

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 203**

51 Int. Cl.:

A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)
B01D 61/02 (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)
B01D 61/58 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
B01D 63/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2008 E 08738428 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2131681**

54 Título: **Proceso para producir extractos nutraceuticos refinados a partir de residuos de alcachofa y otras plantas del género Cynara**

30 Prioridad:

28.02.2007 IT RM20070109

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2013

73 Titular/es:

GOLDWATER S.R.L. UNI PERSONALE (33.3%)
Via Maira 3
04100 Latina (LT), IT;
PIZZICHINI, MASSIMO (33.3%) y
ROMANI, ANNALISA (33.3%)

72 Inventor/es:

PIZZICHINI, MASSIMO;
ROMANI, ANNALISA;
PIZZICHINI, DANIELE;
RUSSO, CLAUDIO y
PINELLI, PATRIZIA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 401 203 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para producir extractos nutraceuticos refinados a partir de residuos de alcachofa y otras plantas del género *Cynara*.

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir extractos nutraceuticos refinados a partir de residuos de alcachofa y otras plantas del género *Cynara*. Más específicamente, la invención se refiere a un proceso para fraccionar y refinar productos naturales que se obtienen a partir de residuos de material vegetal, y particularmente el residuo de la producción de alcachofa, o a partir de otros materiales vegetales que vienen del género *Cynara*, tal como el cardo. El proceso se basa en el uso de tecnologías basadas en separación de membrana y permite la producción de extractos purificados de alto valor biológico para usar en la industria farmacéutica, en el campo
10 nutraceutico, en la industria cosmética o para productos innovadores en la industria alimentaria.

Como se sabe, el género *Cynara*, que pertenece a la familia *Compositae*, incluye las especies *Cynara cardunculus* que a su vez incluye la alcachofa (*C. cardunculus* L. subsp. *scolymus* L., normalmente llamada *Cynara scolymus*), el cardo cultivado (*C. cardunculus* L. var. *altilis* DC), el cardo salvaje (*C. cardunculus* L. var. *sylvestris* Lam.) y algunas otras especies menos conocidas. La inflorescencia de estas plantas, las cabezas, están hechas de muchas flores individuales, de un color púrpura cuando se abren, que se reúnen en la parte central mediante un receptáculo o
15 tálamo, alrededor de la parte más externa están las brácteas o involucreo.

Cuando son inmaduras y tiernas, se recolectan las cabezas de *Cynara scolymus*, antes de que las brácteas endurezcan y antes de que las flores centrales crezcan demasiado. Proporcionan la parte comestible de la alcachofa, comúnmente conocido como el "corazón", que consiste en el receptáculo y las flores que contiene, así como la base carnosa de las brácteas internas, y posiblemente de una parte del pedúnculo.
20

La alcachofa es un producto característico italiano, aunque en años recientes su cultivo también se ha extendido a otras área geográficas (tal como California, Argentina y Nueva Zelanda), y se ha estimado que el área mediterránea tiene 90% de la producción mundial, siendo Italia el producto líder con una producción estimada de mas de 500.000 toneladas/año. Aunque Italia tiene terreno considerable dedicado a la producción de alcachofa, también hay producción notable en España y Francia.
25

La producción italiana está principalmente destinada a consumo en fresco, incluso si la cantidad destinada a la industria de procesamiento de alimentos está creciendo, especialmente en lo que se refiere a la producción de alimentos conservados en aceite.

Al contrario que muchos otros cultivos, en el crecimiento de alcachofa la relación entre la parte comestible y la planta completa es extremadamente baja (aproximadamente 15%), y por tanto la cantidad de subproducto es considerable. El corazón de la alcachofa supone 40-55% del peso de la cabeza entera y contiene aproximadamente 15% de materia seca, y es particularmente rico en fibra. La parte restante, consiste en hojas y tallos, constituye el material residual que a menudo se debe desechar con costosos tratamientos adicionales de residuos de acuerdo con la legislación medioambiental. Esta materia residual se podría usar ampliamente y ventajosamente como un
30 componente semiprocésado tanto en alimentación humana como en alimentos para animales. El uso de materia residual y residuos que derivan del sector agronómico industrial de la producción de alcachofa y sus derivados podría permitir una reducción del impacto medioambiental de la propia producción, y la reducción de costes de trabajo y costes de eliminación de biomasa.
35

