



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 332 039**

51 Int. Cl.:
C07C 37/82 (2006.01)
C11B 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02704833 .9**
96 Fecha de presentación : **14.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1362021**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación de compuestos polifenólicos procedentes de descartes de selección de vegetales frescos utilizando una resina de alto rendimiento de adsorción y de elución.**

30 Prioridad: **15.02.2001 FR 01 02096**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.01.2010

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
147, rue de l'Université
75338 Paris Cédex 07, FR
SCALIME NUTRITION**

72 Inventor/es: **Goupy, Pascale;
Amiot-Carlin, Marie-Josephe;
Escudier, Jean-Louis;
Mikolajczak, Michel y
Martin, Michel**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 332 039 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación de compuestos polifenólicos procedentes de descartes de selección de vegetales frescos utilizando una resina de alto rendimiento de adsorción y de elución.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación de compuestos procedentes de hortalizas de hoja ancha de la familia de las Compuestas o de bulbo de la familia de las Liliáceas o de descartes de selección de vegetales frescos, para obtener un extracto rico en compuestos polifenólicos.

10 En particular, la invención tiene por objeto un procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación de compuestos polifenólicos, en el que la purificación se realiza mediante la adsorción de los compuestos polifenólicos en una resina adsorbente, seguida por la elución de los compuestos retenidos en la resina.

15 Por extracto rico en compuestos polifenólicos se entiende, en el sentido de la presente solicitud, un producto que tiene un contenido mínimo de compuestos polifenólicos igual o superior a 30% con respecto al peso seco.

Por purificación se entiende, en el sentido de la presente solicitud, la recuperación o la selección de los compuestos fenólicos extraídos.

20 Los procedimientos de extracción y de purificación de compuestos polifenólicos contenidos en unos materiales vegetales que usan una resina adsorbente se conocen en la técnica anterior.

La patente US nº 5.994.413 se refiere a un procedimiento de extracción de compuestos polifenólicos de frutas de rosáceas tales como manzanas, peras, melocotones y frutas relacionadas. Esta patente describe más particularmente un procedimiento de aislamiento y de purificación de compuestos polifenólicos de frutas mediante la extracción del zumo a partir de frutas peladas o no peladas, mediante la trituración de frutas y después la centrifugación y la recuperación, continuando con el paso del zumo así obtenido en una resina capaz de retener selectivamente los compuestos fenólicos, y por último la elución de los polifenoles retenidos en la resina de manera que se obtenga un polvo rico en compuestos polifenólicos. Esta patente menciona varios adsorbentes, tales como las resinas sintéticas de estireno-divinilbenceno, las resinas de intercambio de aniones o también geles de sílice en los que se fijan químicamente los grupos octadecilo, teniendo lugar la elución de los polifenoles adsorbidos en estas resinas añadiendo una solución de alcohol, tal como el etanol.

25 La patente US nº 5.141.611 describe un procedimiento que permite eliminar las sustancias polifenólicas contenidas en una solución, y si es necesario, recuperarlas usando una resina poliamida en la que se adsorben los polifenoles.

La patente US nº 5.856.429 se refiere a un procedimiento de eliminación de los polifenoles a partir de líquidos, en el que los polifenoles se retienen en una resina a base de amida. Esta patente da a conocer asimismo otros tipos de soporte que adsorbe polifenoles tal como el Nylon o la polivinilpolipirrolidona (PVPP).

40 La patente US nº 4.910.182 describe un procedimiento de estabilización de bebidas que contienen polifenoles en el que se usa un soporte adsorbente a base de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Este procedimiento se adapta particularmente a la eliminación de compuestos polifenólicos a partir de cerveza.

45 La patente US nº 4.008.339 se refiere a un procedimiento de eliminación de los polifenoles a partir de bebidas de origen vegetal tales como las cervezas, los vinos y los zumos de frutas que utiliza una resina adsorbente a base de poliamida N-sustituida.

50 Estos procedimientos adolecen sin embargo del inconveniente de utilizar unas resinas que poseen o bien un alto rendimiento de adsorción, o bien un alto rendimiento de elución, pero que no presentan al mismo tiempo un alto rendimiento de adsorción y un alto rendimiento de elución.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es un procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación de compuestos polifenólicos, eliminando los inconvenientes en la técnica anterior.

55 Más particularmente, un objeto de la presente invención es un procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación, que comprende una etapa de extracción de compuestos polifenólicos procedentes de hortalizas de hoja ancha de la familia de las Compuestas o de bulbo de la familia de las Liliáceas o de descartes de selección de vegetales frescos, una etapa de adsorción seguida por una etapa de elución de estos compuestos usando una resina que tiene unas características físicas particulares, que le confieren un alto poder de adsorción de los compuestos polifenólicos y una gran capacidad de elución.

La invención tiene asimismo por objeto un producto rico en compuestos polifenólicos obtenido mediante el procedimiento según la invención.

65 La invención tiene asimismo por objeto la utilización de un producto tal como se ha definido anteriormente en la fabricación de productos cosméticos y/o de compuestos farmacéuticos y/o de ingredientes alimenticios.

ES 2 332 039 T3

Los objetivos de la presente invención se alcanzan por lo tanto mediante un procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación de compuestos polifenólicos procedentes de hortalizas de hoja ancha de la familia de las Compuestas o de bulbo de la familia de las Liliáceas, o de descartes de selección de vegetales frescos, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) extraer los compuestos polifenólicos para obtener un extracto bruto de vegetales,
- b) adsorber en una resina adsorbente los compuestos polifenólicos contenidos en el extracto bruto,
- 10 c) eluir los compuestos polifenólicos retenidos en la resina para obtener un extracto purificado, y
- d) concentrar, y eventualmente secar el extracto purificado para obtener un producto rico en compuestos polifenólicos.

15 Este procedimiento está caracterizado porque la resina es una resina de estireno-divinilbenceno que presenta las siguientes características físicas:

- 1) unos poros con un tamaño medio comprendido entre 50 y 110 Å, preferentemente entre 60 y 100 Å,
- 20 2) una superficie específica igual o superior a 800 m²/g, preferentemente igual o superior a 800 m²/g, confiriendo a la resina un poder de adsorción elevado de las partículas orgánicas,
- 3) un volumen de poros superior a 1 ml/g, y preferentemente igual o superior a 1,4 ml/g.

