos con hoja destilada de romero (*Nieto et al., 2010; Nieto, G. et al. 2011. Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions Food Chemistry 124: 1423–1429*) y otros en los que el efecto de extractos de romero comerciales es nulo (*Haaka, L. et al. "Effect of dietary rosemary and α -tocopheryl acetate on the oxidative stability of raw and cooked pork following oxidized linseed oil administration". Meat Science. 2008. 78, 239–247*).

El éxito de un extracto depende enormemente de la biodisponibilidad de sus principios activos tras el metabolismo animal, la cual debe ser demostrada para poder atribuir un posible efecto beneficioso. La composición y la relación de concentración entre estos componentes son cruciales a la hora de asegurar resultados concluyentes. Hasta la fecha no existen datos fehacientes acerca del efecto de las proporciones entre principios activos de los extractos de romero empleados en alimentación animal.

Sería por tanto necesario disponer de un extracto estandarizado de romero, cuya composición fuera conocida e invariable, para ser adicionado en el pienso de pequeños rumiantes, en la dosis mínima efectiva y durante el periodo fisiológico animal requerido, asegurando así resultados de mejora de calidad y conservación de la carne fresca y cocinada.

Hasta la fecha, los extractos empleados a nivel comercial contienen dosis elevadas de ácido carnósico, no prestando atención a la mayor o menor presencia de carnosol en ellos.

Ahora, tras un importante trabajo de investigación, los autores de la presente invención han demostrado que la concentración de carnosol en el extracto tipificado de romero, debe al menos igualar, e incluso superar, la del ácido carnósico.

Así, en base a los resultados de sus investigaciones, los autores de la presente invención han obtenido un extracto procedente de la hoja destilada de romero, donde los principios

activos (ácido carnósico y carnosol) están presentes en un ratio de concentración conocido cercano a 1.

5 La carne procedente de animales alimentados con pienso suplementado por el extracto de la presente invención posee una mayor capacidad antimicrobiana y antioxidante que la carne procedente de animales alimentados con pienso no suplementado, por lo que el extracto mejora su calidad e incrementa su vida comercial.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 10
- Figura 1:** Estatus antioxidante del músculo externus abdominis de cordero Segureño
- Figura 2:** Capacidad antirradicalaria (IC50) del músculo externus abdominis de cordero Segureño.
- Figura 3:** Estatus antioxidante del músculo deltoideus en cordero Segureño.
- 15 **Figura 4.** Capacidad antirradicalaria (IC50) del músculo Deltoideus de cordero Segureño.
- Figura 5.** Estatus antioxidante del hígado de cordero Segureño.
- Figura 6.** Valores de oxidación de los lípidos expresados como TBARS (mg MDA / kg) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por menor
- Figura 7.** Valores de ángulo hue (rad) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por
- 20 menor
- Figura 8.** Recuentos de bacterias psicrófilas totales (Log ufc/g) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por menor
- Figura 9.** Puntuaciones de olor a carne cruda de cordero (escala sensorial arbitraria establecida mediante panel entrenado) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por
- 25 menor.
- Figura 10.** Lomo fresco de cordero no suplementado (izquierda), suplementado con 640 mg/kg (centro) ó 980 mg/kg de compuestos activos (derecha), tras 11 días de exposición en condiciones de venta al por menor.
- Figura 11.** Lomo fresco de cordero no suplementado (izquierda), suplementado con 640 mg/kg
- 30 (centro) ó 980 mg/kg de compuestos activos (derecha), tras 14 días de exposición en condiciones de venta al por menor.

OBJETO DE LA INVENCION

Es objeto de la invención un extracto de romero que comprende los diterpenos ácido carnósico y carnosol con una relación de concentraciones [ácido carnósico] / [carnosol] comprendida entre
5 0.7 y 1.2.

Es asimismo objeto de la invención el empleo del extracto de romero en alimentación animal.

10 Es también objeto de la invención el empleo del extracto en la fabricación de un pienso para alimentación animal.

Es finalmente objeto de la invención el método para la obtención del extracto de romero de la invención.

15

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Los diterpenos ácido carnósico y su derivado, la lactona carnosol, son componentes presentes en la fracción polifenólica liposoluble de la hoja de romero, la de mayor capacidad antioxidante.

20 Los trabajos de los autores de la presente invención avalan la elevada capacidad antioxidante de estos componentes *in vitro*. Además, a diferencia de lo publicado hasta la fecha, los experimentos *in vivo* llevados a cabo por ellos revelan el importante papel de la lactona carnosol para asegurar una mayor transferencia de estos componentes y sus metabolitos, y de esta forma asegurar resultados relevantes.

25

Así, en un aspecto principal de la invención se contempla un extracto vegetal (extracto de la invención) procedente de hoja de romero deshidratada, tanto desacetilada como entera, que comprende los diterpenos ácido carnósico y carnosol con una relación de concentraciones [ácido carnósico]/[carnosol] comprendida entre 0.7 y 1.2. En realizaciones preferidas, la relación de
30 concentraciones es 1.

El extracto de la invención, además de los principios activos, puede incluir otros componentes adicionales, comunes cualitativamente a otros extractos de romero, tales como monoterpenos, otros diterpenos, triterpenos, ácido ursólico, flavonoides, otros fenoles, fibras, y otros
35 componentes característicos de cualquier material vegetal tipo hoja.

El extracto de la invención permite incrementar la capacidad de conservación endógena de la carne animal, confiriéndola propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

5 En una realización preferida, la concentración mínima de diterpenos presente en el extracto de la presente invención (la suma del peso de ambos principios activos, ácido carnósico y carnosol, con respecto al peso total del extracto) está comprendido entre un 25 y un 35%.

En otro aspecto principal de la invención se contempla el empleo del extracto de la invención en alimentación animal.

10 La suplementación de la dieta animal con extracto de romero en las condiciones indicadas proporciona cantidades de ácido carnósico y carnosol adecuadas para incrementar la capacidad de conservación de la carne.

15 En otra realización principal, se contempla el empleo del extracto de la invención en la fabricación de un pienso para alimentación animal.

20 La importancia de la relación entre la concentración de ácido carnósico y carnosol en el extracto de romero a adicionar en el pienso para alimentación animal es fundamental para asegurar una correcta biodisponibilidad de ambos componentes y asegurar así la mejora efectiva de la calidad y vida útil de la carne.

De forma particular, el pienso suplementado con el extracto está destinado a la alimentación de rumiantes.

25 En realizaciones preferidas, la administración del pienso suplementado con el extracto de la invención se lleva a cabo durante el periodo de cebo. La elección del periodo de cebo para administrar el extracto es únicamente por cuestiones económicas (el extracto encarece el precio del pienso) y logística (sólo habría que introducirlos en el pienso de cebo de los corderos, ya que también hay pienso de crecimiento y para madres). La extensión del extracto a los tres tipos de pienso (adultos, crecimiento y cebo) es igualmente posible y adecuado, aunque encarecería la alimentación y difícilmente podría mejorar los resultados obtenidos.

En una realización particular, el pienso suplementado con el extracto de la invención se destina al cebo de corderos de razas ligeras y pesadas, con un peso vivo de sacrificio que puede oscilar entre 26 ± 3 Kg.

