

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 762**

21 Número de solicitud: 201530239

51 Int. Cl.:

A61K 36/49 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.02.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.08.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e
Innovación. Avda. de Elvas, s/n
06006 Badajoz ES**

72 Inventor/es:

**CAVA LÓPEZ, Ramón;
CANTERO MENA, Víctor Jesús y
LADERO GARCÍA, Luis**

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un extracto de hoja de árboles o arbustos de género Quercus, extracto obtenido y su uso**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de un extracto de hoja de árboles o arbustos de género *Quercus*, extracto obtenido y su uso.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* que comprende a) triturar la hoja, b) añadir al triturado de la hoja obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos, c) agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases, y d) separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto. Asimismo, se refiere al extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* obtenible por dicho procedimiento y a su uso como antioxidante.

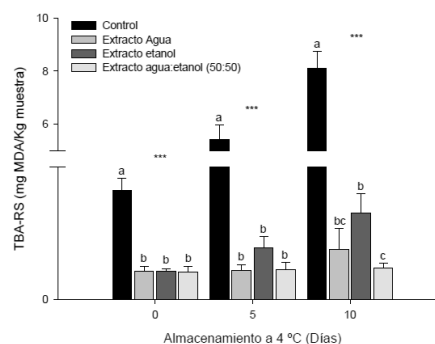


FIGURA 1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de un extracto de hoja de árboles o arbustos de género Quercus, extracto obtenido y su uso.

5

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la obtención de antioxidantes naturales. En concreto, se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de hoja de árboles o arbustos de género Quercus, al extracto obtenido por ese procedimiento y a su uso, en particular como antioxidante.

10

Antecedentes de la invención

La oxidación de lípidos es un proceso que conlleva un importante deterioro de la calidad de los alimentos, resultando en una variedad de productos de degradación que producen malos olores, sabores desagradables, cambios en las propiedades reológicas y formación de compuestos tóxicos (Faustman, C., Cassens, R.G. (1990). *The Biochemical Basis for Discoloration in Fresh Meat: A Review. Journal of Muscle Foods*, 1, 217-243).

20

Por ello, la prevención de la oxidación de lípidos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos es esencial para mantener la calidad y la seguridad (Buckley, D.J., Morrissey, P.A. y Gray, J.I. (1995). *Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. Journal of Animal Science* 73:3122-3130).

25

La oxidación en los alimentos puede controlarse o minimizarse por el uso de antioxidantes, que son sustancias presentes en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable y que retardan significativamente la oxidación de éste. Los antioxidantes pueden clasificarse según su naturaleza en sintéticos y naturales. Los sintéticos son derivados de estructuras fenólicas (Giese, J. (1996). *Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. Food Technology*, 73-81) como los galatos (entre los que destacan los de propilo, octilo y dodecilo), Butil-hidroxi-anisol (BHA), Butil-hidroxi-tolueno (BHT) y Terbutilhidroxiquinona

30

(TBHQ). Sin embargo, debido a las preocupaciones acerca de su seguridad toxicológica puede ser deseable sustituir estos antioxidantes convencionales por sustancias antioxidantes naturales (*Formanek, Z., Kerry, J.P., Higgins, F.M., Buckley, D.J., Morrissey, P.A. y Farkas, J. (2001) Addition of synthetic and natural antioxidants to alpha-tocopheryl acetate supplemented beef patties: Effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. Meat Science, 58:337-341*). Las plantas son fuente de moléculas con capacidad para capturar radicales libres, tales como vitaminas, terpenoides, compuestos fenólicos, ligninas, taninos, flavonoides, alcaloides, cumarinas y otros metabolitos ricos en actividad antioxidante. Los antioxidantes de origen natural han sido ampliamente estudiados debido a sus beneficios para la salud y a su valor añadido. Investigaciones recientes remarcan la relación entre actividad antioxidante y contenido en compuestos fenólicos de plantas que se están utilizando en la lucha contra enfermedades como el cáncer (*Whej, Z. & Shioh, Y.W. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, Journal of Agricultural Food Chemistry, 49:5165-5170*). El uso de plantas, especias y hierbas como fuentes potenciales de antioxidantes naturales en alimentos frescos y procesados está tomando cada vez más importancia en la industria alimentaria, presentándose como una alternativa a los antioxidantes sintéticos.

