

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
1 de junio de 2017 (01.06.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/088080 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

B01D 11/00 (2006.01) **C07J 63/00** (2006.01)
C07J 71/00 (2006.01) **C07J 75/00** (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/CL2015/000062

(22) Fecha de presentación internacional:

25 de noviembre de 2015 (25.11.2015)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitante: **NATURAL RESPONSE S.A.** [CL/CL];
Avenida Industrial 1970, Quilpue 243 0000, Quinta
Región (CL).

(72) Inventores: **PADILLA IGLESIAS, Leandro**; Avenida
Industrial 1970, Quilpue 243 0000, Quinta Región (CL).
VALENCIA MICHAUD, Andres; Avenida Industrial
1970, Quilpue 243 0000, Quinta Región (CL).

(74) Mandatario: **ARANGUIZ ARZE-VARGAS, Vladimir**;
Avenida Industrial 1970, Quilpue 243 0000, Quinta
Región (CL).

(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, 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, RO, 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*):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, ST, 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))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING SAPONINS FROM PLANTS

(54) Título : MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE SAPONINAS A PARTIR DE PLANTAS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for obtaining and purifying saponins from plant extracts, which comprises extracting saponins and subsequently removing impurities by adding a salt selected from the group of alkaline earth metal salts, which form complexes with the polysaccharides present in the solution, and adding sodium phosphates to precipitate said complexes, the complexes being removed together with the rest of the impurities by means of suitable filters and adsorbents.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un proceso para la obtención y purificación de saponinas a partir de extractos de plantas, que comprende la extracción de saponinas y posterior eliminación de impurezas por la adición de una sal que se selecciona del grupo de las sales de metales alcalinotérreos que forman complejos con los polisacáridos presentes en la solución, y adición de fosfatos de sodio para precipitar dichos complejos, los que se remueven junto al resto de impurezas con adsorbentes y filtros adecuados.



WO 2017/088080 A1

MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE SAPONINAS A PARTIR DE PLANTAS

Campo Técnico

La presente invención se relaciona con el campo técnico de la obtención de compuestos a partir de plantas, en particular proporciona un método para la obtención y purificación de saponinas de plantas, mediante la eliminación de impurezas por precipitación con sales y filtración.

Antecedentes

Las saponinas son compuestos presentes en una amplia variedad de plantas, presentes en granos y hojas, etc., cuya estructura química básica se compone de una porción esteroideal o triterpenoide, unida a una o más cadenas de azúcares. La gran variedad de estructuras químicas de las saponinas permite que tengan características fisicoquímicas y biológicas diversas, y por tanto múltiples aplicaciones industriales, como por ejemplo en áreas de la alimentación, cosmética, minería, agricultura y farmacéutica.

Para la producción de productos que contienen saponinas, se requiere de la extracción y purificación de este compuesto a partir de material vegetal, para lo cual se deben eliminar impurezas indeseadas tales como iones orgánicos e inorgánicos, compuestos fenólicos, proteínas, carbohidratos y polisacáridos, entre otros. El contenido de impurezas indeseadas en el extracto influye directamente en su aplicación industrial. Por ejemplo, el uso de saponinas en aplicaciones inmunológicas requiere una saponina altamente purificada, es decir, que no contenga impurezas que puedan afectar negativamente su uso farmacéutico.

En el estado de la técnica, existen diversos métodos descritos para la purificación de saponinas, entre los que se destacan la purificación por solventes, por adsorción, ultrafiltración, o cromatografía (Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2007. 47: 231-58). Por ejemplo, la solicitud de patente US 2014/0030318 enseña un método para la purificación de saponinas en el cual a un extracto de planta se adiciona un primer compuesto solubilizante, preferentemente acetonitrilo, y luego se reemplaza una porción de dicho

compuesto con un solvente de intercambio, proceso que puede realizarse mediante diafiltración, ultrafiltración seguido de dilución, o diálisis. Por otra parte, la solicitud de patente CL 200202573 divulga un proceso para la producción de saponinas de alta pureza basado en la eliminación de impurezas al agregar un adsorbente en el extracto de planta, seguido por la filtración y descarte de dicho adsorbente unido a las impurezas. Otro ejemplo de procesos para la purificación de saponinas se divulga en la patente US 6,355,249, en la cual se indica que posterior a la extracción de las saponinas provenientes de quínoa, se purifica mediante técnicas tales como la ultrafiltración, cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía de fase reversa.

Sin embargo, estos métodos de purificación no son eficientes pues a nivel industrial significan un alto costo de producción, o comprenden tiempos excesivamente largos para la obtención de dichas saponinas purificadas. Por ejemplo, el tiempo de producción de un lote de productos basados en 90% de saponinas (en base a sólidos sólidos secos) puede tomar alrededor de 2 meses mediante estos métodos convencionales. Adicionalmente, estos procesos no son capaces de eliminar en su totalidad las impurezas, particularmente los polisacáridos presentes en los extractos de plantas, debido a que su gran tamaño impide su paso a través de las membranas de ultrafiltración. Estos residuos de polisacáridos en los extractos líquidos de saponinas purificadas, generalmente forman precipitados indeseados durante el periodo de almacenamiento o al momento de ser utilizado por el usuario final, y por tanto son considerados atributos negativos en el producto comercializable de saponinas purificadas.

En consecuencia, se requiere de nuevos procesos para la obtención de saponinas altamente purificadas, que eliminen adecuadamente los polisacáridos, y que sean eficientes tanto en tiempo como en costos de producción.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para la obtención de saponinas a partir de plantas que comprende las etapas de: proporcionar un extracto de planta que contiene saponinas, mezclar dicho extracto con una sal que se selecciona del grupo de las sales de metales alcalinotérreos para formar una solución con

complejos ión-polisacáridos, ajustar el pH de la mezcla anterior entre 6 y 7, agregar fosfatos de sodio e hidróxido de sodio para formar una mezcla a partir de la cual se obtiene un precipitado de complejos ión-polisacáridos, filtrar los precipitados para obtener una solución, y clarificar la solución para generar un
5 extracto de saponinas purificado.

En una modalidad preferida de la invención, la obtención del extracto de planta que contiene saponinas comprende las etapas de: proporcionar una biomasa de la planta, secar y moler dicha biomasa, y agregar un solvente adecuado a dicha biomasa para obtener el extracto. Dicho solvente adecuado es preferentemente
10 agua a una temperatura entre 50 y 80 grados Celsius.

En una modalidad preferida de la invención, la biomasa se obtiene de plantas que se seleccionan del grupo de las familias de *Quillajaceae*, *Asparagaceae*, *Araliaceae*, *Fabaceae*, y *Sapindaceae*. Preferentemente, la biomasa se obtiene de la especie *Quillaja saponaria* Molina.