5 La concentración de extracto a adicionar al pienso ha de estar en el rango de 2700 a 4000 ppm, para conseguir una adecuada efectividad. En estas condiciones, la concentración mínima de la suma de los dos principios activos presentes en el pienso se encuentra comprendida entre 600-900 ppm.

10 La dieta de los corderos durante la etapa de cebo debe ser suplementada con una cantidad de extracto de romero que proporcione un total de 640-980 mg de diterpenos (ácido carnósico y carnosol a partes iguales) por kg de pienso de engorde. La forma de suministrarlo es ad libitum.

La actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto ha sido demostrada por los autores de la
15 presente invención primero *in vivo*, mediante el seguimiento de compuestos activos del romero en fluidos y tejidos, para después acreditar su efectividad como conservantes endógenos en la carne fresca y cocinada sometida a condiciones de venta al por menor.

El ratio de concentración (0.7-1.2) entre ambos diterpenos incrementa la biodisponibilidad de
20 los principios activos del extracto de romero, los cuales se acumulan en el tejido muscular, lo que supone,

a) Para la carne fresca de cordero:

- 25
- Mejoras en el estatus antioxidante de la carne y el hígado de los corderos.
 - Fuerte reducción de la oxidación de los lípidos en la carne cruda hiperoxigenada.
 - Considerable reducción de los recuentos de mesófilos totales y psicrófilos totales.
 - Moderado retraso del deterioro de color del magro y de la grasa.
 - Moderado retraso del deterioro de la pérdida de olor propio.

30

 - Prevención de la aparición de olor rancio.

b) Para la carne cocinada:

- 35
- Fuerte reducción de la oxidación de los lípidos.
 - Retraso del deterioro del olor y sabor.
 - Retraso de la aparición de rancidez.

- Disminución del olor y sabor a recalentado.
- Fuerte prevención de la aparición de olor rancio.

5 En otro aspecto principal de la invención se contempla un método para la obtención del extracto vegetal de la invención que comprende los siguientes pasos:

- Obtención de una hoja de romero deshidratada,
- Extracción sólido-líquido empleando un disolvente orgánico de entre metanol, etanol, acetona o acetato de etilo, con una relación peso/volumen comprendida entre 1:8 y 10 1:12, a una temperatura comprendida entre 50°C y la temperatura de reflujo de cada disolvente, durante un tiempo comprendido entre 45 y 120 minutos. En realizaciones particulares, la separación sólido-líquido se efectúa mediante separación con filtro-prensa o centrífuga de cesto.
- Tras la separación sólido-líquido, la disolución orgánica obtenida conteniendo los 15 ingredientes activos se lleva a un tanque agitado y se mezcla con una cantidad específica de agua, hasta alcanzar una proporción peso-peso respecto del disolvente de extracción situada entre el 20 y el 50%, preferiblemente el 40 %,
- El medio así conformado se agita lentamente durante un periodo comprendido entre 1 y 4 horas, a temperatura ambiente, para la precipitación de un sólido cristalino,
- 20 - El sólido cristalino que precipita se filtra, mediante un filtro prensa o centrífuga de cesto, y se lava con agua en una proporción peso-volumen comprendida en el rango 1: 5 – 1: 8, a una temperatura situada en el rango 70 – 90 °C.
- El sólido así lavado se filtra, mediante filtro prensa o centrífuga, y se seca en estufa de vacío a una temperatura situada en el rango 45-80°C.

25 Una vez seco el producto (con una humedad inferior al 2%), se descarga para la obtención del extracto de romero.

30 Para la fabricación del pienso suplementado con el extracto de la invención, el extracto sólido obtenido mediante el procedimiento de la invención se añade como un aditivo más en la mezcladora, y seguidamente se procede como en otros procedimientos realizados habitualmente en el estado de la técnica: se mezcla con el pienso a una temperatura inferior a los 65 °C; se efectúa la granulación a 70-75 °C y 2 kg de vapor, siendo la humedad relativa del producto final inferior al 11%.

EJEMPLOSEjemplo 1. Capacidad antioxidante del extracto de la invención en músculo de cordero5 *Materiales y métodos*

Para el desarrollo de la experimentación se analizaron muestras de carne procedentes de dos músculos con diferente demanda metabólica y contenido en grasa intramuscular, *Musculus externus abdominis* y *Musculus deltoideus*, para de esta forma asegurar los beneficios del extracto con proporciones 1:1 frente al 2:1 en los diferentes cortes de carne ofertados al consumidor.

La extracción de los metabolitos transferidos al músculo del cordero se realizó mediante extracción con Soxhlet empleando metanol como agente extractante, siguiendo la metodología publicada por Moñino et al. ("*Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes diet supplemented with the distillate from rosemary (Rosmarinus officinalis) leaves*". *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 3363–3367).

Para la medición de las capacidades antioxidantes y antirradicalarias, mostradas por los extractos metanólicos anteriormente citados, se utilizaron el método FRAP (capacidad reductora frente al Fe+3 definido por Benzie y Strain (1996) y modificado por Descalzo et al., ("*Antioxidant status and odour profile in fresh beef from pasture or grain-fed cattle*". *Meat Sci.* 2007, 75, 299-307) y la capacidad inhibidora del radical libre DPPH• descrita por Brand-Williams et al., ("*Use of free radical method to evaluate antioxidant activity*". *Lebensm.-Wiss. Technol.* 1995, 28, 25-30).

Resultados

En la **Figura 1** se representa la capacidad reductora (frente al Fe+3) de los metabolitos procedentes de la ingesta de los dos extractos de romero P1 y P2 adicionados a la dieta del cordero Segureño durante todo el periodo de cebo. Tal y como se muestra, la capacidad antioxidante de las muestras (*Musculus externus abdominis*) procedentes del extracto con iguales proporciones entre el ácido carnósico y el carnosol superaron en gran medida ($p < 0.05$) a las provenientes de los extractos tradicionalmente empleados, en los que el ácido carnósico dobla su concentración con respecto al carnosol (2:1) y a las muestras denominadas control (piensos sin aditivos antioxidantes procedentes del romero). Este mismo comportamiento se

detectó para la capacidad antirradicalaria, medida frente al radical DPPH•; en este caso los valores IC50 de los extractos metanólicos de la dieta P1 fueron menores que los de P2. **(Figura 2).**

- 5 En relación a los valores obtenidos para las muestras procedentes del *Musculus deltoideus*, de nuevo se confirmó lo definido anteriormente, tanto la capacidad antioxidante como la antirradicalaria de estas matrices mejoraron significativamente con el empleo del extracto P1 frente al P2 y al grupo control **(Figuras 3 y 4).**
- 10 Otro parámetro que justifica las mejoras inducidas por la adición del extracto de romero con proporción 1:1 en diterpenos (P1), sobre el bienestar animal, fue el aumento de la capacidad antioxidante del hígado de los corderos con respecto al extracto más comercializado (P2) y al grupo conocido como control negativo (C) **(Figura 5).**
- 15 El estudio de la transmisión de estos componentes a dos músculos con diferente actividad metabólica (*Musculus deltoideus* y *Musculus obliquus externus abdominis*) mostró que al introducir estos extractos únicamente durante el periodo de cebo ya se mejoró el estatus antioxidante de la carne de cordero.
- 20 Ejemplo 2. Actividad conservante endógena de la carne en condiciones de venta al por menor.

a) Carne cruda fragmentada

Las muestras analizadas fueron medallones de carne fresca (músculo *longissimus dorsi*) de 1,5
25 cm de grosor envasados en bandeja de poliestireno cubierta por un plástico de baja permeabilidad al oxígeno ($8-12 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ O}_2$ por 24h) en cuyo interior se introdujo una atmósfera modificada de uso ordinario para envasar carne roja (70% oxígeno y 30% dióxido de carbono). Las muestras fueron expuestas durante 0, 1, 7 ó 14 días en expositores comerciales a una temperatura de 2°C e iluminadas con luz blanca a 1600 lx.