Aunque el presente estado de la técnica está dirigido esencialmente a su conversión en energía, estas biomásas casi nunca se considera que representen nuevas materias primas de coste bajo para la producción de bio-productos de alto valor añadido para la industria alimentaria, de fitoterapia y cosmética.
40

La fibra bruta total de la alcachofa, que consiste en 65% de celulosa, 21% de hemicelulosa y 14% de lignina, supone un global de 1,4% de la sustancia fresca. Desde un punto de vista nutricional y dietético, la alcachofa es un alimento noble por la abundancia de sustancias azoadas y por su contenido en hidratos de carbono. En esencia, es un vegetal con un valor energético medio (38 cal/100 g), no sólo rico en sales minerales (K, Na, Ca, P, Fe), vitaminas (A, B₁, C) y azúcares (incluyendo inulina, un polímero de fructosa de actividad pre-biótica, que promueve el equilibrio adecuado de flora bacteriana intestinal), pero también, y especialmente, compuestos de polifenoles responsables de actividad biológica considerable por la que la alcachofa se ha reconocido como una planta oficial desde la antigüedad.
45

En realidad, los extractos y pigmentos de alcachofa, que la mayoría se obtienen a partir de las hojas de las plantas, se han usado mucho como hepatoprotectores y reguladores de la función del hígado, en patologías hepatobiliares, como coleréticos (para incrementar el flujo biliar) e hipocolesterolémicos (para bajar los niveles de colesterol en la sangre). En general, ambas formas espontánea y cultivada del género *Cynara* se usan para extraer sustancias biofarmaceuticas.
50

Los diferentes compuestos de origen vegetal que contienen pueden expresar diferentes propiedades biológicas (antioxidantes, antirradicales, antimicrobiana) y, en muchos casos, la molécula sola es menos activa con respecto a la mezcla de compuestos, sugiriendo así una acción sinérgica entre ellos. En otras palabras, no es extraño encontrar
55

que extractos brutos de origen vegetal tienen una bioactividad más alta con respecto a la encontrada cuando se usan solos compuestos individuales de estas plantas.

Los compuestos responsables de las actividades biológicas de la alcachofa incluyen: a) los hidroxycinamatos de la familia del ácido clorogénico, entre ellos ácido clorogénico o monocateoilquinico (5-O-cafeoilquinico), dicafeoilquinico o ácido de cinarina (ácido 1,5-dicafeoilquinico); b) flavonoides y heterósidos flavonoides (luteolina y sus conjugados, tal como cinarósido (luteolin-7-O-glucósido), scolimósido, luteolin-glucurónido); c) sesquiterpenos lactona, entre ellos los compuestos responsables del sabor amargo característico, cinaropicrina y dehidrocinaropicrina.

Por tanto *Cynara* tiene aplicaciones importantes no sólo en fitoterapia sino también en la industria cosmética, donde los extractos se usan por sus propiedades antioxidantes y antirradicales libres.

En muchos estudios farmacológicos, se ha encontrado que los extractos de *Cynara* poseen diversas propiedades: (i) protegen a proteínas, lípidos y ADN de la oxidación causada por los radicales libres; (ii) muestran una actividad colerética, diurética y hepatoprotectora; (iii) inhiben la biosíntesis de colesterol contribuyendo a evitar arteriosclerosis y otras enfermedades circulatorias; (iv) inhiben VIH integrasa, la enzima clave en la replicación de VIH y en su integración en el genoma huésped; y (v) posee actividad antibacteriana.

Estudios recientes (Romani A., Pinelli P., Cantini C., Cimato A. & Heimler D. "Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.), Food Chemistry, 95, 221-225, 2006) sobre cultivares de Violetto di Toscana y Terom, la última ampliamente disponible en el mercado, han caracterizado el contenido de polifenol de diversos tejidos de *Cynara* (hojas, brácteas, cabezas, tallos) y se ha encontrado que el tallo tiene una composición de polifenol muy similar a la de la cabeza, esto es, la parte comestible de la alcachofa. Estos tejidos son esencialmente ricos en derivados de cafeoilquinico, mientras que las hojas y brácteas también son ricas en compuestos flavonoides.