15 En otra modalidad preferida, la mezcla a partir de la cual se obtiene el precipitado de complejos ión-polisacáridos se somete a un tratamiento térmico, donde se calienta a una temperatura entre 70 y 90 grados Celsius. Preferentemente, la sal utilizada para obtener los complejos ión-polisacáridos es sal de cloruro de calcio. Por otra parte, los fosfatos de sodio utilizados para precipitar dichos complejos
20 son preferentemente fosfatos disódicos.

En otra modalidad preferida, el filtrado de los precipitados de complejos ión-polisacáridos y otras impurezas se realiza preferentemente mediante un filtro de tierras diatomeas.

En una modalidad preferida de la invención, la etapa para clarificar la solución
25 comprende adicionalmente las etapas de: llevar la solución a pH ácido, preferentemente adicionando ácido clorhídrico, agregar adsorbentes poliméricos y un material arcilloso a dicha solución para atrapar impurezas residuales, y remover los adsorbentes poliméricos y el material arcilloso que contiene dichas impurezas mediante filtración, preferentemente mediante un filtro de tierras
30 diatomeas.

En una modalidad preferida, dichos adsorbentes poliméricos se seleccionan del grupo de gelatina bovina, gelatina de pescado, proteínas de origen vegetal, albúmina, proteínas de leche, polivinilpirrolidona (PVP), y polivinilpolipirrolidona (PVPP). Adicionalmente, el material arcilloso utilizado en la presente invención es
5 preferentemente bentonita.

En otra modalidad preferida, el extracto de saponinas purificado obtenido mediante el método de la presente invención se concentra mediante técnicas de filtración seleccionadas del grupo que consiste de nanofiltración, ultrafiltración y diafiltración, o combinaciones de las mismas.

10 Otro objeto de la presente invención se refiere a un extracto de saponinas purificado que se obtiene mediante el proceso descrito anteriormente.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de una modalidad preferida del proceso de purificación de saponinas a partir de la corteza de *Quillaja saponaria*
15 Molina.

La Figura 2 es una representación esquemática de otra modalidad preferida del proceso de purificación de saponinas a partir de la biomasa de *Quillaja saponaria* Molina.

La Figura 3 es una representación esquemática de otra modalidad preferida del proceso de purificación de saponinas a partir de un producto que contiene saponinas el cual se obtiene mediante procesos convencionales.
20

Descripción detallada de la invención

Como se ha descrito, la presente invención se refiere a un proceso para la obtención y purificación de saponinas a partir de extractos de plantas, que
25 comprende la extracción de saponinas y posterior eliminación de impurezas por la adición de sales de calcio que forman complejos con los polisacáridos presentes en la solución, y adición de fosfatos de sodio para precipitar dichos complejos, los que se remueven junto al resto de impurezas con adsorbentes y filtros adecuados.

Sorprendentemente, la presente invención se basa en la adición de una sal que se selecciona del grupo de las sales de metales alcalinotérreos a un extracto de planta que contiene saponinas, el cual forma complejos ión-polisacárido con aquellas moléculas libres, pero no forma complejos con las cadenas de azúcares de las saponinas. Esto permite que al añadir fosfatos de sodio e hidróxido de sodio a la mezcla, puedan precipitar sólo los complejos ión-polisacáridos, mientras que las saponinas se mantienen en suspensión.

En consecuencia, la presente invención permite la eliminación de impurezas de extractos de planta para la obtención de saponinas purificadas de forma rápida y reproducible. Con el método de obtención de saponinas divulgado en esta invención, se puede obtener un producto que contiene más de un 70% de saponinas (en base a sólidos secos) en un tiempo entre 8 a 12 días, mucho menor que los métodos convencionales descritos en el estado de la técnica.

Todos los términos técnicos utilizados para describir la presente invención tienen el mismo significado entendido para una persona con conocimientos básicos en el campo técnico en cuestión. No obstante, para definir con más claridad el alcance de la invención, a continuación se incluye una lista de la terminología utilizada en esta descripción.

Se debe entender por el término "saponina" como cualquier glucósido caracterizado porque comprende una porción insoluble que puede ser esteroideal o triterpenoide, y una porción soluble de una o más cadenas de sacáridos. Dichos sacáridos pueden ser cualquier azúcar, como glucosa, arabinosa, galactosa, ramnosa, xilosa, fucosa, ácido glucurónico, y ácido galacturónico, sin restringirse a los aquí mencionados.

Se debe entender por el término "extracto de planta" cualquier sustancia o producto derivado que se obtenga mediante extracción a partir de una parte de la planta, a través de cualquier método conocido en el estado de la técnica, tales como extracción por solventes, adsorción, maceración, destilación, entre otros. También se considerará como "extracto de planta" cualquier producto basado en extractos de planta que se sometió a previamente a un primer proceso extractivo

y puede encontrarse a la venta al público general, tanto en forma líquida como en polvo.

Se debe entender por el término “biomasa” cualquier materia biológica proveniente del reino *Plantae*. Por ejemplo, biomasa puede ser la corteza, tronco,
5 hojas, tallos, raíces, semillas, frutos o una combinación de cualquiera de ellas.

Se debe entender por el término “impureza” cualquier otra sustancia en una solución diferente al compuesto químico principal o de interés. Para la presente invención, el compuesto principal son saponinas, y por tanto cualquier otra sustancia presente como iones orgánicos e inorgánicos, compuestos fenólicos
10 (como taninos, quercitina, leucocianidina, kaemferol, entre otros), ácidos orgánicos (como ácido caféico, ácido gálico, ácido cumárico, entre otros), sacáridos y polisacáridos, lípidos y compuestos nitrogenados, entre otros, se consideran impurezas.

Se debe entender por el término sales de “metales alcalinotérreos” como aquellas
15 sales que se forman con elementos pertenecientes al grupo IIA de la tabla periódica, que comprende berilio (Be), magnesio (Mg), calcio (Ca), estroncio (Sr), bario (Ba) y radio (Ra). Todos estos elementos tienen como propiedad la capacidad de formar iones positivos con carga 2+.

Se debe entender por el término “clarificar” en el contexto de la presente
20 invención la eliminación de sólidos solubles que reaccionan con otros componentes no solubles mediante complejamiento, cargas eléctricas, arrastre o reacción química. La clarificación se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas conocidas en el estado de la técnica, tales como filtración mediante diatomeas, mediante floculación, o a través del uso de coagulantes, entre otros.

