(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 385 559**

(21) Número de solicitud: 201100028

(51) Int. CI.:

A23L 1/22 (2006.01)
A23L 1/236 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación:

30.12.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

26.07.2012

Fecha de la concesión:

19.03.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

02.04.2013

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES

(72) Inventor/es:

GARCIA-GRANADOS LOPEZ DE HIERRO, Andres;
ROSUA CAMPOS , Jose Luis;
MARTINEZ RODRIGUEZ , Antonio y
SERRANO BERNARDO, Francisco

(54) Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE STEVIOSIDOS ORGANICOS A PARTIR DE STEVIA**

(57) Resumen:

Procedimiento de obtención de esteviosidos orgánicos a partir de de stevia.

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción depurativa de esteviósidos naturales contenidos en plantas del género Stevia, principalmente en sus partes aéreas, que emplea bicarbonato de calcio en la extracción o en la depuración posterior. La extracción y depuración parcial de los esteviósidos, o lo que es lo mismo, la obtención de esteviósidos de la forma más selectiva posible, se consigue en un medio acuoso y condiciones de pH controlado gracias al empleo de un reactor auxiliar de alta eficacia de bicarbonato de calcio y extracción a sobrepresión de anhídrido carbónico y, en ocasiones, con el auxilio de un gas inerte, obteniendo así un tipo de extracto selectivo que reduce y facilita extraordinariamente los subsiguientes procesos usuales de purificación de esteviósidos.

ES 2 385 559 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE ESTEVIOSIDOS ORGÁNICOS A PARTIR DE STEVIA.

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de esteviósidos orgánicos a partir de *Stevia.*

Concretamente, la invención que se presenta es un procedimiento de extracción depurativa de esteviósidos naturales contenidos en plantas del género *Stevia,* principalmente en sus partes aéreas, que emplea bicarbonato de calcio en la extracción o en la depuración posterior. La extracción y depuración parcial de los esteviósidos, o lo que es lo mismo, la obtención de esteviósidos de la forma más selectiva posible, se consigue en un medio acuoso y condiciones de pH controlado gracias al empleo de un reactor auxiliar de alta eficacia de bicarbonato de calcio y extracción a sobrepresión de anhídrido carbónico y, en ocasiones, con el auxilio de un gas inerte, obteniendo así un tipo de extracto selectivo que reduce y facilita extraordinariamente los subsiguientes procesos usuales de purificación de esteviósidos.

El procedimiento sólo emplea productos admitidos por el código alimentario (Carbonato cálcico E-170(I), Bicarbonato cálcico E-170(II) generado "in situ", óxido de calcio (E-529) y ácido fosfórico (E-338)) con objeto de obtener esteviósidos en condiciones ecológicas

Un segundo objeto de la invención es el producto intermedio resultante de esta extracción depurativa obtenido antes del procesado final (decoloración, desionización, concentración y secado). Este producto sería un concentrado más natural de esteviósidos con posible interés comercial.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La demanda mundial de edulcorantes de alta potencia y bajas calorías está aumentando, siendo la mezcla de edulcorantes una práctica habitual. La hierba dulce de Paraguay, *Stevia rebaudiana* Bertoni, produce un edulcorante alternativo, con la

ventaja añadida de que los edulcorantes de la *Stevia* son productos naturales de la planta que tienen como base un diterpeno tetracíclico, esteviol, al que se unen principalmente unidades de glucosa. Sin embargo estas unidades de azúcar se unen al diterpeno bien en forma de éster o bien en forma de betaglicósidos, al igual que en las uniones glicosídicas que ocurren entre ellos, por lo que el ser humano no puede metabolizarlos y por tanto no aportan calorías a la dieta. Además, los glicósidos dulces de esteviol tienen propiedades sensoriales superiores a las de otros muchos edulcorantes potenciales.

Se han caracterizado ocho glucósidos dulces de la *Stevia*. Estos glucósidos se acumulan principalmente en las hojas de *Stevia* constituyendo entre un 10 y un 20% del peso de las hojas, aunque esta concentración, e incluso la composición relativa de las hojas, es muy variable en función del material vegetal utilizado. Sobre la base de peso seco, un perfil típico de los cuatro principales glucósidos que se encuentran en las hojas de Stevia, es el siguiente: el denominado dulcosido constituye el 0,3%, el rebaudiósido C el 0,6%, el rebaudiósido A, el 3,8%, y el esteviósido, un 9,1%. También se han identificado otros glicósidos dentro de la *Stevia* como rebaudiósido B y E, y dulcosides A y B. El rebaudiósido B puede ser un artefacto formado a partir del rebaudiósido A durante la extracción, ya que la saponificación del rebaudiósido A puede dar lugar a este rebaudiósido B. Sin embargo, es habitual la selección genética de la planta para aumentar la proporción de rebaudiósido A, uno de los componentes dulces más apreciados.

Existen publicados decenas de procedimientos, muchos de ellos reiterativos además de obvios, dentro de la práctica habitual de un laboratorio, para la extracción y purificación de los esteviósidos. En general todos ellos pueden ser válidos, pero no todos se pueden calificar de ecológicos y en la mayoría de las redacciones se evita describir la dificultad técnica de utilización desde el punto de vista de la operatividad a escala industrial y de la economía del proceso, cuestiones de tal envergadura en un proceso industrial que son definitivos en la eficacia y la economía y por tanto en la viabilidad real. Por otra parte, ya que el método propuesto sólo utiliza agua como disolvente y procedimientos de eliminación de productos acompañantes exclusivamente mediante productos admitidos en el código alimentario, se centrará la revisión del estado de la técnica en a aquellos procedimientos que puedan encuadrase dentro de este tipo de metodología.

La patente estadounidense, nº 4,892,938 describe un proceso de purificación en la que los extractos acuosos de la planta son depurados por percolación a través de una serie de resinas de intercambio iónico que se seleccionan para eliminar las impurezas diversas. Los glicósidos dulces permanecen en el agua y son recuperados por la evaporación de este solvente. La ventaja es que todo se hace en el agua, mientras que la mayoría de los procesos implican la utilización de un disolvente en algún momento. La desventaja es que el producto final es muy impuro, con sólo el 70% es una mezcla de los glicósidos dulces. El resto es principalmente el material más polar que los glicósidos dulces que se identificaron como una mezcla compleja de polisacáridos (25%) y una pequeña cantidad de material de color amarillo, aceitoso menos polar que los glucósidos dulces (alrededor del 5%). El agotamiento de resinas al tratar directamente los extractos obtenidos dificulta en gran medida el escalado industrial, por lo que se acude a la utilización de enzimas que ayuden a purificaciones previas a las resinas.