También se han evaluado las propiedades antioxidantes en LDL humano (lipoproteínas de baja densidad) de extractos obtenidos a partir de diversos tejidos de alcachofa (Coinu R., Carta S., Urgeghe p. P., Mulinacci N., Pinelli P., Franconi F., Romani A. "Dose-Effect study on the antioxidante properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke", Food Chem., 2007, 101, 524-531) para los que siempre se ha registrado una actividad alta. Los estudios también se han extendido a cardo cultivado y su progenitor, el cardo salvaje, ambos pertenecen al género *Cynara*. Estas especies contienen antioxidantes polifenoles similares a los encontrados en la alcachofa (ácidos cafeoilquinico y flavonoides) (Pinelli P., Ieri F., Buzzini P., Turchetti B., Lanteri S., Romani A., "Composti polifenolici ad attività antimicotica in tessuti di diverse cultivar di carciolo", VII CISETA (Congresso Italiano di Scienza E Tecnologia degli Alimenti), Cernobbio (CO), 19-20 Settembre 2005). El cardo también contiene compuestos hidroxycinámicos que o bien están ausentes o sólo se encuentran en trazas en la alcachofa (Pinelli P., Agostini F., Comino C., Lanteri S., Portis E., Romani A., "Polyphenolic Composition of Wild and Cultivated Cardoon Leaves", 2007, próxima publicación).

En el campo fitoterapéutico más específicamente, se sabe que los extractos de alcachofa se obtienen por extracción con agua o con disoluciones hidroalcohólicas a partir de hojas o bien frescas o secas. Por ejemplo, la solicitud de patente de EEUU 2004/0234674 (Eich et al.) describe extractos de hoja de alcachofa caracterizados por que tienen un contenido total de ácidos cafeoilquinicos (mono- y dicafeoilquinicos) de al menos 6% con respecto a la cantidad total del extracto, y un contenido total de flavonoides de al menos 3%, aún con respecto a la cantidad total del extracto. Según la descripción, estos productos se obtuvieron por medio de extracción líquido-líquido de un extracto primario a partir de hojas frescas o secas de *Cynara*, en la que el disolvente de extracción es un disolvente orgánico no acuoso, y la fase acuosa resultante es la que se recupera.

Aún en el mismo campo, la solicitud de patente internacional número WO 2007/006391 (Indesa S.p.A.) describe extractos de *Cynara scolymus* que se obtienen por fraccionamiento sobre resinas, en la que las partes superficiales superiores de las plantas (incluyendo las cabezas), ambas en estado fresco y seco, se someten a extracción con una disolución hidroalcohólica a la que se añade una cantidad de cisteína para obtener una cantidad grande de cinaropicrina en el extracto final, y para mantener estable esta cinaropicrina en formulaciones terapéuticas. Se considera que los ácidos amino sulfurados dan lugar a aductos que estabilizan el sesquiterpeno. Después los extractos hidroalcohólicos se concentran, y las sustancias precipitadas se separan por filtración, y la disolución resultante se concentra y se purifica sobre una resina de adsorción. Finalmente, el extracto deseado se eluye con etanol de la resina.

La patente de EEUU número 5780060 (Levy et al.) describe el uso de extractos refinados basados en ingredientes de polifenol activo a partir de plantas para la producción de composiciones farmacéuticas, dietéticas o alimentarias. Los polifenoles de planta de interés se extraen a partir del material de planta respectivo y después se someten a retrocruzamiento interfacial con un agente de retrocruzamiento tal como un diácido haloideo, para dar un producto en la forma de microcápsulas.

La patente de EEUU número 6818234 (Nair et al.) describe la producción de complementos dietéticos para humanos que contienen fitoquímicos que se dan naturalmente que pueden ser útiles para aliviar dolor y como agentes

antiinflamatorios, comenzando a partir de productos vegetales. Los fitoquímicos de interés son antocianinas, un grupo específico de flavonoides que se encuentran principalmente en frutos rojos y azules y flores. Los complementos dietéticos basados en antocianinas se pueden obtener, según este documento, sometiendo el material inicial de plantas a extracción para obtener un zumo de extracto, que después se trata mediante tecnología de filtración de membrana tangencial (por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa) para obtener fracciones que contienen antocianina purificada.