Si bien las frutas son los productos más utilizados como fuentes de antioxidantes, otras partes de las plantas, tales como corteza, hojas, cáscaras y raíces también pueden utilizarse con ese fin debido a su contenido en compuestos con actividad antioxidante. Así se han realizado estudios de antioxidantes en las hojas verdes de vegetales como el amaranto, espinaca, hojas de guayaba, hojas de zarzamora, hojas de frambuesa roja, hojas de fresa (*Wang SY, Lin HS (2000) Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48:140-146*).

Las plantas del género *Quercus* son árboles de gran porte por lo general, aunque también se incluyen arbustos. Los hay de follaje permanente, caducifolios y marescentes. El fruto se denomina bellota, es solitario y de origen axil, con cotiledones planos. Participan como elementos dominantes del paisaje arbóreo en muchos territorios de su área de distribución por Europa, Asia occidental, Norteamérica y Sudamérica. Son frecuentes los fenómenos de

hibridación entre sus especies, que suelen presentar, además, facilidad para la regeneración vegetativa por brotes de raíz o de cepa. En España, las especies predominantes de árboles de género *Quercus* son el alcornoque (*Quercus suber L.*), la encina (*Quercus ilex L.*) y el roble (*Quercus robur L.*). Sus principales usos son para la obtención de bellota, madera y corcho (alcornoque). El corcho es el tejido celular suberificada con usos en diversos sectores (construcción, decoración, tapones para embotellado de vino). La bellota es el fruto principal de la Dehesa y es una importante fuente de alimento para la fauna y los animales domésticos, utilizándose para engordar a los cerdos durante la temporada de montanera o bellota, que se extiende desde principios de noviembre hasta finales de febrero.

Con todo ello adquiere un interés especial la obtención de un extracto que englobe todas estas características, que sea natural, que pertenezca a un cultivo industrializado, que se obtenga de una parte no aprovechada dentro de la industria del mismo, que presente actividad antioxidante, que pueda ser aplicado en alimentos y que preserve a los alimentos en los que se incluya de un deterioro oxidativo.

Descripción de las figuras

Figura 1: Efecto de la incorporación de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) sobre la oxidación lipídica –medida como TBA-RS (mg MDA/kg)- de un producto cocido elaborado a partir de carne de pollo y almacenado a refrigeración durante 10 días. N=5 determinaciones/lote; a,b,c: Para los mismos días de almacenamiento, barras con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$).

Objeto de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* (procedimiento de la invención), que comprende las siguientes etapas:

- 5
- a) Triturar la hoja,
 - b) Añadir al triturado de la hoja obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos,
 - c) Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases, y
 - d) Separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

10 Asimismo, en un segundo aspecto, la presente la invención, se refiere a un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* obtenible por el procedimiento según el primer aspecto de la invención.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* según el segundo aspecto de la invención como antioxidante.

15 Por último, un cuarto aspecto de la invención se refiere a un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* según el segundo aspecto de la invención.

Descripción de la invención

20 En base a las necesidades del estado de la técnica, los inventores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para la obtención de un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* con un alto contenido en polifenoles el cual comprende una etapa de extracción con un disolvente. El extracto obtenido con el procedimiento de la invención presenta una alta actividad como antioxidante.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus*, que comprende las siguientes etapas:

- 30
- a) Triturar la hoja,
 - b) Añadir al triturado de la hoja obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo

formado por agua (acidificada o no), alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos,

c) Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases,

d) Separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.

5

Así, la primera etapa del procedimiento de la invención consiste en el triturado de la hoja de árbol o arbusto de género *Quercus*. La hoja puede obtenerse mediante recogida manual o mecánica de árboles o arbustos pertenecientes al género *Quercus*. El triturado de la hoja se lleva a cabo mediante medios manuales o mecánicos hasta la obtención de partículas de

10 pequeño tamaño, preferiblemente comprendido entre 0,1 y 10 mm.

En la etapa b), las proporciones utilizadas de hoja o disolvente pueden modificarse a fin de obtener extractos con mayor o menor concentración y por tanto con diferente actividad antioxidante. Preferentemente, la relación entre la hoja triturada y el disolvente

15 (hoja:disolvente) está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen). En una realización particular, la proporción hoja:disolvente es de 1:10 (g:mL).