25 Como se ha descrito, un objeto de la presente invención se refiere a un método o proceso para la obtención de saponinas a partir de plantas que comprende al menos las etapas de: proporcionar un extracto de planta que contiene saponinas, mezclar dicho extracto con una sal que se selecciona del grupo de las sales de metales alcalinotérreos para formar una solución que contiene entre otros
30 compuestos complejos ión-polisacáridos, ajustar el pH de la mezcla anterior en un rango entre 6 y 7, agregar fosfatos de sodio para formar una mezcla a partir de la

cual se obtiene un precipitado de complejos ión-polisacáridos, filtrar los precipitados para obtener una solución, y clarificar la solución para generar un extracto de saponinas purificado.

En una realización preferida, la obtención del extracto de planta que contiene saponinas se realiza mediante un método convencional de extracción por solvente, sin embargo puede utilizarse cualquier método para la extracción de saponinas conocido en el estado de la técnica. Preferentemente, el extracto de planta utilizado para la presente invención comprende las etapas de: proporcionar una biomasa de una planta, secar y moler dicha biomasa, y agregar un solvente adecuado a dicha biomasa para obtener el extracto. Dicho solvente adecuado se refiere preferentemente a agua a temperatura entre 50 y 80 grados Celsius, pero debe entenderse para determinar el alcance de esta invención, que el solvente a utilizarse puede ser cualquiera, tanto orgánico como inorgánico.

La biomasa que se utiliza en la presente invención se obtiene de cualquier planta que contiene saponinas. Las saponinas se encuentran en más de 100 familias de plantas entre las cuales se mencionan las más relevantes como *Quillajaceae*, *Asparagaceae*, *Dioscoreaceae*, *Liliaceae*, *Caryophyllaceae*, *Araliaceae*, *Leguminosae*, *Sapindaceae*, *Amaranthaceae*, *Aceraceae*, *Rhamnaceae*, *Hippocastanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Araliaceae*, *Dennstaedtiaceae*, entre otros. La cantidad de saponinas que contiene la planta y el tipo de estructura química presente depende de la especie, origen de la planta, factores agronómicos y medioambientales. Por ejemplo, las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en plantas monocotiledóneas, mientras que las saponinas triterpenoides se encuentran principalmente en plantas dicotiledóneas. Las principales fuentes vegetales de saponinas utilizadas para aplicaciones medicinales e industriales son alfalfa (*Medicago sativa*), castaño de indias (*Aesculushippocastanum*), regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), yuca (*Yuccaschidigera*), gingseng (*Panaxgenus*) y quillay (*Quillaja saponaria*).

En una modalidad preferida, la biomasa se obtiene de plantas seleccionadas del grupo de *Quillajaceae*, *Asparagaceae*, *Araliaceae*, *Fabaceae*, y *Sapindaceae*, sin embargo no se restringe a las mencionadas. Preferentemente, la planta utilizada corresponde a la especie *Quillaja saponaria* Molina. Esta planta, contiene

principalmente saponinas triterpenoides, sin embargo, contiene alrededor de 60 tipos de saponinas diferentes difiriendo entre ellas por la composición de sus cadenas de sacáridos.

En otra modalidad preferida de la invención, la sal adicionada al extracto de planta para formar la solución con complejos ión-polisacáridos es una sal que se forma con cualquiera del grupo de los metales alcalinotérreos, preferentemente cloruro de calcio (CaCl_2) o cloruro de magnesio (MgCl_2), principalmente por su bajo costo debido a su abundancia, y por su inocuidad para el empleo en la industria alimenticia y farmacéutica, aunque puede utilizarse cualquier sal de calcio o magnesio inorgánica, soluble en agua o sales de calcio o magnesio de grado alimenticio.

En una modalidad preferida, para ajustar el pH de la mezcla de extracto de planta con las sales de metales alcalino térreos a un rango entre 6 y 7, se agrega de modo preferente hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), pero puede agregarse cualquier otro hidróxido, como hidróxido de sodio (NaOH).

En otra modalidad preferida de la invención, los fosfatos de sodio agregados son preferentemente fosfatos disódicos (Na_2HPO_4), pero puede ser cualquiera de los fosfatos sódicos, tales como fosfato monosódico (NaH_2PO_4), fosfato trisódico (Na_3PO_4) o bifosfato de sodio ($\text{NaH}(\text{PO}_4)_2$).

En otra modalidad preferida de la invención, la mezcla a partir de la cual se obtiene un precipitado de complejos ión-polisacáridos, se somete a un tratamiento térmico, que consiste en calentar dicha mezcla a una temperatura entre 70 y 90 grados Celsius con el fin de aumentar la eficiencia y asegurar la precipitación de todos los complejos. Este proceso se lleva a cabo preferentemente durante 1 hora.

En una modalidad preferida de la invención, el filtrado de los precipitados de complejos ión-polisacáridos se realiza mediante un filtro de tierras diatomeas, tales como Hyflo, Perlita o 535. Puede utilizarse también cualquier filtro de tierras diatomeas conocido en el estado de la técnica.

En otra modalidad preferida, la clarificación de la solución para generar un extracto de saponinas purificado incluye las etapas de: llevar la solución a pH ácido, preferentemente en un rango de pH 4 – 5, preferentemente agregando ácido clorhídrico (HCl) a la solución; luego agregar adsorbentes poliméricos y un material arcilloso a dicha solución acidificada para atrapar impurezas residuales; y remover los adsorbentes poliméricos y el material arcilloso conteniendo dichas impurezas mediante filtración.

Preferentemente, los adsorbentes poliméricos que se pueden utilizar son gelatina bovina, gelatina de pescado, proteínas de origen vegetal, albúmina, proteínas de leche, polivinilpirrolidona (PVP), y polivinilpolipirrolidona (PVPP), sin restringirse a este grupo de adsorbentes, pudiéndose utilizar también cualquier otro adsorbente polimérico adecuado. Adicionalmente, el material arcilloso preferentemente utilizado en la presente invención es bentonita, la cual puede abarcar bentonita sódica o cálcica.

En una modalidad preferida de la invención, el filtrado de los adsorbentes poliméricos y el material arcilloso con las impurezas se realiza mediante un filtro de tierras diatomeas, tales como Celite Hyflo®, Mineral de Perlita o Celite 535®, dependiendo del nivel deseado, pudiendo utilizarse tierras con distintas velocidades de filtración (Darcys) y tamaño de partícula. Puede utilizarse además cualquier filtro de tierras diatomeas conocido en el estado de la técnica. Ejemplos de dispositivos de separación sólido líquido incluyen, pero no se limitan a: Filtros de Vela, Filtros de placas recesivas, marcos y placas, filtros de cartuchos, filtros profundos, decantadores, filtros de disco, filtros de placas de celulosa, centrifugas industriales, filtro de tambor rotativo etc.