Los artículos científicos de Rafael Llorach et al. (Llorach L. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 3458-3464; Llorach L. et al., *Eur. Food Res. Technol.*, 2005, 220:31-36) describe procesos para la producción de extractos a partir de subproductos de alcachofa. En el primer caso la materia prima vegetal se trató con ambos metanol y extracción con agua donde los respectivos extractantes se mantuvieron hirviendo durante 1 h; en el segundo caso el material vegetal se extrajo mediante reflujo con agua hirviendo 1:2 p/v durante 1 hora, y después se enfrió y se filtró.

Volviendo al sector agroalimentario, se debe señalar que no sólo el consumo de vegetales frescos, sino también, y especialmente, su procesado y envasado produce una cantidad alta de residuos (hojas, tallos y agua residual). En la industria de procesado de alcachofa, en algunos casos este residuo excede 60% de la masa vegetal total. Más allá de sus uso en fitoterapia y cosméticos, los extractos de residuos de alcachofa y cardo se pueden usar como aditivos para mejorar la calidad tanto de alimento para animales como de alimentación para humanos (bajando la peroxidación de lípidos e incrementando las propiedades saludables de los propios alimentos, así como proporcionando fibra). Además, gracias a las propiedades antimicrobianas de la alcachofa, los extractos de hoja se consideran como aditivos potenciales en alimentos para los que se busca la protección natural (biocontrol) contra microbios contaminantes.

En vista de lo anterior, un objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de producción que permita la reutilización ventajosa de los productos residuales de la producción de alcachofa y posiblemente otros materiales o residuos vegetales a partir de plantas específicamente cultivadas que pertenecen al género *Cynara*, para obtener extractos purificados, tanto en forma de polvo como líquido, útiles por sus ingredientes activos para usar en la industria agroalimentaria así como en productos nutraceúticos, fitoterapéuticos, cosméticos y dermatológicos.

En este extremo, se ha ideado un método de producción, según la presente invención, para producir extractos de residuos de alcachofa, en particular pero no exclusivamente a partir de hojas de planta, y en base a un proceso de refinado que usa tecnologías basadas en separación de membrana. Como se sabe, estas tecnologías son una alternativa segura, fiable e innovadora (Best Available Technology) para las técnicas de extracción con base de disolvente tradicionales. Estas técnicas no introducen sustancias que contaminan (y, en particular, no usan disolventes orgánicos), funcionan a temperatura ambiente y así no dañan térmicamente la matriz, son perfectamente esterilizables, y por tanto son seguras microbiológicamente, y también han sido ampliamente tratadas y probadas en las preparaciones farmacéuticas más delicadas.

El proceso propuesto se basa en el uso especializado de tecnologías basadas en separación de membranas, aplicada directamente en una decocción bruta, en agua, de materiales vegetales que se van a tratar, después de separar el material sólido de él por medio de filtración mecánica. El líquido filtrado se somete a una fase de microfiltración tangencial (MF), una fase de ultrafiltración tangencial (UF) sobre el permeado previo, cuyo producto permeado produce prácticamente la cantidad total de ingredientes activos nutraceúticos de *Cynara*, y una fase de ósmosis inversa (RO) sobre el permeado UF, que produce un retenido rico en ingredientes activos concentrados y un permeado, que consiste en agua ultrapura, que se recicla en las fases previas de extracción, y en la preparación del baño de decocción.

Para algunos de los usos concebidos, el concentrado RO se seca o se liofiliza para obtener un polvo estable rico en moléculas de polifenoles antioxidantes, en particular, flavonoides (tales como los glucósidos de luteína y apigenina) y ésteres cafeolquínicos (tales como ácido clorogénico y cinarina).