La utilización de uno u otro disolvente influye en la cantidad de compuestos extraídos así como en el tipo de compuestos con actividad antioxidante que se obtiene debido a las

20 características de los mismos y su afinidad por el disolvente. En una realización preferente, en la etapa b) el disolvente seleccionado es una mezcla de agua y un alcohol C₁-C₆.

En el contexto de la presente invención, el término "alcohol C₁-C₆" se refiere a un alcohol que puede tener de un carbono a seis carbonos en una cadena lineal o ramificada, con al

25 menos una función hidróxido.

En una realización particular, en la etapa b) el disolvente seleccionado es una mezcla de agua destilada y etanol, donde la relación agua:etanol está comprendida entre 20:80 y 80:20 (v:v), de manera más preferente entre 30:70 y 70:30 (v:v) y de manera más preferente aún

30 es 50:50 (v:v). La extracción llevada a cabo con una mezcla de agua y etanol en una proporción 50:50 es la que resulta en un extracto con un mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.

El término “compuestos fenólicos” se refiere a compuestos aromáticos que comprenden al menos dos grupos hidroxifenólicos en la molécula. Dentro de este grupo de compuestos se incluyen los flavonoides, grupo heterogéneo de polifenoles vegetales que comparten una estructura de benzopirano. Los principales flavonoides con actividad antioxidantes son (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y los correspondientes ésteres del ácido gálico, galato de (-)-epicatequina y galato de (-)-epigallocatequina.

Las condiciones de temperatura, tiempo y exposición a la luz en la etapa c) pueden ajustarse en un rango en el que la obtención de compuestos con actividad antioxidante sea óptima evitando se degradación. Preferentemente, la etapa c) se realiza a una temperatura comprendida entre 20°C y 28°C, preferentemente entre 22°C y 26°C, durante un tiempo entre 30 y 210 minutos, preferentemente entre 100 y 150 minutos, y en condiciones de luminosidad reducida, preferentemente oscuridad. En una realización particular, la etapa c) se lleva a cabo en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 25°C y durante un tiempo de 2 horas.

Mediante la agitación de la etapa c) se obtienen dos fases de la que se utiliza la fase sobrenadante que se separa de la fase sólida. En la etapa d), la separación de las dos fases formadas en la etapa c) para recoger el sobrenadante que comprende el extracto, se realiza mediante decantación o centrifugación o cualquier otro método que permita la diferenciación de las fases.

El sobrenadante recogido en la etapa d), que comprende el extracto de hoja, puede comprender algún resto del triturado o impurezas, por lo que en una realización particular, el procedimiento de la invención comprende una etapa e) de filtración del sobrenadante recogido en la etapa d). Asimismo, el sobrenadante recogido en la etapa d) o filtrado en la etapa e) puede concentrarse mediante destilación o transformarse mediante liofilización o cualquier otra modificación que permita obtener un extracto que se adecue a las necesidades de aplicación. Así, en otra realización particular, el procedimiento de la invención comprende una etapa f) de destilación del sobrenadante obtenido en la etapa d) o filtrado en la etapa e). Y en otra realización particular, el sobrenadante recogido en la etapa

d), filtrado en la etapa e) o concentrado en la etapa f) es liofilizado (etapa g). Dependiendo del extracto final, su conservación podrá realizarse en condiciones ambientales o requerirá almacenamiento a temperatura controlada en envase adecuado. En una realización particular, el extracto se conserva en condiciones de oscuridad y refrigeración.

5

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* obtenible por el procedimiento de la invención según una cualquiera de las realizaciones según el primer aspecto de la invención. En una realización preferente el extracto tiene un contenido en compuestos fenólicos comprendido entre 5,6 y 11,4 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. Preferentemente entre 6,5 y 10,8 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra. En una realización preferente el extracto de la invención tiene un contenido en compuestos flavonoides comprendido entre 5,3 y 8,0 equivalentes de catequina por gramo de muestra. Preferentemente entre 6,4 y 7,9 mg equivalentes de catequina por gramo de muestra.

15

El extracto de la presente invención, obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, es eficaz como agente antioxidante, con importantes aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Así, un tercer aspecto de la invención se refiere al uso del extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* según el aspecto segundo de la invención como antioxidante.

