



(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 8/96 (2006.01) *A61K 36/03* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070288

(22) Fecha de presentación internacional:
10 de abril de 2014 (10.04.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201330523 12 de abril de 2013 (12.04.2013) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA** [ES/ES]; Área de Valorización, Transferencia y Emprendimiento, Edificio EMPRENDIA-Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES).

(72) Inventores: **SINEIRO TORRES, Jorge**; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES). **SÁNCHEZ GUERRERO, Marivel**; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES). **NÚÑEZ GARCÍA, María José**; Edificio EMPRENDIA, Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES).

(74) Mandatario: **PARDO SECO, Fernando Rafael**; Área de Valorización, Transferencia y Emprendimiento, Edificio EMPRENDIA - Campus Vida, E-15782 Santiago de Compostela (La Coruña) (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*):

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ANTIOXIDANT EXTRACT FROM BROWN MACROALGAE AND METHOD FOR OBTAINING SAME

(54) Título : EXTRACTO ANTIOXIDANTE A PARTIR DE MACROALGAS PARDAS Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

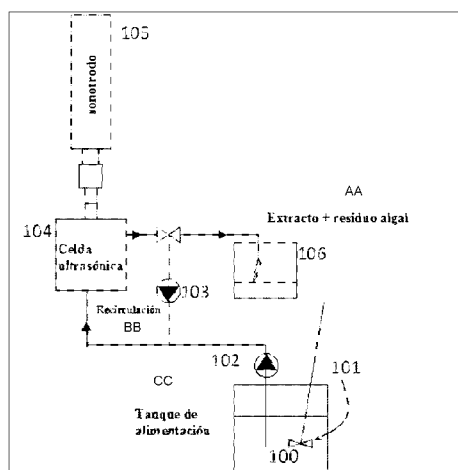


Figura 1

104 Ultrasonic cell
105 Sonotrode
AA Extract + alga residue
BB Recirculation
CC Feed tank

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining antioxidant extracts from macroalgae using ultrasound-assisted continuous aqueous extraction. The process can be performed using fresh algae or dry algae, after resuspending same in water. A suspension of alga in water is prepared with a solid concentration of 10 % to 30 %. The mixture is fed to an ultrasonic breakdown system. The extract is filtered and lyophilised, obtaining total polyphenol concentrations of 62.4 mg eq. of phloroglucinol / g of lyophilizate with *Bifurcaria bifurcata* and 44 mg eq. of phloroglucinol / g of lyophilizate with *Ascophyllum nodosum*. The extract can be used as an ingredient in cosmetic and food formulations.

(57) Resumen: Se presenta un procedimiento de obtención de extractos antioxidantes a partir de macroalgas empleando extracción acuosa en continuo y asistida por ultrasonidos. El proceso se puede realizar sobre alga fresca o sobre alga seca, tras una resuspensión en agua. Se prepara una suspensión de alga en agua con una concentración de sólidos entre un 10 y un 30%. La mezcla se alimenta a un sistema de ruptura ultrasónica. El extracto es filtrado y liofilizado, obteniéndose concentraciones de polifenoles totales de 62.4 mg eq. de floroglucinol/ g de liofilizado con *Bifurcaria bifurcata* y 44 mg eq. de floroglucinol/ g de liofilizado con *Ascophyllum nodosum*. El extracto se puede emplear como ingrediente en

formulaciones cosméticas y alimentarias.





ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *con reivindicaciones modificadas y declaración (Art. 19(1))*

Extracto antioxidante a partir de macroalgas pardas y procedimiento de obtención

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a la extracción de compuestos a partir de macroalgas. Más concretamente la invención se refiere a la extracción de antioxidantes a partir de macroalgas pardas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

- Los antioxidantes son metabolitos secundarios presentes en las macroalgas, plantas, y
10 particularmente en las frutas. Son compuestos que inhiben o previenen la oxidación de un sustrato. En la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética se emplean principalmente compuestos sintéticos antioxidantes como hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo o butirohidroxianisol (BHA). Los antioxidantes naturales como los provenientes de extractos de uva, de romero, de cacao etc., están siendo mejor acogidos debido a su baja
15 toxicidad y alta actividad antioxidante. Una gran familia de compuestos antioxidantes son los florotaninos presentes en macroalgas que muestran buena actividad antioxidante

- Varios protocolos de extracción de florotaninos han sido propuestos, entre ellos se pueden citar particiones secuenciales líquido-líquido, utilizando principalmente solventes orgánicos como metanol, hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo y butanol,
20 además de purificaciones en columnas cromatográficas, tales como Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from *Shige okamurae* in Free Radical Mediated Oxidative Systems, Yanping, Z., Zhong-Ji Q., Yong L., Moon-Moo K., Sang-Hoon, L. & Se-Kwon K, J. Agric. Food Chem., 56, 7001-7009, 2008; Phenolic Compounds in the Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and Radical-scavenging Activities, Audibert, L.,
25 Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D. & Ar Galla, E, Phytochemical analysis, 21, 399-405, 2010; Chemical components and its antioxidant properties in vitro: an edible marine brown alga *Ecklonia cava*, Li, Y., Qian, Z.J., Ryu, B., Lee, S.H., Kim, M.M. and Kim, S.K., Bioorg Med Chem 17, 1963-1973, 2009; Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae), Breton, F., Cérantola, S. & Ar Gall E., Journal of
30 Experimental Marine Biology and Ecology, 399, 167-172, 2011. Sin embargo estos procesos generan residuos no permitidos en alimentación y cosmética, tales como metanol o compuestos organohalogenados. Además, si se requiere una polaridad inferior a la del agua, las mezclas hidroalcohólicas son una opción a los disolventes derivados del petróleo.