Otra patente representativa es la que describe el uso combinado de la microfiltración, la ultrafiltración y la nanofiltración para la purificación del extracto de la *stevia* (US. Pat. N º 5,972,120). El método da un buen resultado, sin embargo, la aplicación de los equipos antes mencionados hace que el producto tenga un costo muy elevado si no se hacen tratamientos previos debidamente seleccionados. Además, el proceso es usualmente técnicamente inviable por el rápido ensuciamiento de las membranas, siendo por tanto muy dependiente del estado en que el extracto llegue a estas membranas. La variante introducida con respecto a otra patente de 1995, con empleo de resinas y membranas (CN 95-102071) es el proceso de nanofiltración, con objeto de concentrar los glicósidos y eliminar productos diferentes a los glicósidos buscados.

Un buen resumen del estado de la técnica viene recogido en la patente WO/2006/038221, en que se describe la utilización de vapor directo para la extracción de hoja de *Stevia* y en publicaciones como "*Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from Stevia rebaudiana: methanol versus wáter*" Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Rep. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2007), 388(8), p. 1847-1857 (donde se describe un procedimiento, sólo a microescala y sin indicar la cantidad de agua empleada, para extraer sólo 500 mg de hoja de *Stevia* dispersada en arena), de extracción a alta presión y temperatura.

Otras patentes como la CN101693047 describen una extracción a muy alta presión, y otra anterior, KR2001-72880, describe un procedimiento en el que se extrae a alta presión y temperatura.

Para la eliminación de sustancias precipitables es muy común el empleo (conocido desde los inicios de la industria azucarera de remolacha y de caña de azúcar) de hidróxido cálcico, siempre posterior al proceso de extracción. Este procedimiento, sin contraindicaciones en el blanqueo de la sacarosa, tiene un alcance limitado en el caso de la *Stevia* ya que una pequeña cantidad de de este hidróxido cálcico eleva extraordinariamente el pH del extracto, pudiendo provocar la saponificación de la unión de tipo éster existente entre el carboxilo de C-19 del steviol y el oxígeno en C-1 de la glucosa así unida en los esteviósidos naturales, a pesar de lo cual su uso es prácticamente general en todos los casos.

Sin embargo, patentes antiguas emplean medios muy básicos para extraer o depurar seguidamente, con las consecuencias de saponificación previsibles, como la patente JP 53091173.

El empleo de productos alternativos al hidróxido cálcico no han dado buenos resultados. Por ejemplo, utilizar carbonato cálcico en el momento de la extracción o inmediata depuración posterior no da resultados adecuados desde el punto de vista de eliminación de sustancias ajenas a los esteviósidos. Por otra parte, el cloruro cálcico, si bien proporciona altas concentraciones de calcio y pH intermedio, es un material que puede acarrear toxicidad y que introduce gran cantidad de cloruros al medio (WO/2006/038221). Otras sales o hidróxidos que se han utilizado son los de hierro o aluminio, pero su uso no se ha extendido por las dificultades que presentan en lo que se refiere a la formación de barros de difícil procesado y a la presencia residual de esos cationes en el producto final.

No se conoce ningún método de extracción de *Stevia* que emplee bicarbonato cálcico en el momento de la extracción o en la depuración posterior.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Representación esquemática del procedimiento en su forma general. S representa la materia prima; RE es el reactor de extracción; RBC el reactor de bicarbonato de calcio, al que se le aporta H_2O, CO_2 y $CACO_3$; D el depósito de tratamiento y P el producto resultante que se tratará en para obtener los esteviósidos deseados.

Figura 2.- Representación esquemática del procedimiento en su forma secundaria en la que se emplea un reactor auxiliar. S representa la materia prima; RE es un reactor al que se le aporta H_2O y en el que se realiza la extracción integral; RD es el reactor de eliminación de impurezas mediante altas concentraciones de bicarbonato de calcio procedente de RBC; RBC, es el reactor de bicarbonato de calcio al que se le aporta H_2O, CO_2 y $CACO_3$; D el depósito de tratamiento posterior y P el producto resultante que se tratará para obtener los esteviósidos deseados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción y depuración realizado sobre material procedente de la *Stevia* que utiliza bicarbonato de calcio. En particular, el procedimiento emplea agua a presión superior a la atmosférica y bicarbonato de calcio generado en un reactor auxiliar y en condiciones de sobrepresión de anhídrido carbónico y/o un gas inerte, en condiciones de pH débilmente ácido.

El procedimiento se puede llevar a cabo, de forma general, utilizando un solo reactor de extracción al que se incorpora la materia prima, agua y el aporte de bicarbonato cálcico (obtenido al mezclar agua y carbonato cálcico bajo una presión de CO2 en otro reactor) en condiciones de sobrepresión de CO2 y, en su caso, con un gas inerte auxiliar. También es posible introducir una fase previa en la que se lleva a cabo una extracción con agua y pH neutro en otro reactor que puede mantenerse presurizado a conveniencia con un gas inerte, antes de incorporar el bicarbonato cálcico al extracto, siempre en condiciones de presión superior a la atmosférica.

A la hora de implementar el procedimiento se llevarán a cabo, al menos, las siguientes etapas:

1. Introducción de la materia prima (preferentemente, partes aéreas de *Stevia*, más preferentemente, hojas secas de *Stevia*) en un reactor capaz de trabajar a sobrepresión y provisto de un dispositivo filtrante (RE) al que se le añade agua que contiene altas concentraciones de bicarbonato de calcio conseguidas en un reactor auxiliar (RBC) y cuya concentración se mantiene mediante aportes controlados de anhídrido carbónico y, opcionalmente, de un gas inerte (preferentemente argón) a presiones superiores a la atmosférica.
2. Calentamiento de la mezcla dentro de reactor (RE) y reposo a temperatura constante si el procedimiento funciona por lotes; o calentamiento de la mezcla dentro del reactor (RE) al que se da entrada y salida con control de presión del medio acuoso extrayente si se está realizando un procedimiento de extracción continua, hasta lograr la depuración de la disolución de esteviósidos
3. Evacuación del filtrado a presión controlada a través de su propio elemento filtrante hacia un deposito de tratamientos (D) en el que se realizarán los siguientes pasos:
    a. Enfriamiento del filtrado
    b. Nuevo filtrado
    c. Acidificación
    d. Filtrado
    e. Etapa opcional de basificación y nueva filtración

La mezcla de los componentes descritos en el reactor va a permitir que exista una gran cantidad de catión calcio en disolución de forma estable y persistente durante el tiempo que dure el proceso y a la temperatura elegida (aunque sea elevada), de forma que el pH estaría controlado por la presión de la atmósfera de anhídrido carbónico, permitiendo así trabajar con alta concentración de calcio pero en unas condiciones de pH que no provoquen la ruptura ni de los grupos funcionales sensibles a los medios ácidos o ni de los sensibles a los medios básicos y sin introducir ningún tipo de anión diferente al sistema en equilibrio bicarbonato/carbonato.