20

Además, un cuarto aspecto de la invención, se refiere a un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto según el segundo aspecto de la invención.

La incorporación del extracto a un producto se realiza de múltiples formas, como mediante adición dentro de una formulación, mediante pulverización sobre el producto o cualquier otro método que permita la correcta distribución del extracto y su acción antioxidante. La concentración de extracto a utilizar viene determinada por factores propios del extracto, como la capacidad antioxidante, así como los atribuibles al producto tales como tipo de producto, contenido y tipo de grasa, concentración en anti- y pro-oxidantes, etc. Igualmente se deben tener en cuenta los procesos tecnológicos que puedan llevarse a cabo tras la adición del extracto así como las características de conservación de producto.

30

Ejemplos

5 A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

En particular se describe la obtención de tres extractos a partir de la hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) y su caracterización mediante contenido en fenoles totales y su contenido en flavonoides.

10

Ejemplo 1. Obtención del extracto de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) mediante la utilización de mezcla de disolventes.

15 Para obtener el extracto se partió de hojas de alcornoque recogidas manualmente de los árboles. Las hojas fueron desmenuzadas mediante triturado en una picadora convencional. La extracción de compuestos con propiedades antioxidantes se realizó mediante la utilización de dos disolventes y la mezcla de ambos. Así, se utilizó agua destilada, etanol y una mezcla de agua:etanol en proporción 50:50 (vol:vol), que dieron lugar a tres extractos distintos. En base a resultados obtenidos en experiencias previas, se utilizó una proporción 20 1:10 (g:mL) de hoja y disolvente. Las mezclas de disolvente y hoja se mantuvieron en agitación durante dos horas a una temperatura controlada de 25°C en condiciones de luminosidad reducida. Una vez transcurrido el tiempo de agitación se procedió a la separación de las fases mediante centrifugación obteniéndose dos fases perfectamente diferenciadas. La fase sobrenadante fue filtrada a través de filtro de papel Whatman nº 54 y 25 conservada en recipiente opaco a temperatura de refrigeración.

Ejemplo 2. Caracterización de tres extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) mediante la cuantificación de su contenido en fenoles totales.

30 La cuantificación de fenoles totales de los extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Singleton y cols., (1999). 50uL de cada uno de los extractos fueron depositados en un pocillo de placa microtiter al que se

añadieron 20uL del reactivo de Folin-Cicalteau y 50uL de carbonato de sodio al 20% (p/v). La mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente, tras lo cual se midió la absorbencia a 765nm frente a un blanco donde se sustituyó la muestra por agua destilada. La cuantificación de las medidas realizadas se realizó frente a una curva patrón de ácido gálico. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico y quedan reflejados en la tabla 1.

Tabla 1. Contenido en compuestos fenólicos (mg Eq ácido gálico/g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*)

10

Solvente de extracción	Compuestos Fenólicos
Agua	6,49 b ± 0,52
Agua:etanol 50:50 v/v	10,76 a ± 0,63
Etanol	6,12 b ± 0,52
p	<0,001

N=8 determinaciones

a, b: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$)

15

Ejemplo 3. Caracterización de tres extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) mediante la cuantificación de su contenido en flavonoides.

La cuantificación del contenido en flavonoides de los extractos obtenidos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) se realizó siguiendo el método propuesto por Zhishen y cols., (1999). Este procedimiento se basa en la formación de quelatos entre $AlCl_3$ y flavonoides de la muestra, que presentan una coloración rosada. Así, 400uL de muestra se depositaron en tubo de ensayo a los que se añadieron 60uL de $NaNO_2$ al 10%, 60uL de $AlCl_3$ al 20% y 400uL de $NaOH$ 1M. Tras agitación se midió su absorbencia a 510 nm. La cuantificación de las medidas realizadas se realizó frente a una curva patrón de catequina. Los resultados se expresaron en mg de catequina equivalente por gramo de muestra y quedan reflejados en la tabla 2.