La utilización de acetona al 70% y acetato de etilo como disolventes fue reportada en Phlorotannins as Radical Scavengers from the Extract of Sargassum ringgoldianum, Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. & Miki, W., Marine Biotechnology, 8, 409-414, 2006). Una primera fase de eliminación de material lipídico con hexano y posterior
5 extracción de florotaninos con acetona-agua al 70% fue utilizada en High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga Fucus vesiculosus, Koivikko, R., Loponen, J., Pihlaja, K. and Jormalainen, V., Phytochem. Anal. 18, pp. 326-332, 2007. Se ha utilizado etanol puro y al 60% para la extracción de florotaninos en especies como Ascophyllum nodosum y Fucus vesiculosus, seguido de partición líquido-líquido con éter de petróleo o diclorometano (Evaluation of quantitative methods for the
10 determination of polyphenols in algal extracts, Parys, R., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Reher, G., Glombitza, K-W and König, G.M. . J. Nat. Prod., 1865-1870, 2007.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los extractos obtenidos a partir del tratamiento de macroalgas pardas, como pueden ser
15 Bifurcaria bifurcata y Ascophyllum nodosum, pueden emplearse para consumo alimentario, cosmético y/o farmacéutico por su contenido en fucoidanos y florotaninos. El alto contenido en fucoidanos provoca que estos extractos posean una capacidad humectante en la piel, mientras que el poder antioxidante viene dado por la presencia de florotaninos.

La obtención de un producto natural que no posea un fuerte aroma característico es deseable para su empleo como ingrediente cosmético para no interferir con otros
20 deseados, lo cual se favorece con extracción acuosa y evitando usar disolventes orgánicos. Es otra característica deseable del proceso de extracción de extractos que los disolventes empleados sean baratos, renovables, de baja o nula toxicidad y que su
25 manejo no sea peligroso. Los extractos crudos o fracciones aisladas presentan frecuentemente mayor actividad antioxidante que antioxidantes sintéticos como BHA (butirohidroxianisol) o BHT (butirohidroxitolueno).

El procedimiento objeto de la presente invención permite emplear agua para obtener un producto estable, fácil de manejar y adicionar a diferentes productos y libre de trazas de
30 disolventes.

El método de extracción del antioxidante a partir de una macroalga parda comprende:

a) Si se emplea macroalga fresca, esta se somete a un lavado con agua corriente que elimina arenas y epifitas, y posteriormente se seca con papel absorbente. En el caso de que se emplee alga seca este proceso de limpieza con agua no es necesario.

5 b) A continuación se mezcla el alga seca o fresca con agua a una relación líquido/sólido (L/S) entre 3 y 5 g/g.

c) A continuación se somete la mezcla anterior a un proceso de triturado, preferiblemente en un molino de aspas, hasta reducir el tamaño de partícula entre 0.5 y 2 mm para macroalga seca y entre 0.5 y 3 mm para macroalga fresca.

10 d) Mezclar la macroalga triturada con un disolvente líquido que comprende etanol puro o mezclas etanol:agua en relación 1:1 v/v, en una relación Líquido/Sólido (L/S) de entre 5 y 15 (g/g) cuando se parte de macroalga fresca y de entre 50 y 150 (g/g) cuando se parte de macroalga seca e) Someter la mezcla a un proceso de disrupción celular aplicando ultrasonidos en continuo.

15 f) El residuo sólido algal obtenido en la etapa anterior se separa por sedimentación y posterior centrifugación o filtración.

g) Se elimina el etanol o el 50% del agua, en el caso de que sólo se hubiera empleado agua, a vacío sin superar la temperatura de 40 °C.

h) El extracto concentrado se liofiliza para obtener un extracto sólido.

20 El producto se almacena refrigerado a menos de 5 °C y se protege de la luz para evitar su alteración.

En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto antioxidante estable obtenido a partir del procesado de macroalgas pardas, más concretamente de macroalgas algas de las especies *Bifurcaria bifurcata*, *Ascophyllum nodosum*, *Saccorhiza polyschides* y *Sargassum muticum*

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades detalladas en las figuras se ilustran a modo de ejemplo y no a modo de limitación:

La Figura 1 muestra el esquema para disrupción celular asistida por ultrasonido en un sistema de alimentación macroalgal en continuo.

La Figura 2 muestra la detección de florotaninos mediante HPLC en columna de fase reversa C18.

La Figura 3 muestra el perfil ultravioleta del extracto de *Bifurcaria bifurcata*, con un perfil característico de florotaninos y semejante al de floroglucinol.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una realización particular la invención se dirige a un extracto acuoso antioxidante obtenido a partir de macroalgas pardas caracterizado por a) un contenido de carbohidratos entre 33 y 156 mg de glucosa/g de liofilizado; b) un contenido en fucoidanos, expresados como sulfatos totales tras la digestión de la muestra, entre 44 y 118 mg de sulfatos/g de liofilizado; c) un contenido de florotaninos, expresados como floroglucinol, entre 12 y 62.4 mg equivalentes de floroglucinol/g de liofilizado; y d) un contenido en alginatos, entre 10 y 55 mg equivalentes de ácido glucurónico/g de liofilizado.

En otro aspecto, la invención se dirige a una composición cosmética y/o alimentaria que comprende el extracto antioxidante objeto de la presente invención.

Se cita a modo de ejemplo y sin limitar el alcance de la protección un ejemplo de la aplicación del método de extracción de antioxidantes a partir de *Bifurcaria Bifurcata*. La extracción se realiza en continuo y en condiciones de temperatura inferior a 40 °C para evitar reducción en el poder antioxidante o cantidad de los compuestos extraídos.

