

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 192**

21 Número de solicitud: 201201201

51 Int. Cl.:

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/22 (2006.01)

A23L 3/3472 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.05.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
OTRI-Vicerrectorado de i+d+i C/ Benito Pérez
Galdós, s/n
11002 Cádiz ES

72 Inventor/es:

MARTINEZ DE LA OSSA FERNANDEZ, Enrique
Jose;
MANTELL SERRANO, Casimiro;
CASAS CARDOSO, Lourdes y
FERNANDEZ PONCE, Maria Teresa

54 Título: **Extractos fenólicos de Mangifera indica Linn, procedimiento de obtención y usos.**

57 Resumen:

Extractos fenólicos de Mangifera indica Linn, procedimiento de obtención y usos.

La invención contempla extractos fenólicos de Mangifera indica Linn, ricos en mangiferina y quercetina, obtenidos mediante disolventes verdes a alta presión. El procedimiento de obtención comprende en: a) una etapa de preparación de la materia prima que comprende operaciones de secado, congelación y molienda, b) una extracción a altas presiones con disolventes verdes como dióxido de carbono supercrítico y mezclas de agua/alcohol en ausencia de luz y oxígeno, c) una etapa de concentración supercrítica en columna, d) una evaporación del disolvente a vacío o con nitrógeno. También se contempla el empleo de los extractos con actividad antioxidante y contenido en mangiferina y quercetina, para su uso cosmético y/o alimentario.

ES 2 464 192 A1

DESCRIPCIÓN

EXTRACTOS FENÓLICOS DE MANGIFERA INDICA LINN, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y USOS.

SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 Extractos fenólicos bioactivos de aplicación en la industria alimentaria, nutracéutica y cosmética.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios de las plantas más numerosos, con más de 8000 estructuras conocidas (*Sobratte et al. (2005) Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research 579, 200-213*). El interés en estos compuestos radica en los efectos biológicos beneficiosos que poseen, tales como: propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas, antidiabéticas, entre otras

15 (*Nijveltdt et al. (2001) Flavonoides: a review of probable mechanisms of action and potential applications. American Journal Clinical Nutrition 74, 418—25*). Muchas de estas funciones se atribuyen a su capacidad antioxidante y a otros mecanismos implicados en la protección contra el estrés oxidativo como son su actividad antiradical, la quelación de iones metálicos, la modulación de la expresión genética y la prevención del daño oxidativo del ADN.

20 Debido a estas propiedades, actualmente se considera que los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes terapéuticos en un amplio número de patologías relacionadas con el daño de radicales libres, dentro de las cuales se incluyen el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, disfunciones cardiovasculares, enfermedades inmunológicas, y el envejecimiento (*Soobratte et al. (2005) Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research 579, 200-213*).

25

Los compuestos fenólicos pueden encontrarse en casi cualquier parte de las plantas, por tanto los subproductos agroindustriales son una fuente rica en este tipo de compuestos. En el caso de los subproductos agrícolas de la planta de *Mangifera indica Linn*, su interés se atribuye a su alta concentración en compuestos fenólicos de alto poder antioxidante (*Teng*

30 *Lin et al. (2009) Standardised Mangifera indica extract is an ideal antioxidant. Food Chemistry 113, 1154-1159*), considerados como los compuestos responsables de las múltiples propiedades farmacológicas de esta planta. En la bibliografía se describen propiedades antiespasmódicas, antipiréticas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antifúngicas, antidiabéticas, inmunomoduladoras, analgésicas, antioxidantes y antidiarreas

(Aderibigbe et al. (2001) Evaluation of antidiabetic action of *Mangifera indica* in mice. *Phytotherapy Research* 15, 456-458; Amazzal et al. (2007) Mangiferin protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity mediated by oxidative stress in N2a cells. *Neuroscience Letters* 428, 159-164; Carvalho et al. (2007) Gastroprotective effect of mangiferin, a xanthonoid from *Mangifera indica*, against gastric injury induced by ethanol and indomethacin in rodents. *Plant Medicine* 73, 1372-1376; Garrido et al. (2004) In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacological Research* 50, 143-149; Massibo et al. (2008) Major Mango Polyphenols and their Potential Significance to Human Health. *Comprehensive review in food science and food safety* 7, 309-318).

Entre los polifenoles más importantes de la planta de mango, en términos de capacidad antioxidante y cantidad, se encuentran la mangiferina y quercetina; aunque esta planta contiene otros polifenoles en menor proporción como catequinas, kaempferol, antocianinas, ácido gálico y ácido benzoico.

La mangiferina, de la familia de las xantonas, presenta interesantes propiedades nutraceuticas y farmacológicas, y se considera un agente prometedor en el tratamiento de enfermedades degenerativas como el cáncer. La quercetina es un flavonoide que posee propiedades antioxidantes y anticancerígenas así como efectos en la regulación de la expresión genética (Rocha et al. (2010) *Bioactive Compounds in Mango (Mangifera indica L.)*. *Bioactive foods in promoting health. Fruits and vegetables. El Sevier Chapter 34*, 507-514; Massibo et al. (2008) *Major Mango Polyphenols and their Potential Significance to Human Health. Comprehensive review in food science and food safety* 7, 309-318).

Las aplicaciones cosméticas de los extractos de mango y de sus componentes mayoritarios (mangiferina y quercetina) también han sido descritas en patentes de aplicación.

25

- EP0793476: Utilisation de mangiferine o uses dérivés pour une application cosmetique, Rouillard, F; Josse, A, Robin, J-R. Describe diferentes propiedades cosméticas de la mangiferina como efecto fotoprotector, actividad anti-colagenasa y actividad antirradicalaria.

30

- US 2006/0088560 A1: Cosmetic use of mangiferin, Charrier, L; Poirier, F; Maillet, G; Lubrano, C. Esta patente se refiere al uso de la mangiferina obtenida a partir de extractos polares de *Mangifera indica* para prevenir y/o reducir los efectos del estrés térmico en la piel causado por variaciones de temperatura.

35

Los extractos comerciales de las hojas y corteza de *Mangifera indica* Linn se obtienen principalmente por medio de técnicas de extracción sólido-líquido, como por ejemplo se describe en la patente P0793476: Utilisation de mangiferine o uses dérivés pour une application cosmetique, Rouillard, F; Josse, A, Robin, J-R. Sin embargo, la extracción con
5 solventes orgánicos presenta diversos inconvenientes como largos procesos de extracción, uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos considerados como perjudiciales para la salud y el ambiente, así como largos procesos de concentración/evaporación que en ocasiones degradan los compuestos bioactivos y no permiten retirar completamente los disolventes del producto.

10 También se han descrito métodos para extraer mangiferina a partir de *Mangifera indica* Linn utilizando métodos de extracción con agua o mezclas hidro-alcohólicas a alta presión y temperatura (CN 101429222 A: Method for extracting mangiferin, 2009). Este método tiene ventajas frente a la extracción convencional como la reducción de tiempos de extracción y gastos de energía. Pero la extracción por medio de líquidos presurizados utilizando
15 disolventes orgánicos sigue teniendo el inconveniente de obtener productos con restos de disolventes.

Continúa existiendo en el estado de la técnica, por tanto, la necesidad de un procedimiento que permita obtener extractos de *Mangifera indica* Linn enriquecidos en compuestos fenólicos, como mangiferina y quercetina, que supere los inconvenientes de los
20 procedimientos del estado de la técnica.