25 Preferentemente, la resina según la invención presenta las siguientes características físicas:

- 1) unos poros con un tamaño medio comprendido entre 80 y 110 Å, preferentemente entre 88 y 92 Å, y mejor de aproximadamente de 90 Å,
- 30 2) una superficie específica igual o superior a 1.000 m²/g, preferentemente igual a o superior a 1.200 m²/g,
- 3) un volumen de poros igual o superior a 2 ml/g, y preferentemente igual o superior a 2,4 ml/g.

35 La distribución de los poros en función de su tamaño se muestra en la figura 1, para dos resinas según la invención.

Las resinas según la invención adsorben los compuestos polifenólicos contenidos en los vegetales, pero no muestran o muestran poca afinidad con una gama completa de moléculas y solutos contenidos asimismo en estos mismos vegetales que son eliminados parcialmente, tal como las sales disueltas, los azúcares, los polisíidos, los cationes, los aniones, los nitratos y los nitritos.

Los vegetales son generalmente plantas o frutas. En particular, en el caso de la presente solicitud, los compuestos polifenólicos están contenidos en los tejidos vegetales de hortalizas.

45 Por hortalizas se entiende cualquier planta o vegetal que se utiliza en cocina.

Las hortalizas particularmente preferidas son las hortalizas de hoja ancha de la familia de las Compuestas y las hortalizas de bulbo de la familia de las Liliáceas.

50 Como ejemplos de plantas de la familia de las Compuestas, se pueden citar la lechuga, la endibia y en particular la escarola y la escarola rizada.

Entre las diversas variedades de lechuga, se citarán por ejemplo, la lechuga romana, la batavia, la lechuga iceberg, etc.

55 Como ejemplos de plantas de bulbo de la familia de las Liliáceas se pueden citar la cebolla, el ajo, el puerro y la chalota.

Una vez fijadas selectivamente, las moléculas a valorar, es decir, los compuestos polifenólicos, se eluyen con un solvente, preferentemente alimenticio.

Por solvente alimenticio se entiende, en el sentido de la presente solicitud, cualquier solvente adaptado para la preparación de productos destinados a la alimentación humana o animal.

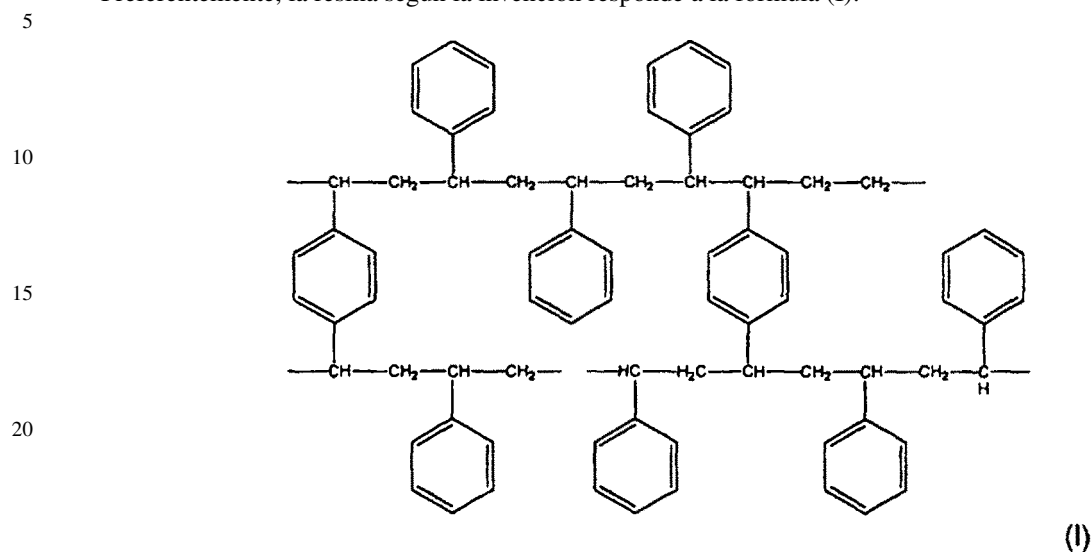
65 Preferentemente, el solvente alimenticio es el etanol o el metanol.

La elución debe ser fácil, rápida y tan completa como sea posible para no diluir el extracto y consecuentemente, el rendimiento global del procedimiento.

ES 2 332 039 T3

El extracto purificado, o eluado, generalmente se concentra y se obtiene un producto rico en compuestos polifenólicos, pudiendo el extracto secarse por atomización o secarse por liofilización.

Preferentemente, la resina según la invención responde a la formula (I):



A título de ilustración de resina según la invención, se citarán las resinas de estireno-divinilbenceno comercializadas por la compañía RESINDION con las denominaciones comerciales SP70 y SP700.

Las resinas adsorbentes según la invención son muy selectivas frente a los compuestos polifenólicos y tienen una gran capacidad de elución con unos solventes alimenticios tales como el metanol o el etanol.

En particular, el índice de adsorción de los compuestos polifenólicos en la resina es igual o superior a 80% y el índice de elución de los compuestos polifenólicos es igual o superior a 60%.

Se entiende por índice de adsorción de los compuestos polifenólicos, la relación entre la cantidad de compuestos polifenólicos fijados en la resina y la cantidad de compuestos polifenólicos contenida en el extracto bruto.

Asimismo, se entiende por índice de elución, el rendimiento global del procedimiento, es decir, la relación entre la cantidad de compuestos polifenólicos contenidos en el extracto purificado (o eluado) y la cantidad de compuestos polifenólicos contenida en el extracto bruto.

La extracción de los compuestos fenólicos comprende generalmente un calentamiento rápido de la planta desde una temperatura ambiente de 25°C hasta una temperatura que puede alcanzar 105°C, para obtener un zumo de exudación caliente y un mosto de plantas cocidas exudadas enfriadas, constituyendo el zumo de la exudación por lo menos parcialmente el extracto bruto.

El calentamiento rápido se lleva a cabo preferentemente en ausencia del oxígeno del aire para el bloqueo de las actividades enzimáticas y la protección de los materiales vegetales tratados contra las eventuales degradaciones hidrolíticas u oxidativas.

Ventajosamente, el calentamiento se lleva a cabo de uno a quince minutos sin maceración.

Para favorecer la extracción, es decir, para obtener una mayor cantidad de compuestos polifenólicos en los extractos brutos, respetando al mismo tiempo la calidad de los compuestos extraídos, el calentamiento rápido puede estar seguido por una etapa de puesta bajo vacío sustancialmente inmediata de la planta, provocando la vaporización de parte de la planta, realizándose esta etapa a una presión comprendida entre 10^3 y 2×10^4 Pa.