Tabla 2. Contenido en flavonoides (mg Eq. catequina/g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*)

5

Solvente de extracción	Flavonoides totales
Agua	5,40 b ± 0,10
Agua:etanol 50:50 v/v	7,85 a ± 0,12
Etanol	6,35 ab ± 0,10
p	<0,001

N=8 determinaciones

a, b: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$)

10

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) se realizaron siguiendo dos metodologías de reducción de radicales sintéticos, método FRAP y método ABTS, como se muestra en los ejemplos 4 y 5. En estas pruebas se evidencia el poder antioxidante de la muestra mediante cambios en la coloración de una solución que contenga un radical susceptible de ser reducido. En ambos casos, la respuesta obtenida se extrapola a una curva de calibración con Trolox por lo que los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

15

20

Ejemplo 4. Evaluación de la capacidad antioxidante de tres extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) mediante la utilización del radical ABTS.

25

Se siguió el método propuesto por Re y cols. (1999). Así, se obtuvo el radical ABTS a partir de la mezcla a partes iguales de una solución de ABTS /nM y persulfato potásico 2,45nM. Esta solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 horas en condiciones de oscuridad para la generación del radical. La solución se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de 0,7 ($\pm 0,1$) a 734nm. 245uL de la disolución con el radical ABTS se depositaron en un pocillo de una placa microtiter y se midió su absorbancia a 734nm. A continuación se añadieron 5uL del extracto a ensayar y, transcurrido un minuto, se repitió la

medida a 734nm. Los resultados obtenidos se enfrentaron a una curva de calibración de Trolox. Los resultados se expresaron como mg TEAC/g muestra y quedan reflejados en la tabla 3.

- 5 Tabla 3. Capacidad antioxidante medida por el método ABTS (mg TEAC/g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*)

Solvente de extracción	ABTS
Agua	32,34 b ± 1,40
Agua:etanol 50:50 v/v	51,14 a ± 4,72
Etanol	16,94 c ± 0,79
p	<0,001

N=8 determinaciones

- 10 a, b, c: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$)

Ejemplo 5. Evaluación de la capacidad antioxidante de tres extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) mediante el método FRAP.

- 15 Este método propuesto por Benzie y Strain (1996), determina la capacidad de reducción férrica que tiene una muestra a pH bajo, transformando el complejo de tripiridiltriazina (TPTZ) con hierro (III) a su forma ferrosa. Así, se preparó el reactivo FRAP a partir de 2,5ml de una solución TPTZ 10mM junto con 2,5mL de una solución FeCl₃-6H₂O 20mM y 25 mL de tampón acetato 0,3mM y pH 3,6. Se realizó una lectura de absorbencia a 593nm de 20 200mL del reactivo FRAP a los que se añadieron posteriormente 7uL de muestra realizándose medidas de absorbencia transcurridos 4 y 30 minutos. Los resultados obtenidos se enfrentaron a una curva de calibración de Trolox. Los resultados se expresaron como mg TEAC/g muestra y quedan reflejados en la tabla 4.

- 25 Tabla 4. Capacidad antioxidante medida por el método FRAP (4min y 30min) (mg TEAC/g de muestra) de extractos (agua, agua:etanol 50:50 v/v, etanol) de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*).

Solvente de extracción	FRAP 4min	FRAP 30min
Agua	17,66 b ± 3,10	22,68 b ± 3,34
Agua:etanol 50:50 v/v	32,08 a ± 7,09	48,95 a ± 8,00
Etanol	14,41 b ± 2,64	20,20 b ± 2,94
p	<0,001	<0,001

N=8 determinaciones

5 a, b: En la misma columna medias con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas (Test de Tukey, $p < 0,05$)

El extracto obtenido siguiendo lo dispuesto en la presente invención ha mostrado su eficacia como agente antioxidante en la incorporación sobre productos alimentarios. La incorporación del extracto puede realizarse en múltiples formas como puede ser mediante adición dentro de una formulación, mediante pulverización sobre el producto o cualquier otro método que permita la correcta distribución del extracto y su acción antioxidante. La concentración de extracto a utilizar vendrá determinada por factores propios del extracto (capacidad antioxidante) así como los atribuibles al producto alimentario tales como tipo de producto, contenido y tipo de grasa, concentración en anti y prooxidantes, etc. Igualmente se deberá tener en cuenta los procesos tecnológicos que puedan llevarse a cabo tras la adición del extracto así como las características de conservación de producto alimentario.