En la Figura 1 se muestra el esquema para disrupción celular asistida por ultrasonido en un sistema de alimentación macroalgal en continuo compuesto por una unidad de generación de ultrasonidos que incluye un sonotrodo (105) dispuesto en una celda de flujo continuo (104), que es alimentado mediante una bomba peristáltica principal (102) y otra de recirculación (103).

En una realización particular de la invención el proceso de extracción del compuesto acuoso antioxidante comprende las siguientes etapas:

a) Se lavaron 120 g de macroalga fresca con agua potable y posteriormente con agua destilada.

b) Se añadieron 300 mL de agua

c) Se pretritura la macroalga, accionando una batidora de aspas durante 10 min obteniendo un tamaño de partícula inferior a 3 mm.

d) Se añadió agua a la preparación obtenida en el paso anterior hasta obtener una relación L/S de 10 y se introdujo en un tanque de alimentación (100) que se mezcla mediante un agitador (101). Se seleccionó una de las condiciones de extracción descritas en la Tabla 1, que resume un diseño experimental factorial 2^2 con 4 puntos centrales.

- 5 e) Las condiciones extracción ultrasónica en continuo consideraron los parámetros de potencia (como amplitud o porcentaje de la potencia nominal aplicada) y relaciones de recirculación del caudal de entrada del caldo de alga a la celda de flujo continuo (celda de sonicated o ultrasónica) (104) en la que un sonotrodo (105) aplica ultrasonidos en continuo a la mezcla con una densidad de potencia en el rango entre 3 y 13 W/cm³. La
- 10 Tabla 1 resume la combinación de tratamientos ejecutados para el diseño experimental. El montaje de extracción requiere de un sistema de extracción asistido con ultrasonido como el que se muestra en la Figura 1.

f) Se dejó sedimentar el residuo sólido sedimentable y se separó del sobrenadante por decantación.

- 15 g) El siguiente paso consistió en centrifugar y separar nuevamente el sobrenadante. Este tiene un volumen de 1200 mL, el cual se redujo hasta 500 mL por evaporación a vacío a 30°C o a temperatura ambiente,

h) Se obtuvo un extracto liofilizado (106), que en esta realización particular comprende un volumen total de 1400 mL en el que y finalmente para obtener un extracto sólido y seco.

Amplitud	Ratio de recirculación	Potencia W/cm ³	Tiempo de residencia en celda (s)
1	1	13	9.2
1	-1	13	6.9
-1	1	7.2	9.2
-1	-1	7.2	6.9
0	0	10.1	8.28
0	0	10.1	8.28
0	0	10.1	8.28
0	0	10.1	8.28

Tabla 1.- Diseño experimental 2² y 4 puntos centrales. Códigos de ajuste de amplitud -1, 0 y 1 corresponden a amplitudes de 50%, 70% y 90%. Códigos de relación de recirculación -1, 0 y +1 corresponden a 1, 1.5 y 2, siendo el caudal de recirculación constante de 300 mL/min

El rendimiento de extracción en base húmeda a partir de macroalga fresca se encuentra dentro de un intervalo de 2.9 - 6.6 % (p/p); mientras que el rendimiento de extracción para alga seca se encuentra dentro del intervalo 27.7 y 57.3 % (p/p); los rendimientos para cada una de las especies de algas analizadas se recogen en la Tabla 2.

- 10 El máximo de absorbancia de este extracto liofilizado y posteriormente redissuelto en agua, frente a un blanco de agua se localiza entre 250 nm y 280 nm, tal y como se recoge en la Figura 3.

Contenido de polifenoles totales:

- 15 Se entiende por polifenoles toda una familia de compuestos presentes en los vegetales, que contiene o se derivan del grupo fenol: derivados del ácido benzoico, derivados de ácido cinámico, flavonoides, etc.

- Para determinar el contenido de polifenoles del extracto obtenido se empleó una ligera modificación del método propuesto en Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Singleton & Rossi, Singleton, V. L.; Rossi, J. J. Am. J. Enol. Vitic., 16, 144–158, 1965. Así, se usaron 500 µL de muestra

disuelta en agua, a la cual se le añadieron 2,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 2,0 mL de Na_2CO_3 . La absorbancia se leyó a 765 nm, después de incubar las muestras durante 15 min a 45°C.

5

Especie	Rendimiento (% p/p) _{b.s}	Rendimiento (% p/p) _{b.h.}
<i>Ascophyllum nodosum</i>	38,0	6,6
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	27,7	4,8
<i>Saccorhiza polyschides</i>	42,0	4,9
<i>Sargassum muticum</i>	57,3	2,9

Tabla 2.- Rendimientos de extractos acuosos en base seca y húmeda. b.s: considerando secado de 24 h × 45°C

El ensayo de inhibición del radical DPPH propuesto en “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”, Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C . LWT Food Sci Technol 28:5–30 18 (1995), se utilizó para determinar la capacidad donante de protones por parte del extracto. El método se aplicó con una leve modificación tal y como se describe, en donde a 980 μL de una solución metanólica del radical ($6,9 \times 10^{-5}$ mol/L) se añadieron 20 μL de una solución acuosa del extracto. La disminución de la absorbancia se registró a 515 nm después de 16 minutos. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se calculó frente al registro de un blanco. Intervalos de concentración entre 5 y 40 mg/mL de extractos de *Ascophyllum nodosum* y *Bifurcaria bifurcata* se evaluaron para determinar la EC50, cuyos resultados fueron 23.73 ± 3.83 mg extracto /mL y 17.68 ± 2.2 mg extracto/mL, respectivamente. Estos mismos valores expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG) corresponden a 1.08 ± 0.16 y 1.04 ± 0.13 mg EAG/mL, respectivamente.