Con este procedimiento se controla además el efecto salino y también se realiza en condiciones de la llamada extracción asistida (ASE) o extracción de alta eficacia con

agua caliente, lo que permite una baja relación de agua/material vegetal, eligiendo a voluntad presión y temperatura de forma que pueda además ejercerse una cierta selectividad en la extracción de los distintos esteviósidos, rebaudiósidos y dulciósidos presentes en la planta a extraer.

Se obtiene así, un extracto selectivo, P, menos coloreado y con una menor cantidad de productos acompañantes. Estas características del extracto facilitan extraordinariamente cualquiera de los procedimientos posteriores hasta la total purificación de los esteviósidos.

Tras la filtración, se acidifica el producto resultante hasta llevar el sistema a pH neutro (o al que se considere conveniente) con ácido fosfórico. Este pH neutro también se puede alcanzar por burbujeo de anhídrido carbónico hasta pH 7. Esta situación de pH también se puede lograr por burbujeo de un gas inerte, preferiblemente argón, en la disolución ácida con objeto de rebajar la cantidad de anhídrido carbónico disuelto en el extracto, desplazando el equilibrio y precipitando también de esta manera la cantidad adecuada de carbonato cálcico y por tanto el ión calcio presente en el medio en forma de bicarbonato.

Aunque la mayoría del calcio soluble se elimina espontáneamente cuando se saca el extracto caliente del reactor y pasa a estar bajo presión atmosférica, y por tanto baja la presión parcial de CO_2, se puede eliminar el exceso de bicarbonato de calcio del medio con la adición de hidróxido cálcico (lechada de cal) hasta pH 8,5 aproximadamente, precipitando carbonato cálcico insoluble que en su precipitación elimina también coloides y otras impurezas. Con esto se evita la saturación prematura de la ulterior utilización de resinas de cambio iónico u otro procedimiento de eliminación de cationes, que se pueda utilizar

Como se ha comentado, el procedimiento puede constar de una etapa previa en la que, se realiza una extracción de la materia prima con agua a pH neutro y posteriormente, tras un filtrado, se introduce el producto resultante en un segundo reactor en el que se trata y depura con agua bicarbonatada cálcica.

Las etapas serían en este caso las siguientes:

1. Extracción del material vegetal en un reactor (RE) utilizando agua, manteniendo un pH neutro, a temperatura elevada y bajo presión, en este caso

sólo con gas inertizante, preferentemente argón.

2. Una vez terminado el proceso de extracción se filtra el contenido del reactor.
3. Introducción del extracto acuoso obtenido en otro reactor de similares características (RD), se somete a una atmósfera de CO_2 a sobrepresión y se añade la cantidad deseada de bicarbonato de calcio y atmósfera de anhídrido carbónico procedente del reactor auxiliar (RBC)
4. Calentamiento de la mezcla dentro de reactor (RE) y reposo a temperatura constante si el procedimiento funciona por lotes; o calentamiento de la mezcla dentro del reactor (RE) al que se da entrada y salida con control de presión del medio acuoso extrayente si se está realizando un procedimiento de extracción continua; hasta alcanzar la sobrepresión que se estime adecuada para lograr la depuración de la disolución de esteviósidos.
5. Una vez terminado este proceso, se procede a filtrar y transferir la disolución caliente saturada de bicarbonato de calcio hasta un recipiente a presión atmosférica (D), comenzando de forma espontánea la descomposición de bicarbonato de calcio en anhídrido carbónico y carbonato cálcico, que precipita, procediendo además a eliminar el exceso de calcio disuelto por tratamiento con hidróxido de calcio o mediante burbujeo de argón.
    i. Si se considera necesario, ajuste de pH con ácido fosfórico y proceder a una nueva filtración

Ambos diseños tienen como fundamento único el comportamiento de los sistemas en equilibrio de las sales de calcio en presencia de agua y anhídrido carbónico. Es bien conocido que el carbonato de calcio posee una muy baja solubilidad en agua y que sin embargo el bicarbonato de calcio es muy soluble en agua. También es conocido el proceso que sufre el carbonato de calcio en presencia de agua que contiene anhídrido carbónico, ya que este sistema está en equilibrio con el denominado ácido carbónico según la siguiente ecuación:

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrows CO_3H_2 \qquad \text{(Ecuación 1)}$$

y este ácido carbónico reacciona con el ácido carbónico de la siguiente forma:

$CO_3Ca + CO_3H_2 \leftrightarrows (CO_3H)_2Ca$ (Ecuación 2)

sin embargo, el bicarbonato de calcio descrito, que se supone va disuelto en el medio acuoso tiende a descomponerse, y muy especialmente a temperatura alta, de la siguiente forma:

$(CO_3H)_2Ca \leftrightarrows CO_3Ca + H_2O + CO_2$ (Ecuación 3)

Este último proceso es el que se produce en la formación de las estalactitas y estalagmitas y también lo que sucede al hervir un agua dura, ya que se ablanda dando lugar a un precipitado de carbonato cálcico y desprendimiento de anhídrido carbónico.