La incorporación de tres extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*), obtenidos mediante tres disolventes, sobre un producto cárnico de pollo, se mostró eficaz frente a fenómenos oxidativos como la cocción. El ejemplo 6 muestra el estudio comparativo que evaluó la evolución del contenido en TBA-RS en un producto de pollo con extracto añadido frente a un producto sin extracto en su formulación.

25 Ejemplo 6. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de hoja de alcornoque (*Quercus suber L.*) incorporados en la formulación de un producto cocido de pollo.

Se preparó un producto de pollo a partir de pechugas obtenidas en un establecimiento de venta al público. La formulación utilizada contenía 79% de carne picada, 18% de agua, 1%

de sal y 2% de cada uno de los extractos con respecto al peso final. Se utilizaron los extractos de agua, etanol y agua:etanol (50:50 v/v) y un control sin extracto añadido. La mezcla se distribuyó en tubos de plástico con aproximadamente 30g en cada tubo. Los tubos se introdujeron en agua caliente hasta obtener una temperatura en el centro de la
5 mezcla de 72oC y se mantuvieron durante 30min para obtener un producto cocido. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo y se almacenaron a 4oC durante 8 días. La cuantificación de los procesos oxidativos se realizó mediante el método del índice del ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) descrito por Salih y cols. (1987) que mide el contenido en ciertos productos secundarios derivados de la oxidación lipídica como el malondialdehído
10 (MDA). Así, se tomaron 2g de muestra y se homogenizaron con 7,5mL de ácido perclórico 3,86%. 2mL de homogenizado se mezclaron con 2mL de TBA 0,02M y se calentó la mezcla a 90oC durante 30 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota para medir su absorbencia a 532nm frente a un blanco. Los resultados obtenidos se enfrentaron a una curva de calibración de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Los resultados se expresaron como
15 mg de MDA/Kg muestra y quedan reflejados en la figura 1.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. Triturar la hoja,
 - b. Añadir al triturado de la hoja obtenido en la etapa a) un disolvente seleccionado del grupo formado por agua, alcohol C₁-C₆ y mezclas de los mismos,
 - c. Agitar la mezcla del triturado y el disolvente obteniéndose dos fases, y
 - 10 d. Separar las dos fases obtenidas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende una etapa e) de filtración del sobrenadante recogido en la etapa d).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende una etapa f) de
15 destilación del sobrenadante recogido en la etapa d) o del filtrado obtenido en la etapa e).
4. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una etapa g) de liofilización del sobrenadante recogido en la etapa d) o del filtrado obtenido en la etapa e) o del destilado obtenido en la etapa f).
5. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde, en la
20 etapa a), la hoja se tritura hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 0,1 y 10 mm.
6. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la relación triturado de hoja:disolvente está comprendido entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen).
- 25 7. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el disolvente seleccionado es una mezcla de agua y un alcohol C₁-C₆.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde la relación agua:alcohol C₁-C₆ está comprendida entre 20:80 y 80:20 (v/v).
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8 donde el disolvente seleccionado en la
30 etapa b) es una mezcla de agua y etanol.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la etapa c) se lleva a cabo a entre 20 y 28°, durante 30 y 210 minutos.

11. Extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* obtenible por el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus*, según la reivindicación 11, caracterizado porque tiene un contenido en fenoles totales comprendido entre 5,6 y 11,4 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra.
13. Extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus*, según la reivindicación 11 ó 12, caracterizado porque tiene un contenido en flavonoides comprendido entre 5,3 y 8 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra.
14. Uso del extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, como antioxidante.
15. Producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* de las reivindicaciones 11-13.