Especie	Azúcares totales	Sulfatos	Ácido urónico	Polifenoles totales	Oligoelementos					
					Na	K	Mg	P	Ca	S
					mg/g extracto					
<i>Ascophyllum nodosum</i>	115	50	47	44	70	46	9	2	6	18
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	156	118	55	62.4	20	71	3	1	4	36
<i>Saccorhiza polyschides</i>	33	44	10	3	48	180	6	4	3	12
<i>Sargassum muticum</i>	122	70	40	12	44	87	23	4	5	19

Tabla 3. Caracterización de extractos liofilizados a partir de cuatro variedades de algas pardas.

Contenido en polisacáridos:

- 5 Se entiende por polisacáridos los polímeros formados a partir de azúcares, principalmente hexosas y/o pentosas, que funcionan como componente estructural y de reserva energética en los vegetales.

Se determinó el contenido en polisacáridos mediante el método fenol-sulfúrico, propuesto en Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Anal. Chem. , 28, 350–356, 1956. Se obtuvo un contenido promedio de carbohidratos de 156.7 mg de glucosa/g de liofilizado del extracto obtenido a partir de la macroalga *Bifurcaria bifurcata*, siendo un 29% superior al obtenido a partir de *Ascophyllum nodosum* en similares condiciones.

Se entiende por fucoidanos una familia de polisacáridos característicos de las algas, que son formados por polimerización de derivados de la fucosa, un azúcar sulfatado.

El contenido promedio en fucoidanos fue determinado mediante el procedimiento descrito en Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non- enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters, Dodgson, Dodgson, K. S. . Biochem. J., 78, pp. 312-317, 1961, y es expresado como sulfatos totales tras la digestión de la muestra. El valor promedio en los extractos de *Bifurcaria bifurcata* es de 118 mg de sulfatos/g de liofilizado, un 134% superior a un extracto de *Ascophyllum nodosum*

obtenido en similares condiciones. Los niveles de azufre determinados mediante técnicas de ICP-OES (media de 36.3 mg S/g liofilizado) fueron el doble de los obtenidos para *Ascophyllum nodosum* (media de 18.14 mg/g).

Los principales polisacáridos en las algas son los denominados alginatos, formado por
5 polimerización principalmente del ácido glucurónico.

El contenido en alginatos fue estimado a partir del contenido en ácidos urónicos según el método propuesto en New method for quantitative determination of uronic acids, Blumenkrantz et al., Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G. Anal. Biochem, 54, pp. 484-489, 1973. El extracto de *Bifurcaria bifurcata* mostró un contenido medio de alginatos,
10 expresado como ácidos urónicos y empleando ácido glucurónico como estándar, de 55.1 mg/g de liofilizado, siendo un 15% superior a un extracto de *Ascophyllum nodosum* obtenido en las mismas condiciones.

Determinación espectrofotométrica de polifenoles totales.

Se empleó el método Folin-Ciocalteu de determinación de polifenoles totales,
15 empleando floroglucinol como estándar. El contenido promedio de polifenoles totales, principalmente florotaninos, en el extracto de *Bifurcaria bifurcata*, fue de 62.4 mg equivalentes de floroglucinol/g de liofilizado, un 7.3 % superior al obtenido de *Ascophyllum nodosum*.

Detección cromatográfica de florotaninos:

20 Por florotaninos se entienden polímeros generados por polimerización de floroglucinol (1,3,5 trihidroxibenceno), en paralelismo con la denominación de taninos, formados por polimerización de catequina/epicatequina y derivados. Los taninos son componentes de la pared celular de las plantas y los florotaninos lo son en las macroalgas.

Se realizó la extracción de florotaninos a partir del extracto liofilizado, de acuerdo con la
25 metodología propuesta en High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus* Phytochem, Koivikko et al., 2007, Koivikko, R., Loponen, J., Pihlaja, K. and Jormalainen, V. ,Anal. 18, pp. 326-332,2007, en donde se eliminaron las etapas de lavados con hexano.

Se pesaron 95 mg del extracto de *Bifurcaria bifurcata*. y se solubilizaron en 25 mL de
30 agua, posteriormente, los florotaninos se extrajeron 4 veces con 10 mL de una mezcla de acetona/agua: 7/3. La muestra se centrifugó para separar el sobrenadante. Las porciones de sobrenadante se unieron y se eliminó la acetona con corriente de N₂. El residuo se

resuspendió en agua y posteriormente se liofilizó. El liofilizado se disolvió en 1 mL de agua destilada y quedó listo para inyectar al equipo de cromatografía líquida de alta eficacia. El método de separación cromatográfica fue el propuesto en Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts, ,Zaragoza, M.C.,
5 López, D., Sáiz, M. P., Poquet M., Pérez J., Puig-Parellada, P., Mármol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y., Burtin, P., Inisan, C., Rousseau, I., Besnard, M., and Mitjavila, M.T. . J. Agric. Food Chem, 56, pp. 7773-7780, 2008.

En la Figura 2, se observan los picos mayoritarios (5-6, 11 y 18) cuya señal se detecta a los 25-26, 30 y 37 min, respectivamente. La máxima absorbancia de la mezcla de
10 florotaninos se observa a los 273 nm, como se muestra en la Figura 3. El perfil del espectro UV-Visible coincide con el de un estándar de la molécula de floroglucinol.