Por tanto, la presente invención específicamente proporciona un proceso para la producción de extractos refinados a partir de plantas del género *Cynara*, que comprende, en orden, las siguientes operaciones:

- a) obtener una decocción de un material vegetal a partir de residuos de alcachofa o a partir de otras plantas del género *Cynara*, en agua, por medio de infusión caliente (esto es, a temperaturas más altas que la temperatura ambiente, pero más baja que el punto de ebullición) por calentamiento de dicho material en agua, con una proporción peso/volumen entre 10 y 35% a una temperatura entre 80°C y 95°C, durante un tiempo global que está en el intervalo entre 15 y 45 minutos;
- b) separar mecánicamente el material vegetal obtenido en la fase previa a partir de la fase líquida filtrada;
- c) tratar dicha fase líquida filtrada que resulta de la operación b) por medio de microfiltración tangencial (MF), para producir una fase de retenido y una fase de permeado;
- d) tratar el permeado que proviene de la operación anterior por medio de ultrafiltración tangencial (UF), para producir una fase de retenido y una fase de permeado;

- e) tratar el permeado que proviene de la operación d) por medio de ósmosis inversa (RO), para producir una fase de retenido rica en ingredientes de polifenoles activos y una fase de permeado que consiste en agua desmineralizada;

5 dicha decocción de material vegetal separada de la fase b), se empobrece en compuestos de polifenol amargos, y se reutiliza como alimento para animales, y dichas fases de retenido MF y UF que vienen de las operaciones c) y d) se reutilizan en el sector de alimentación humana.

Preferentemente, el concentrado de ósmosis inversa, rico en ingredientes activos de polifenol purificado, se seca por pulverizado o se liofiliza para obtener un polvo estable rico en moléculas antioxidantes.

10 Con referencia específica al caso en que el material vegetal que se trata está compuesto por residuos del proceso de producción de alcachofa, y específicamente las hojas, brácteas externas y/o tallos o incluso cabezas que se consideran no comestibles, este material se puede usar después de su separación en diversos tipos de tejidos o mezclado y, como ya se señaló con referencia a textos científicos publicados o en publicación, dará lugar a productos refinados de composición química general diferente. En esencia, los productos refinados que se obtienen a partir de tallos o a partir de cabezas tienen composición de ingredientes activos muy similar, con una prevalencia de compuestos cafeoilquínicos, mientras que las hojas y brácteas también son ricas en derivados flavonoides.

15 Como ya se indicó, el proceso de la invención se puede utilizar no sólo para material vegetal seleccionado de hojas de alcachofa, brácteas externas, tallos y cabezas tomados separadamente o mezclados, sino que también para el caso donde el material vegetal viene de cardo cultivado, *C. cardunculus* L. var. *atillis*, o incluso a partir de cardo salvaje, *C. cardunculus* L. var. *sylvestris*. En todos estos casos, los ingredientes activos que se recuperan de la operación de ultrafiltración pertenecen a familia de polifenoles correlativos, incluso si, dependiendo de la variedad botánica y también del cultivar y condiciones de cultivo y cosecha, la cantidad de los compuestos individuales que pertenecen a las principales familias será diferente.

20 La decocción del material vegetal se lleva a cabo calentando dicho material en agua (agua de grifo o destilada) a una temperatura entre 80°C y 95°C, y preferentemente 85°C, con una proporción peso/volumen entre 10 y 35%, durante un intervalo de tiempo general entre 15 y 45 minutos, y preferentemente aproximadamente 30 minutos. Al final del calentamiento en el medio acuoso, la decocción se recolecta mediante filtración mecánica sobre un filtro de malla de 2-10 mm, y preferentemente un filtro de malla de acero inoxidable de 2 mm.

25 Las hojas y tallos de la alcachofa se pueden someter a una segunda fase de extracción por calor para eliminar totalmente los ingredientes activos residuales. En este caso, después de la fase b) de separación mecánica, la materia vegetal separada se somete a una segunda fase de decocción, seguido de una separación mecánica más del material vegetal obtenido, para producir una fase líquida filtrada.

30 La parte de vegetal residual que se recolecta después de la decocción se empobrece o se evita completamente (segunda extracción) de compuestos de polifenol y cafeína, que son particularmente amargos, normalmente presentes en *Cynara*, y así puede ser una materia prima interesante para alimento de ganado, también por adición de otros componentes (forraje, alfalfa, trébol, etc).

35 Después el líquido filtrado de la decocción se enfría a 30°C y se trata con tres tecnología diferentes basadas en filtración tangencial de membrana: microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa.