Para la aplicación que nos ocupa es preciso considerar que en cualquiera de los dos modelos descritos para la extracción/depuración de *Stevia* estamos trabajando a presión alta y volumen constante, con posibilidad además de controlar presión y clase de atmósfera presente, ya que en estos equilibrios descritos hay que tener muy en cuenta la variación de volúmenes que se producen entre los sistemas en equilibrio y que pueden desplazar este equilibrio en el sentido que consideremos necesario y conveniente. Así, en la Ecuación 3 cada mol de bicarbonato de calcio que se descompone da lugar a 22,4 litros de gas carbónico. Es por ello que en el proceso que elijamos para que actúe el calcio soluble en la extracción/purificación o purificación de *Stevia* es preciso mantener en el sistema una sobrepresión, total o parcialmente de gas carbónico, al objeto de desplazar ese equilibrio hacia el primer término de la ecuación y que no se descomponga el bicarbonato a carbonato insoluble y por ello así se ha descrito en los procedimientos objeto de la invención. Por otra parte hay que hacer notar que aunque se podrían utilizar las condiciones descritas en las ecuaciones 1 y 2 para disponer de calcio soluble, este procedimiento no sería operativo para la eficacia necesaria de tiempo y concentración del proceso industrial por lo que es preciso acudir a la utilización de bicarbonato de calcio y anhídrido carbónico a sobrepresión para alcanzar las concentraciones de calcio soluble necesario.

A presión atmosférica, la presión parcial del CO_2 presente en la atmósfera es alrededor de $3.5x10^{-4}$. A esta presión parcial la concentración de CO_2 disuelto es de $1.2x10^{-5}$ moles/litro y la de ácido carbónico es de 2.0×10^{-8} moles/litro, por lo que se produce

un agua ácida que reaccionará con el CO_3Ca que tenemos en el medio dando lugar a un pH de 8.27 y una concentración de Ca^{2+} de 4.7 x 10^{-4} moles/litro a 25ºC. Sin embargo, si aumentamos la presión de CO_2 a 10 atmósferas en un sistema confinado (reactor), el pH pasa a ser ácido (5.30) y se solubiliza más de 100 veces ión Ca^{2+} hasta llegar a 1.42 x 10^{-2} moles/litro. Cuando convenga, podemos eliminar calcio disuelto bajando la presión parcial de CO_2 y calentando, ya que el bicarbonato de calcio disuelto se reequilibrará por desprendimiento de CO_2 y precipitación de la mayoría del calcio. Elevándose el pH hasta 8.27 cuando se alcanzase el equilibrio. Aún así quedarían 18.9 mg/litro de calcio, que podemos hacer bajar hasta 10.1 llevando la disolución a 8.4 con hidróxido de calcio, empleando posteriormente ácido fosfórico para neutralizar el medio sin elevar el calcio disuelto dado el bajo producto de solubilidad de los fosfatos de calcio o bien mediante tratamiento con argón como se describió anteriormente.

Con posterioridad a estos tratamientos se puede tratar el extracto obtenido, P, utilizando cualquier combinación de procedimientos de dominio público para obtener finalmente los cristales de esteviósidos.

Los distintos productos obtenidos se han analizado por RMNP de 25 mg de cristales en D_2O y HPLC en columnas de fase reversa C-18, empleando agua/acetonitrilo en régimen isocrático y detector de UV a 210 nm, confirmando composición y grado de pureza de los distintos extractos realizados.

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

La versatilidad del proceso propuesto lo hace válido para una gran cantidad de combinaciones de parámetros. Sin embargo, describiremos algunos ejemplos ilustrativos de la metodología reivindicada.

Ejemplo Nº 1.-

Se introduce 1 kg de hoja seca molida de *Stevia* en un reactor cilíndrico de acero inoxidable provisto de calefacción periférica lateral mediante flujo de aceite térmico o

vapor de agua con controles de temperatura, presión, válvula de seguridad tarada a 10 atmósferas de presión, elemento filtrante en la parte inferior, sistemas para añadir líquidos, anhídrido carbónico y argón y salida con posibilidad de regular la presión de evacuación (RE).

Se añaden 3 litros de agua desionizada y saturada de argón, se cierra la tapa del reactor y a continuación se añaden por el conducto correspondiente entre 5 y 30, preferentemente 7, litros de agua saturada de bicarbonato de calcio procedente de un reactor de bicarbonato de calcio (RBC) trabajando entre 1 y 8 atmósferas de presión de CO2, preferentemente a 2, y manteniendo el conjunto entre 35 y 100ºC, preferentemente a 85 ºC, entre 1 y 30 minutos, preferentemente durante 10 minutos.

Pasado este tiempo se abre la llave inferior y el extracto filtrado se evacua sobre un depósito (D) provisto de una camisa para calentar o refrigerar, según se necesite. Se procura el mejor escurrimiento posible mediante presión de argón.

El extracto evacuado se mantiene entre 10 y 60 minutos, preferentemente 15 minutos entre 35 y 100ºC, preferentemente a 85ºC, a presión atmosférica, observándose un burbujeo de anhídrido carbónico y precipitación de carbonato de calcio.

Con posterioridad se enfría el sistema hasta una temperatura comprendida entre 0ºC y 35 ºC, preferentemente a 20ºC, que se mantiene un tiempo comprendido entre 0 y 60 minutos, preferentemente 15 minutos y a continuación se eliminan los precipitados por filtración.

La nueva disolución básica se lleva a pH ácido, preferentemente pH 4, con disolución de ácido fosfórico y de nuevo se procede a filtrar, adicionando a continuación hidróxido cálcico hasta pH 7 y filtrando de nuevo.

Finalmente, y tras decolorar y desionizar mediante electrolisis y resinas de cambio iónico, se procede a una concentración previa a vacío hasta la cuarta parte de su volumen, llevando a sequedad mediante atomización.

Se obtienen así unos 90 gramos de esteviósidos.

Ejemplo Nº 2.