La invención objeto de esta patente consiste en un método de extracción y purificación de compuestos fenólicos a partir de *Mangifera indica* Linn utilizando CO₂ supercrítico en presencia de modificadores polares como agua y etanol. La extracción con CO₂ supercrítico se ha desarrollado ampliamente en los últimos años para una gran variedad de aplicaciones
25 debido a la escasa contaminación a la que da lugar, a que opera bajo condiciones en las que se evitan reacciones de oxidación y/o degradación y a que su poder de solvatación puede fácilmente modificarse con cambios de presión y temperatura, o adicionando disolventes polares para el caso de extracción de compuestos polares.

El proceso descrito en la presente invención presenta ventajas adicionales como el uso de
30 solventes verdes (CO₂, agua y etanol), la reducción de la cantidad de disolventes líquidos, la reducción de las etapas de concentración, y la obtención de extractos con alta concentración en compuestos fenólicos y sin restos de disolventes orgánicos.

La invención también incluye un nuevo proceso de purificación de los extractos de *Mangifera indica* Linn, basado en la separación cromatográfica con fluidos supercríticos.
35 Este método de purificación ofrece igualmente la ventaja de permitir una etapa de

concentración verde y eficiente, que aumenta la concentración del extracto en polifenoles y por tanto las propiedades antioxidantes del mismo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a extractos de las hojas y/o ramas de *Mangifera indica Linn*, conteniendo mangiferina, quercetina y otros compuestos fenólicos minoritarios, y teniendo potentes propiedades antioxidantes. También se protege su procedimiento de obtención, y su uso como ingrediente en la industria cosmética y/o alimentaria.

10 El problema a resolver es la obtención de extractos de *Mangifera indica Linn*, ricos en compuestos fenólicos, mediante una tecnología verde y eficiente. En particular, se quieren conseguir extractos de mango 100% naturales, libres de disolventes orgánicos y con elevadas propiedades antioxidantes.

15 Se describen los extractos de *Mangifera indica Linn* caracterizados por su contenido en polifenoles, particularmente mangiferina y quercetina, y sus potentes propiedades antioxidantes. El procedimiento de obtención, que también se protege, se basa en el empleo de disolventes verdes, como son dióxido de carbono, agua, y etanol, bajo condiciones sub-
o supercríticas a elevada presión y temperatura. Se consigue con este nuevo proceso aumentar la eficiencia del proceso, reducir tiempos de operación y obtener extractos libres de disolventes orgánicos. Además, es importante resaltar que el uso de dióxido de carbono
20 minimiza el empleo de disolventes líquidos, lo que reduce las etapas de concentración y la posible degradación de los compuestos fenólicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1:** Análisis LC-ES-MS de compuestos fenólicos presentes en extractos de *Mangifera indica Linn*.

Figura 2: Análisis LC-ES-MS y LC-UV para los patrones de compuestos fenólicos presentes en los extractos de sub- o supercríticos de *Mangifera indica Linn*.

30 **Figura 3:** Análisis HPLC por columna de fase reversa Sinergy Hidro RP para el extracto fenólico obtenido en el ejemplo 1, con identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los compuestos fenólicos mangiferina y 3- β -D-glucosil-quercetina de acuerdo a su tiempo de retención (t_r =20min para mangiferina y t_r =34,4 min para 3- β -D-glucosil-quercetina).

Figura 4: Análisis LC-ES-MS en cuadrupolo-ES Modo Scan para el extracto obtenido en el ejemplo 1. Se comprueba la presencia de los compuestos fenólicos ácido gálico, metil galato, 3-D-galactosil-quercetina, 3-β-D-glucosil-quercetina, 3-O-α-L-arabinopiranosil quercetina y 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glucosa (m/z= 169, 183, 421, 463, 463, 433 y 939 respectivamente). No se observa presencia de quercetina (m/z= 301 y t_r= 47,7 min).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención consiste en extractos de las hojas y/o ramas de *Mangifera indica* Linn caracterizados por presentar un contenido fenólico mínimo de mangiferina y quercetina de 1,93 y 0,88 % respectivamente, así como la presencia de compuestos minoritarios. La sinergia entre los diferentes compuestos presentes en el extracto le otorgan potentes propiedades antioxidantes, con un Índice de Actividad Antioxidante mínimo de 4,0, superior al del tocoferol (IAA=3,65), considerado un potente antioxidante.

Las características de los extractos obtenidos permiten que puedan ser utilizados en la industria cosmética para el cuidado de la piel y/o el cabello, por ejemplo como agentes para combatir el envejecimiento. Y en el caso de la industria alimentaria, como antioxidantes naturales en reemplazo de antioxidantes sintéticos como el BHT (butirohidroxitolueno) o el BHA (butirohidroxianisol).

Las hojas y corteza de *Mangifera indica* Linn son un subproducto agroalimentario que generalmente es quemado después de la poda. Por lo que este procedimiento de obtención de extractos supondría una valorización de dicho subproducto al obtenerse productos de mayor valor añadido.

Caracterización de los extractos sub- o supercríticos de Mangifera indica Linn

Los extractos de *Mangifera indica Linn* se caracterizan teniendo en cuenta su contenido fenólico y su capacidad antioxidante, para determinar su posible uso en la industria cosmética y alimentaria.

5 *i) Determinación del contenido fenólico de los extractos sub- o supercríticos de Mangifera indica Linn:*

10 La determinación del contenido fenólico del extracto se realiza por medio de cromatografía líquida de alta resolución HPLC (High Performance Liquid Chromatography), en un equipo Agilent HPLC series 1100 (Agilent Technologies, Estados Unidos), con una columna C18 de fase reversa (Thermo Electron Corporation) y un detector UV/vis.

El método de separación utiliza como fase móvil una disolución de ácido acético en agua al 2% (solvente A) y metanol (solvente B), a una tasa de flujo de 0,9 mL/min, un volumen de inyección de 50 µmL, y utilizando las siguientes condiciones de elución: 0–2 min, 5% B isocrático; 2-7 min, gradiente lineal 5-25% B; 7-11 min, 25% B isocrático; 11-19 min, gradiente lineal 25-32% B; 19-27 min, 32% B isocrático; 27-28 min, gradiente lineal 32-40% B; 28-38 min, 40% B isocrático y finalmente se incluye una etapa de lavado y reacondicionamiento de la columna (38-50 min, gradiente lineal 40–100% B; 50-60 min, 100% B isocrático; 60-70 min, gradiente lineal 100–5% B; y 5 min, 5% B isocrático).

20 Los compuestos fenólicos se detectan a una longitud de onda de 340 nm de acuerdo a su tiempo de retención, y se cuantifican utilizando curvas de calibración para los patrones correspondientes.

25 Las curvas de calibración de los compuestos mayoritarios presentes en los extractos, mangiferina y 3-β-D-glucosil-quercetina, se expresan como $Abs = 54.252 \cdot C - 100,12$, y $Abs = 87.077 \cdot C - 130,11$, respectivamente. Donde C es la concentración expresada en µg/ml. Para cada muestra se realizan mediciones por triplicado.

Finalmente el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos se expresa en términos de g/100g extracto seco. Los extractos de *Mangifera indica Linn* obtenidos según el procedimiento de extracción, presentan un contenido mínimo en mangiferina y quercetina de 1,93 % y 0,88 % respectivamente.