Luego de este filtrado, se obtiene un extracto de saponinas purificado. Opcionalmente, dicho extracto puede concentrarse mediante cualquier técnica de filtración conocido en el estado de la técnica. Preferentemente, la concentración del extracto de saponinas purificado se lleva a cabo mediante nanofiltración, ultrafiltración y diafiltración, o cualquier combinación de estas técnicas.

Con el fin de que el extracto de saponinas dure más en las estanterías de venta, opcionalmente se puede realizar un proceso de pasteurización del extracto de

saponinas purificado, mediante cualquier método estándar de pasteurización conocido en el estado de la técnica, tales como pasteurización VAT, HTST o UHT.

Luego de este proceso, se obtiene un producto que comprende el extracto de saponinas purificado, concentrado y pasteurizado en un formato líquido.

- 5 Opcionalmente, dicho producto líquido puede transformarse a un producto en polvo, mediante cualquier técnica ya conocida en el estado de la técnica. Preferentemente, el proceso mediante el cual se genera un producto en polvo es a través de secado por aspersion o pulverización.

- 10 Los pasos o etapas de la presente invención no deben considerarse como secuenciales y por tanto pueden realizarse en distinto orden a los descritos. Por ejemplo, el extracto de plantas puede clarificarse previo a la etapa de adición de sales de calcio, obteniendo finalmente el mismo extracto de saponinas purificado en comparación con el proceso realizado en el orden ya mencionado.

- 15 Otro objeto de la presente invención, es un producto que comprende un extracto de saponinas purificado que se obtiene del proceso mencionado anteriormente. Dicho producto contiene más de 70% de saponinas en base a sólidos secos, y un porcentaje menor al 5% de polisacáridos y polifenoles en base a sólidos secos como impurezas. Esto permite que el extracto de saponinas purificado obtenido a través de este método en solución acuosa sea más estable (en términos de
20 formación de precipitados) frente a la adición de etanol, prueba comúnmente utilizada en la industria alimenticia para medir cualitativamente la presencia de polisacáridos en los productos.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

- 25 **Ejemplo 1: Obtención de saponinas a partir de corteza de *Quillaja saponaria***

En la Figura 1, se muestra una representación esquemática de una modalidad preferida del proceso completo de obtención de saponinas desde la biomasa de *Quillaja saponaria* Molina 1 hasta producto de saponinas purificado líquido 30 y productos de saponinas purificado en polvo 32.

Para la generación de un extracto de planta 2, se utilizaron 210 kg de corteza de *Quillaja saponaria* Molina 1 previamente seca y molida, con 1000 L de agua blanda 3, los cuales se cargaron en diferentes tanques de la siguiente forma:

- a) Se agregó 70 kg de corteza 1 en cada uno de los tanques de extracción 4, 5, 6, luego se agregó 250 L de agua blanda 3 en el tanque 4, se calentó el contenido de dicho tanque 4 a 60 grados Celsius por 3 horas, y se obtuvo un extracto, el cual se bombeó hacia el tanque 5, a través de la línea de transferencia 7.
- b) Se agregó nuevamente 250 L de agua blanda 3 en el tanque 4, luego se calentó el contenido de los tanques 4 y 5 a 60 grados Celsius durante 3 horas, y se obtuvo un extracto de cada uno de estos tanques. El extracto del tanque 5 se bombeó hacia el tanque 6, a través de la línea de transferencia 8, y el extracto del tanque 4 se bombeó hacia el tanque 5, a través de la línea de transferencia 7.
- c) Se agregó nuevamente 250 L de agua blanda 3 en el tanque 4, luego se calentó el contenido de los tanques 4, 5, 6 a 60 grados Celsius durante 3 horas, y se obtuvo un extracto de cada uno de estos tanques. El extracto del tanque 6 se bombeó a través de la línea de transferencia 9 hacia el tanque final 10, el extracto del tanque 5 se bombeó hacia el tanque 6, a través de la línea de transferencia 8, y el extracto del tanque 4 se bombeó hacia el tanque 5, a través de la línea de transferencia 7.
- d) Se agregó nuevamente 250 L de agua blanda 3 en el tanque 4, luego se calentó el contenido de los tanques 4, 5, 6 a 60 grados Celsius durante 3 horas, y se obtuvo un extracto de cada uno de estos tanques. El extracto del tanque 6 se bombeó hacia el tanque 10, a través de la línea de transferencia 9, el extracto del tanque 5 se bombeó hacia el tanque 6, a través de la línea de transferencia 8, y el extracto del tanque 4 se bombeó hacia el tanque 5, a través de la línea de transferencia 7.
- e) Luego, se calentó el contenido de los tanques 5 y 6 a 60 grados Celsius durante 3 horas, y se obtuvo un extracto de cada uno de estos tanques. El extracto del tanque 6 se bombeó hacia el tanque 10, a través de la línea de transferencia 9, y el extracto del tanque 5 se bombeó hacia el tanque 6, a través de la línea de transferencia 8.

f) Finalmente, se calentó el contenido del tanque 6 a 60 grados Celsius por 3 horas, y se obtuvo un extracto el cual se bombeó hacia el tanque 10, a través de la línea de transferencia 9.

El extracto de planta 2 que se obtuvo en el tanque 10 se transfirió a través de la línea de transferencia 11 a un tanque de agitación 12. Se enfrió dicho extracto 2 hasta los 15 grados Celsius y se agregó 2,8 kg de CaCl_2 13 y 0,46 kg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 14 para neutralizar el pH y se agitó durante 30 minutos. A la mezcla obtenida, se agregó 60 L de una solución que contenía 3,2 kg de Na_2HPO_4 15 y 0,5 kg de NaOH 16 y se agitó durante 30 minutos. Se calentó la mezcla obtenida a 80 grados Celsius por 1,5 horas para asegurar la precipitación de los complejos calcio-polisacáridos, y para eliminarlos se filtró la mezcla con de tierra de diatomeas 17. La solución 18 obtenida, se transfirió a un tanque de agitación 19. Se enfrió dicha solución 18 hasta los 15 grados Celsius y se agregó HCl 20 para ajustar el pH entre un rango de 4,3 y 4,5. Se agregó 20 kg de PVPP 21 y 53L de una suspensión acuosa de bentonita 22(75 g/L) y se agitó. Se filtró la mezcla resultante con de tierra de diatomeas 23 y se obtuvo un extracto clarificado 24 o extracto de saponinas purificado que contenía entre 35 a 65 g de solutos extraídos por litro.