40 La operación c) de microfiltración tangencial se puede llevar a cabo con membranas de polímero en espiral o membranas cerámicas, con un tamaño molecular en el intervalo 0,10-3,0 µm. Dichas membranas de polímero en espiral preferentemente se hacen de poliétersulfona, acetato de celulosa regenerado o nylon, mientras que las de cerámica preferentemente se hacen de un monolito cerámico celular de alúmina con un recubrimiento interno de zirconio u óxido de titanio, de tipo isoflux, de forma de "girasol" o "dalia", con 23 ó 39 canales de filtración.

45 Según las realizaciones preferentes de la invención, al final de dicha operación c) de MF se lleva a cabo una diafiltración, alimentando la membrana con agua desmineralizada (permeado de RO), que se añade al retenido de MF.

La operación d) de ultrafiltración tangencial preferentemente se lleva a cabo con membranas de polímero de límite molecular entre 500 Dalton y 50 kDalton. Las membranas de polímero de UF son de tipo espiral y están hechas de uno de los siguientes materiales: polisulfona, poliétersulfona, nylon o acetato de celulosa regenerado.

50 Aún según una solución preferente de la presente invención, al final de dicha operación d) de UF se lleva a cabo una diafiltración, alimentando la membrana con agua purificada (permeado de RO), obtenida a partir de dicha operación e) de ósmosis inversa, que se añade al retenido de UF.

Como ya se indicó, la operación de ósmosis inversa se lleva a cabo para eliminar el agua (permeado) y para concentrar los ingredientes activos de *Cynara*, y se puede llevar a cabo con membranas de polímero de espiral con rechazo salino bajo o alto normalmente a presiones en el intervalo entre 0,7 5 MPa (7 y 50 bares) y a velocidades de

alimentación de flujo entre 0,5 y 2 m³/h, cuando se usan módulos de tipo espiral de 10,16 x 101,6 cm (4 x 40 pulgadas).

5 Según algunas formas de realizaciones específicas de la invención, las membranas usadas son membranas de polímero de diversa naturaleza química, forma geométrica (plano, fibra hueca, espiral, tubular, cajón, etc) y tamaño de los módulos.

10 Si se desea, los ingredientes activos de polifenol del concentrado de RO se pueden aprovechar directamente con el producto en forma líquida, o se pueden secar para obtener un polvo. Preferentemente, dichas operaciones de secado de retenido de ósmosis inversa se llevan a cabo por secado por pulverizado, posiblemente después de añadir dextranos o maltodextrinas (preferentemente 30 g/l) al retenido de RO para mejorar la textura y estabilidad del polvo.

15 Los extractos refinados basados en ingredientes activos de polifenol purificado que se obtienen directamente del proceso propuesto según la presente invención se usan ventajosamente tanto para producción alimentaria como para productos nutraceuticos, farmacéuticos, fitoterapéuticos y cosméticos. En particular, estos extractos se pueden usar incluso en productos alimentarios innovadores tal como masas especiales para hornear productos y/o productos en polvo o, en forma líquida, como aditivos estabilizantes para productos alimentarios, tal como para estabilizar (en vez de ácido ascórbico) productos vegetales "frescos" tal como corazones de alcachofa que se usan, sin conservantes, en la industria de hostelería.

20 En forma de polvo sólido, los extractos refinados de *Cynara* preparados según la presente invención son útiles no sólo como ingredientes activos nutraceuticos y farmacéuticos, tales como productos de venta sin receta (OTC), pero también como componentes semiterminados de antioxidantes y actividad antirradicales libres para productos cosméticos y dermatológicos.

En resumen, el sistema de producción según la invención se caracteriza por los siguientes aspectos ventajosos:

- ♦ usa un proceso innovador capaz de recuperar y reutilizar todos los componentes químicos que resultan del tratamiento de los residuos de la producción de alcachofa;
- 25 ♦ respeta el medioambiente, también mediante la reutilización integrada de efluentes secundarios, incluyendo agua osmotizada;
- ♦ evita el uso de disolventes orgánicos en la extracción, que afectaría negativamente el uso del ingrediente activo recuperado en productos alimentarios y farmacéuticos;
- 30 ♦ permite el desarrollo de un proceso industrial a una escala de acuerdo con las cantidades de materia prima disponibles en el territorio nacional debido a las tecnologías de membrana, que son modulares y así fácilmente adaptables a cualquier escala de producción;
- ♦ permite usar un intervalo de ingredientes activos purificados, concentrados, formulados de forma estable.