REIVINDICACIONES

- 1- Un extracto antioxidante liofilizado obtenido a partir de macroalgas pardas caracterizado por:
- 5 a. un contenido de carbohidratos entre 33 y 156 mg de glucosa/g de liofilizado;
- b. un contenido en fucoïdanos, expresados como sulfatos totales tras la digesti3n de la muestra, entre 44 y 118 mg de sulfatos/g de liofilizado;
- c. un contenido de florotaninos, expresados como floroglucinol, entre 12 y 62.4 mg equivalentes de floroglucinol/g de liofilizado; y
- 10 d. un contenido en alginatos, entre 10 y 55 mg equivalentes de 1cido glucur3nico/g de liofilizado.
- 2- El extracto seg3n la reivindicaci3n 1 caracterizado por un m1ximo de absorbancia en la regi3n ultravioleta entre 260-280 nm.
- 3- El extracto seg3n la reivindicaci3n 1 caracterizado por una capacidad de inhibici3n del radical DPPH con un valor de EC50 de 17.7 a 23.7 mg de extracto/mL.
- 15 4- El extracto seg3n las reivindicaciones 1 a 3 donde la macroalga parda es *Bifurcaria bifurcata*, *Ascophyllum nodosum*, *Saccorhiza polyschides* y *Sargassum muticum*.
- 5- Un procedimiento para obtener un extracto antioxidante liofilizado, caracterizado seg3n las reivindicaciones 1 a 4, a partir de la macroalgas pardas frescas o secas que comprende:
- 20 a. lavar con agua las macroalgas, en el caso de que se empleeen macroalgas frescas;
- b. mezclar la macroalga con agua con una relaci3n l3quido/s3lido (L/S) entre 3 y 5 g/g;
- 25 c. triturar la mezcla obteniendo una macroalga triturada con un tama1o de part3cula inferior a 3 mm.
- d. mezclar la macroalga triturada con un disolvente l3quido que comprende etanol puro o mezclas etanol:agua en relaci3n 1:1 v/v, en una relaci3n

Líquido/Sólido (L/S) de entre 5 y 15 (g/g) cuando se parte de macroalga fresca y de entre 50 y 150 (g/g) cuando se parte de macroalga seca;

- 5 e. someter la mezcla a un proceso de disrupción celular aplicando ultrasonidos en continuo con una densidad de potencia en el rango entre 3 y 13 W/cm³;
- f. separar el residuo sólido algal obtenido en la etapa anterior mediante sedimentación y posterior centrifugación o filtración;
- g. eliminar el etanol o el 50% del agua a vacío a una temperatura inferior a 40°C obteniendo un extracto concentrado; y
- 10 h. liofilizar el extracto concentrado obteniendo un extracto liofilizado.
- 6- El procedimiento según la reivindicación 5 en el que el tamaño de las partículas trituradas está entre 0.5 y 2 mm para macroalga seca y entre 0.5 y 3 mm para macroalga fresca.
- 15 7- El uso del extracto antioxidante caracterizado según las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente en formulaciones cosméticas y alimentarias.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS
recibidas por la oficina Internacional el 04 Agosto 2014 (04.08.2014)

- 1- Un extracto antioxidante acuoso y su derivado liofilizado obtenido a partir de macroalgas pardas caracterizado por:
- 5 a. un contenido de carbohidratos entre 33 y 156 mg de glucosa/g de extracto una vez liofilizado;
- b. un contenido en fucooidanos, expresados como sulfatos totales tras la digestión de la muestra, entre 44 y 118 mg de sulfatos/g una vez liofilizado liofilizado;
- 10 c. un contenido de florotaninos, expresados como floroglucinol, entre 12 y 62.4 mg equivalentes de floroglucinol/g una vez liofilizado liofilizado; y
- d. un contenido en alginatos, entre 10 y 55 mg equivalentes de ácido glucurónico/g una vez liofilizado liofilizado.
- 2- El extracto según la reivindicación 1 caracterizado por un máximo de absorbancia en la región ultravioleta entre 260-280 nm.
- 15 3- El extracto según la reivindicación 1 caracterizado por una capacidad de inhibición del radical DPPH con un valor de EC50 de 17.7 a 23.7 mg de extracto/mL.
- 4- El extracto según las reivindicaciones 1 a 3 donde la macroalga parda es *Bifurcaria bifurcata*, *Ascophyllum nodosum*, *Saccorhiza polyschides* y *Sargassum muticum*.
- 20 5- Un procedimiento para obtener un extracto antioxidante, caracterizado según las reivindicaciones 1 a 4, a partir de la macroalgas pardas frescas o secas que comprende:
- a. lavar con agua las macroalgas, en el caso de que se empleeen macroalgas frescas;
- 25 b. mezclar la macroalga con agua con una relación líquido/sólido (L/S) entre 3 y 5 g/g;
- c. triturar la mezcla obteniendo una macroalga triturada con un tamaño de partícula inferior a 3 mm.

- d. mezclar la macroalga triturada con un disolvente líquido que comprende etanol puro o mezclas etanol:agua en relación 1:1 v/v, en una relación Líquido/Sólido (L/S) de entre 5 y 15 (g/g) cuando se parte de macroalga fresca y de entre 50 y 150 (g/g) cuando se parte de macroalga seca;
 - 5 e. someter la mezcla a un proceso de disrupción celular aplicando ultrasonidos en continuo con una densidad de potencia en el rango entre 3 y 13 W/cm³;
 - f. separar el residuo sólido algal obtenido en la etapa anterior mediante sedimentación y posterior centrifugación o filtración;
 - 10 g. eliminar el etanol o el 50% del agua a vacío a una temperatura inferior a 40°C obteniendo un extracto concentrado; y
 - h. liofilizar el extracto concentrado obteniendo un extracto liofilizado.
- 6- El procedimiento según la reivindicación 5 en el que el tamaño de las partículas trituradas está entre 0.5 y 2 mm para macroalga seca y entre 0.5 y 3 mm para
- 15 macroalga fresca.
- 7- El uso del extracto antioxidante caracterizado según las reivindicaciones 1 a 4 como ingrediente en formulaciones cosméticas y alimentarias.