La puesta bajo vacío es necesaria cuando los compuestos polifenólicos están contenidos en hortalizas que pertenecen a la familia de las Liliáceas, en particular la cebolla, para las cuales la extracción de los compuestos polifenólicos resulta difícil.

Por el contrario, cuando las plantas son de la familia de las Compuestas y en particular lechugas, la etapa de puesta bajo vacío es útil pero no necesaria.

La extracción de los compuestos polifenólicos, en particular las etapas calentamiento rápido y de puesta bajo vacío del material vegetal, se han descrito ampliamente en la patente europea EP-0 728 189 y en la patente francesa FR-9313286.

ES 2 332 039 T3

Se pueden utilizar varios modos de calentamiento. Preferentemente, el calentamiento de las plantas se realiza haciendo circular, sobre las plantas, zumo procedente de las plantas tratadas, o vapor.

Se pueden utilizar asimismo otros procedimientos, continuos o discontinuos. Se citarán por ejemplo el calentamiento por microondas, el calentamiento por inducción, el calentamiento óhmico, el calentamiento discontinuo en cuba o el calentamiento a partir de un intercambiador térmico.

Como ejemplos de intercambiadores térmicos, se pueden citar por ejemplo, los intercambiadores tubulares o de placas, los intercambiadores de superficie rascada que permiten un suministro directo de calorías a las plantas, los intercambiadores Corugais y los intercambiadores coaxiales.

El extracto purificado puede ser usado en forma líquida o seca, pero se usa preferentemente en forma seca.

Según la invención, el extracto purificado puede secarse por atomización o por liofilización.

Según la invención, el extracto purificado tiene un contenido en compuestos polifenólicos igual o superior a 30%.

Si las hortalizas de las que se extraen los extractos polifenólicos son lechugas, los flavonoles representan como máximo 25% de los compuestos polifenólicos y los ésteres de ácidos hidroxycinnámicos representan por lo menos 50% de los compuestos polifenólicos, con respecto al peso total del extracto purificado seco.

Los ésteres de ácidos hidroxycinnámicos son en particular unos derivados del ácido cafeico que comprenden los ésteres del ácido tártrico con ácido monocateoiltártrico, los isómeros del ácido dicafeoil tártrico, el ácido 5'-cafeoilquínico (o ácido clorogénico), el ácido 3'-5'-dicafeoilquínico (o ácido isoclorogénico), el ácido cafeoil málico y el ácido feruloilquínico.

Los flavonoles comprenden el kaempferol-3-glucósido (kaempferol o luteolina), el kaempferol-3-glucurónido, el kaempferol-3-O-malonilglucósido, la quercetina-3-glucurónido, la quercetina-3-O-malonilglucósido y los derivados de kaempferol-malonilglucósido.

Por el contrario, si las hortalizas son unas cebollas, los flavonoles representan por lo menos 90% de los compuestos polifenólicos con respecto al peso total del extracto purificado seco.

Comprenden en particular la quercetina-3,4'-diglucósido, la quercetina-4'-monoglucósido, la quercetina, la isorhamnetina-3,4'-diglucósido y la isorhamnetina-4'-monoglucósido.

Las propiedades antirradicalarias de los extractos purificados de lechugas y de cebolla se evalúan por su capacidad para neutralizar el radical DDPH[•], según el método descrito en el artículo de P. Goupy, M. Hugues, P. Boivin y M.J. Amiot, Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79, paginas 1625-1634.

La actividad antirradicalaria se define como la relación $1/IC_{50}$, en la que IC_{50} se define como la cantidad de producto purificado necesario para la reducción en un 50% de la cantidad de DDPH[•] presente a una concentración inicial de $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Cuanto más elevada es la relación $1/IC_{50}$, más importante es la actividad antirradicalaria del extracto.

Según la invención, el extracto de lechugas tiene una actividad antirradicalaria definida por una relación $1/IC_{50}$ igual o superior a 0,2 y el extracto de cebollas tiene una actividad antirradicalaria definida por una relación $1/IC_{50}$ igual o superior a 0,12 para un contenido de compuestos polifenólicos igual o superior a 30%.

Los productos obtenidos según la invención se pueden usar para la fabricación de productos cosméticos, y/o de compuestos farmacéuticos, y/o de ingredientes alimenticios.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar por ello su el alcance.

En los ejemplos, a menos que se especifique lo contrario, todas las cantidades se expresan en fracción másica con respecto a la cantidad de compuestos polifenólicos contenidos en un extracto bruto.

1. Materias primas

Extracción de compuestos polifenólicos contenidos en las lechugas y las cebollas

Se han preparado unos extractos de lechugas y de cebollas durante la etapa de extracción del procedimiento según la invención, que se describe en la patente europea EP-0 728 189 y en la patente francesa FR-9313286.

La figura 2 representa un dispositivo para la realización de este procedimiento.

ES 2 332 039 T3

El material tratado mediante este procedimiento de extracción está constituido por descartes de selección de lechugas o de cebollas.

El procedimiento se puede aplicar a unos descartes de selección de vegetales frescos de cualquier naturaleza.

En el procedimiento mostrado en la figura 2, los descartes de selección de vegetales frescos (o material vegetal) son conducidos a una cámara de calentamiento 4.

El calentamiento del material vegetal se lleva a cabo a una temperatura controlada de una manera precisa dentro del intervalo de temperatura comprendido entre 25 y 105°C, evitando la presencia de aire que podría provocar degradaciones oxidativas.

El calentamiento del material vegetal en la cámara de calentamiento 4 puede llevarse a cabo usando cualquier medio apropiado. Por ejemplo, se puede introducir en la cámara 4 vapor condensante biológico emitido a partir de zumo o de condensados procedentes del procedimiento. Este vapor se emite a partir del dispositivo 5, mediante unos conductos 6.

Los condensados y los zumos de escurrido o de exudación se recuperan de la cámara de calentamiento 4 y se envían, mediante unos conductos 3 y 4 y una bomba P1, a un intercambiador 8. Se puede prever asimismo transferir zumo procedente de la prensa (referencia 22) al intercambiador 8. Esta variante no se muestra en la figura 2.