30 Sin embargo la actividad antioxidante de los extractos no depende únicamente del alto contenido de estos dos compuestos, sino de la sinergia entre los diferentes compuestos fenólicos extraídos durante el proceso.

ii) *Determinación cualitativa de los compuestos fenólicos presentes en los extractos sub- o supercríticos de Mangifera indica Linn:*

Para confirmar que los extractos contienen mangiferina y 3-β-D-glucosil-quercetina, así como la presencia de otros compuestos fenólicos se realiza un análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas LC-MS utilizando un detector de masas cuadrupolo-ES de alta resolución (Quadrupolar-ionization time-of-flight mass spectrometry).

Para este análisis se contó con patrones comerciales de ácido gálico, metil galato, mangiferina, 3-D-galactosil-quercetina, 3-β-D-glucosil-quercetina, 3-O-α-L-arabinopiranosil-quercetina, 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glucosa, y quercetina. Con objeto de optimizar las condiciones de ionización, se inyectaron los patrones de manera individual, uno por uno, directamente en el espectrómetro de masas. Se utilizó una fase móvil compuesta por una disolución A de agua al 0,1% de ácido fórmico y una disolución B de acetonitrilo al 0,1% de ácido fórmico, en modo isocrático 50:50, a una tasa de flujo de 1,0 mL/min, y un volumen de inyección de 10μL, en modo de ionización ES (Electro Spray) Negativo con un rango m/z de 50-2000 u.m.a.

En la tabla siguiente se indican las masas de los iones correspondientes para cada patrón de compuesto fenólico (m/z) obtenidos del análisis LC-ES-MS correspondiente para cada patrón. (Figura 1: Análisis LC-ES-MS de compuestos fenólicos presentes en extractos de *Mangifera indica* Linn).

20 Señales LC-ES-MS [M-H]⁻ (m/z)

Compuesto fenólico	m/z [M-H] ⁻	tr (min)
Acido gálico	169	4,06
metil galato	183	10,13
mangiferina	421	25,94
3-D-galactosil-quercetina	463	38,81
3-β-D-glucosil-quercetina	463	39,66
3-O-α-L-arabinopiranosil-quercetina	433	42,39
1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glucosa	939	43,50
quercetina	301	47,86

Además del análisis LC-ES-MS para los patrones, los extractos se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas HPLC-MS para separar los distintos compuestos fenólicos. Se utilizó un HPLC con una columna Phenomenex C18 de fase reversa Synergi 4 μm Hydro -RP 150x3mm con precolumna C18. Como fase móvil se empleó una disolución A de agua al 0,1% de ácido fórmico y una disolución B de acetonitrilo al 0,1% de ácido fórmico, a una tasa de flujo de 0,8 mL/min, y utilizando un gradiente de elución de: 0-0,2 min, 0% B; 0,2-0,3 min, gradiente lineal 0-7% B; 0,3-14,7 min, gradiente lineal 7-8,5% B; 14,7-40 min, gradiente lineal 8,5-19% B; 40-45 min, gradiente lineal 19-33% B; 45-48 min, gradiente lineal 33-50% B; 48-50 min, gradiente lineal 50-95% B y finalmente una etapa de lavado y reacondicionamiento de la columna (50-57 min, gradiente lineal 95-0% B; 57-63 min, 0% B), a una longitud de onda fijada a t=0 min 278 nm, t=18 min a 340 nm, t=43 min a 278 nm, t=45 min 340 nm, un volumen de inyección de 20 μL . Como detector se empleó un cuadrupolo en modo de ionización SIM ES Negativo y ventanas de fragmentor de los iones seleccionados de los espectros de masas de los patrones: 0-7 min: 100V (169,125), 7-18 min: 120V (183,124), 18-33 min: 150V (421,301) 33-41,1 min: 160V (463,301,300), 41,1-43 min: 150V (433,301,300), 43-45 min: 240V (939,769,617), 45-63 min: 150V (301,151,179).

Un cromatograma tipo de una mezcla de los patrones se muestra en la Figura 2: Análisis LC-ES-MS y LC-UV para los patrones de posibles compuestos fenólicos presentes en los extractos de sub- o supercríticos de *Mangifera indica* Linn.

iii) *Determinación de la actividad antioxidante con el radical α - α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH) de los extractos sub- o supercríticos de *Mangifera indica* Linn:*

Para medir la actividad antioxidante con el radical α - α -difeníl- β -picrilhidracilo (DPPH) (Brand Williams et al. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel. Wissenschaft. Und Technologie* 28, 25-30), se mide la disminución de la absorbancia a 515 nm, cada dos minutos hasta el estado estacionario, de una disolución de 3,9 mL de DPPH $6 \cdot 10^{-5}$ M en metanol y 10 μL del extracto antioxidante. El extracto se evalúa a diferentes concentraciones entre 0 y 5000 ppm. Para obtener la referencia de un antioxidante, se evalúa igualmente la actividad antioxidante del patrón comercial de α -tocoferol.

La concentración de DPPH* (C_{DPPH}) en el medio de reacción se calcula de la curva de calibrado determinada por regresión lineal con la siguiente ecuación:

$$Abs = 12.709 \cdot C_{\text{DPPH}} + 0,002$$

El porcentaje de DPPH remanente se calcula según la siguiente ecuación:

$$\%DPPH \text{ remanente} = C_{DPPH_t} / C_{DPPH_0} \times 100$$

- 5 La EC50 o concentración que inhibe el 50% del radical DPPH se calcula gráficamente utilizando una regresión no lineal de la curva de concentración vs. % DPPH remanente en el estado estacionario. La actividad antioxidante de los extractos se expresa como Índice de Actividad Antioxidante (IAA) que se calcula considerando la concentración final de DPPH y la EC50 como lo expresa la siguiente ecuación:

$$IAA = \text{Concentration Final de DPPH} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) / EC_{50} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right)$$

- 10 Los extractos de planta presentan actividad antioxidante baja cuando $IAA < 0,5$, moderada cuando IAA se encuentra entre 0,5 y 1,0, potente cuando IAA se encuentra entre 1,0 y 2,0, y muy fuerte cuando $IAA > 2,0$.

- 15 Los extractos objeto de esta patente presentan un valor de IAA mínimo de 4,0, y superior al valor IAA obtenido para el α -tocoferol (AAI=3,65). Esto nos indica la potente actividad antioxidante de los extractos sub- o supercríticos de *Mangifera indica Linn*, y su potencial uso como antioxidante en alimentos y cosméticos. En cualquier caso, estos extractos también pueden presentar otras actividades/propiedades de interés para la industria alimentaria, dietética, cosmética y farmacéutica que también se incluirían en esta invención. Así, por ejemplo, es de esperar que los extractos conteniendo alto contenido en mangiferina y quercetina presenten actividades descritas para las moléculas aisladas como actividades anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas, o cierta capacidad de prevención de enfermedades neurológicas o cardíacas.
- 20

- 25 Estos extractos se podrían emplear como ingredientes en alimentos, para elaboración de suplementos dietéticos y de cosméticos, así como antioxidante natural para conservación de productos alimenticios.