Al extracto clarificado 24 se eliminó el agua por nano-filtración 25 para producir un extracto concentrado que contenía entre 85-100 g de solutos extraídos por litro. Luego, del extracto concentrado se removió aún más agua e impurezas de bajo peso molecular mediante ultra-filtración 26 (membrana de 10.000 – 75.000 Da). Cuando la concentración de solutos en el extracto concentrado alcanzó los 200-250 g de solutos extraídos por litro, se cambió a modo diafiltración 27 para producir un precursor líquido 28 que contenía 130-150 g de solutos extraídos por litro. La pureza de saponinas en el precursor líquido 28 estuvo en el rango de los 83-91% p/p sobre sólidos secos. Se pasteurizó el precursor líquido 28 calentándolo a 86 grados Celsius por 30 a 120 minutos en un tanque de calentamiento 29, y se obtuvo un producto de saponinas purificadas líquido 30. Una parte del producto 30 se sometió a un proceso de secado por pulverización en un equipo de dos boquillas 31 (temperatura de entrada de aire, 200 grados Celsius, temperatura de salida de aire, 105-110 grados Celsius) y se produjo 8-10

kg de producto de saponinas purificadas en polvo **32**, con una pureza en un rango entre 83-91% p/p sobre sólidos secos.

En la Figura 2, se muestra representación esquemática de otra modalidad preferida del proceso de purificación de saponinas a partir de la biomasa de *Quillaja saponaria* Molina **1**, en el cual, previo a la adición de sales de calcio se realizó el proceso de clarificación del extracto de planta **2**. Es decir, el extracto de planta **2** que se obtuvo en el tanque **10**, se transfirió a un tanque de agitación **19**. Se enfrió dicho extracto **2** hasta los 15 grados Celsius y se agregó HCl **20** para ajustar el pH entre un rango de 4,3 y 4,5. Se agregó PVPP **21** y una suspensión acuosa de bentonita **22** (75 g/L) y se agitó. Se filtró la mezcla resultante con de tierra de diatomeas **23** y se obtuvo un extracto clarificado **24**. Se enfrió dicho extracto clarificado **24** hasta los 15 grados Celsius y se agregó CaCl_2 **13** y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ **14** para neutralizar el pH y se agitó durante 30 minutos. A la mezcla obtenida, se agregó una solución de Na_2HPO_4 **15** y NaOH **16** y se agitó durante 30 minutos más. Se calentó la mezcla obtenida a 80 grados Celsius para asegurar la precipitación de los complejos calcio-polisacáridos, y para eliminarlos se filtró la mezcla con de tierra de diatomeas **17**. La inversión de estas etapas no afectó el resultado final, pues se obtuvo un extracto de saponinas con una pureza en un rango entre 83-91% p/p sobre sólidos secos, similar al producto que se obtuvo al seguir los pasos descritos en la Figura 1.

Ejemplo 2: Obtención de saponinas a partir de biomasa de *Quillaja saponaria*

En este ejemplo, se utilizó biomasa completa de *Quillaja saponaria* Molina **1** a diferencia del ejemplo anterior donde se utilizó sólo la corteza de dicha planta.

Para la generación de un extracto de planta **2**, se utilizó 3.500 kg de biomasa completa de *Quillaja saponaria* Molina **1** previamente seca y molida, con 6.300 L de agua blanda **3**, los cuales se cargaron en diferentes tanques siguiendo el proceso descrito anteriormente.

En la Tabla 1, se muestra el volumen, pH y composición del extracto de planta **2** que se obtuvo a partir de la biomasa de *Quillaja saponaria* Molina.

Tabla 1. Caracterización del extracto de planta 2

Volumen del extracto	5.350 L
pH	4,9
Concentración de sólidos solubles totales (TSS)	33 g/kg
Fracción de masa de saponinas en base a sólidos secos	26,9% p/p
Fracción de masa de polisacáridos en base a sólidos secos	20,0% p/p
Fracción de masa de polifenoles en base a sólidos secos	13,1% p/p

El extracto de planta 2 obtenido en el tanque 10 se transfirió a un tanque de agitación 12 a través de la línea de transferencia 11. Se enfrió dicho extracto 2 hasta los 15 grados Celsius y se agregó 7,4 kg de CaCl_2 13. Luego de la disolución completa de esta sal de calcio, se agregó 1,8 kg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 14 en polvo para aumentar el pH a 7,0. Luego de la homogenización de esta mezcla, se agregó 154 L de solución que contenía 8,2 kg de Na_2HPO_4 15 y 1,3 kg de NaOH 16 y se agitó durante 30 minutos. Se calentó esta mezcla a 80 grados Celsius por 1,5 horas y se filtró a través de tierra de diatomeas 17 para producir una solución 18, la cual es transferida a un tanque de agitación 19. Se enfrió dicha solución 18 hasta los 15 grados Celsius y se agregó HCl 20 para ajustar el pH entre un rango de 4,3 y 4,5. Se agregó 45 kg de PVPP 21 y 120 L de una suspensión acuosa de bentonita 22 (75 g/L) y se agitó. Se filtró la mezcla resultante con de tierra de diatomeas 23 y se obtuvo un extracto clarificado 24 o extracto de saponinas purificado que contenía entre 25 a 35 g de solutos extraídos por litro.

Al extracto clarificado 24 se eliminó el agua por nano-filtración 25 para producir un extracto concentrado que contenía entre 85-100 g de solutos extraídos por litro. Luego, del extracto concentrado se removió aún más agua e impurezas de bajo peso molecular mediante ultra-filtración 26 (membrana de 10.000 – 75.000 Da). Cuando la concentración de solutos en el extracto alcanzó los 200-250 g de solutos extraídos por litro, se cambió a modo diafiltración 27 para producir un precursor líquido 28 que contenía 130-150 g de solutos extraídos por litro. La pureza de saponinas en el precursor líquido 28 estuvo en el rango de los 86-94% p/p en base a sólidos secos. Se pasteurizó el precursor líquido 28 calentándolo a

86 grados Celsius por 30 a 120 minutos en un tanque de calentamiento **29**, y se obtuvo un producto de saponinas purificadas líquido **30**. Una parte del producto **30** se sometió a un proceso de secado por pulverización en un equipo de dos boquillas **31** (temperatura de entrada de aire, 200 grados Celsius, temperatura de salida de aire, 105-110 grados Celsius) y se produjo 33-38 kg de producto de saponinas purificadas en polvo **32**, con una pureza en un rango entre 86-94% p/p en base a sólidos secos. En la Tabla 2 se muestra un detalle de las características del producto que se obtuvo.

Tabla 2. Caracterización del producto en polvo **32** del Ejemplo 2.