30

La oxidación de la grasa se midió como índice de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (mg malondialdehído kg⁻¹), determinado por colorimetría (espectrofotómetro Unicam UV2) según el método de *Botsoglou et al. (1994)* (“*Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid methods for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples*”).
 5 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1931–1937).

La carga bacteriana general se estableció mediante recuentos (log ufc g⁻¹) de aerobios mesófilos totales y bacterias psicrófilas (ISO 4833, 2003, *International Organization for Standardization Publications. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method*
 10 *for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees C.* <www.iso.org>). Las muestras fueron manipuladas asépticamente en una campana de flujo laminar (Bio-II-A Telstar, Terrasa, Barcelona, España) y homogeneizadas en bolsas estériles con agua de peptona (Oxoid Ltd. CM0087. Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) empleando un mezclador tipo Masticator (IUL Instruments, GMBH, Königswinter, Alemania). El medio de
 15 cultivo empleado fue PCA (Oxoid CM0325). La incubación se realizó en una estufa de cultivo modelo 207 (Selecta, Abrera, Barcelona, España).

El color objetivo se midió por reflectancia con un colorímetro CR400 R-200/08 Chroma Meter II (Minolta, Milton Keynes, Reino Unido) Los resultados se expresaron en unidades CIELAB como
 20 saturación o ángulo Hue ($H^* = \text{tg}^{-1} (b^*/a^*)$).

La evaluación sensorial se realizó mediante análisis sensorial descriptivo cuantitativo (*Norma ISO 4121, 2003. Sensory analysis Methodology. Evaluation of food products by methods using scales. International Organization for Standardization Publications. <www.iso.org>*) utilizando 8
 25 panelistas seleccionados y entrenados de acuerdo con la Norma ISO 8586-1 (1993). *Sensory analysis Methodology. General guidance for the selection and training and monitoring of assessors. Part 1. Selected assessors. International Organization for Standardization Publications. www.iso.org*. La escala utilizada fue de 1 (mínimo) a 5 (máximo). Los análisis se realizaron en una sala de catas normalizada.

30 El efecto de los dos tratamientos aplicados (dieta de los corderos y el tiempo de almacenamiento) con posible efecto sobre la carne de cordero fragmentada se estableció mediante análisis múltiple de la varianza. El efecto de ambos tratamientos se estableció simultáneamente para calcular la posible extensión de la vida comercial de la carne. Desde un
 35 punto de vista estadístico, el tratamiento afectaba a las variables dependientes (parámetros de calidad) cuando sus valores medios eran diferentes según los cálculos establecidos en el test

de homogeneidad de medias de Scheefe para una probabilidad inferior al 95% ($P < 0,05$). Los valores medios diferentes de una misma variable fueron representados en las tablas con letras diferentes en forma de superíndices. Los valores medios fueron ordenados de mayor a menor en grupos identificados con letras desde la letra ^a (mayor valor medio) en adelante.

5

En las **figuras 6, 7, 8 y 9** y se muestran algunos resultados que demuestran la eficacia de los extractos testados, principalmente reflejados en:

- Fuerte reducción de la oxidación de los lípidos.
- 10 - Considerable reducción de la carga microbiológica total.
- Retraso en el deterioro de color del magro y de la grasa.
- Moderado retraso del deterioro de la pérdida de olor propio.
- Prevención de la aparición de olor rancio.

15 En la **figura 6** se muestran valores medios de oxidación de los lípidos expresados como TBARS (mg MDA kg^{-1}) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por menor. Una mayor concentración de MDA indica cuantitativamente mayor formación de aldehídos y otros compuestos tipo carbonilo que no están presentes en la carne fresca y que se van formando progresivamente por oxidación lipídica de la carne durante el almacenamiento de la misma.

20 La oxidación de lípidos fue similar en la carne recién envasada con independencia de la dieta de los corderos. Tanto la dieta P1, como la dieta P2 retrasaron la oxidación de lípidos con respecto al control en los días 7 y 14. En cambio, la dieta P1 inhibió la oxidación de lípidos con mayor efectividad que la dieta P2 en el día 14, cuando la carne presentaba mayor oxidación de los lípidos, por tanto, el extracto de romero P1 fue el tratamiento antioxidante

25 más eficaz.

En la **figura 7** se muestran valores de ángulo hue (rad) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por menor. Un mayor ángulo H^* indica mayor pardeamiento o color marrón típico de la carne envejecida, producido por oxidación de la mioglobina muscular,

30 mientras que un menor ángulo Hue significa un mayor enrojecimiento de la carne. La carne recién envasada presentó un color rojo característico con independencia de la dieta de los corderos. La dieta P1 estabilizó el color rojo de la carne mejor que la dieta P2 y control en el día 7, mientras ambas dietas, tanto la dieta P1, como la dieta P2, retrasaron el pardeamiento de la carne de forma similar en el día 14, por tanto, el extracto de romero P1 fue el tratamiento

35 antioxidante más eficaz.

En la **figura 8** se muestran recuentos de bacterias psicrófilas totales (Log ufc/g) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por menor. Un mayor recuento de bacterias psicrófilas significa mayor carga total de bacterias alterantes capaces de crecer en la carne a temperatura de refrigeración y por tanto peor calidad microbiológica de la carne. La carga bacteriana fue similar en la carne recién envasada con independencia de la dieta de los corderos. Tanto la dieta P1, como la dieta P2, inhibieron el crecimiento de bacterias alterantes de forma similar en los días 7 y 14, por tanto, los extractos de romero P1 y P2 presentaron un efecto antimicrobiano similar.

En la **figura 9** se muestran puntuaciones de olor a carne cruda de cordero (escala sensorial arbitraria establecida mediante panel entrenado) en carne cruda expuesta en condiciones de venta al por menor. Una mayor nota de olor propio a suero indica una mayor frescura de la carne fresca. Este olor característico se pierde progresivamente por la aparición de olores rancios o desagradables debido a la oxidación de la carne cruda. El olor propio de la carne recién envasada fue similar con independencia de la dieta de los corderos. Tanto la dieta P1, como la dieta P2, retrasaron de forma similar el deterioro del olor propio de bacterias alterantes en los días 7 y 14, por tanto, los extractos de romero P1 y P2 presentaron un efecto sensorial similar.