El conducto 3 se conecta preferentemente al conducto 26 por medio de una válvula V3. así, cuando los conductos 7 transportan condensados y zumos en cantidad suficiente, la válvula V3 se abre y los condensados y los zumos del conducto 3 se transfieren directamente a la cámara de expansión 14. Esto permite obtener un mejor rendimiento energético en la medida en que los condensados y los zumos transportados por el conducto 8 están más fríos que los de los conductos 7. En caso contrario, la válvula V3 se cierra y el conjunto de los condensados y de los zumos recuperados en los conductos 3 y 7 se envía al intercambiador 8.

Un generador de vapor 9 se conecta al intercambiador 8 que es, preferentemente, un intercambiador de superficie rascada que transmite vapor al dispositivo 5 mediante unos medios apropiados 10.

Este dispositivo permite evitar el calentamiento mediante un vapor de agua exógeno que procede directamente de calderas.

La duración del calentamiento puede regularse de tal manera que es posible calentar o bien la totalidad de los vegetales, o bien la película de estos vegetales, en particular en el caso de las cebollas, o bien también una parte periférica de estos mismos vegetales. Esto permite controlar el nivel de extracción de los diferentes compuestos polifenólicos presentes en estos materiales vegetales.

La duración de calentamiento es relativamente corta. Es inferior a 5 minutos y preferentemente es igual a aproximadamente 3 minutos en el caso de la extracción de compuestos polifenólicos contenidos en lechugas. En el caso de la extracción de compuestos polifenólicos de la cebolla, la duración de calentamiento es inferior a 15 minutos, y preferentemente es igual a aproximadamente 10 minutos.

El material vegetal se calienta a una temperatura desde una temperatura ambiente de 25°C hasta una temperatura que puede alcanzar 105°C, según la naturaleza de los vegetales: para las lechugas y las cebollas, la temperatura de calentamiento es preferentemente superior o igual a 90°C.

Según la figura 2, el material vegetal se transfiere desde la entrada de la cámara de calentamiento 4 hasta la salida 12, por medio de tornillos, que presenta unas artesas perforadas que están destinadas a recibir una cantidad determinada de material. Los tornillos giran alrededor de un eje 13. La velocidad de rotación, la altura de la capa regulable, la longitud de los tornillos así como la anchura de banda de calentamiento, definen el caudal y el tiempo de estancia de los productos calentados.

El material vegetal calentado se transfiere desde la salida 12 de la cámara de calentamiento 4 hasta una cámara de expansión 14 por medio de un conducto 15. Este está equipado con una esclusa o una bomba 16, preferentemente substancialmente estanca, de manera que se eviten fugas de vapor.

La cámara de expansión 14 está conectada mediante unos medios apropiados 17 a un condensador 18 que está conectado a su vez a un dispositivo de vacío 19.

El material precalentado se dispone bajo vacío substancialmente de inmediato. La presión en el interior de la cámara de expansión 14 está comprendida 10^3 y 2×10^4 Pa absolutos. El valor de la presión se selecciona en función de la naturaleza de los vegetales. Así, en el caso de los compuestos polifenólicos extraídos de cebollas, la presión absoluta en la cámara de expansión es 12×10^3 Pa absolutos, mientras que es ventajoso usar una presión relativamente inferior, de aproximadamente 6×10^3 Pa absolutos en el caso de compuestos polifenólicos extraídos de lechugas.

El vacío en la cámara 14 se obtiene mediante la condensación de los vapores emitidos a través del condensador 18.

ES 2 332 039 T3

Esta puesta bajo vacío muy rápida provoca una auto-evaporación de las fracciones líquidas del material vegetal que destruye el material vegetal calentado previamente. Esto permite incrementar la puesta en solución de diferentes compuestos y en particular los compuestos polifenólicos.

5 Este efecto es más importante por cuanto que la diferencia entre la temperatura de calentamiento del material vegetal y la provocada por la puesta bajo vacío también es importante.

10 El material vegetal tratado se evacua a continuación de la cámara de expansión 14 mediante unos medios apropiados 20. El producto que sale de la cámara de expansión 14 es un puré de material vegetal.

Se deberá observar que este puré sale de la cámara de expansión 14 a una temperatura relativamente baja, del orden de 20 a 25°C, cuando el vacío presente en esta cámara es acusado (del orden de 2×10^3 Pa absolutos) y el material del vegetal ha sido calentado a una temperatura apropiada.

15 Se puede dejar que el puré se difunda.

El puré se prensa generalmente en el dispositivo 21, de manera que se obtenga un zumo, también denominado zumo bruto de prensado que fluye por el conducto 22.

20 Se recupera el puré prensado en 24, que constituye entonces una torta de prensa de material vegetal.

Si se desea obtener únicamente un zumo a partir del puré, se recupera el conjunto del zumo obtenido mediante el procedimiento.

25 Si se desea obtener un zumo fermentado (en el caso de cebollas por ejemplo), se procede a la fermentación del puré que procede de la cámara de expansión 14, después del tratamiento con levaduras y enzimas de este puré.

Se deberá observar asimismo que el zumo obtenido a la salida del intercambiador 8 se transfiere a la cámara de expansión 14, por medio del conducto 26 y de la bomba P2.

30 El vapor emitido durante la puesta bajo vacío se recupera, a la salida del condensador 18, en forma de condensados aromáticos. Estos pueden ser transferidos del condensador 18 hacia la cámara de expansión 14, estando entonces la válvula V1 abierta y la válvula V2 cerrada, lo cual permite restituir un puré con un peso idéntico al de la materia prima vegetal. Se puede prever asimismo transferir los condensados presentes en el condensador 18 hacia el exterior del dispositivo, por medio de la bomba P3. En este caso, la válvula V1 se cierra y la válvula V2 se abre. Esta variante del procedimiento permite realizar una pre-concentración controlable del puré.

En esta variante, los condensados aromáticos pueden ser tratados para concentrar los aromas y separar el agua.

40 El zumo bruto de prensado y el zumo de exudación, que contienen los compuestos polifenólicos a valorar, se reúnen para constituir el zumo bruto o el extracto bruto de vegetales.

Cuando el procedimiento según la invención se lleva a cabo con el dispositivo mostrado en la figura 2, la materia prima se trata de forma continua.

45 El procedimiento que acaba de ser descrito permite obtener unos extractos brutos de vegetales cuyos compuestos polifenólicos se fraccionan y purifican usando una resina de alto rendimiento de elución y de adsorción.