Masa del producto polvo	33 – 38 kg
Apariencia	Entre color blanco y marrón claro, polvo liviano, no aglomerado
Fracción de masa de saponinas en base a sólidos secos	86-94% p/p
Fracción de masa de polisacáridos en base a sólidos secos	< 3,5% p/p
Fracción de masa de polifenoles en base a sólidos secos	< 1,3% p/p

10

Ejemplo 3: Obtención de saponinas a partir de un producto en polvo derivado de *Quillaja saponaria*

En este ejemplo, se utilizó 60 kg de producto polvo **33** de saponinas de *Quillaja saponaria* Molina, extraídas y purificadas mediante un método convencional estándar, el cual se disolvió en agua blanda **3** para producir una solución de producto convencional **34**. En la Tabla 3 se caracteriza el producto convencional **34** y en la Figura 3 se muestra un esquema de esta modalidad de la invención.

Se enfrió dicha solución de producto convencional **34** hasta los 15 grados Celsius EN un tanque de agitación **12** y se agregó 2,5 kg de CaCl_2 **13**. Luego de la disolución completa de esta sal de calcio, se agregó entre 0,5-1,5 kg de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ **14** en polvo para neutralizar el pH. Luego de la homogenización de esta mezcla, se agregó 60 L de solución que contenía 3,0 kg de Na_2HPO_4 **15** y 0,5 kg de NaOH

20

16 y se agitó durante 30 minutos. Se calentó esta mezcla a 80 grados Celsius y se filtró a través de tierra de diatomeas 17 para producir una solución 18. Se enfrió dicha solución 18 hasta los 15 grados Celsius en un tanque de agitación 19 y se agregó 25 kg de PVPP 20 y se agitó. Se filtró la mezcla resultante con de tierra de diatomeas 23 y se obtuvo un extracto clarificado 24 o extracto de saponinas purificado. Este extracto 24 se sometió a un proceso de nanofiltración 25, a ultrafiltración 26 y diafiltración 27 para producir un precursor líquido 28, caracterizado en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización de la solución de producto convencional 34 y del precursor líquido 28.

	Solución de producto convencional 34	Precursor líquido 28
Concentración de sólidos	230 g/kg	145,5 g/kg
Fracción de masa de saponinas en base a sólidos secos	43,5% p/p	55,5% p/p
Fracción de masa de polisacáridos en base a sólidos secos	12,0% p/p	1,8% p/p
Fracción de masa de polifenoles en base a sólidos secos	7,4% p/p	1,2% p/p

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de saponinas a partir de plantas, CARACTERIZADO porque comprende las etapas de:
 - 5 - proporcionar un extracto de planta que contiene saponinas;
 - mezclar dicho extracto con una sal que se selecciona del grupo de las sales de metales alcalino térreos para formar una solución con complejos ión-polisacáridos;
 - ajustar pH de la mezcla anterior entre 6 y 7;
 - 10 - agregar fosfato de sodio e hidróxido de sodio para formar una mezcla a partir de la cual se obtiene un precipitado de complejos ión-polisacáridos;
 - filtrar el precipitado para obtener una solución; y
 - clarificar la solución para generar un extracto de saponinas purificado.
2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque para la obtención
15 del extracto de planta que contiene saponinas dicho método comprende las etapas de:
 - proporcionar una biomasa de la planta;
 - secar y moler dicha biomasa; y
 - agregar un solvente adecuado a dicha biomasa para obtener el extracto.
- 20 3. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque la biomasa se obtiene de plantas que se seleccionan de la familia de *Quillajaceae*, *Asparagaceae*, *Araliaceae*, *Fabaceae*, y *Sapindaceae*..
4. El método de la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque la biomasa se obtiene de la especie *Quillaja saponaria* Molina.
- 25 5. El método de la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque el solvente adecuado es agua a temperatura entre 50 y 80 grados Celsius.

6. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la sal de un metal alcalino térreo utilizada para formar una solución con complejos ión-polisacáridos cloruro de calcio.
7. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque para ajustar el pH de la mezcla del extracto de planta con la sal del metal alcalino térreo en un rango entre 6 y 7 se utiliza hidróxido de calcio.
8. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque los fosfatos de sodio son fosfatos disódicos.
9. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la mezcla a partir de la cual se obtiene un precipitado de complejos ión-polisacáridos se calienta a una temperatura entre 70 y 90 grados Celsius.
10. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el filtrado de los precipitados se realiza mediante un filtro de tierras diatomeas.
11. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la etapa de clarificar la solución comprende adicionalmente las etapas de:
- llevar la solución a pH ácido
 - agregar adsorbentes poliméricos y un material arcilloso a dicha solución para atrapar impurezas residuales; y
 - remover los adsorbentes poliméricos y el material arcilloso conteniendo dichas impurezas mediante filtración.
12. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque para llevar la solución a pH ácido se adiciona ácido clorhídrico.
13. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque los adsorbentes poliméricos se seleccionan del grupo de gelatina bovina, gelatina de pescado, proteínas de origen vegetal, albúmina, proteínas de leche, polivinilpirrolidona (PVP), y polivinilpolipirrolidona (PVPP).
14. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque el material arcilloso es bentonita.

15. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO porque para remover los adsorbentes poliméricos y el material arcilloso con las impurezas se utiliza un filtro de tierras diatomeas.
16. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el extracto de saponinas purificado se concentra adicionalmente mediante técnicas de filtración seleccionadas del grupo que consiste de nanofiltración, ultrafiltración y diafiltración o combinaciones de las mismas.
17. Un extracto de saponinas purificado, CARACTERIZADO porque se obtiene mediante el proceso de las reivindicaciones 1 a 16.