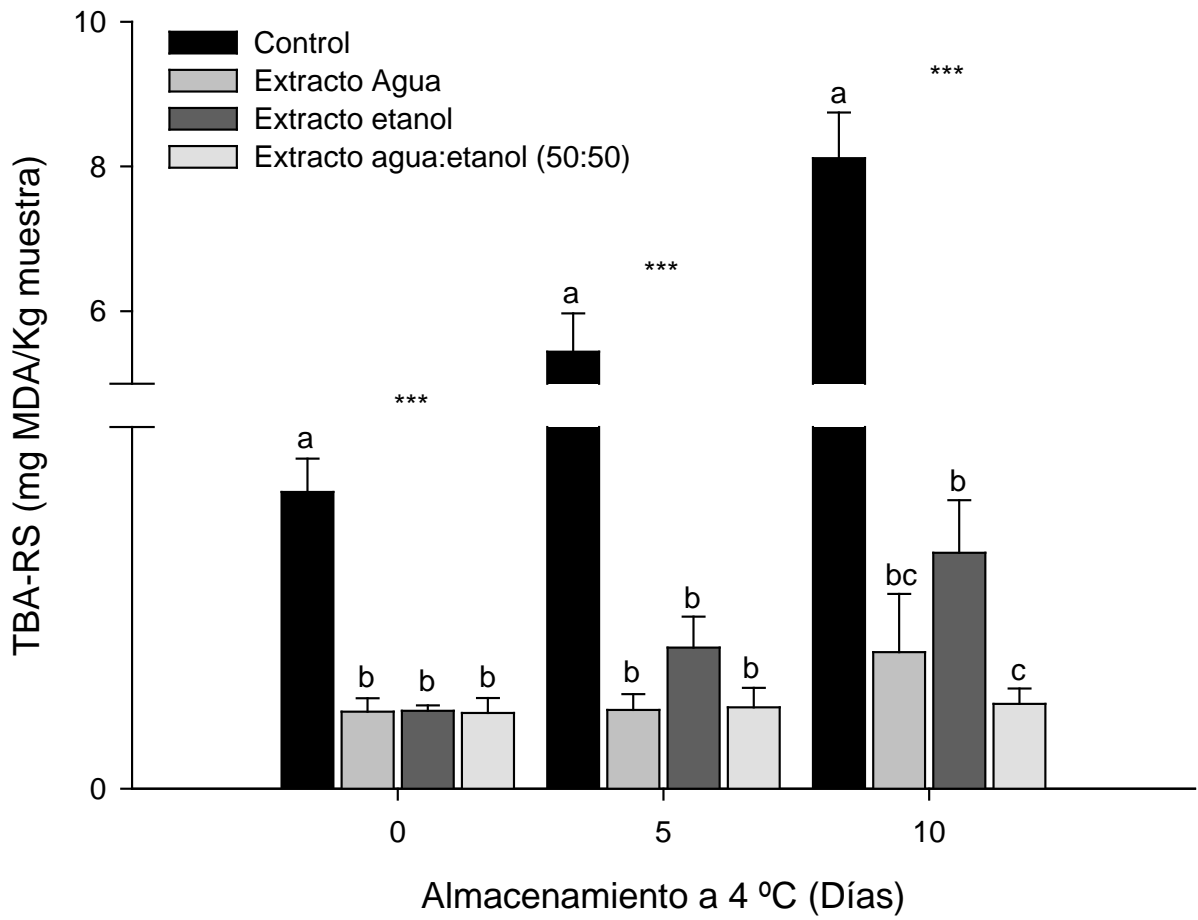


FIGURA 1



- ②¹ N.º solicitud: 201530239
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 25.02.2015
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61K36/49** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ALMEIDA I F et al. Protective effect of <i>Castanea sativa</i> and <i>Quercus robur</i> leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. <i>JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY</i> . 2008 VOL: 91. Páginas 87-95. Páginas 87 y 88.	1-9,11,12,14,15
X	POPOVIC BORIS M et al. Antioxidant Characterization of Oak Extracts Combining Spectrophotometric Assays and Chemometrics. <i>Scientific World Journal</i> . 2013. Páginas 1-8. Páginas 2 y 5.	1,2,5,10,11,13-15
A	HOSONO A et al. Antioxidative effect of a leaf extract from <i>Quercus actissima</i> Carr, on lard and fish oil. <i>Agricultural and Biological Chemistry</i> . 1991 VOL: 55 No: 5 Páginas: 1397-1398.	1-15

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:

<p>Fecha de realización del informe 12.06.2015</p>	<p>Examinador I. Rueda Molíns</p>	<p>Página 1/5</p>
---	--	------------------------------