50 2. Métodos de medición

La resina R usada en el procedimiento según la invención es una resina de estireno-divinilbenceno que responde a la fórmula (I) y cuyas características físicas se reúnen en la tabla 1.

55 TABLA 1

Características físicas	Resina R
Tamaño medio de los poros (Å)	90
superficie específica (m ² /g)	1200
volumen de los poros (ml/g)	2,4

65

ES 2 332 039 T3

Cuantificación de los compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos se analizan mediante HPLC y se cuantifican mediante un patrón externo.

5 Para los extractos de lechugas, los diferentes contenidos se expresan en gramos equivalentes de ácido clorogénico para los ésteres de ácidos hidroxycinnámicos (EAC) y en gramos equivalentes de quercetina para los flavonoles (EQ).

10 Para los extractos de cebollas, los contenidos se expresan en equivalentes de quercetina-4'-monoglucósido, o en equivalentes de quercetina-3,4-diglucósido para los compuestos identificados como tales, o en equivalentes de quercetina para los demás flavonoles.

Este método tiene la ventaja, además de cuantificar cada compuesto presente en el extracto o en la solución analizada, de verificar la presencia de todos los compuestos polifenólicos.

15 La cuantificación se lleva a cabo mediante:

- los extractos brutos depositados en las resinas,
- las soluciones eluidas durante la carga y el aclarado con agua de la resina que precede a la elución propiamente dicha, para verificar la pérdida de compuestos polifenólicos durante esta etapa,
- los compuestos polifenólicos adsorbidos en la resina, y
- los extractos purificados.

25 La relación entre la cantidad de compuestos fenólicos adsorbidos en la resina R y la cantidad de compuestos polifenólicos contenidos en el extracto bruto depositado en la resina, representa el índice T_A de adsorción de compuestos fenólicos en la resina.

30 Asimismo, la relación entre la cantidad de compuestos polifenólicos contenidos en el extracto purificado y la cantidad de compuestos polifenólicos contenidos en el extracto bruto, representa el índice T_E de compuestos polifenólicos recuperados después de la elución con metanol. Esta relación representa de hecho el rendimiento total del método de purificación.

35 Por último, el índice T_{NE} de los compuestos polifenólicos no evaluables y que se fijan en la resina es la relación entre la cantidad de compuestos polifenólicos adsorbidos en la resina y no eluidos durante la etapa de elución con metanol o eluidos durante el aclarado con agua o durante la carga, y la cantidad de compuestos polifenólicos contenidos en el extracto depositado en la resina.

40 El índice T_A de adsorción en la resina de compuestos polifenólicos es la suma de los índices T_E y T_{NE} .

Ejemplo 1

45 *Purificación de extractos de lechugas*

Los extractos brutos de lechugas se han purificado usando respectivamente el procedimiento según la invención.

50 Los extractos brutos de lechugas se depositan en la resina R (carga). El volumen de resina usado es 25 ml, es decir, 1 BV (Bed Volume). Después de un aclarado con agua con un volumen de agua de 125 ml (es decir, 5 BV), los compuestos polifenólicos se eluyen con 80 ml de metanol, es decir, 3,2 BV. Se obtiene un extracto purificado EP.

55 La solución eluida durante la carga y la eluida durante el aclarado con agua de la resina se reúnen y se llevan a un volumen de 350 ml, de la cual se analizan asimismo la naturaleza y la cantidad de compuestos polifenólicos, para cuantificar la pérdida de compuestos polifenólicos durante esta etapa.

Se mide la cantidad de compuestos polifenólicos contenidos en el extracto purificado EP. Esta medición se muestra en la figura 3.

60 La figura 3 muestra que el extracto bruto depositado contiene 317 mg de compuestos polifenólicos y el extracto purificado EP contiene 199 mg de compuestos fenólicos. No se observa ninguna diferencia cualitativa entre el extracto depositado y el extracto purificado: estos extractos contienen ácidos hidroxycinnámicos y flavonoles.

65 Los valores obtenidos de los índices T_A , T_E y T_{NE} así como la cantidad de compuestos polifenólicos fijados por ml de resina se muestran en la Tabla 2.

ES 2 332 039 T3

TABLA 2

		Resina R
5	T_A [%]	87
	T_E [%]	63
	T_{NE} [%]	24
10	Cantidad de polifenoles fijados en la resina [mg/ml de resina]	11,1

Ejemplo 2

15 *Purificación de extractos de cebollas*

Los extractos brutos de cebollas se depositan en al resina R. Después de un aclarado con agua (125 ml, es decir 5 BV), los compuestos se eluyen con 100 ml de metanol (es decir, 4 BV). Se obtiene un extracto purificado EP.

20 Las soluciones eluidas durante la carga y el aclarado con agua de las resinas se reúnen y se llevan a un volumen de 300 ml, para cuantificar la pérdida de compuestos polifenólicos durante esta etapa.

25 La figura 4 muestra que el extracto depositado contiene 494 mg de compuestos fenólicos y el extracto purificado EP contiene 499 mg de compuestos fenólicos. No se observa ninguna diferencia cualitativa entre el extracto depositado y el extracto purificado EP de la cebolla, que contienen más de 95% de los flavonoles derivados de la quercetina, que comprenden los siguientes compuestos: quercetina, monoglucósido de quercetina y diglucósido de quercetina entre otros.

30 Los valores obtenidos de los índices T_A , T_E y T_{NE} así como la cantidad de flavonoles fijados por ml de resina se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

		EP
35	T_A [%]	99
	T_E [%]	91
40	T_{NE} [%]	9
	Cantidad de flavonoles fijados en la resina [mg/ml de resina]	19,6

45 La tabla 3 muestra que el índice de flavonoles adsorbidos en la resina R según la invención y recuperados después de la elución con metanol es elevada: 91% de los compuestos son retenidos en el adsorbente y eluidos por el metanol.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de extracción, de fraccionamiento y de purificación de compuestos polifenólicos procedentes de hortalizas de hoja ancha de la familia de las Compuestas o de bulbo de la familia de las Liliáceas o de descartes de selección de vegetales frescos, que comprende las siguientes etapas:

- a) extraer los compuestos polifenólicos para obtener un extracto bruto de vegetales,
- b) adsorber en una resina adsorbente los compuestos polifenólicos contenidos en el extracto bruto,
- c) eluir los compuestos polifenólicos retenidos en la resina para obtener un extracto purificado, y
- d) concentrar, y después secar eventualmente el extracto purificado para obtener un producto rico en compuestos polifenólicos,

caracterizado porque la resina es una resina de estireno-divinilbenceno que presenta las siguientes características físicas:

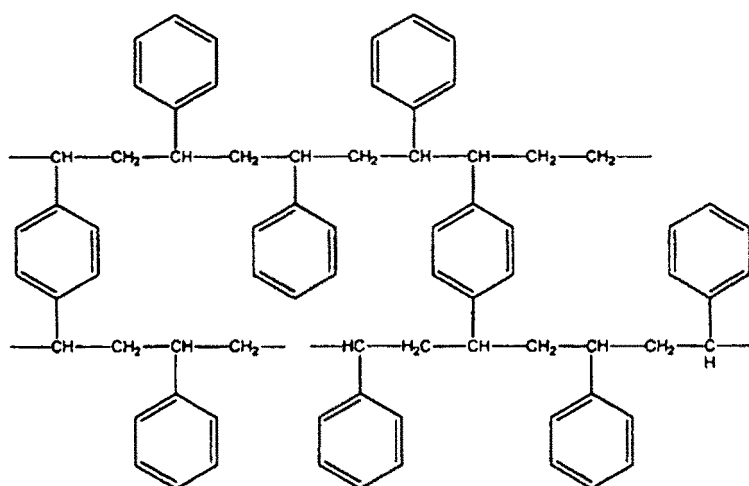
- 1) unos poros con un tamaño medio comprendido entre 50 y 110 Å, preferentemente entre 60 y 100 Å,
- 2) una superficie específica igual o superior a 800 m²/g, preferentemente igual o superior a 880 m²/g,
- 3) un volumen de poros superior a 1 ml/g, y preferentemente igual o superior a 1,4 ml/g.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la resina presenta las siguientes características físicas:

- 1) unos poros con un tamaño medio comprendido entre 80 y 110 Å, preferentemente entre 88 y 92 Å, y mejor de aproximadamente 90 Å,
- 2) una superficie específica igual o superior a 1.000 m²/g, preferentemente igual o superior a 1.200 m²/g, y
- 3) un volumen de poros igual o superior a 2 ml/g, y preferentemente igual o superior a 2,4 ml/g.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el índice de adsorción de los compuestos polifenólicos en la resina, es igual o superior a el 80% y el índice de elución es igual o superior a 60%.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la resina responde a la formula (I):



(I)

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la etapa (a) de extracción comprende una etapa de calentamiento rápido de la planta desde una temperatura ambiente de 25°C hasta una temperatura de 105°C para obtener un zumo de exudación caliente y un mosto de plantas cocidas exudadas enfriadas, constituyendo el zumo de exudación por lo menos parcialmente el extracto bruto.

ES 2 332 039 T3

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el calentamiento se lleva a cabo en menos de quince minutos, sin maceración.

5 7. Procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, **caracterizado** porque el calentamiento se lleva a cabo en ausencia del oxígeno del aire para proteger así los materiales vegetales contra eventuales degradaciones oxidativas.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado** porque la etapa de extracción comprende una puesta bajo vacío, provocando la vaporización de una parte de la planta, siendo esta etapa realizada después de la etapa de calentamiento a una presión comprendida entre 10^3 y 2×10^4 Pa absolutos.

10 9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque los vapores emitidos por las plantas durante la puesta bajo vacío se condensan.

15 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el calentamiento se lleva a cabo por medio de un vapor condensante.

20 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el calentamiento se lleva a cabo haciendo circular, sobre las plantas, zumo procedente de las plantas tratadas o vapor condensado emitido durante la puesta bajo vacío.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque el calentamiento se lleva a cabo mediante aportación directa de calorías a las plantas a partir de un intercambiador apropiado, en particular de un intercambiador de superficie rascada.

25 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la etapa de extracción se lleva a cabo de modo continuo o discontinuo.

30 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la etapa (b) de elución usa un eluyente seleccionado de entre los solventes alimenticios, y preferentemente el metanol o el etanol.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el extracto purificado se usa en forma líquida.

35 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque el extracto purificado se usa en forma seca.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el extracto purificado se seca por atomización.

40 18. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque el extracto purificado se seca por liofilización.

19. Procedimiento según una de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado** porque el extracto se presenta en forma de un polvo, de gránulos o de bolas.

45 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el extracto purificado tiene un contenido en compuestos polifenólicos igual o superior a 30%.

50 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las hortalizas de hoja ancha de la familia de las Compuestas se seleccionan de entre la lechuga, la endibia, la endibia rizada y la escarola y los descartes de selección de estas plantas.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, **caracterizado** porque las hortalizas de hoja ancha son unas lechugas, preferentemente seleccionadas de entre la lechuga romana, la batavia y la lechuga iceberg.

55 23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado** porque las hortalizas de bulbo de la familia de las Liliáceas se seleccionan de entre la cebolla, el ajo, el puerro y la chalota y los descartes de selección de estas plantas.

60 24. Extracto de lechugas obtenido mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 23 y que presenta un contenido en compuestos polifenólicos igual o superior a 30%, **caracterizado** porque los flavonoles representan como máximo 25% de los compuestos polifenólicos y los ésteres de ácidos hidroxicinnámicos por lo menos 50% de los compuestos polifenólicos, con respecto al peso total del extracto purificado seco.

65 25. Extracto según la reivindicación 24, **caracterizado** porque los ésteres de ácidos hidroxicinnámicos son unos derivados del ácido cafeico que comprenden los ésteres del ácido tártrico con el ácido monocateoiltártrico, los isómeros de ácido dicafeoil tártrico, el ácido 5'-cafeoilquinico (o ácido clorogénico), el ácido 3'-5'-dicafeoilquinico (o ácido isoclorogénico), el ácido cafeoilmálico y el ácido feruloilquinico.