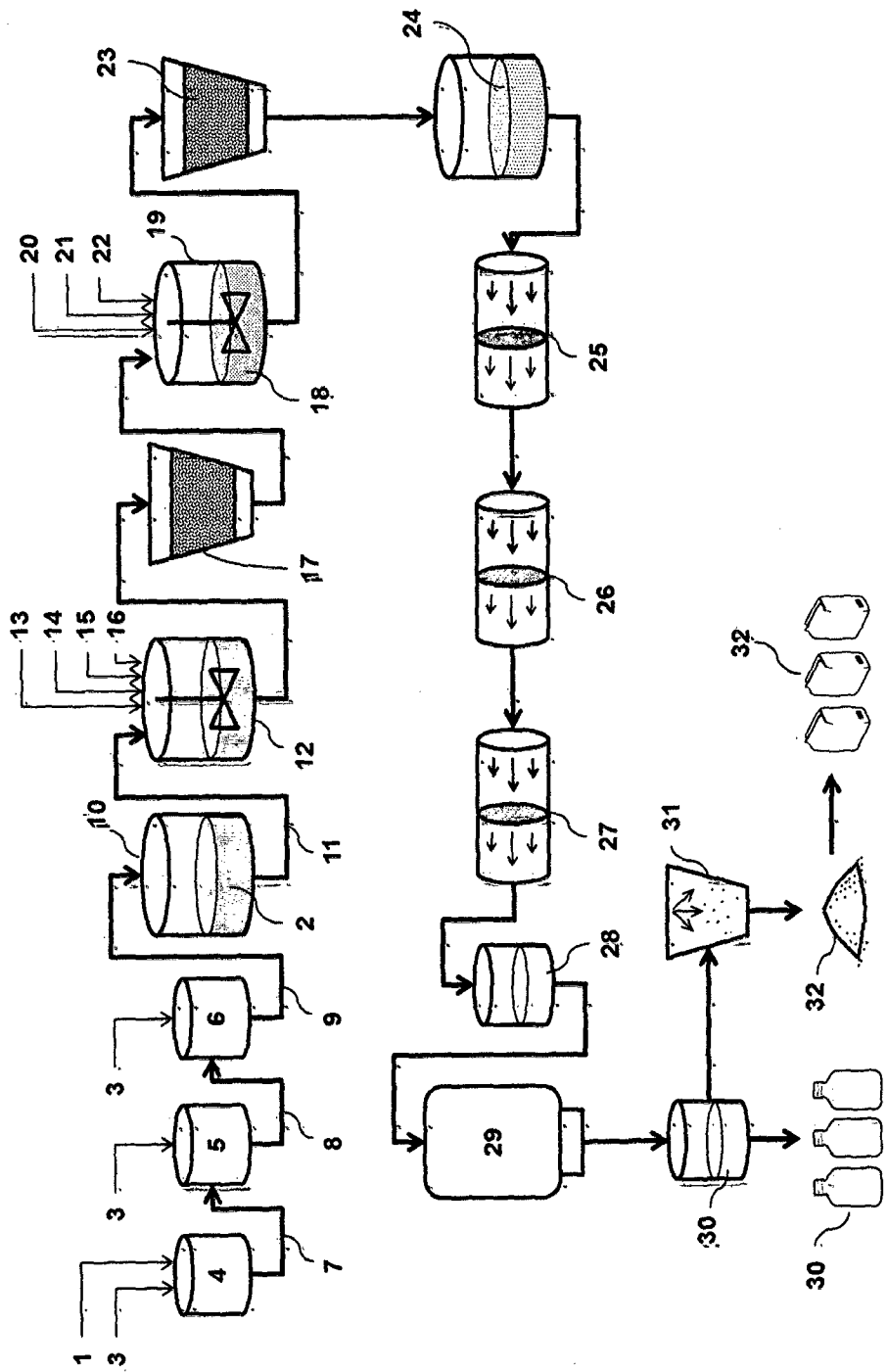


FIGURA 1

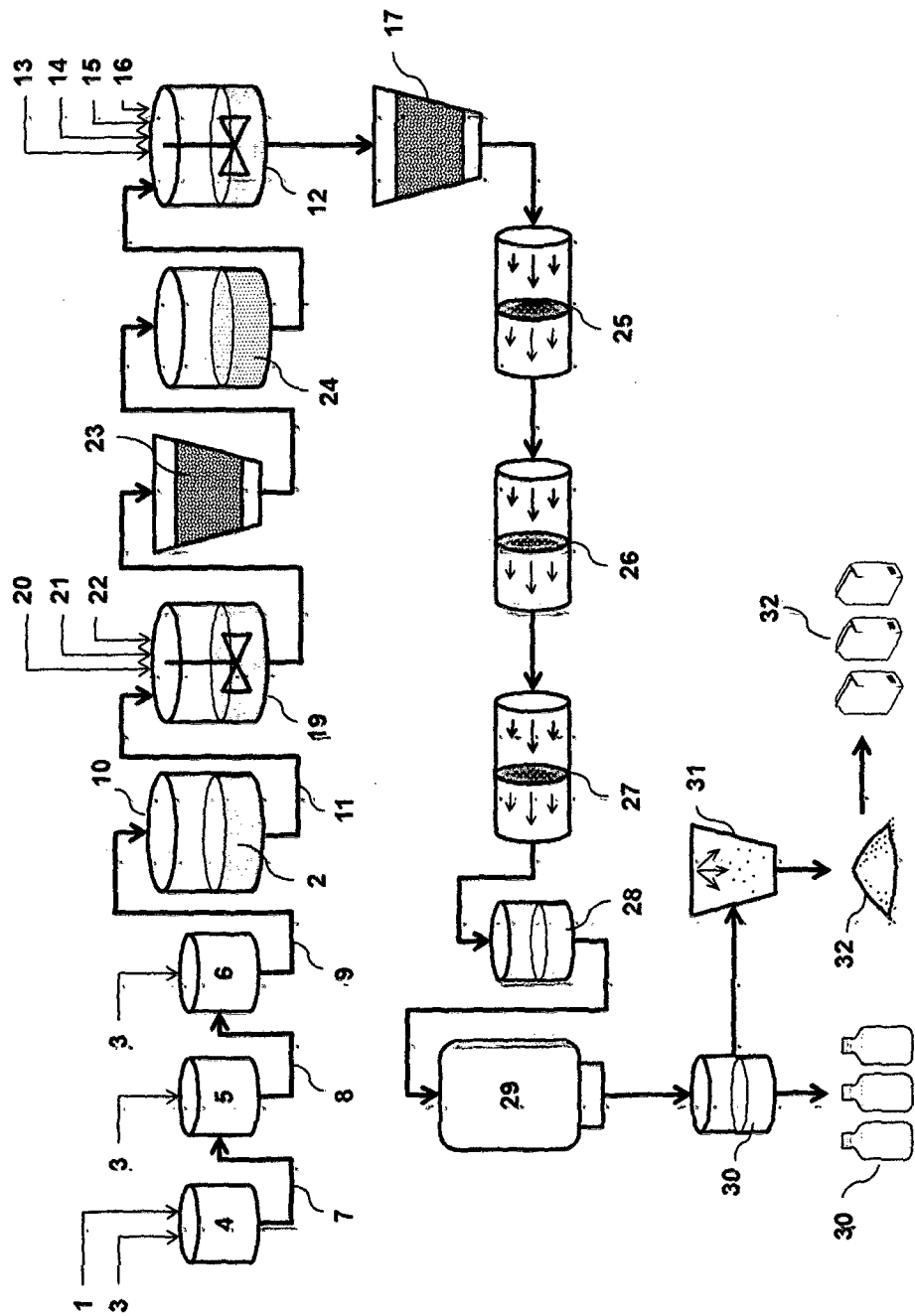


FIGURA 2

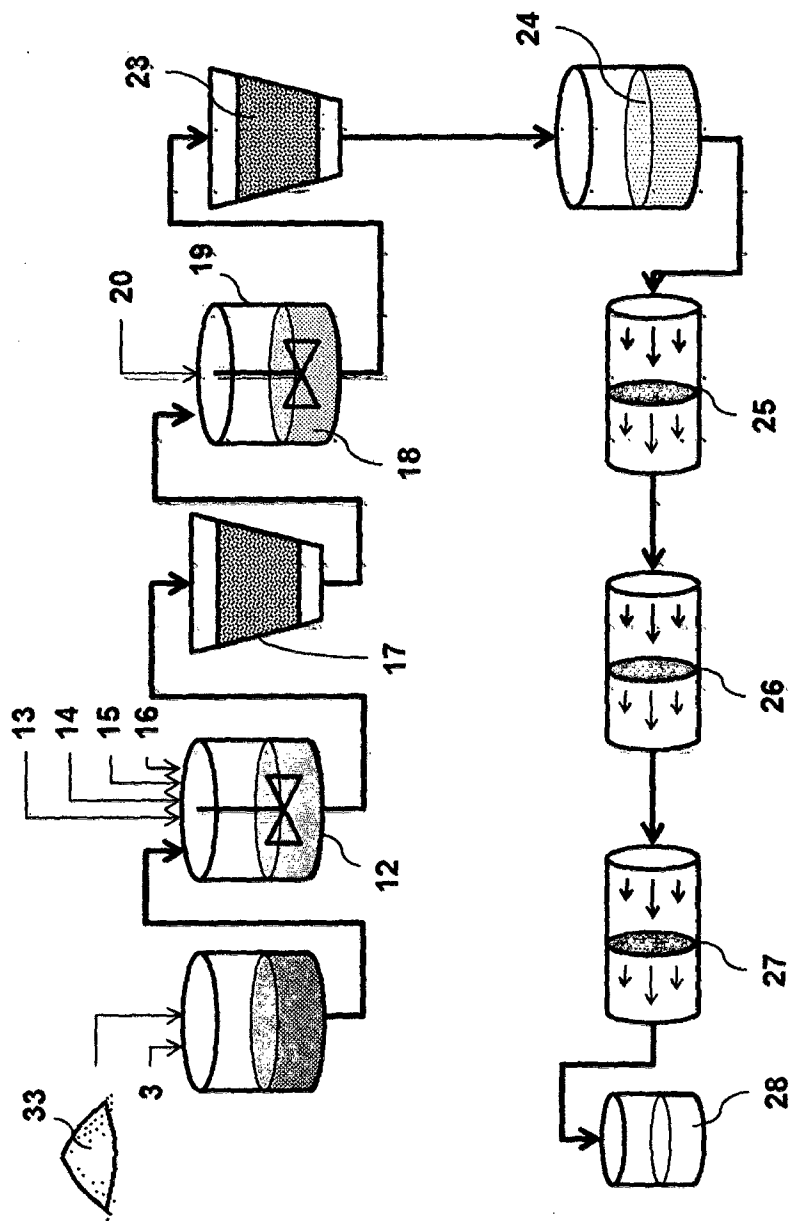


FIGURA 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2015/000062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(CIP) B01D11/00, C07J71/00, C07J63/00, C07J75/00 (2016.01)

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)

(CIP) B01D11/00, C07J71/00, C07J63/00, C07J75/00

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)

ESP@CENET, THOMSON, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENT, BEIC, INAPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7884195 B2 (LONG YUN LI) 08.02.2011 The whole document	17
X	CN 101747401 B (HANGZHOU TEA RES INST ALL CHINA FEDERATION OF SUPPLY AND MARKETING COOPERATIVES) 28.03.2012. The whole document	17
X	XIANG, Li, et al. A study on the extraction and purification technology of tea saponin. African Journal of Biotechnology, 2010, vol. 9, no 18, p. 2691-2696. DOI: 10.5897/AJB10.1235 The whole document	17
X	CHEOK, C.Y. et al. Extraction and quantification of saponins: A review. Food Research International, 2014, vol. 59, p. 16-40. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.057 The whole document	17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent 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)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“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

“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

“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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 2016

Date of mailing of the international search report

10/06/2016

Name and mailing address of the ISA/

INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile

Facsimile No.

Authorized officer

NARVAEZ H., Claudio

Telephone No.

56-2-28870551 56-2-28870550

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CL2015/000062