Efecto de la dosis de principios activos

Un estudio sensorial complementario estableció el efecto de la concentración de extracto de romero P1 (0, 640 ó 980 mg de suma de principios activos ácido carnósico+carnosol) por kg de pienso sobre la calidad de la carne. La carne fue envasada y expuesta en condiciones de venta al por menor de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

Tabla 1. Efecto de la dosis de extracto de romero P1 sobre el color y el olor de la carne cruda.

P1	Días de Tratamiento	0	7	11	14
Color magro	0	4,8 a	3,9 ^{cd}	2,3 ^f	1,6 ^g
	640	4,9 ^{ab}	4,1 ^{cd}	3,8 ^{cde}	3,2 ^e
	980	4,9 ^{ab}	4,3 ^{bc}	3,9 ^{cd}	3,5 ^{de}
Olor propio	0	4,8 ^a	3,9 ^{bc}	1,9 ^e	1,6 ^{ab}
	640	4,8 ^a	4,1 ^b	2,8 ^{cd}	2,3 ^{cd}
	980	4,9 ^a	4,3 ^b	3,5 ^{bc}	2,7 ^{def}
Olor rancio	0	1,0 ^g	1,9 ^{cdef}	3,0 ^{ab}	3,3 ^a
	640	1,0 ^g	1,5 ^{efg}	2,1 ^{efg}	2,4 ^{bc}
	980	1,0 ^g	1,4 ^{fg}	1,7 ^{fg}	2,1 ^{cde}

Medias con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes para $P < 0,05$ (Test de homogeneidad de medias de Scheefe) en función del tratamiento con extracto de romero P1 y el tiempo de almacenamiento. Las letras en forma de superíndices clasifican de menor a mayor un total de 12 valores medios (3 dietas x 4 tiempos de almacenamiento diferentes).

Los resultados más relevantes alcanzados fueron los siguientes:

- Clara estabilización de color durante más tiempo. Tomando como referencia el tratamiento control, ambas dosis fueron efectivas para preservar el enrojecimiento de la carne a partir del día 7 de almacenamiento. Cuantitativamente, la dosis de 980 ppm fue algo más efectiva que la dosis de 600 ppm.
- Menor pérdida de olor propio. Tomando como referencia el tratamiento control, ambas dosis fueron efectivas para preservar el olor propio de la carne a partir del día 11 de almacenamiento. Cuantitativamente, la dosis de 980 ppm fue algo más efectiva que la dosis de 600 ppm.
- Prevención de la aparición de olor rancio. Tomando como referencia el tratamiento control, ambas dosis fueron efectivas para prevenir la rancidez de la carne a partir del día 7 de almacenamiento. Cuantitativamente, la dosis de 980 ppm fue algo más efectiva que la dosis de 600 ppm.
- La administración de 980 ppm incrementó de 11 a 14 días la vida comercial de la carne cruda, comparado con 640 ppm de extracto de romero P1.

A título informativo, las figuras **10 y 11** muestran gráficamente como la suplementación de los corderos con extracto de romero P1 retrasa considerablemente el deterioro del color de la carne, el principal parámetro que limita la vida comercial de la carne roja cruda fragmentada, como la carne de cordero.

b) Carne picada cocinada.

Así mismo, estudios complementarios realizados por los autores de la invención demostraron que la suplementación de los corderos con extracto de romero durante el periodo de cebo aumenta también la capacidad de conservación de las hamburguesas cocinadas de cordero en condiciones de venta al por menor (catering y restauración).

En este caso, las muestras analizadas fueron hamburguesas cocinadas (elaboradas con todos los músculos de la pierna), envasadas en bandejas de poliestireno y cubiertas con film permeable al oxígeno. Las muestras fueron expuestas durante 0, 2 ó 4 días a 2°C y 1640 lux en expositores comerciales.

Los resultados más relevantes alcanzados fueron los siguientes (ver tabla 2):

15

- Fuerte reducción de la oxidación de los lípidos en carne cocinada.
- No afecta al color de la carne cocinada.
- Retraso del deterioro del olor y sabor a carne cocinada de cordero.
- Retraso de la aparición de rancidez.
- Disminución del olor y sabor a recalentado.
- Fuerte prevención de la aparición de olor rancio.

20

Tabla 2. Efecto de la dosis de extracto de romero P1 sobre el color y el olor de la carne cruda.

P1	Trat	Día 0	Día 2	Día 4
		M	M	M
TBARS	0	0,35 ^e	3,68 ^c	5,83 ^a
	640	0,31 ^e	2,74 ^d	4,79 ^b
Olor cordero cocinado	0	4,5 ^a	3,25 ^c	1,9 ^e
	640	4,7 ^a	3,6 ^b	2,3 ^d
Olor rancio	0	1,1 ^d	2,6 ^b	3,1 ^a
	640	1,1 ^d	2,3 ^c	2,6 ^b
Sabor cordero cocinado	0	4,6 ^a	2,8 ^c	1,8 ^e
	640	4,6 ^a	3,5 ^b	2,2 ^d
Sabor recalentado	0	1,2 ^d	2,5 ^c	3,1 ^a
	640	1,1 ^d	2,3 ^c	2,8 ^b

25

Medias con diferentes superíndices son diferentes para P<0,05 (Test de Scheefe) en función del tratamiento con extracto de romero P1 y el tiempo de exposición.

Ejemplo 3. Método específico de obtención de extractos de romero con una relación específica entre los activos ácido carnósico y carnosol.

5 El proceso de extracción se realizó sobre un lote de 3000 kilos de hoja de romero deshidratada y desaceitada, mediante el uso de etanol como disolvente de extracción, en una proporción peso de hoja/volumen de disolvente de 1:10 (1000 kilos de hoja: 10.000 litros de etanol).

10 Las condiciones de extracción fueron: temperatura 60°C y tiempo de extracción 100 minutos. Después de la extracción, se realizó la separación sólido-líquido en una centrifuga de cesto.

Tras la separación sólido-líquido, la disolución orgánica conteniendo los ingredientes activos se llevó a un tanque agitado y se le adicionó una cantidad específica de agua, hasta alcanzar una proporción peso-peso respecto del disolvente de extracción del 40 %.

15 La cantidad de agua adicionada a la disolución etanólica obtenida fue de 6500 litros, obteniéndose así una mezcla de unos 16.500 litros, de proporciones etanol-agua (61:39).

La mezcla se mantuvo en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Se produjo la precipitación (cristalización) de un sólido verdoso-amarillento.

20 El sólido precipitado se filtró mediante filtro-prensa, empleando como medio filtrante telas de polipropileno. Este sólido se lavó posteriormente en un depósito con unos 250 litros de agua desionizada (ratio 1:8), a una temperatura de 85°C.

25 El sólido lavado se filtró de nuevo empleando un filtro prensa. Se descargó para su secado en una estufa de vacío. La temperatura de secado se inició en 45°C y se realizó un gradiente ascendente de temperatura, hasta llegar a los 80°C como temperatura final. Una vez seco el producto (humedad inferior al 2%), se descargó, obteniéndose 31 kilos de extracto de romero.