ES 2 332 039 T3

26. Extracto según la reivindicación 24, **caracterizado** porque los flavonoles comprenden kaempferol-3-glucósido (kaempferol o luteolina), kaempferol-3-glucurónido, kaempferol-3-O-malonilglucósido, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3-O-malonilglucósido y derivados de kaempferol-malonilglucósido.
- 5 27. Extracto según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, **caracterizado** porque tiene una actividad antirradicalaria definida por una relación $1/IC_{50}$ igual o superior a 0,2 para un contenido en compuestos polifenólicos igual o superior a 30%, en la que el IC_{50} es la cantidad de producto purificado necesario para la reducción en un 50% de la cantidad de DDPH• presente a una concentración inicial de $6 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- 10 28. Extracto de cebollas obtenido mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 23 y que presenta un contenido en compuestos polifenólicos igual o superior a 30%, **caracterizado** porque los flavonoles representan por lo menos 80% de los compuestos polifenólicos con respecto al peso total del extracto purificado seco.
- 15 29. Extracto según la reivindicación 28, **caracterizado** porque los flavonoles comprenden quercetina-3,4'-diglucósido, quercetina-4'-monoglucósido, quercetina, isorhamnetina-3,4'-diglucósido e isorhamnetina-4'-monoglucósido.
- 20 30. Extracto según la reivindicación 28 ó 29, **caracterizado** porque tiene una actividad antirradicalaria definida por una relación $1/IC_{50}$ igual o superior a 0,12 para un contenido en flavonoles igual o superior a 30%, en la que el IC_{50} es la cantidad de producto purificado necesario para la reducción en un 50% de la cantidad de DDPH• presente a una concentración inicial de $6 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- 25 31. Utilización de un extracto purificado a partir de lechugas o de cebollas o de descartes de selección de éstos tal como se ha definido según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30 para la fabricación de productos cosméticos, de ingredientes alimenticios, o de compuestos farmacéuticos.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