De acuerdo con el Artículo 19.1 del Tratado PCT, referente a la modificación de las reivindicaciones ante la Oficina Internacional y teniendo en cuenta las citas y explicaciones contenidas en la Opinión escrita de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional, el solicitante ha realizado las siguientes modificaciones en el juego de reivindicaciones:

- a) Se ha modificado la reivindicación 1 para incluir el término acuoso que hace referencia al estado en el que se puede encontrar el extracto y que se obtiene como paso previo a la obtención del extracto liofilizado.
- b) Se han incluido en *itálica* los nombres científicos de las especies nombradas en la reivindicación 4 para cumplir con la Regla 10.3 del PCT.
- c) Se ha modificado la reivindicación 5 eliminando el término “*liofilizado*”.

El solicitante declara que las modificaciones están soportadas por la descripción de la invención y se desprenden clara e inequívocamente de la misma.

DECLARACION SEGUN EL ARTICULO 19 (1)

DIBUJOS

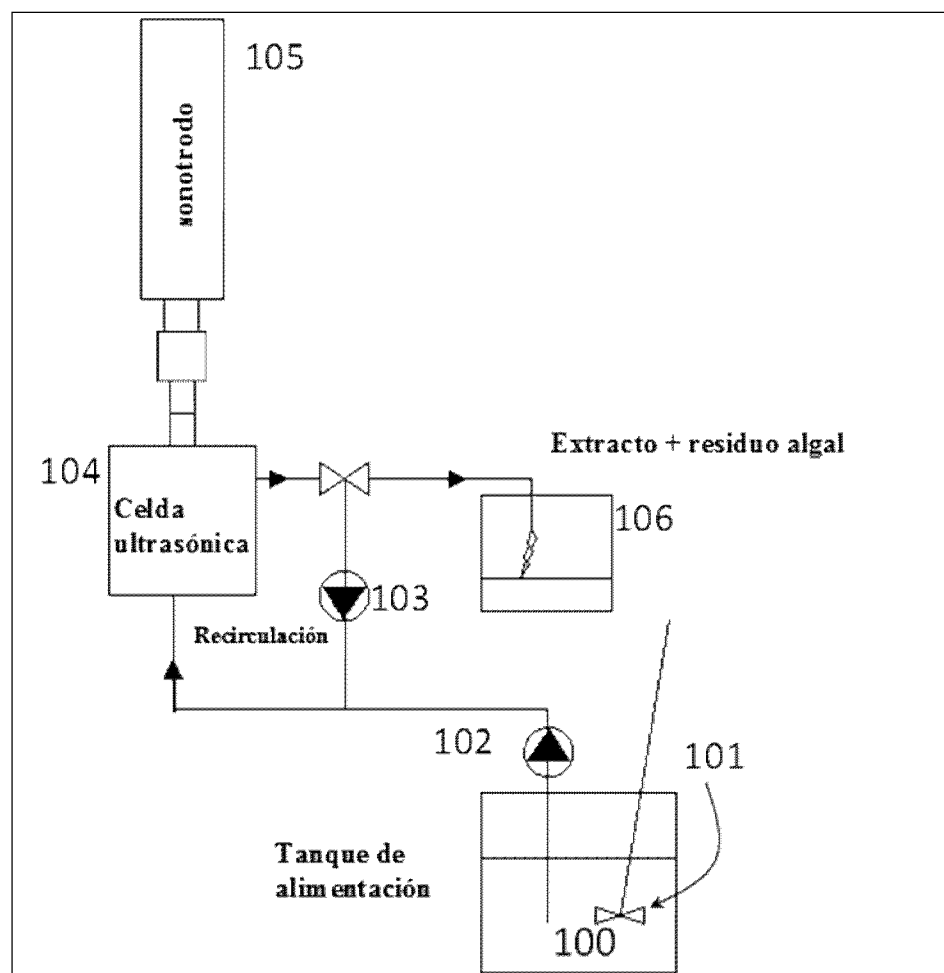


Figura 1

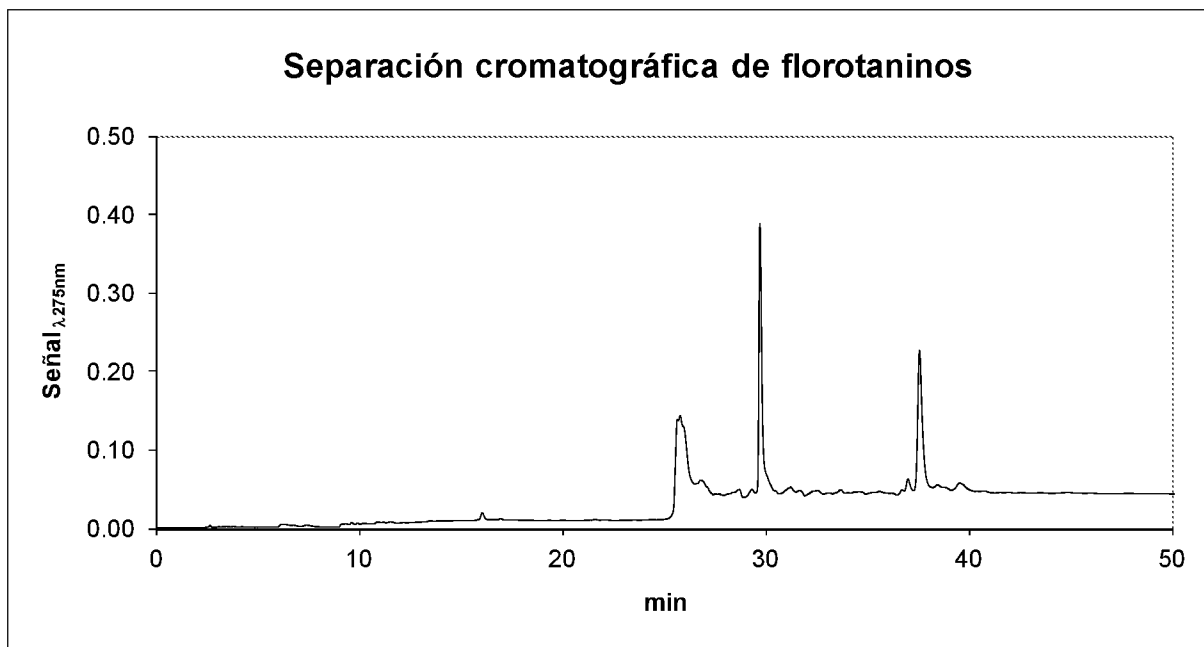


Figura 2

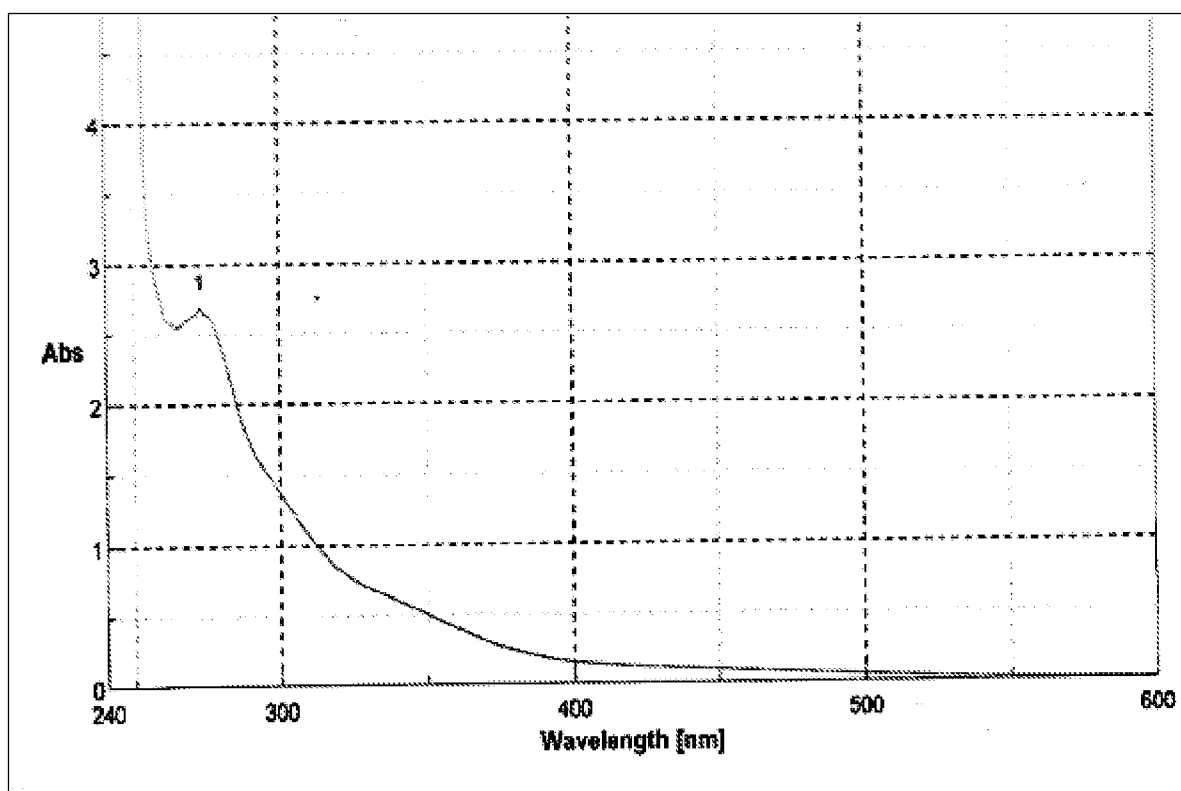


Figura 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, KOSMET, FSTA, AGRICOLA, CABA, SCISEARCH, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008280994 A1 (ZHANG, JUNZENG et al.) 13.11.2008, page 1, [0008], [0011]-[0014]; page 2, [0060], [0063]; page 3, [0078]-[0080]; page 4, [0082], [0086], [0091]-[0094]; page 5, [0112]-[0115]; page 7, [0131]; page 10, [0165], [0175]; claims 13, 17-19, 27-30, 55	1 - 7
A	CN 101250232 A (GUOYING QIAN; CAISHENG WANG) 27.08.2008, & Abstract from EPODOC Database. Retrieved from EPOQUE; Accession Number CN-200810060550-A	4 - 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 June 2014 (26.06.2014)

Date of mailing of the international search report
(30/06/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