Procedimiento de obtención

Otro aspecto de la invención es el procedimiento de obtención de los extractos caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

5 *i) Preparación de las hojas y ramas de Mangifera indica Linn:*

Se parte de hojas y corteza de *Mangifera indica Linn* húmeda o seca. El secado se puede realizar al ambiente o en horno. La materia prima se almacena en condiciones de refrigeración o congelación y posteriormente es molida para reducir su tamaño.

10 *ii) Extracción de hojas y ramas de Mangifera indica Linn con disolventes sub- o supercríticos:*

La corteza y hojas secas y molidas se someten a un proceso de extracción en continuo con disolventes verdes a alta presión.

15 Como sistema disolvente se emplean mezclas de dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) con agua y/o disolventes hidro-alcohólicos y/o alcohólicos. Como alcoholes se utilizan metanol o etanol, utilizando preferentemente el etanol por ser un disolvente GRAS (*Generally Recognized as Safe*). El porcentaje de CO₂ se fija entre 0–100 % w/w, el de agua entre 0-100 %, y de igual forma el de etanol, dando lugar a diferentes mezclas de disolventes. El sistema disolvente se somete a un flujo entre 5–40 g/min dependiendo del tamaño de la planta de extracción.

20 El uso de CO₂ en el proceso de extracción aumenta la eficiencia del proceso, reduce los tiempos de extracción, minimiza el uso de disolventes líquidos, reduce las etapas de concentración, y permite conservar las propiedades de los compuestos bioactivos.

25 La temperatura de extracción se fija entre un rango de 35-140 °C, considerando una temperatura superior al punto crítico del CO₂ y no muy elevada para evitar degradación de compuestos termolábiles. Se utiliza preferiblemente un rango entre 80-10°C

La presión se fija entre 10–40 MPa, considerando una presión superior al punto crítico del CO₂, preferentemente en un rango entre 100-200bar.

30 El tiempo de extracción está en el intervalo de 1 a 3 horas, preferentemente entre 1,5-2 horas, para un flujo de disolvente en un rango de 5-40g/min dependiendo del tamaño de la planta de extracción

El proceso extractivo con CO₂-SC se realiza protegido de la luz y en ausencia de oxígeno, esto previene el inicio de reacciones de oxidación y evita posibles degradaciones de los compuestos fenólicos. Ventaja adicional que ofrece el uso de CO₂ en el sistema disolvente.

5 El rendimiento de extracción global obtenido con el proceso extractivo oscila entre el 1–50 g/100g de materia seco. El uso de CO₂-SC como disolvente único permite muy bajos rendimientos de extracción. La adición de modificadores polares como agua y/o etanol permite obtener mayores rendimientos de extracción, llegando a rendimientos del 42% cuando se utiliza como sistema disolvente una mezcla de CO₂ 1:0,5:0,5.

10 Los extractos obtenidos en esta etapa ya pueden ser utilizados en aplicaciones cosméticas y alimentarias por que presentan contenido fenólico mínimo entre 1,93% y 0,88% de mangiferina y quercetina respectivamente, así como potentes propiedades antioxidantes con un IAA mínimo de 4,0, superior al IAA del tocoferol.

iii) Fraccionamiento o purificación de los extractos de Mangifera indica Linn:

15 Para aumentar la concentración de los extractos en compuestos fenólicos antioxidantes se puede realizar una posterior etapa de fraccionamiento. En la presente invención se describe un método de fraccionamiento de compuestos fenólicos de extractos de *Mangifera indica* Linn, utilizando un proceso de fraccionamiento en columna preparativa con fluidos supercríticos.

20 Para la etapa de purificación desarrollada en la presente invención se utilizan diferentes tipos de relleno de sílica normal o sílica fase reversa C18 de tamaño de partícula entre 5–10 µm. Para la fase móvil se utilizan disolventes verdes como CO₂, agua o etanol. El método de separación se establece en modo isocrático, o utilizando una rampa que inicia con CO₂ puro, aumentando progresivamente el porcentaje de codisolvente (agua, etanol, o mezclas
25 agua/etanol). Se trabaja a condiciones de presión entre 10-40 MPa, condiciones de temperatura entre 35-140 °C, y un flujo de la fase móvil entre 5-40 g/min.

A lo largo del proceso se recolectan constantemente fracciones del extracto. Finalmente se lava la columna para un posterior uso. Y las fracciones son caracterizadas en cuanto a contenido fenólico y actividad antioxidante.

30

iv) Obtención de los extractos secos de Mangifera indica Linn:

Los extractos sub- o supercríticos de *Mangifera indica Linn* obtenidos se pueden secar de diversas formas, teniendo en cuenta que siempre se realice preferentemente a temperaturas inferiores a 40 °C. Se contemplan como formas de secado la evaporación a vacío, secado
5 con nitrógeno, la liofilización o el secado por precipitación empleando fluidos supercríticos.

Los extractos se almacenan refrigerados o congelados, preferentemente a -4 °C, y protegidos de la luz para evitar posibles alteraciones en el contenido fenólico, así como en las propiedades antioxidantes/antirradicalarias de los extractos.

10

Ejemplos

Ejemplo 1

*Preparación del extracto de hojas de Mangifera indica Linn obtenido con una mezcla
15 CO₂/agua/etanol en una relación de 1,0:0,5:0,5 como sistema disolvente.*

Las hojas secas, congeladas y molidas de *Mangifera indica Linn* de la variedad Kent se someten a un proceso de extracción en continuo en un equipo de alta presión Thar Technologies Modelo SF100 de 100 mL de capacidad. Se utiliza como sistema disolvente una mezcla de CO₂/agua/etanol en una relación 1,0:0,5:0,5 a un flujo de CO₂ de 5 g/min.
20 Las condiciones de extracción se fijan a una temperatura de 80 °C y una presión de 120 bar. La extracción se realiza por un tiempo de 3 horas, en una atmósfera inerte y protegido de la luz.

Posterior a la etapa de extracción, el extracto obtenido se evapora con nitrógeno a temperatura ambiente hasta sequedad. Se almacena en congelación a -4 °C protegido de la
25 luz para evitar su degradación.

El rendimiento de la extracción para este ejemplo 1 es de 38,8g de extracto/100g hojas secas.

El contenido de mangiferina y quercetina en el extracto de este ejemplo 1 se determinó inyectando 50µL de extracto a 1000 ppm en un equipo Agilent HPLC series 1100, con una
30 columna C18 de fase reversa Thermo Electron. Se utilizó como método de separación una fase móvil Solvente A: ácido acético en agua al 2% y Solvente B: metanol a una tasa de flujo de 0,9 mL/min, y con un gradiente de: 0–2 min, 5% B; 2-7 min, 5-25% B; 7-11 min, 25% B; 11-19 min, 25-32% B; 19-27 min, 32% B; 27-28 min, 32-40% B; 28-38 min, 40% B; 38-50

min, 40–100% B; 50-60 min, 100% B; 60-70 min, 100–5% B; 5 min, 5% B isocrático, a una longitud de onda de 340nm.

Cada compuesto fue identificado de acuerdo a su tiempo de retención ($t_r=20$ min para mangiferina y $t_r=34,4$ min para 3- β -D-glucosil-quercetina), y cuantificado de acuerdo a la curva de calibración respectiva, $Abs = 54.252 \cdot C - 100,12$ para mangiferina, y $Abs = 87.077 \cdot C - 130,11$ para quercetina.