35 Las características específicas de la presente invención, así como sus ventajas y modalidades relativas de operación, se harán más evidentes con referencia a la descripción detallada presentada simplemente con propósitos de ejemplos a continuación, junto con los resultados de los experimentos llevados a cabo. Los diagramas de los procesos propuestos y algunos resultados experimentales también se ilustran en los dibujos adjuntos, donde:

la figura 1 muestra un diagrama de bloque del proceso de extracción y refinado de material vegetal del género *Cynara* según la presente invención;

40 la figura 2 muestra la tendencia en el tiempo del flujo de permeado a través de la membrana de microfiltración (MF) del ejemplo;

la figura 3 muestra la tendencia en el tiempo del flujo de permeado a través de la membrana de ultrafiltración (UF) del ejemplo;

la figura 4 muestra el cromatograma HPCL del polvo de extracto de alcachofa obtenido como el producto final a partir del proceso del ejemplo, con la leyenda de los compuestos de polifenol presentes; y

45 la figura 5 muestra el cromatograma HPCL del polvo obtenido a partir de extracto de cardo salvaje, con la leyenda de los compuestos de polifenol presentes.

Ejemplo.

El esquema global del proceso aplicado es el mismo que el que se muestra en la figura 1.

Decocción de la materia vegetal.

El extracto acuoso de hojas de alcachofa se obtiene calentando el material vegetal (hojas, brácteas, las cabezas consideradas no comestibles por su tamaño, etc) en agua a 85°C durante aproximadamente 30 minutos, evitando que bulla.

- 5 En este caso, se usaron 25 kg de material vegetal fresco (hojas) en 100 l de agua de grifo (25% de peso seco), sin requerimientos particulares de pureza química. La disolución de decocción se separa de las hojas simplemente filtrando sobre una malla de alambre de 2 mm y después se alimenta la microfiltración tangencial. Esta disolución se caracterizó respecto al contenido de polifenol del extracto inicial (el dato introducido es necesario tanto para las condiciones de extracción estándar como para definir las características del producto terminado).

Microfiltración de la decocción, con límite molecular de 0,14 µm

- 10 El extracto acuoso se microfiltró (MF) con membrana cerámica tubular de alúmina, internamente recubierta con zirconio, del tipo isoflux de Tami (Francia), y con forma de un "girasol" (23 canales, 3,6 mm de diámetro) con una porosidad de 0,14 µm y superficie de filtración de 0,35 m².

- 15 El proceso se lleva a cabo con un aparato piloto de ENEA Casaccia Laboratories que usa dos membranas cerámicas en paralelo del tipo descrito anteriormente. Los parámetros del proceso del ensayo MF se indican en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1. Parámetros del proceso del ensayo de MF de 0,14 µm

Parámetros del proceso	Valor
Velocidad de flujo	9,5 m ³ /hora
Presión transmembrana	0,135 MPa (1,35 bar)
Temperatura	20-29 °C
Velocidad de flujo	5,6 m/s
VCR (proporción de concentración volumétrica)	alrededor de 3,5

El diagrama de la figura 2 adjunta muestra la curva de producción en términos de litros producidos a lo largo del tiempo y con respecto a la superficie de filtración del ensayo MF de 0,14 µm.

- 20 Una vez que se alcanza el VCR (proporción de concentración volumétrica) de 3,5, los 28 litros de concentrado de MF de 0,14 µm se añaden con 23 litros de agua osmotizada (MF/DF), continuando la filtración para incrementar la extracción de las moléculas de interés en el permeado. El proceso MF/DF con una membrana de 0,14 micrómetros produjo 26,5 litros de permeado. El volumen final de concentrado de 0,14 micrómetros MF/DF es de aproximadamente 25 litros. La tasa media del flujo de permeado en DF incrementa a valores de aproximadamente 170 (L/m²h).

- 25 Ultrafiltración del permeado de MF, con límite molecular de 6 kD.

Esta operación utiliza, como alimentador, una disolución de 97 L, + volumen de retención (alrededor de 7 litros), para un total de aproximadamente 104 L.

La operación de UF se dirige a eliminar compuestos de alto peso molecular (proteínas, compuestos coloidales, pectinas, ceras, fragmentos de paredes celulares, etc.).