Se introduce 1 kg de hoja seca molida de *Stevia* en un reactor cilíndrico de acero inoxidable provisto de calefacción periférica lateral mediante flujo de aceite térmico o vapor de agua, con controles de temperatura, presión, válvula de seguridad tarada a 10 atmósferas de presión, elemento filtrante en la parte inferior y salida con posibilidad de regular la presión de evacuación y sistemas para añadir líquidos, anhídrido carbónico y argón (RE). Se añaden 3 litros de agua desionizada y saturada de argón, se cierra la tapa del reactor y a continuación se añaden por el conducto correspondiente entre 5 y 30, preferentemente 7, litros de agua saturada de bicarbonato de calcio procedente de un reactor de bicarbonato de calcio (RBC) trabajando entre 1 y 8 atmósferas de presión de CO2, preferentemente a 2 atmósferas, y manteniendo el conjunto entre 35 y 100ºC, preferentemente a 85 ºC, entre 1 y 30 minutos, preferentemente durante 10 minutos. Pasado este tiempo se abre la llave inferior y el extracto filtrado se evacua sobre un depósito (D) provisto de una camisa para calentar o refrigerar, según se necesite. Se procura el mejor escurrimiento posible mediante presión de argón. El extracto evacuado se mantiene entre 10 y 60 minutos, preferentemente 15 minutos entre 35 y 100º C, preferentemente a 85ºC, a presión atmosférica, observándose un burbujeo de anhídrido carbónico y precipitación de carbonato de calcio. Con posterioridad se enfría el sistema entre 0ºC y 35 ºC, preferentemente a unos 20ºC, que se mantiene un tiempo comprendido entre 0 y 60 minutos, preferentemente 15 minutos y a continuación se eliminan los precipitados por filtración. A continuación se añade lechada de cal con agitación hasta alcanzar un pH de 8,4 y se filtran los precipitados, llevándose de nuevo la disolución hasta un pH 7 por burbujeo de anhídrido carbónico. Finalmente, y tras decolorar y desionizar mediante electrolisis y resinas de cambio iónico, se procede a una concentración previa a vacío hasta la cuarta parte de su volumen, llevando a sequedad mediante atomización.

Se obtienen así unos 90 gramos de esteviósidos.

Ejemplo Nº 3.-

Se introduce 1 kg de hoja seca molida de Stevia en un reactor cilíndrico de acero inoxidable provisto de calefacción periférica lateral mediante flujo de aceite térmico o vapor de agua, con controles de temperatura, presión, válvula de seguridad tarada a 10 atmósferas de presión, elemento filtrante en la parte inferior y salida con posibilidad de regular la presión de evacuación y sistemas para añadir líquidos, anhídrido carbónico y argón (RE). Se añaden 3 litros de agua desionizada y saturada de argón, se cierra la tapa del reactor y a continuación se añaden por el conducto

correspondiente entre 5 y 30, preferentemente 7, litros de agua saturada de bicarbonato de calcio procedente de un reactor de bicarbonato de calcio (RBC) trabajando entre 1 y 8 atmósferas de presión de CO2, preferentemente a 2, y manteniendo el conjunto entre 35 y 100ºC, preferentemente a 85 ºC, entre 1 y 30 minutos, preferentemente durante 10 minutos. Pasado este tiempo se abre la llave inferior y el extracto filtrado se evacua sobre un depósito (D) provisto de una camisa para calentar o refrigerar, según se necesite. Se procura el mejor escurrimiento posible mediante presión de argón. El extracto evacuado se mantiene entre 10 y 60 minutos, preferentemente 15 minutos entre 35 y 100ºC, preferentemente a 85ºC, a presión atmosférica, observándose un burbujeo de anhídrido carbónico y precipitación de carbonato de calcio. Con posterioridad se enfría el sistema entre 0ºC y 35 ºC, preferentemente a unos 20ºC, que se mantiene un tiempo comprendido entre 0 y 60 minutos, preferentemente hasta 20ºC, que se mantiene un tiempo comprendido entre 0 y 60 minutos, preferentemente 15 minutos y a continuación se eliminan los precipitados por filtración.

Se obtienen así unos 95 gramos de extracto de esteviósidos (P).

Ejemplo Nº 4.-

Se introduce 1 kg de hoja seca molida de *Stevia* en un reactor cilíndrico de acero inoxidable provisto de calefacción periférica lateral mediante flujo de aceite térmico o vapor de agua, con controles de temperatura, presión, válvula de seguridad tarada a 10 atmósferas de presión, elemento filtrante en la parte inferior y sistemas para añadir líquidos, anhídrido carbónico y argón (RE). Se añaden entre 5 y 30, preferentemente 10, litros de agua desionizada y saturada de argón, se cierra la tapa del reactor y a continuación se somete al conjunto a una presión DE entre 1 y 8, preferentemente 4, atmósferas de argón, calentando el conjunto hasta una temperatura de entre 35 y 100ºC, preferentemente 85ºC, durante un tiempo de 0 a 60, preferentemente 10, minutos. Se abre la válvula inferior y el filtrado se conduce a un segundo reactor (RD) igual al descrito, precalentado a 60ºC y con atmósfera de anhídrido carbónico en su interior, añadiendo 1 litro de agua bicarbonatada procedente del reactor de calcio (RBC) que trabaja a 7 atmósferas de presión de CO_2, llevando el conjunto a 4 atmósferas de presión con anhídrido carbónico y calentando a 85ºC de temperatura durante 10 minutos, transcurridos los cuales se abre la válvula inferior y el extracto filtrado se lleva un depósito (D) provisto de una camisa para calentar o refrigerar,

según se necesite, manteniéndose durante 15 minutos a 85ºC, observándose un burbujeo de anhídrido carbónico y precipitación de carbonato de calcio. Con posterioridad se enfría el sistema hasta un temperatura de entre 0 y 35ºC, preferentemente a 20ºC, que se mantiene durante otro periodo de tiempo de entre 0 y 60 minutos, preferentemente 15 minutos y a continuación se eliminan los precipitados por filtración. La disolución así obtenida se trata con hidróxido cálcico hasta pH 8,5 y se procede a filtrar de nuevo. La nueva disolución básica se lleva a pH ácido, preferentemente pH 4 con disolución de ácido fosfórico y de nuevo se procede a filtrar, adicionando a continuación hidróxido cálcico hasta llevarlo a un pH básico, preferentemente pH 7 y filtrando de nuevo. Finalmente, y tras decolorar y desionizar mediante electrólisis y resinas de cambio iónico, se procede a una concentración previa a vacío hasta la cuarta parte de su volumen, llevando a sequedad mediante atomización. Se obtienen así unos 95 gramos de esteviósidos. En estas condiciones el rendimiento es algo superior, aunque también se observa en la composición del sólido un 25% más de rebaudiósido C que en el ejemplo anterior.