El extracto obtenido del ejemplo 1 tuvo un contenido de $3,78 \pm 0,01$ g de mangiferina/100g de extracto y $1,23 \pm 0,02$ g de 3- β -D-glucosil-quercetina/100g de extracto. (Figura 3: Análisis HPLC por columna de fase reversa Synergy Hidro RP para el extracto obtenido en el ejemplo 1, con identificación de los picos de mangiferina y 3- β -D-glucosil-quercetina).

Se identificaron también otros compuestos fenólicos presentes en el extracto mediante el método LC-MS. Se inyectaron 100 μ L de una dilución del extracto a una concentración de 300 ppm en un equipo Q-TOF de alta resolución, utilizando una columna Phenomenex C18 de fase reversa Synergi 4 μ m Hydro –RP 150x3mm con precolumna C18, una fase móvil de A: Agua 0,1% de ácido fórmico y B: Acetonitrilo al 0,1% de ácido fórmico, a 0,8 mL/min, utilizando un gradiente de elución de: 0–0,2 min, 0% B; 0,2-0,3 min, 0-7% B; 0,3-14,7 min, 7-8,5% B; 14,7-40 min, 8,5-19% B; 40-45 min, 19-33% B; 45-48 min, 33-50% B; 48-50 min, 50-95% B; 50-57 min, 95-0% B; 57-63 min, 0% B; a una longitud de onda de 278 nm 0-18 min, 340 nm 18-43 min, 278 nm 43-45 min, 340 nm hasta 50min. La ionización se realizó en modo scan negativo a 100V. La identificación de los compuestos fenólicos se realizó teniendo en cuenta el tiempo de retención y los iones de cada compuesto determinados por su respectivo espectro de masas.

En el extracto obtenido en este ejemplo 1 se identificó la presencia además de mangiferina y 3- β -D-glucosil-quercetina , de ácido gálico, metil galato, 3-D-galactosil-quercetina, 3-O- α -L-arabinopiranosil-quercetina y 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glucosa , más no de quercetina (Figura 4: Análisis LC-ES-MS en Q-TOF modo Scan para el extracto obtenido en el ejemplo 1)

También se determinó la capacidad antioxidante del extracto de *Mangifera indica* Linn con el ensayo de DPPH $^{\bullet}$, expresada en términos de Índice de Actividad Antioxidante IAA. Este extracto del ejemplo 1 presentó una potente actividad antioxidante con un valor IAA=4,84, superior al del tocoferol IAA=3,65.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, caracterizado por el empleo de disolventes verdes, como son dióxido de carbono, agua, y etanol, bajo condiciones sub- o supercríticas a elevada presión y temperatura.
- 10
2. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según reivindicación 1, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 15
- i) Preparación de la materia prima, compuesta por hojas y/o corteza de *Mangifera indica* Linn, que comprende operaciones de secado, congelación y molienda.
- 20
- ii) Extracción sub- o supercrítica en continuo de la corteza y/o hojas secas y molidas de *Mangifera indica* Linn con mezclas de CO₂ y disolventes acuosos, alcohólicos o hidroalcohólicos.
- 25
- iii) Purificación de los extractos de *Mangifera indica* Linn por medio de un fraccionamiento en columna con fluidos supercríticos, en los casos en los que se desee aumentar la concentración en compuestos fenólicos de los extractos obtenidos.
- 30
- iv) Obtención de los extractos secos de *Mangifera indica* Linn, pudiendo realizarse este secado preferentemente a temperaturas inferiores a 40 °C, mediante cualquiera de los procedimientos siguientes: evaporación a vacío, secado con nitrógeno, la liofilización o el secado por precipitación empleando fluidos supercríticos.
- 25
3. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 2, caracterizado porque el proceso de extracción en continuo se realiza con disolventes verdes a alta presión, como CO₂, agua y etanol, en condiciones sub- o supercríticas;
- 30
4. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 2, caracterizado porque la temperatura de la extracción superior a la del punto crítico del CO₂, está en el rango de 35-140 °C, utilizando preferentemente un rango entre 80-100°C.

5. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 2, caracterizado porque la presión de extracción está en el rango de 100-400bar, utilizando preferentemente un rango entre 100-200bar.
- 5 6. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 2, caracterizado porque el flujo de disolvente está en el rango de 5-40 g/min según el tamaño de la planta de extracción.
- 10 7. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 2, caracterizado porque el tiempo de extracción está en el intervalo de 1-3 horas, preferentemente entre 1,5 - 2 horas.
- 15 8. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 2, caracterizado porque el proceso extractivo se realiza en ausencia de luz y de oxígeno.
- 20 9. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 3, caracterizado porque el disolvente de extracción es una mezcla de CO₂/agua/etanol, utilizando preferentemente un porcentaje de codisolvente del 50% w/w, que mezcla las ventajas de la extracción con líquidos presurizados y de la extracción supercrítica.
- 25 10. Procedimiento de obtención de extractos purificados de *Mangifera indica* Linn obtenidos según la reivindicación 1, caracterizado porque el proceso de purificación se realiza por medio de un fraccionamiento o concentración supercrítica con columna preparativa utilizando tipos de relleno de sílica normal o sílica fase reversa C18 de tamaño de partícula entre 5 – 10 µm.
- 30 11. Procedimiento de obtención de extractos purificados de *Mangifera indica* Linn obtenidos según la reivindicación 1, caracterizado porque el proceso de purificación se realiza utilizando como fase móvil CO₂, agua o etanol, en modo isocrático, o utilizando un gradiente de CO₂ puro, aumentando progresivamente el porcentaje de codisolvente (agua, etanol, o mezclas agua/etanol).

- 5 12. Procedimiento de obtención de extractos purificados de *Mangifera indica* Linn obtenidos según la reivindicación 1, caracterizado porque las condiciones de operación del proceso de purificación se establecen en un rango de presión entre 10-40 MPa, un rango de temperatura entre 35-80 °C, y un flujo de la fase móvil entre 5-40 g/min.
- 10 13. Procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 1, caracterizado porque la extracción de extractos secos de *Mangifera indica* Linn, se realiza preferentemente con nitrógeno a temperatura ambiente para evitar la degradación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto.
- 15 14. Extractos secos de *Mangifera indica* Linn obtenidos según las reivindicaciones 1 a 13.
- 20 15. Extractos secos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 14, caracterizados por poseer un contenido fenólico mínimo de mangiferina de 1,93% y de 3-β-D-glucosil-quercetina de 0,88%, con presencia de otros compuestos fenólicos como ácido gálico, metil galato, 3-D-galactosil-quercetina, 3-O-α-L-arabinopiranosil-quercetina y 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glucosa , y con potente actividad antioxidante con valor mínimo de IAA de 4,0, superior al IAA del tocoferol de 3,65.
- 25 16. Uso de los extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 15, como agente cosmético para el cuidado de la piel y/o el cabello, destinado a actuar como agente anti-envejecimiento y antioxidante, por prevenir las alteraciones derivadas de la oxidación celular o el estrés oxidativo, y por actuar como inhibidor de radicales libres.
- 30 17. Uso de los extractos de *Mangifera indica* Linn, según la reivindicación 15, en la industria alimentaria como conservante natural en reemplazo de antioxidantes sintéticos como BHA y BHT.