30 El análisis cromatográfico del extracto obtenido tuvo los siguientes resultados: ácido carnósico, 13,3%; carnosol, 16,7% (ratio ácido carnósico / carnosol: $0,796 \approx 0,8$), concentración total de activos, 30%.

Ejemplo 4. Método de fabricación de un pienso de cebo de corderos empleando el extracto de romero de la invención

5 Se empleó el extracto de romero (30% de pureza) con proporciones (0.8) en ácido carnósico:carosol a una concentración de 2700 ppm -suponiendo que la degradación de los diterpenos tras la fabricación del pienso no supera el 20%, para asegurar una riqueza de 640 ppm en diterpenos- para alimentar al cordero durante todo el periodo de cebo.

10 El extracto sólido se añadió como un aditivo más en la mezcladora. Seguidamente se mezcló con el pienso a una temperatura de 60°C.

La granulación se efectuó a 73 °C y 2 kg de vapor. La humedad relativa del producto final obtenido fue del 11%.

REIVINDICACIONES

1. Extracto vegetal procedente de hoja de romero que comprende los diterpenos ácido carnósico y carnosol con una relación de concentraciones [ácido carnósico] / [carnosol] comprendida entre 0.7 y 1.2.
5
2. Extracto vegetal, según la reivindicación 1, donde la relación de concentraciones [ácido carnósico] / [carnosol] es 1.
3. Extracto vegetal, según las reivindicaciones 1 ó 2, donde la suma del peso del ácido carnósico y del carnosol, con respecto al peso total del extracto, está comprendida entre un
10 25 y un 35%.
4. Extracto vegetal, según la reivindicación 1, para su empleo en alimentación animal.
5. Empleo del extracto vegetal de la reivindicación 1 en la fabricación de un pienso para alimentación animal.
6. Empleo, según la reivindicación 5 donde el pienso está destinado al cebo de rumiantes.
- 15 7. Empleo, según la reivindicación 6 donde el rumiante es un cordero.
8. Empleo, según la reivindicación 7 donde el extracto se encuentra en el pienso a una concentración mínima comprendida entre 2700 y 4000 ppm.
9. Pienso para alimentación animal suplementado con un extracto vegetal de romero, según las reivindicaciones 1-4.
- 20 10. Método para la obtención del extracto vegetal de la reivindicación 1 que comprende:
 - a. Obtención de una hoja de romero deshidratada,
 - b. Extracción sólido-líquido de la hoja obtenida empleando un disolvente orgánico de entre: metanol, etanol, acetona o acetato de etilo, con una relación peso/volumen comprendida entre 1:8 y 1:12, a una temperatura comprendida entre 50°C y la
25 temperatura de reflujo de cada disolvente, durante un tiempo comprendido entre 45 y 120 minutos,
 - c. Mezcla de la disolución orgánica obtenida en b) con agua hasta alcanzar una proporción peso-peso respecto del disolvente de extracción situada entre el 20 y el 50%.
 - 30 d. Agitación de la mezcla obtenida en c) durante un periodo comprendido entre 1 y 4 horas a temperatura ambiente para la precipitación de un sólido cristalino,
 - e. Filtrado y lavado del sólido obtenido en d) con agua en una proporción peso-volumen comprendida entre 1:5 y 1:8, a una temperatura comprendida entre 70-90°C,
 - 35 f. Filtrado del sólido lavado en e) y secado a una temperatura comprendida entre 45-80°C.