Ejemplo Nº 5.-

Se introduce 1 kg de hoja seca molida de *Stevia* en un reactor cilíndrico de acero inoxidable provisto de calefacción periférica lateral mediante flujo de aceite térmico o vapor de agua, con controles de temperatura, presión, válvula de seguridad tarada a 10 atmósferas de presión, elemento filtrante en la parte inferior y salida con posibilidad de regular la presión de evacuación y sistemas para añadir líquidos, anhídrido carbónico y argón. (RE). A continuación se tara la válvula de salida a 2 atms y se añaden por el conducto correspondiente entre 5 y 30, preferentemente 20, litros de agua saturada de bicarbonato de calcio procedente de un reactor de calcio (RBC) trabajando a entre 1 y 8, preferentemente 7, atmósferas de presión de CO_2, previamente calentada a una temperatura de entre 35 y 100ºC, preferentemente 85ºC, con un cambiador de calor y manteniendo el conjunto del reactor a dicha temperatura, de forma que el paso de los 20 litros, y por tanto la extracción se realice en un tiempo de entre 0 a 60, preferentemente 20, minutos. El extracto, filtrado por el elemento filtrante del propio reactor, se evacúa en forma continua a través de la válvula tarada a 2 atm. sobre un depósito (D) provisto de una camisa para calentar o refrigerar, según se necesite. Se procura el mejor escurrimiento posible mediante presión de argón por encima de las 2 atm del tarado de la válvula de salida. El extracto evacuado se mantiene durante un periodo de entre 0 y 60, preferentemente 15, minutos a una temperatura de entre 35 y 100ºC, preferentemente a 85ºC, observándose un burbujeo

de anhídrido carbónico y precipitación de carbonato de calcio. Con posterioridad se enfría el sistema hasta una temperatura de entre 0 y 35ºC, que se mantiene durante otros 0 a 60, preferentemente 15, minutos y a continuación se eliminan los precipitados por filtración. A continuación se añade lechada de cal con agitación hasta alcanzar un pH básico, preferentemente pH 8,4 y se filtran los precipitados, llevándose de nuevo la disolución hasta un pH más bajo, preferentemente a pH 7 por burbujeo de anhídrido carbónico. Finalmente, y tras decolorar y desionizar mediante electrolisis y resinas de cambio iónico, se procede a una concentración previa a vacío hasta la cuarta parte de su volumen, llevando a sequedad mediante atomización. Se obtienen así unos 90 gramos de esteviósidos.

Ejemplo Nº 6.-

Se introduce 1 kg de hoja seca molida de *Stevia* en un reactor cilíndrico de acero inoxidable provisto de calefacción periférica lateral mediante flujo de aceite térmico o vapor de agua, con controles de temperatura, presión, válvula de seguridad tarada a 10 atmósferas de presión, elemento filtrante en la parte inferior y salida con posibilidad de regular la presión de evacuación y sistemas para añadir líquidos, anhídrido carbónico y argón (RE). A continuación se tara la válvula de salida a entre 1 y 8, preferentemente 2, atmósferas y se añaden por el conducto correspondiente entre 5 y 30, preferentemente 20, litros de agua, previamente calentada a una temperatura de entre 35 y 100ºC, preferentemente 85ºC, con un cambiador de calor, y una bomba de desplazamiento positivo provista de variador de frecuencia y caudalímetro y manteniendo el conjunto del reactor a la misma temperatura, de forma que el paso de los 20 litros, y por tanto la extracción se realice en un tiempo de entre 0 y 60 minutos, preferentemente 20 minutos. El extracto, filtrado por el elemento filtrante del propio reactor, se evacúa en forma continua a través de la válvula tarada a 2 atm. el filtrado se conduce a un segundo reactor (RD) igual al descrito, precalentado a una temperatura entre 35 y 100ºC, preferentemente a 60ºC, y con atmósfera de anhídrido carbónico en su interior, añadiendo entre 1 y 7 litros, preferentemente 1 litro, de agua bicarbonatada procedente del reactor de calcio que trabaja a entre 4 y 8, preferentemente 7, atmósferas de presión de CO_2, llevando el conjunto a una presión más baja, con anhídrido carbónico, preferentemente a 4 atmósferas, y calentando a temperatura de entre 35 y 100ºC, preferentemente a 85ºC de temperatura durante un periodo de entre 0 y 60 minutos, preferentemente 10 minutos, transcurridos los cuales se abre la válvula inferior y el extracto filtrado se lleva un depósito (D) provisto de una camisa para calentar o refrigerar, según se necesite, manteniéndose durante 0 a 60,

preferentemente 15, minutos a temperatura de entre 35 y 100º, preferentemente a 85ºC, observándose un burbujeo de anhídrido carbónico y precipitación de carbonato de calcio. Con posterioridad se enfría el sistema hasta una temperatura comprendida entre 0 y 35ºC, preferentemente a unos 20ºC, que se mantiene durante otros un periodo de entre 0 y 60, preferentemente 15, minutos y a continuación se eliminan los precipitados por filtración. La disolución así obtenida se trata con hidróxido cálcico hasta un pH básico, preferentemente pH 8,5 y se procede a filtrar de nuevo. La nueva disolución básica se lleva a pH ácido, preferentemente pH 4, con disolución de ácido fosfórico y de nuevo se procede a filtrar, adicionando a continuación hidróxido cálcico hasta basificar de nuevo el producto, llevándolo preferentemente hasta pH 7 y filtrando de nuevo. Finalmente, y tras decolorar y desionizar mediante electrólisis y resinas de cambio iónico, se procede a una concentración previa a vacío hasta la cuarta parte de su volumen, llevando a sequedad mediante atomización.

En las condiciones descritas en los anteriores ejemplos hay que hacer notar la gran eficacia de la eliminación de productos no deseados y de color por la metodología empleada del sistema presurizado de bicarbonato de calcio /carbonato de calcio/anhídrido carbónico, haciendo que procesos técnicamente problemáticos a escala industrial como es el empleo de electrólisis y resinas de cambio (formación de costras, rápida saturación y envejecimiento de resinas y persistencia de colorantes con absorciones a 640 nm) puedan utilizarse de forma sencilla y técnicamente viable. Otro tanto cabe decir respecto al empleo en las fases de purificación y/o concentrado de membranas, ya que el gran problema de su utilización con extractos no adecuados es el rápido ensuciamiento (*fouling*) de las mismas, lo que se evita en gran manera con los extractos obtenidos por nuestro procedimiento.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtención de esteviósidos a partir de *Stevia* que comprende una extracción con agua a alta presión en presencia de bicarbonato de calcio y pH débilmente ácido.

2. Procedimiento para obtención de esteviósidos a partir de *Stevia* según reivindicación 1, en el que la extracción con agua a alta presión se realiza en atmósfera de CO_2 y de forma simultánea al suplemento de bicarbonato cálcico.