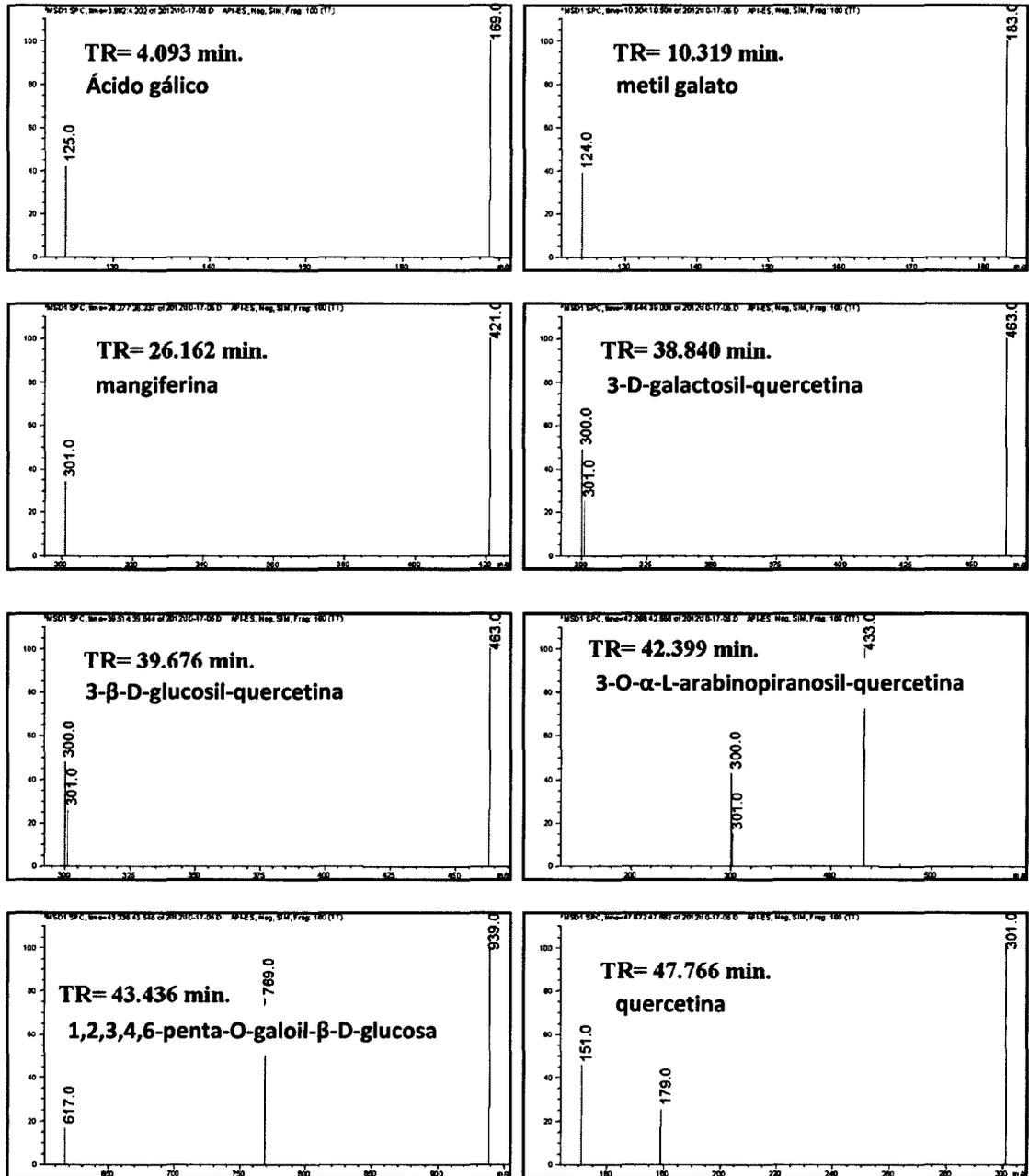
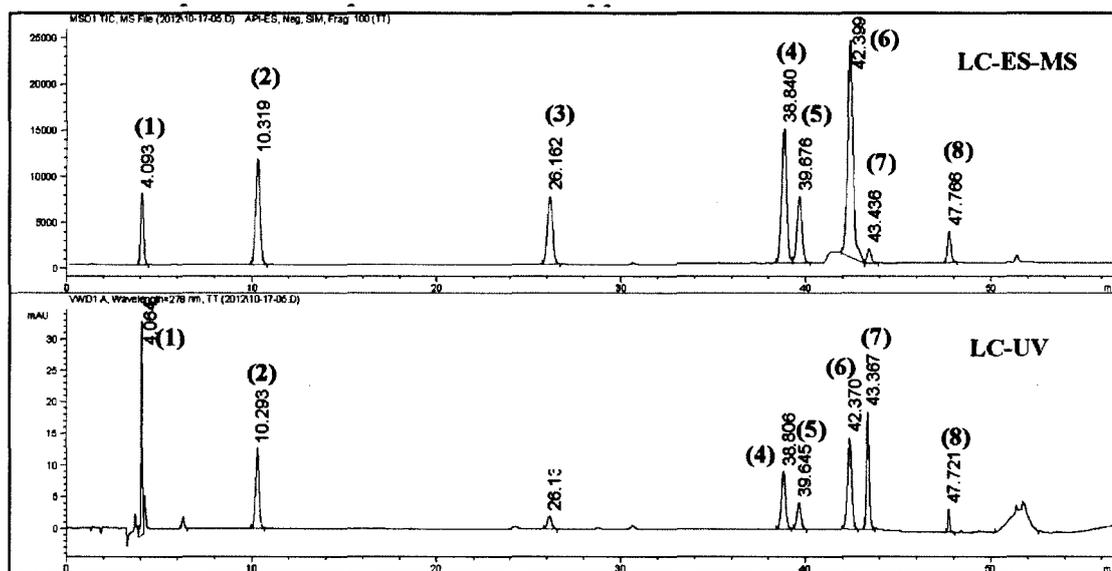


Figura 1



Donde: 1) Ácido gálico, 2) metil galato, 3) mangiferina, 4) 3-D-galactosil-quercetina, 5) 3-β-D-glucosil-quercetina, 6) 3-O-α-L-arabinopiranosil-quercetina, 7) 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glucosa, y 8) Quercetina.