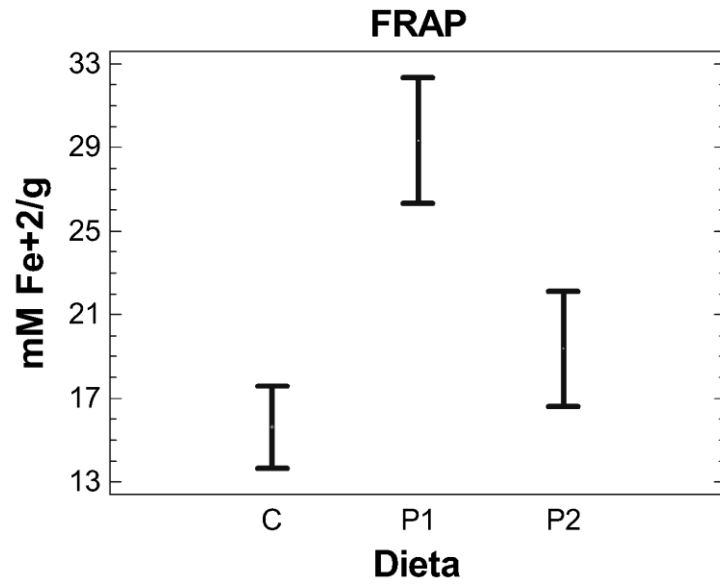


FIG. 1

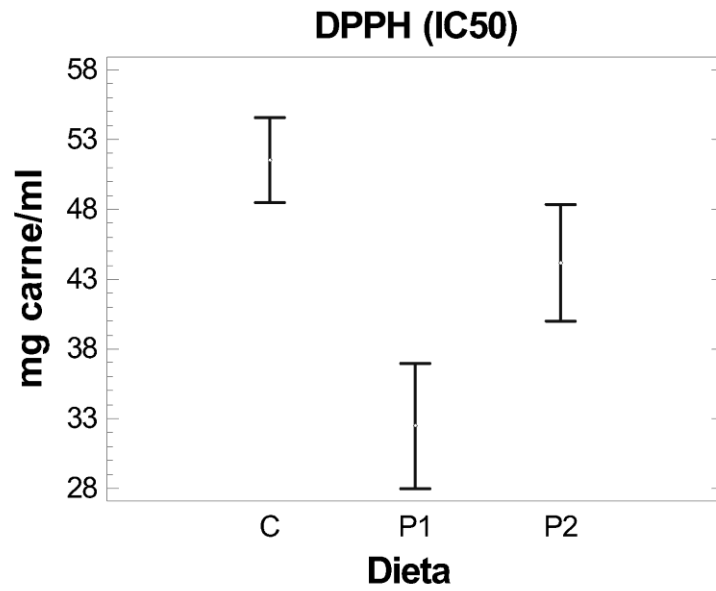


FIG. 2

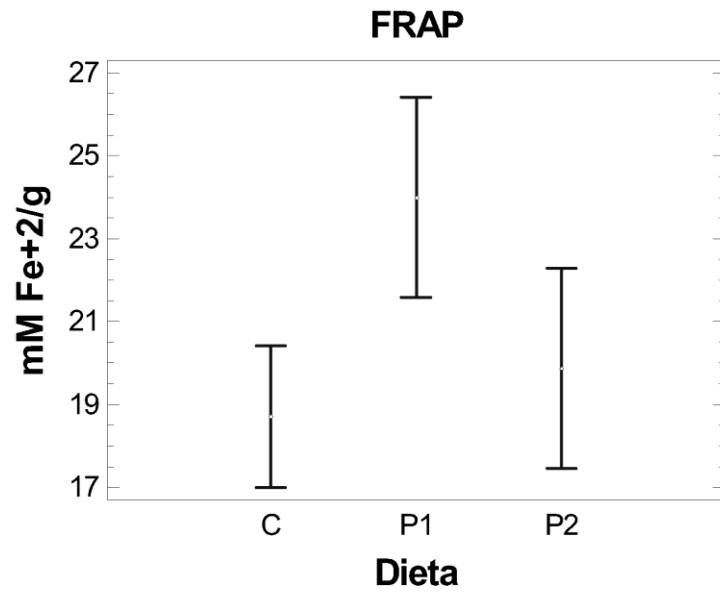


FIG. 3

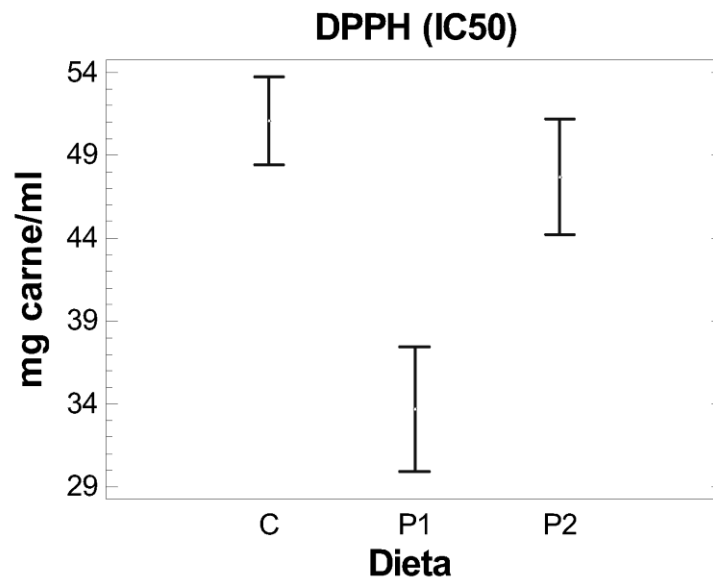


FIG. 4

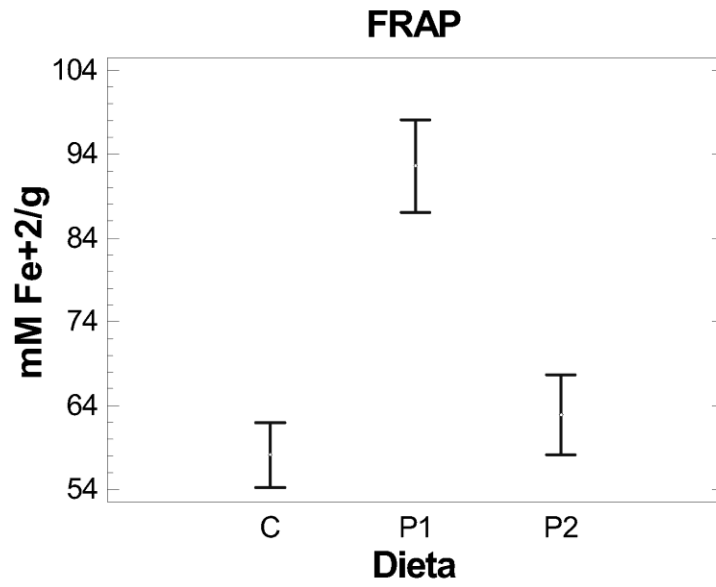


FIG. 5

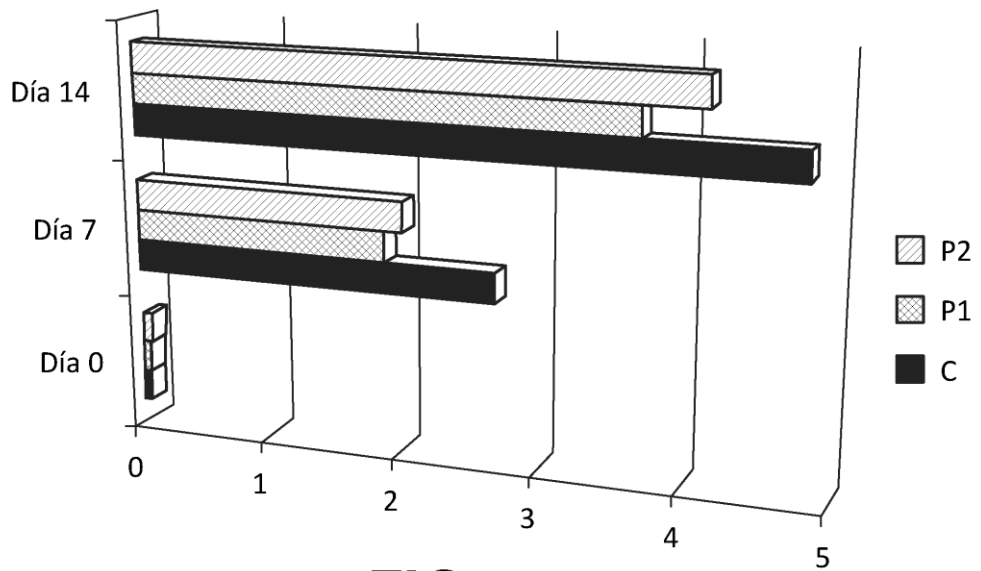


FIG. 6

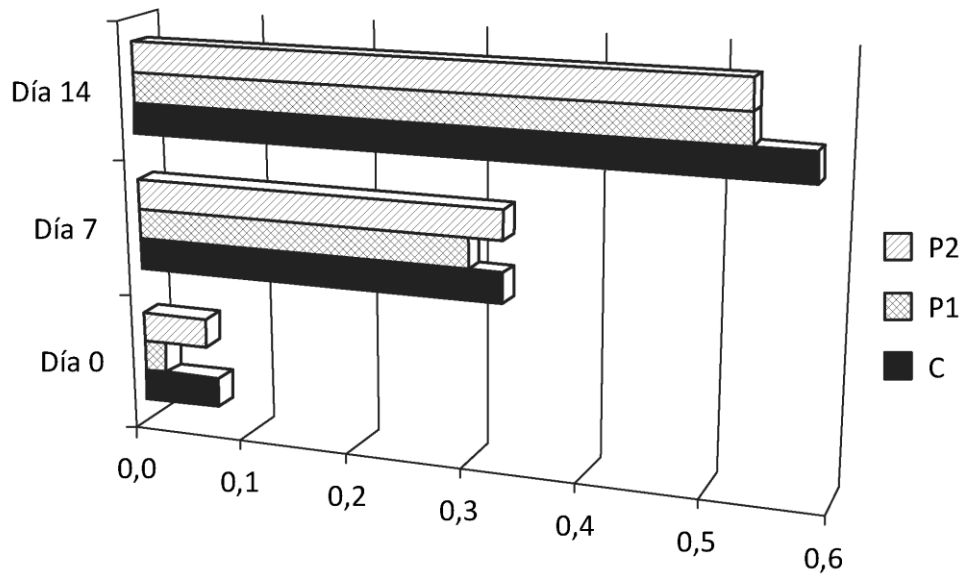


FIG. 7

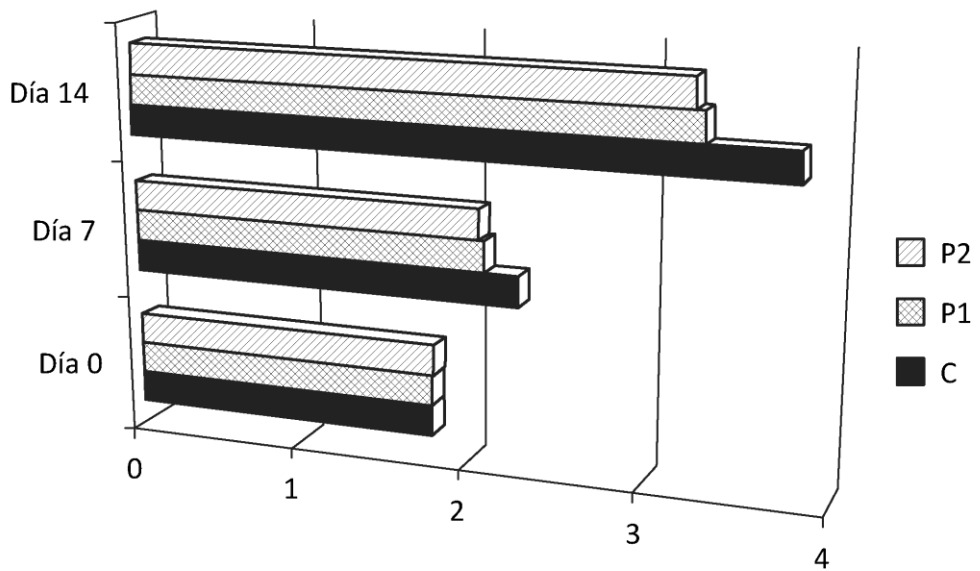


FIG. 8

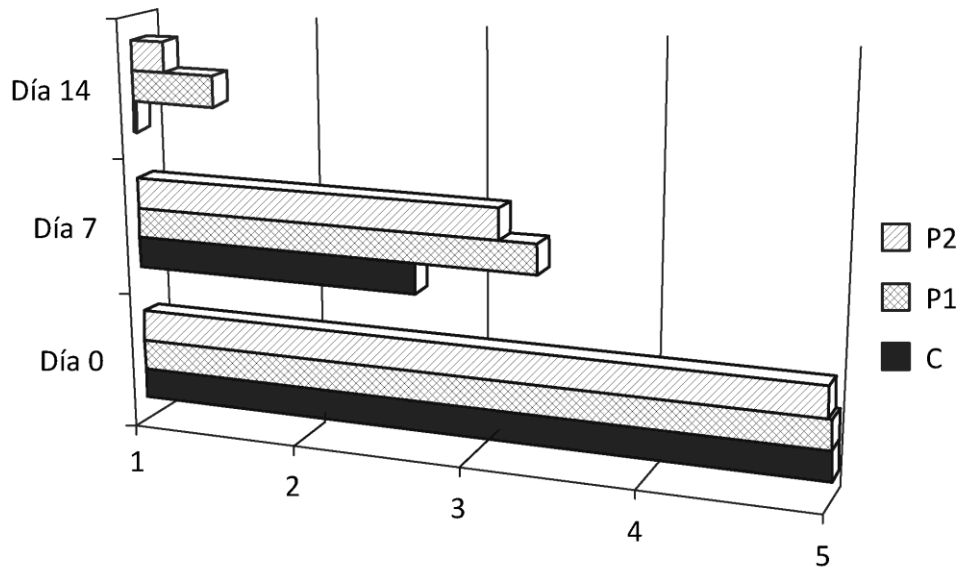


FIG. 9

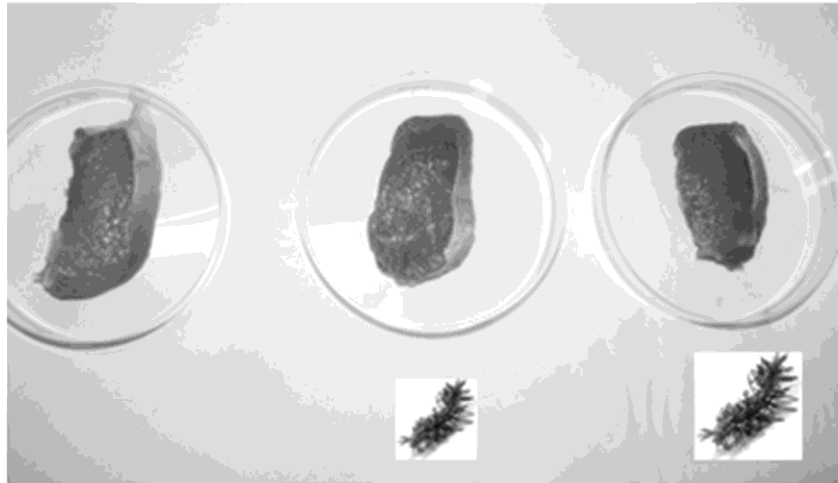


FIG. 10

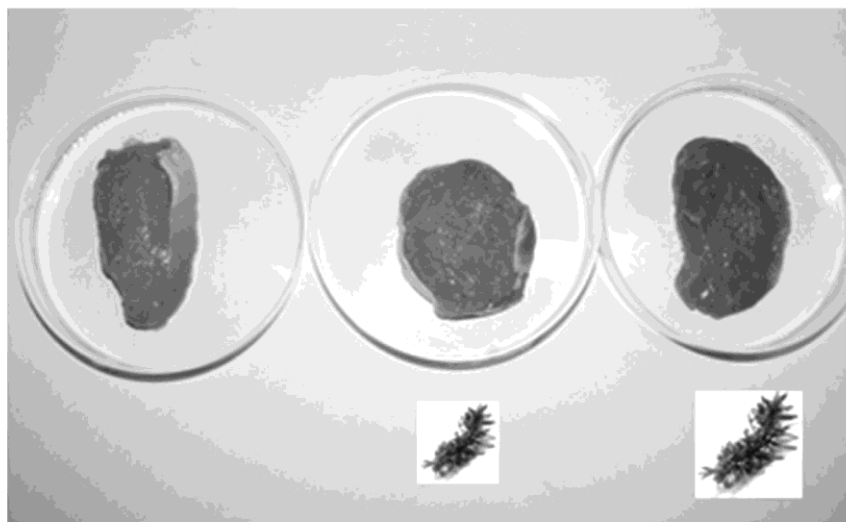


FIG. 11



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201230114

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.01.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A23K1/16** (2006.01)
A23K1/18 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JORDAN, M. J. et al. Introduction of distillate rosemary leaves into the diet of the Murciano-Granadina goat: transfer of polyphenolic compounds to goats' milk and the plasma of suckling goat kids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010; vol. 58, nº 14, páginas 8265-8270. ISSN 0021 8561. Doi: 10.1021/jf100921z	1-10
A	MOÑINO, I. et al. Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008; vol. 56, nº 9, páginas 3363-3367. ISSN 0021 8561. Doi: 10.1021/jf7036856	1-10
A	EP 1930019 A1 (DSM IP Assets B.V.) 11.06.2008, páginas 2-3, [0010]-[0014]; página 3, [0021],[0022],[0027]; página 6, [0062].	1-10
A	NIETO, G. Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.): influence on lamb meat quality. Meat Science, 2010; vol. 84, nº 1, páginas 23-29. ISSN 0309 1740. Doi: 10.1016/j.meatsci.2009.08.001	1-9
A	KANITHAPORN PUANGSOMBAT et al. Inhibition of heterocyclic amine formation in beef patties by ethanolic extracts of rosemary. Journal of Food Science, 2010, vol. 75, nº 2, páginas T40-T47. ISSN 0022 1147. Doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01491.x	1-6,9,10
A	WO 0124636 A1 (KEMIN INDUSTRIES, INC.) 12.04.2001, página 1, línea 25 – página 2; página 3, líneas 13-31; reivindicaciones 1-3,5,13-15,17.	1-5,9
A	ES 2083190 T3 (NORAC TECHNOLOGIES INC.) 01.04.1996, columnas 1,2,7,8.	1-3,10
A	WO 2011047321 A1 (NATUREX, S. A.) 21.04.2011, página 4, [0011]; página 5, [0021]; reivindicaciones 8-10.	1-3,10

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
28.01.2013

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/4

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

A23K

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.01.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1 - 10	SI
	Reivindicaciones	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 extracto vegetal procedente de hoja de romero que comprende los diterpenos ácido carnósico y carnosol con una relación de concentraciones entre 0.7 y 1.2 (reivindicación 1), donde la relación de ácido carnósico/carnosol es 1 (reiv. 2) y donde la suma de ácido carnósico y de carnosol con respecto al peso total del extracto, está comprendida entre 25 a 30% (reiv. 3).