3. Procedimiento para obtención de esteviósidos a partir de Stevia según reivindicación 1, en el que la extracción con agua se realiza en atmósfera de gas inerte de forma previa al suplemento de bicarbonato de calcio.

4. Procedimiento para obtención de esteviósidos a partir de Stevia según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el Bicarbonato de calcio se genera en un reactor auxiliar mezclando agua con carbonato cálcico en condiciones de sobrepresión de CO2

5. Procedimiento para obtención de esteviósidos a partir de *Stevia* según reivindicación 2, que comprende las siguientes etapas:
    a. Introducción de la materia prima en un reactor capaz de trabajar a sobrepresión y provisto de un dispositivo filtrante (RE) al que se le añade agua que contiene altas concentraciones de bicarbonato de calcio procedentes de un reactor de auxiliar (RBC) y cuya concentración se mantiene mediante aportes controlados de anhídrido carbónico y, opcionalmente, de un gas inerte, a presiones superiores a la atmosférica.
    b. Calentamiento de la mezcla dentro de reactor (RE) y reposo a temperatura constante si el procedimiento funciona por lotes; o calentamiento de la mezcla dentro del reactor (RE) al que se da entrada y salida con control de presión del medio acuoso extrayente si se está realizando un procedimiento de extracción continua, hasta lograr la depuración de la disolución de esteviósidos
    c. Evacuación del filtrado a presión controlada a través de su propio elemento filtrante hacia un deposito de tratamientos (D) en el que se realizarán los siguientes pasos:

i. Enfriamiento del filtrado

ii. Filtrado

iii. Acidificación

iv. Filtrado

6. Procedimiento de extracción de *Stevia* para obtención de esteviósidos según reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:

   a. Extracción del material vegetal en un reactor (RE) utilizando agua, manteniendo un pH neutro, a temperatura elevada y bajo presión de gas inertizante.
   b. Filtrado del contenido del reactor.
   c. Introducción del extracto acuoso obtenido en otro reactor (RD), en el que se somete a una atmósfera de CO_2 a sobrepresión y se añade la cantidad deseada de bicarbonato de calcio y atmósfera de anhídrido carbónico procedente de un reactor auxiliar (RBC).
   d. Calentamiento de la mezcla dentro de reactor (RE) y reposo a temperatura constante si el procedimiento funciona por lotes; o calentamiento de la mezcla dentro del reactor (RE) al que se da entrada y salida con control de presión del medio acuoso extrayente si se está realizando un procedimiento de extracción continua, hasta lograr la depuración de la disolución de esteviósidos.
   e. Filtrado y transferencia de la disolución caliente saturada de bicarbonato de calcio a un recipiente a presión atmosférica (D).
   f. Eliminación del exceso de calcio disuelto

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 que además comprende una etapa posterior de basificación y una nueva filtración.
8. Extracto de esteviósidos (P) obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que además comprende una etapa posterior de decoloración, desionización, concentración y secado.