Figura 2

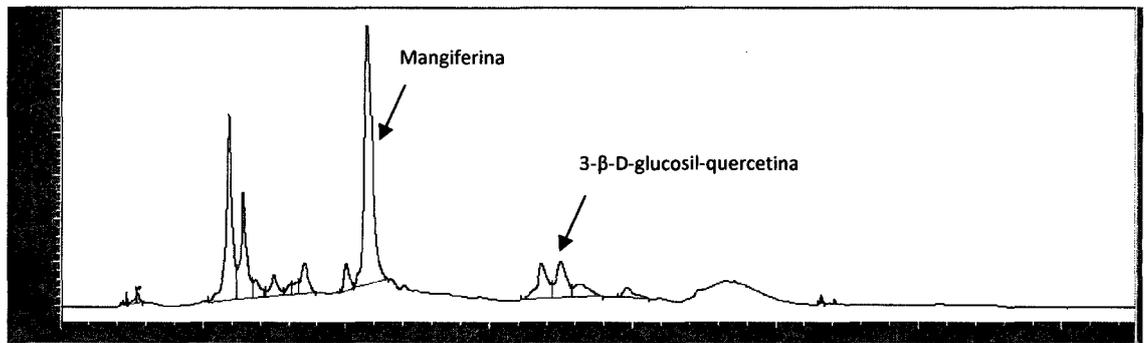


Figura 3

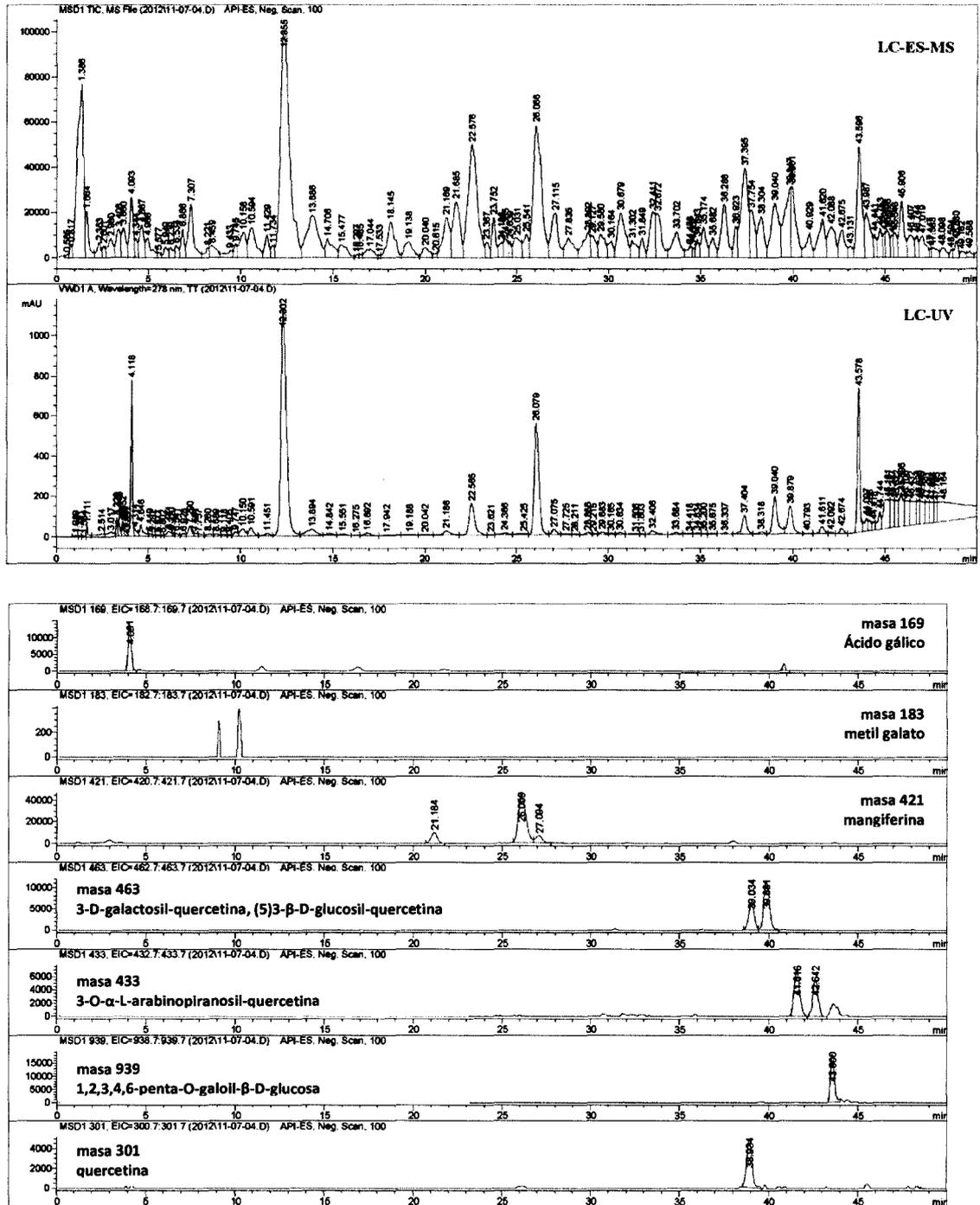


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201201201
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.11.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2006097806 A1 (ALDIVIA, THE SOUTHERN AFRICAN NATURAL PRODUCTS) TRADE ASSOCIATION) 21.09.2006, página 2, líneas 1-22; página 3, líneas 7-29; página 4, líneas 26-30; página 7, líneas 15-22; página 13, líneas 1-21; página 15; reivindicaciones 1, 2, 6-9, 15-19, 36, 43	1, 3, 8, 14-17
Y	YULIANA, M. et al. Effect of extraction methods on characteristic and composition of Indonesian cashew nut shell liquid. Industrial Crops and Products, 2012 (Disponible en Internet 30.07.2011). Vol. 35, nº 1, páginas 230-236. ISSN 0926 6690. Doi: 10.1016/j.indcrop.2011.07.007	1 - 13
Y	RODRIGUEZ-BERNALDO DE QUIRÓS, A. & COSTA, H. S. Analysis of Carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. Journal of Food Composition and Analysis, 2006. Vol. 19, nº 2-3, páginas 97-111. ISSN 0889 1575 Doi: 10.1016/j.jfca,2005.04.004	2-7, 9-13
Y	MASIBO, M., QIAN HE. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2008. Vol. 7, nº 4, páginas 309-319. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2008.00047.x	14 - 17
A	MUKHOPADHYAY, M. et al. Purification of phytochemicals by gas antisolvent precipitation with carbon dioxide. Indian Chemical Engineer, 2009. Vol. 51, nº 2, páginas 111-118. ISSN 0019 4506. Doi: 10.1080/00194500903123938	1 - 9
A	WO 0038699 A1 (CENTRO DE QUIMICA FARMACÉUTICA) 06.07.2000, páginas 3, 4, 7, 8	14 - 17
A	WO 9616632 A1 (LABORATOIRES DE BIOLOGIE VEGETALE YVES ROCHER) 06.06.1996 páginas 4-6, 16-25	14 - 17

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
03.06.2013

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K8/97 (2006.01)

A61K36/22 (2006.01)

A23L3/3472 (2006.01)

A61Q19/00 (2006.01)

A61Q19/08 (2006.01)

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

A61Q

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, KOSMET, FSTA, AGRICOLA, CABA, SCISEARCH, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.06.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1 - 17	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1 - 17	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 extractos de *Mangifera indica* con el empleo de disolventes como dióxido de carbono, agua y etanol, bajo condiciones sub- o supercríticas a elevada presión y temperatura (reivindicación 1).

El procedimiento comprende las siguientes etapas (reiv. 2):

- i. preparación de la materia prima, hojas y/o corteza, con secado, congelación y molienda
- ii. extracción sub- o supercríticas en continuo con mezcla de CO₂ y disolventes acuosos, alcohólicos o hidroalcohólicos
- iii. purificación de los extractos de *Mangifera indica* por fraccionamiento en columna con fluidos supercríticos
- iv. obtención de extractos secos de *Mangifera indica*, a temperaturas de 40°C mediante: evaporación a vacío, secado con nitrógeno, liofilización o secado por precipitación.

El proceso de extracción en continuo se realiza con disolventes a alta presión, como CO₂, agua y etanol, bajo condiciones sub- o supercríticas (reiv. 3), la temperatura de la extracción superior a la del punto crítico del CO₂, entre 35 a 140°C (reiv. 4), la presión entre 100 a 400 bar (reiv. 5), el flujo de disolvente entre 5 a 40 g/min (reiv. 6), el tiempo entre 1 a 3 h (reiv. 7), en ausencia de luz y de oxígeno (reiv. 8).