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

A61K

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.06.2015

Declaración

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

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

Base de la Opinión.-

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

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	ALMEIDA I F et al. Protective effect of <i>Castanea sativa</i> and <i>Quercus robur</i> leaf extracts against oxygen and nitrogen reactive species. <i>JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY</i> . VOL: 91. Páginas 87-95. Páginas 87 y 88.	2008
D02	POPOVIC BORIS M et al. Antioxidant Characterization of Oak Extracts Combining Spectrophotometric Assays and Chemometrics. <i>Scientific World Journal</i> . Páginas 1-8. Páginas 2 y 5.	2013
D03	HOSONO A et al. Antioxidative effect of a leaf extract from <i>Quercus actissima</i> Carr, on lard and fish oil. <i>Agricultural and Biological Chemistry</i> . 1991 VOL: 55 No: 5 Páginas: 1397-1398.	1991

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 y ACTIVIDAD INVENTIVA (artículos 6 y 8 de la LP11/86)**

En las reivindicaciones 1-10, de la solicitud de patente, se reivindica un procedimiento de obtención de un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* que comprende las siguientes etapas: a) triturar la hoja hasta obtener un tamaño de partícula comprendido entre 0,1 mm y 10 mm; b) añadir al triturado de la hoja obtenido en la etapa a) un disolvente (seleccionado entre: agua, un alcohol C₁-C₆ y mezcla de los mismos); c) agitar la mezcla del triturado y del disolvente a una temperatura comprendida entre los 20°C y los 28°C durante un tiempo de 30 min a 210 min; d) separar las dos fases formadas en la etapa c) y recoger el sobrenadante que comprende el extracto; e) filtrar el sobrenadante obtenido en la etapa anterior; f) destilar el sobrenadante obtenido en la etapa d) o tras la etapa e) del filtrado; g) liofilizar el sobrenadante obtenido en la etapa d) o el filtrado de la etapa e) o el destilado de la etapa f). La relación entre el triturado de hoja y el disolvente está comprendida entre 1:50 (peso:volumen) y 1:2 (peso:volumen) y la relación entre el agua y el alcohol C₁-C₆ está comprendida entre 20:80 v/v y 80:20 v/v.

En las reivindicaciones 11-13, de la solicitud de patente, se reivindica un extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* obtenible por el procedimiento anteriormente mencionado que presenta un contenido en fenoles totales comprendidos entre 5,6 y 11,4 mg Eq ácido gálico/g de muestra y un contenido en flavonoides comprendido entre 5,3 y 8 mg Eq catequina/g de muestra.

En la reivindicación 14, de la solicitud de patente, se reivindica el uso del extracto de hoja de árbol o arbusto de género *Quercus* anteriormente mencionado como antioxidante.

En la reivindicación 15, de la solicitud de patente, se reivindica un producto alimentario, cosmético o farmacéutico que comprende el extracto reivindicado.

El documento D01 divulga (ver el resumen de la página 87) cómo el extracto de hoja de *Quercus robur* presenta un efecto antioxidante. En el procedimiento de obtención de dicho extracto, que muestra el documento D01, (ver el apartado de materiales y métodos de la página 88), las hojas son trituradas hasta un tamaño de 500 µm. Posteriormente se añade al triturado una mezcla de agua y etanol que actúa como disolvente. La relación agua:etanol empleada es 2:3. Después de la agitación de la mezcla se procede a una etapa de filtrado. Posteriormente se procede a la evaporación del etanol y finalmente, a la liofilización del extracto. Muestra también el documento D01 (ver el resumen de la página 87) un análisis del contenido en fenoles del extracto. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01, las reivindicaciones 1-9, 11, 12, 14 y 15 presentan novedad pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.

El documento D02 muestra un procedimiento de obtención de un extracto de hoja de las especies *Quercus robur* y *Quercus petraea* (ver el apartado de materiales y métodos de la página 2) que primeramente tritura la hoja de las especies vegetales, a continuación se añade al triturado agua y después de 24 horas a una temperatura de 25°C se realiza una filtración del sobrenadante. El extracto obtenido por este procedimiento presenta flavonoides y propiedades antioxidantes (ver la tabla 1 de la página 5). Por tanto, teniendo en cuenta la información que refleja el documento D02 las reivindicaciones 1, 2, 5, 10, 11 y 13-15 presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.

Por tanto, las reivindicaciones 1-15 de la solicitud de patente presentan novedad, pero no actividad inventiva, según lo establecido en los artículos 6 y 8 de la LP11/86.