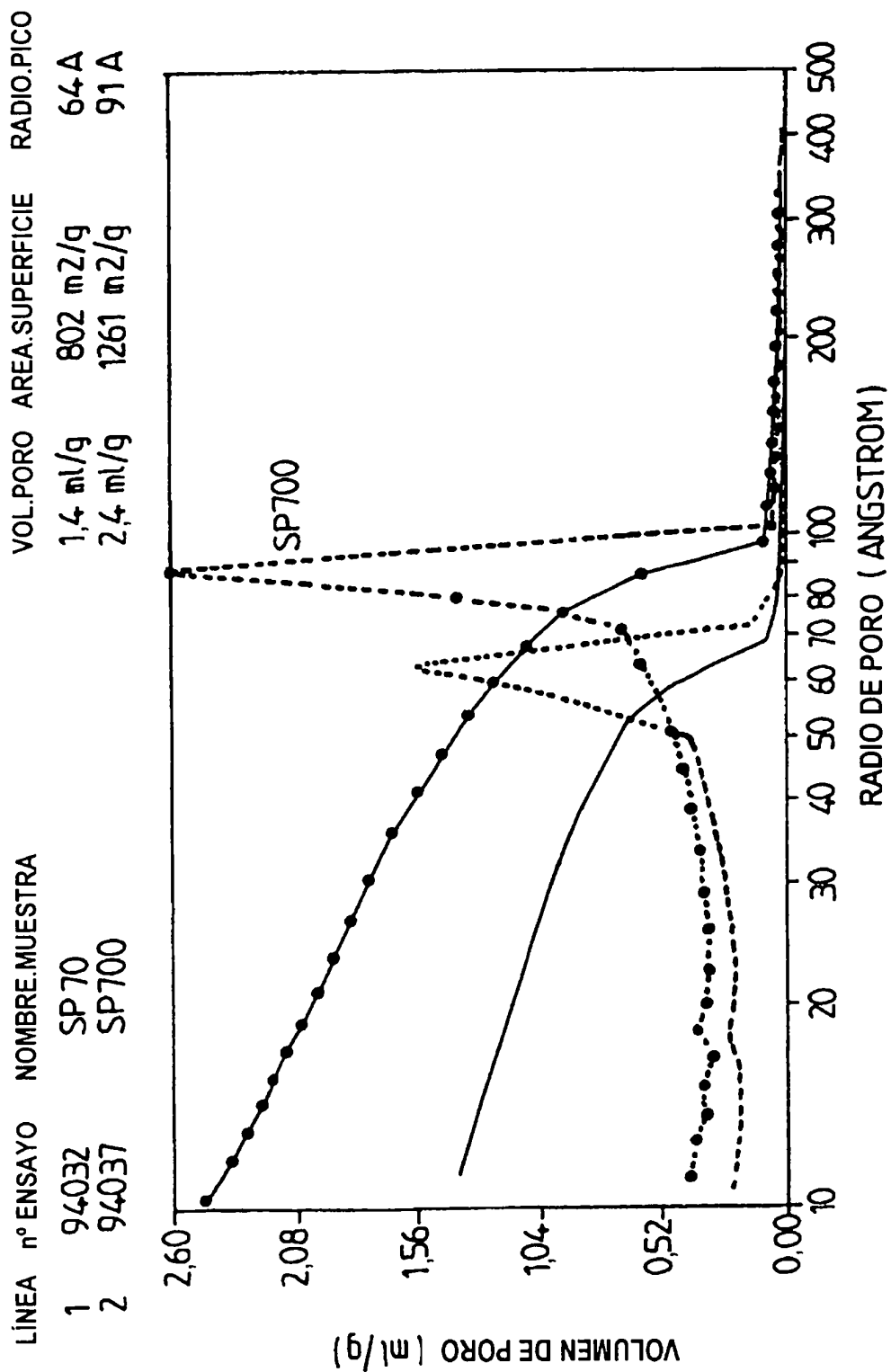


FIG.1

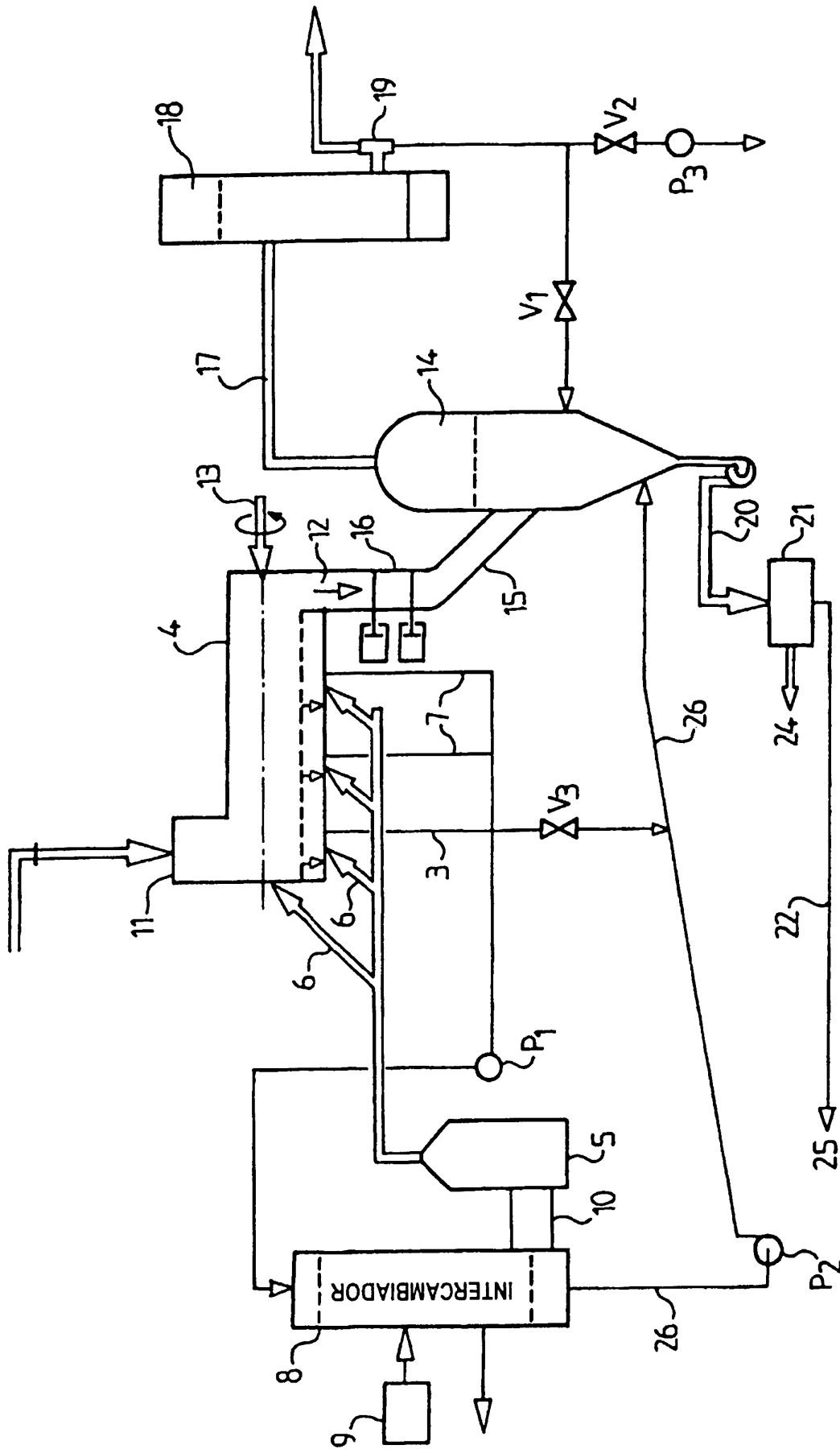


FIG. 2

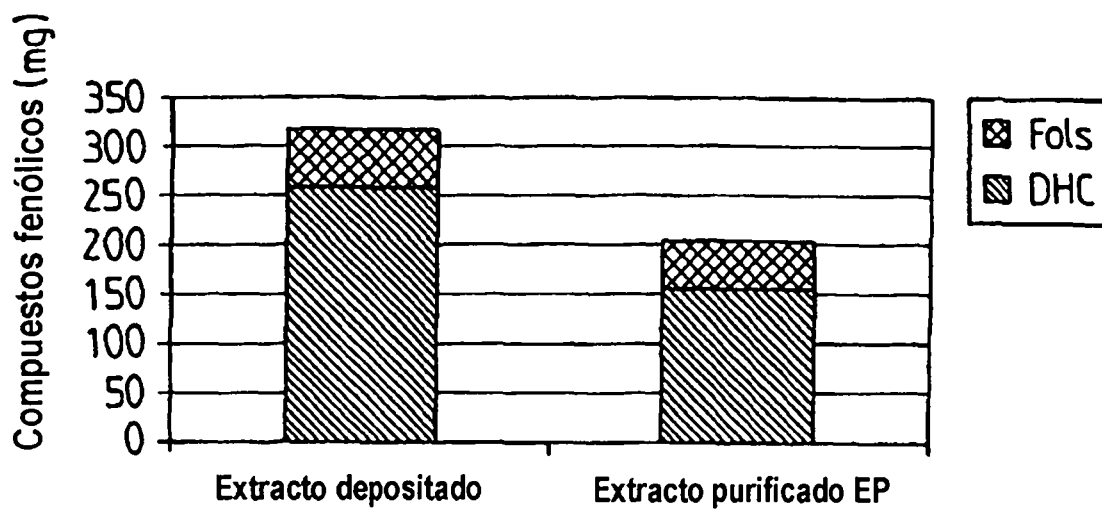


FIG.3

DHC : derivados hidroxicinnámicos; Fols.: flavonoles

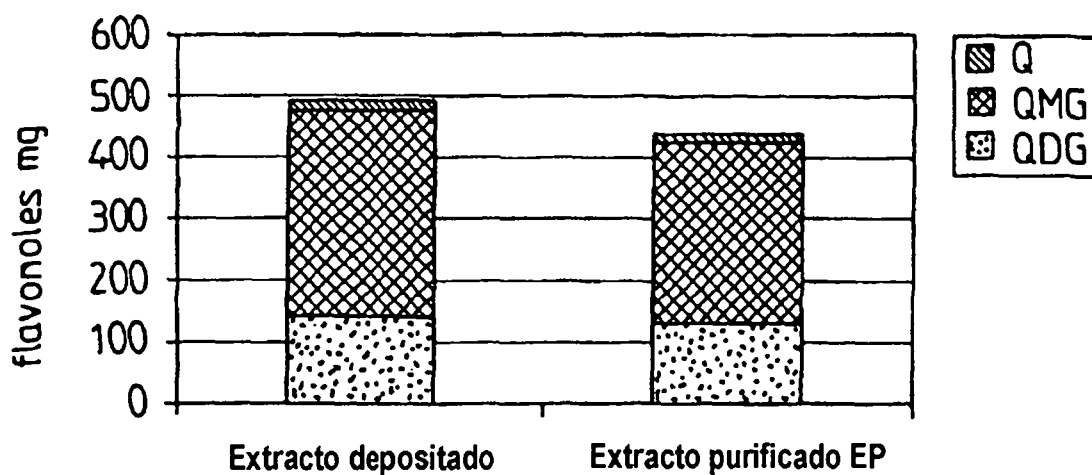


FIG.4

Q : quercetina; QMG: quercetina monoglucósido; QDG: quercetina diglucósido