El disolvente de la extracción es una mezcla de CO₂/agua/etanol con un codisolvente del 50% w/w (reiv. 9). El proceso de purificación utiliza sílica normal o sílica en fase reversa (reiv. 10) y como fase móvil CO₂, agua o etanol en partes iguales o en gradiente (reivs. 11 y 12). La extracción de extractos secos se realiza con nitrógeno líquido a temperatura ambiente (reiv. 13).

Asimismo, es objeto de protección los extractos de *Mangifera indica* obtenidos por este procedimiento (reiv. 14) que poseen un contenido fenólico mínimo de mangiferina de 1,93% y de 3-β-D-glucosil-quercetina de 0,88%, con presencia de otros compuestos fenólicos como ácido gálico, metil galato, 3-D-galactosil-quercetina, 3-O-α-L-arabinopiranosil-quercetina y 1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glucosa (reiv. 15) y el uso de estos extractos como agente cosmético para la piel y/o cabello como antienvjecimiento, antioxidante y para inhibidor radicales libres (reiv. 16), y en la industria alimentaria como conservante natural (reiv. 17).

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	WO 2006097806 A1 (ALDIVIA, THE SOUTHERN AFRICAN NATURAL PRODUCTS TRADE ASSOCIATION)	21.09.2006
D02	YULIANA, M. et al. Effect of extraction methods on characteristic and composition of Indonesian cashew nut shell liquid. <i>Industrial Crops and Products</i> , 2012 (Disponible en Internet 30.07.2011). Vol. 35, nº 1, páginas 230-236	2011
D03	RODRIGUEZ-BERNALDO DE QUIRÓS, A. & COSTA, H. S. Analysis of Carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. <i>Journal of Food Composition and Analysis</i> , 2006. Vol. 19, nº 2-3, páginas 97-111.	2006
D04	MASIBO, M., QIAN HE. Major mango polyphenols and their potential significance to human health. <i>Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety</i> , 2008. Vol. 7, nº 4, páginas 309-319.	2008
D05	MUKHOPADHYAY, M. et al. Purification of phytochemicals by gas antisolvent precipitation with carbon dioxide. <i>Indian Chemical Engineer</i> , 2009. Vol. 51, nº 2, páginas 111-118	2009
D06	WO 0038699 A1 (CENTRO DE QUIMICA FARMACÉUTICA)	06.07.2000
D07	WO 9616632 A1 (LABORATOIRES DE BIOLOGIE VEGETALE YVES ROCHER)	06.06.1996

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** y **D02** se refieren a antioxidantes basados en especies de Anacardiáceas, **D03** y **D05** a la extracción de carotinoides en condiciones supercríticas, **D04** divulga los principales polifenoles del mango y su importancia en la salud humana, mientras que **D06** y **D07** se refieren a composiciones que se obtienen de *Mangifera indica*.

Ninguno de estos compuestos divulga un procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* con empleo de dióxido de carbono, agua y etanol bajo condiciones sub- o supercríticas de elevada presión y temperatura, tal como lo hace la solicitud en estudio.

Por ello, a la vista de los documentos citados D01 a D07, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 17** son nuevas de acuerdo al Artículo 6 LP 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de la invención que es un procedimiento para la obtención de extractos de *Mangifera indica* con disolventes como dióxido de carbono, agua y etanol bajo condiciones sub- o supercríticas a elevada presión y temperatura y el uso de estos extractos como agente cosmético, antienvjecimiento y antioxidante o en la industria alimentaria como conservante, resulta evidente para el experto en la técnica a la vista de los documentos **D01** a **D04**, siendo el más relevante **D01**. En efecto,

- **D01** divulga antioxidantes basados en especies de Anacardiáceas y sus partes (cortezas, hojas, etc.), los métodos de obtención y sus usos en la industria alimentaria y cosmética entre otros por sus propiedades anti radicales (página 3, líneas 7-29; reivindicaciones 1, 2, 17, 18, 43). De la familia de las Anacardiáceas cita varias especies, entre ellas el mango (página 7, líneas 15-22; reivindicación 19) y entre los métodos de obtención varios, entre ellos con CO₂ supercrítico realizados en continuo con control de presión y temperatura en atmósfera desprovista de oxígeno (página 2, líneas 1-22; página 4, líneas 26-30; página 13, líneas 1-21; página 15; reivindicaciones 6-9, 15, 36), condiciones similares a las reivindicadas por lo que afecta a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 3, 8, 14-17.

- **D02** se refiere a un estudio comparativo de los distintos métodos de extracción y la composición procedentes de anacardos indonesios. Entre los métodos destacan los realizados en condiciones subcríticas con agua y los realizados en condiciones supercríticas con dióxido de carbono, ambos en ausencia de luz y oxígeno, y con control de presión y temperatura, obteniéndose compuestos distintos de forma selectiva comparados con otros tipos de extracciones (páginas 230-236), afectando a las reivindicaciones 1-13.

- **D03** divulga un análisis de carotinoides en vegetales extraídos por diversos métodos, entre ellos por extracción supercrítica con dióxido de carbono que tiene la ventaja de no ser tóxico, si bien presenta una baja polaridad, limitación que se puede superar añadiéndole metanol o etanol (página 99, columna 2, párrafo 2.2). También comprende el análisis, el control de temperatura y presión siendo los parámetros óptimos comprendidos en los márgenes reivindicados (página 100, columna 1) y citas de que la extracción subcrítica es mejor para obtener carotinoides y la extracción supercrítica para otros componentes (página 100, columna 2). El análisis de los compuestos se hace por cromatografía líquida de alta resolución en gradiente mejor que en modo isocrático, y la columna utiliza tipos de relleno basados en sílica, afectando esta divulgación de características técnicas a la actividad inventiva de las reivindicaciones 2-7, 9-13.

- **D04** se refiere a los polifenoles del mango, como son mangiferina, 3-D-glucosil-quercetina, ácido gálico, metil galato, 3-D-galactosis-quercetina y otros (página 310, 315, 316), y su potencial en la salud humana (página 311, página 312, columna 2); muchas de sus propiedades basadas en la bioactividad de la mangiferina que se encuentra en la corteza y en las hojas (página 311, columna 2; página 318).

A la vista de lo divulgado en los documentos del estado de la técnica, para el experto en la materia sería evidente el procedimiento de obtención de extractos de *Mangifera indica* reivindicados con disolventes basados en CO₂, agua y etanol, bajo condiciones sub- o supercríticas a elevada presión y temperatura, puesto que está ampliamente divulgado, en Anacardiáceas, entre otras en el mango, las ventajas de la extracción supercrítica con dióxido de carbono (**D01**, **D02**, **D03**) y las ventajas que tiene añadir al CO₂ un disolvente como agua o etanol (**D03**) para mejorar la extracción, asimismo las mejoras que se consiguen con la extracción subcrítica con control de presión y temperatura (**D02**, **D03**) y sus usos como antioxidantes e inhibidor de radicales libres (**D01**, **D04**).

Por ello, a la vista de los documentos D01 a D04, se puede concluir que las reivindicaciones 1 - 17 carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.