US 7884195 B2	08.02.2011	US2008227760 (A1)	18.09.2008
		EP1895966 (A1)	12.03.2008
		EP1895966 (A4)	20.01.2010
		JP2008539225 (A)	13.11.2008
		JP4773512 (B2)	14.09.2011
		WO2006115307 (A1)	02.11.2006
CN 101747401 B	28.03.2012	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2015/000062

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP) B01D11/00, C07J71/00, C07J63/00, C07J75/00 (2016.01)

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)

(CIP) B01D11/00, C07J71/00, C07J63/00, C07J75/00

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) ESP@CENET, THOMSON, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENT, BEIC, INAPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 7884195 B2 (LONG YUN LI) 08.02.2011 Todo el documento	17
X	CN 101747401 B (HANGZHOU TEA RES INST ALL CHINA FEDERATION OF SUPPLY AND MARKETING COOPERATIVES) 28.03.2012. Todo el documento	17
X	XIANG, Li, et al. A study on the extraction and purification technology of tea sapogenin. African Journal of Biotechnology, 2010, vol. 9, no 18, p. 2691-2696. DOI: 10.5897/AJB10.1235 Todo el documento	17
X	CHEOK, C.Y. et al. Extraction and quantification of saponins: A review. Food Research International, 2014, vol. 59, p. 16-40. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.057 Todo el documento	17

☐ 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.
20/05/2016 20/mayo/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
10/06/2016 10/junio/2016

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile
N° de fax

Funcionario autorizado
NARVAEZ H., Claudio
N° de teléfono 56-2-28870551 56-2-28870550

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2015/000062

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
US 7884195 B2	08.02.2011	US2008227760 (A1)	18.09.2008
		EP1895966 (A1)	12.03.2008
		EP1895966 (A4)	20.01.2010
		JP2008539225 (A)	13.11.2008
		JP4773512 (B2)	14.09.2011
		WO2006115307 (A1)	02.11.2006
CN 101747401 B	28.03.2012	Ninguna	