El extracto vegetal obtenido se emplea en alimentación animal (reiv. 4), en la fabricación de un pienso para alimentación animal (reiv. 5), donde el pienso está destinado al cebo de rumiantes (reiv. 6), donde el rumiante es cordero (reiv. 7) y donde el extracto se encuentra en el pienso a una concentración mínima comprendida entre 2700 y 4000 ppm (reiv. 8).

También es objeto de protección el pienso para alimentación animal suplementado con el extracto vegetal de romero reivindicado (reiv. 9).

Por último, es objeto de protección el método para la obtención del extracto vegetal reivindicado que comprende (reivindicación 10):

- obtención de una hoja de romero deshidratada,
- extracción sólido-líquido de la hoja obtenida empleando un disolvente orgánico entre metanol, etanol, acetona o acetato de etilo, con relación peso/volumen de 1:8 y 1:12, a 50°C y durante 45 a 150 minutos,
- mezcla de la disolución orgánica obtenida en b) con agua hasta alcanzar una proporción respecto del disolvente de extracción situada entre el 20 y 50%,
- agitación de la mezcla obtenida en c) durante 1 a 4 horas a temperatura ambiente para la precipitación de un sólido cristalino,
- filtrado y lavado del sólido obtenido en d) con agua a una proporción peso-volumen entre 1:5 y 1:8 a una temperatura entre 70-90°C,
- filtrado del sólido lavado en e) y secado a temperatura entre 45-80°C.

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	JORDAN, M. J. et al. Introduction of distillate rosemary leaves into the diet of the Murciano-Granadina transfer of polyphenolic compounds to goats' milk and the plasma of suckling goat kids	2010
D02	MONINO, I. et al. Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>) leaves.	2008
D03	EP 1930019 A1 (DSM IP Assets B.V.)	11.06.2008
D04	NIETO, G. Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.): influence on lamb meat quality.	2010
D05	KANITHAPORN PUANGSOMBAT et al. Inhibition of heterocyclic amine formation in beef patties by ethanolic extracts of rosemary.	2010
D06	WO 0124636 A1 (KEMIN INDUSTRIES, INC.)	12.04.2001
D07	ES 2083190 T3 (NORAC TECHNOLOGIES INC.)	01.04.1996
D08	WO 2011047321 A1 (NATUREX, S. A.)	21.04.2011

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 **D08** se refieren a extractos procedentes de hojas de romero que comprenden ácido carnósico y carnosol, si bien en ninguno se divulga la relación entre éstos comprendida entre 0,7 y 1,2. En efecto,

- **D01** divulga la introducción de hojas destiladas de romero en la dieta del cordero Murciano-Granadina. Las hojas secas se someten a un proceso de extracción de polifenoles con metanol durante 2 h, y los polifenoles recuperados entre otros son carnosol y ácido carnósico pero la proporción de éstos no es la misma (página 8266, columna 2).