A. Sukhwani

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495473

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070288

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2054485 T3 (SOCIETE D'ENGRAIS COMPOSES MINERAUX ET AMENDEMENTS (S.E.C.M.A.)) 01.08.1994, page 2, lines 12-28, 40-48; page 3, Examples 2, 7; page 4, Examples 10-12; page 9, lines 26-32; page 10, lines 40-51; claims 2, 3, 5	1, 4, 5, 7
A	BALAJI RAGHVENDRAN H. R., SATHIVEL, A. DEVAKI, T. Antioxidant effect of <i>Sargassum polycystum</i> (Phaeophyceae) against acetaminophen induced changes in hepatic mitochondrial enzymes during toxic hepatitis. Chemosphere, 2005. Vol. 61, pages 276-281. ISSN 0045 6535. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.049	1 - 3, 5
A	NAKAI, M. et al. Phlorotannins as radical scavengers from the extract of <i>Sargassum ringgoldianum</i> . Marine Biotechnology, 2006. Vol. 8, pages 409-414. Doi: 10.1007/s10126-005-6168-9	1 - 3, 7
A	LI, YONG-XIN et al. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. Process Biochemistry, 2011. Vol. 46, n° 12, pages 2219-2224. ISSN 1359 5113. Doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.015	1, 3, 5, 7
A	CN 101993501 A (UNI ZHE JIANG SCI & TECH) 30.03.2011, & Abstract from EPODOC Database. Retrieved from EPOQUE; Accession Number CN-200910102087-A	4 - 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070288

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2008280994 A1	13.11.2008	EP1778219 A1 EP1778219 A4 WO2006017943 A1 CA2541747 A1	02.05.2007 30.06.2010 23.02.2006 23.02.2006
----- CN101250232 A -----	----- 27.08.2008 -----	----- CN101250232B B -----	----- 23.06.2010 -----
ES2054485 T3	01.08.1994	US5508033 A EP0504236 A1 EP0504236 B1 AT103171T T JPH05504583 A WO9107946 A1 DE69007626T T2 FR2655268 A1 FR2655268 B1	16.04.1996 23.09.1992 23.03.1994 15.04.1994 15.07.1993 13.06.1991 25.08.1994 07.06.1991 14.10.1994
----- CN101993501 A -----	----- 30.03.2011 -----	----- NONE -----	----- ----- -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070288

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K8/96 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61K36/03 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070288

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, A23L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, X-FULL, NPL, CAPLUS, KOSMET, FSTA, AGRICOLA, CABA, SCISEARCH, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	US 2008280994 A1 (ZHANG, JUNZENG et al.) 13.11.2008, página 1, [0008], [0011]-[0014]; página 2, [0060], [0063]; página 3, [0078]-[0080]; página 4, [0082], [0086], [0091]-[0094]; página 5, [0112]-[0115]; página 7, [0131]; página 10, [0165], [0175]; reivindicaciones 13, 17-19, 27-30, 55	1 - 7
A	CN 101250232 A (GUOYING QIAN; CAISHENG WANG) 27.08.2008, & Resumen de base de datos EPODOC. Recuperado de EPOQUE; Número de acceso CN-200810060550-A	4 - 7

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
26 Junio 2014 (26.06.2014)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
30-Junio-2014 (30/06/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

A. Sukhwani

Nº de teléfono 91 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070288

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	ES 2054485 T3 (SOCIETE D'ENGRAIS COMPOSES MINERAUX ET AMENDEMENTS (S.E.C.M.A.)) 01.08.1994, página 2, líneas 12-28, 40-48; página 3, Ejemplos 2, 7; página 4, Ejemplos 10-12; página 9, líneas 26-32; página 10, líneas 40-51; reivindicaciones 2, 3, 5	1, 4, 5, 7
A	BALAJI RAGHVENDRAN H. R., SATHIVEL, A. DEVAKI, T. Antioxidant effect of <i>Sargassum polycystum</i> (Phaeophyceae) against acetaminophen induced changes in hepatic mitochondrial enzymes during toxic hepatitis. Chemosphere, 2005. Vol. 61, páginas 276-281. ISSN 0045 6535. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.049	1 - 3, 5
A	NAKAI, M. et al. Phlorotannins as radical scavengers from the extract of <i>Sargassum ringgoldianum</i> . Marine Biotechnology, 2006. Vol. 8, páginas 409-414. Doi: 10.1007/s10126-005-6168-9	1 - 3, 7
A	LI, YONG-XIN et al. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. Process Biochemistry, 2011. Vol. 46, nº 12, páginas 2219-2224. ISSN 1359 5113. Doi: 10.1016/j.procbio.2011.09.015	1, 3, 5, 7
A	CN 101993501 A (UNI ZHE JIANG SCI & TECH) 30.03.2011, & Resumen de base de datos EPODOC. Recuperado de EPOQUE; Número de acceso CN-200910102087-A	4 - 7

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/070288

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2008280994 A1	13.11.2008	EP1778219 A1 EP1778219 A4 WO2006017943 A1 CA2541747 A1	02.05.2007 30.06.2010 23.02.2006 23.02.2006
----- CN101250232 A -----	----- 27.08.2008 -----	----- CN101250232B B -----	----- 23.06.2010 -----
ES2054485 T3	01.08.1994	US5508033 A EP0504236 A1 EP0504236 B1 AT103171T T JPH05504583 A WO9107946 A1 DE69007626T T2 FR2655268 A1 FR2655268 B1	16.04.1996 23.09.1992 23.03.1994 15.04.1994 15.07.1993 13.06.1991 25.08.1994 07.06.1991 14.10.1994
----- CN101993501 A -----	----- 30.03.2011 -----	----- NINGUNO -----	----- -----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K8/96 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61K36/03 (2006.01)