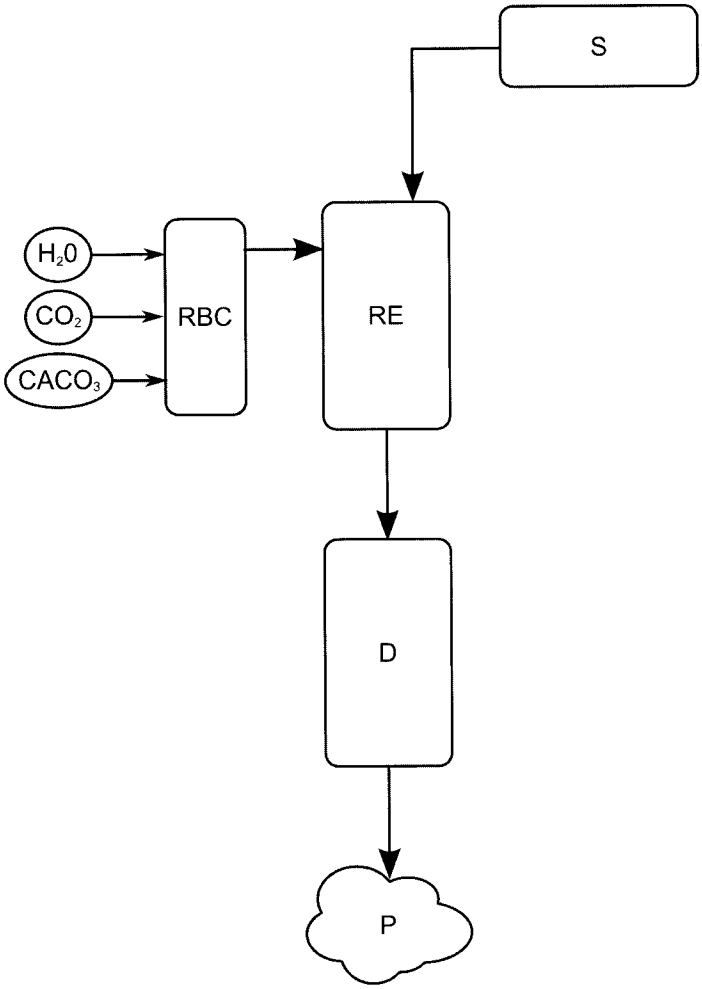

Figura 1

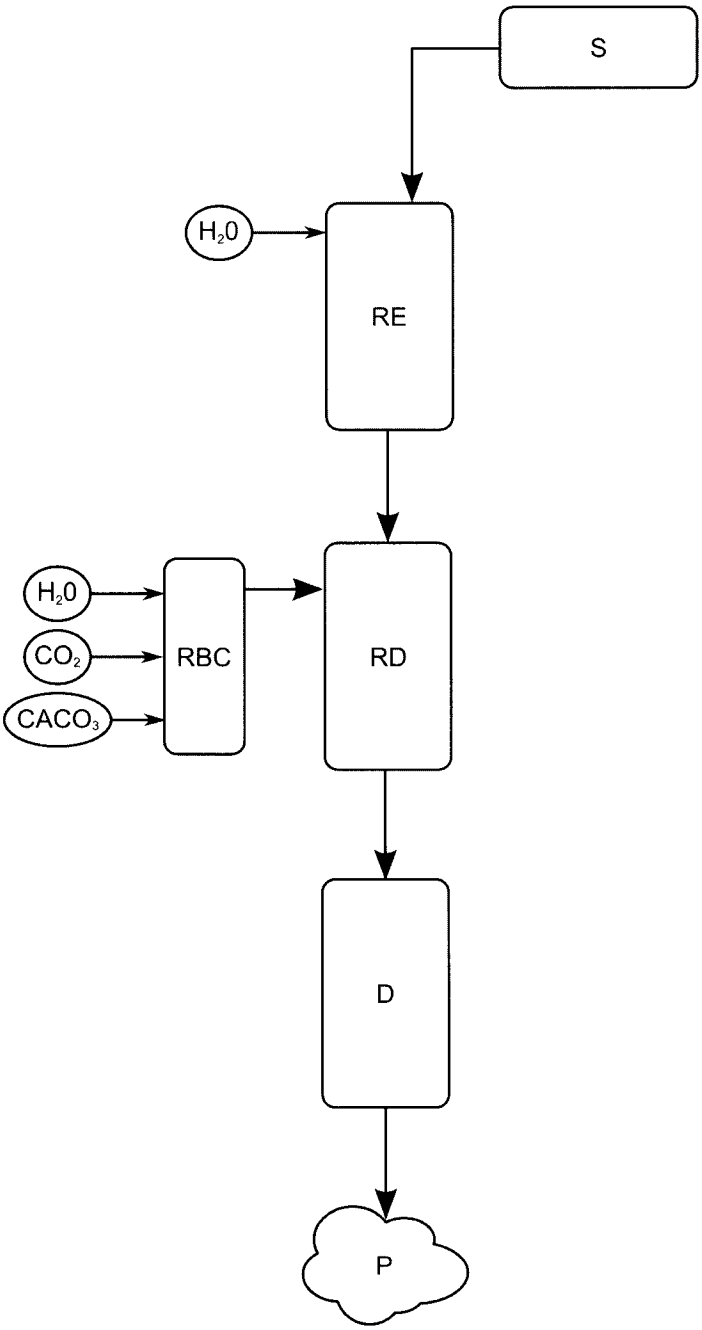

Figura 2

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201100028

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A23L1/22*** (2006.01)
A23L1/236 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ERKUCUK A. et al. Supercritical CO_2 extraction of glycosides from Stevia rebaudiana leaves: Identification and optimization. Journal of supercritical fluids. 20091101. Vol. 51. Nº.1, página 29 – 35. ISSN 0896-8446	1-9
X	CHOI Y. H. et al. Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from Stevia rebaudiana leaves. Chromatographia 2002. Vol.55. Nº. 9-10, páginas 617-620. ISSN 0009-5893.	1-9
X	YODA SIMONE K. et al. Supercritical fluid extraction from Stevia rebaudiana Bertoni using CO_2 and CO_2+water: Extraction kinetics and identification of extracted components. Journa lof Food Engineering. April 2003. Vol. 57. Nº2, páginas 125-134. ISSN 0260-8774	1-9
A	EP 0335265 A2 (KIENLE UDO) 04.10.1989,	1-9

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
03.05.2012	J. Manso Tomico	1/4

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

A23L

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.05.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-9	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-9	**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	ERKUCUK A. et al. Supercritical CO_2 extraction of glycosides from Stevia rebaudiana leaves: Identification and optimization. Journal of supercritical fluids. 01.11.2009. Vol. 51. Nº.1, página 29 – 35. ISSN 0896-8446	
D02	CHOI Y. H. et al. Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from Stevia rebaudiana leaves. Chromatographia 2002. Vol.55. Nº. 9-10, páginas 617-620. ISSN 0009-5893.	
D03	YODA SIMONE K. et al. Supercritical fluid extraction from Stevia rebaudiana Bertoni using CO_2 and CO_2+water: Extraction kinetics and identification of extracted components. Journal of Food Engineering. April 2003. Vol. 57. Nº2, páginas 125-134. ISSN 0260-8774	
D04	EP 0335265 A2 (KIENLE UDO)	04.10.1989

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

La presente solicitud divulga un procedimiento de extracción de esteviosidos a partir de Stevia.

La reivindicaciones 1-9 caracterizan el procedimiento por comprender una extracción con CO_2 en condiciones supercríticas junto a una extracción empleando bicarbonato cálcico como co-solvente a un pH débilmente ácido.

Los documentos D01- D04 representan los documentos del estado de la técnica más cercanos al objeto de la solicitud, junto a los mencionados por el solicitante en la descripción de la solicitud. Todos ellos se refieren procedimientos de extracción de esteviosidos con CO_2 en condiciones supercríticas. Sin embargo, dado que la capacidad de extracción del CO_2 puro es baja, se hace necesaria la utilización de un co-solvente polar adicional, entre los que se han utilizado metanol, agua, etanol y sus mezclas.

La diferencia entre la presente solicitud y el estado de la técnica mencionado seria el bicarbonato cálcico utilizado como co-solvente. El efecto técnico producto de esa diferencia sería la mayor facilidad de operatividad técnica y la utilización de productos admitidos en el código alimentario para la eliminación de compuestos residuales que genera la utilización del bicarbonato cálcico.

Por lo tanto, el problema que plantea la invención sería la provisión de un método de extracción de esteviosidos de escasa dificultad operativa técnica y donde los residuos que se generan en el mismo sean de fácil eliminación.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica se refiere explícitamente a la dificultad operativa de los procesos descritos, sino que divulgan principalmente la optimización de esas condiciones operativas, principalmente de presión, temperatura y concentraciones de solventes para conseguir la mayor eficacia de extracción. Sin embargo no parece que, de los procesos descritos, la eliminación de los co-solventes utilizados suponga una dificultad técnica alta, ya que, tomando D01 en consideración, se puede comprobar que los solventes utilizados en la extracción como son etanol-agua, cuando son sometidos a las condiciones de secado a 70 ºC y posteriormente liofilizado del producto final, son de fácil eliminación por evaporación. Así pues el efecto técnico que se conseguiría sería similar al que se consigue con la utilización del bicarbonato, por lo que se considera que el procedimiento divulgado en la presente solicitud supone una nueva alternativa, pero no inventiva, a los procedimientos existentes.

Por tanto, las reivindicaciones 1-9 cumplirían con lo mencionado en el art. 6 de la ley 11/1986, pero no con lo mencionado en el art. 8 de la ley 11/1986.