- **D02** se refiere a la transmisión polifenólica a la carne de cordero Segureño alimentados con hojas de romero (páginas 3363-3366), si bien la proporción carnosol y ácido carnósico no es igual.
- **D03** hace referencia a que la administración de destilado de hojas de romero en la dieta influye en la calidad de la carne de cordero (página 24, columna 1)
- **D04** divulga extractos de romero extraídos con acetona que contiene ácido carnósico de 20 a 65% y carnosol de 0,5 a 7% que se utilizan para tratar rumiantes como el cordero (páginas 2-3, [0010]-[0014]; página 3, [0021], [0022], [0027]; página 6, [0062]).
- **D05** se refiere a los extractos etanólicos en distintos porcentajes de hojas de romero que inhiben la formación de aminas heterocíclicas en empanadas de carne de res (páginas T40-T47) por lo que se puede utilizar como aditivo.
- **D06** divulga el uso de extracto de romeros en animales, entre los antioxidantes se incluye el ácido carnósico y el carnosol (página 1, línea 25-página 2) en la dieta animal (página 3, líneas 13-31; reivindicaciones 1-3, 5, 13-15,17).
- **D07** divulga un método para concentrar ácido carnósico y otros compuestos antioxidantes diterpénicos fenólicos, como el carnosol, de materiales herbáceos como las hojas de romero, para ello se mezcla con etanol o metanol, durante 2 m a temperatura ambiente (columna 1, 2, 7, 8) pero no se refiere a la relación de los antioxidantes.
- **D08** que se refiere a extractos de hojas de *Rosmarinus officinalis* preparadas con acetona y teniendo como componentes activos ácido carnósico en un 15 a 30% y carnosol en un 1 a 3% página 4, [001]; página 5, [0021]; reivindicaciones 8-10.

Por lo tanto, los documentos citados divulgan ampliamente que el extracto de hojas de romero comprende los diterpenos ácido carnósico y carnosol y que se puede utilizar en la alimentación animal, tanto en rumiantes como concretamente en corderos pero ninguno cita la relación 0,7 y 1,2 entre los diterpenos.

Por ello, a la vista de los documentos citados D01 a D08, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 10** son nuevas de acuerdo al Artículo 6 de la LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de obtener un extracto vegetal procedente de hoja de romero que comprende los diterpenos ácido carnósico y carnosol con una relación de concentraciones entre 0.7 y 1.2, y en concreto donde la relación de ácido carnósico/carnosol es 1, no resulta evidente para el experto en la técnica puesto que en los documentos citados la relación nunca es cercana a 1, sino uno de ellos está presente en mucha mayor cantidad que el otro.

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D08, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 10** tienen actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.