- 30 Se usa una membrana de polímero de polietersulfona en espiral (Osmonics, EEUU), con un tamaño molecular de 6 kD, espaciado 28 mil y superficie de filtrado de 8,36 m².

Los parámetros del proceso del ensayo de UF se muestran en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Parámetros de proceso del ensayo de UF de 6 kD

Parámetros del proceso	Valor
Velocidad de flujo	4,4 m ³ /hora
Presión transmembrana	0,47 MPa (4,7 bar)
Temperatura	22-24 °C
Velocidad de flujo	0,25 m/s
VCR (proporción de concentración volumétrica)	alrededor de 4,1

Una vez que se alcanza el VCR de aproximadamente 4,1, a los 24 litros de concentrado (+ volumen de retención) se añaden 21 litros de agua osmotizada cuatro veces (haciendo un total de 84 litros añadidos), continuando con el filtrado (UF/DF) para incrementar el rendimiento. Se obtuvieron un total de 95 litros de permeado de UF/DF de 6 kD y 13 litros + volumen de retención del concentrado de UF/DF de 6 kD.

- 5 El diagrama de la figura 3 adjunto muestra la curva de producción en términos de litros producidos a lo largo del tiempo y con respecto a la superficie de filtrado de los ensayos de UF y UF/DF de 6 kD.

Operación de ósmosis inversa (RO) sobre el permeado de UF.

Los permeados de UF y los de UF/DF se tratan con RO para concentrar el producto rico en sustancias antioxidantes, y para eliminar el agua, como permeado.

- 10 Se concentraron 80 litros de permeado de UF de 6 kD junto con 95 litros de permeado de UF/DF de 6 kD (+ volumen de retención de aproximadamente 10 litros), para un total de 185 L, en RO con un aparato piloto equipado con un módulo de polímero hecho de compuesto de poliamida de espiral con rechazo salino alto, de la compañía DE SAL (EEUU), con una superficie de filtrado de 7,0 m². Los parámetros del proceso se muestran en la tabla 3 siguiente.

Tabla 3. Parámetros del proceso del ensayo de RO.

Parámetros del proceso	Valor
Velocidad de flujo	0,65-0,60 m ³ /hora
Presión de trabajo	2,0-2,6 MPa (20-26 bar)
Temperatura	22-27 °C
Media de flujo de permeado	0,22 (L/m ² h)
Salinidad expresada en mg/l	0-56
VCR (proporción de concentración volumétrica)	15,0

- 15 La productividad de la membrana permanece constante en la región de 18,8 L/m² por hora a lo largo del ensayo.

Durante el ensayo, la presión, inicialmente fijada a 2,0 MPa (20 bar), automáticamente se eleva en el aparato hasta 2,6 MPa (26 bar) después de 40 minutos, debido a un incremento en la salinidad del permeado. Por esta razón, la productividad a 2,6 MPa (26 bar) incrementa a 23,14 L/m² por hora.

- 20 El ensayo de RO duró un total de 65 minutos, en los que no se observó pérdida de permeabilidad del módulo, lo que significa que esta membrana puede trabajar sin lavarse durante periodos largos (meses).

El producto concentrado líquido es verde claro debido a la presencia de clorofila.

Como se muestra en el proceso del diagrama de la figura 1, el permeado de RO se reutiliza para preparar el nuevo baño de extracción, esto es, para preparar la decocción, evitando el uso de agua de grifo o de pozo.

- 25 Secado del concentrado de RO.

El producto líquido obtenido como un retenido en la fase precedente después se hace polvo mediante un proceso de secado por pulverizado por medio de un secador por pulverizado de laboratorio de tipo ICF Lab 25 con una capacidad de evaporación de 500 ml/h.

Las condiciones de trabajo del secado por pulverizado son las siguientes:

- 30 velocidad de bombeo: 5 ml/minuto;
 temperatura de la cámara de secado por pulverizado: 90°C;
 temperatura de salida del aire: 85°C;
 vacío: 3 kPa (30 mbar).

- 35 El concentrado de RO se somete a secado por pulverizado dando un producto en polvo sólido verde amarillento que contiene aproximadamente 5% de humedad. Este polvo se puede secar más en un horno, y se debe proteger de la humedad, debido a su naturaleza higroscópica.

También se estudió la posibilidad de obtener extractos sólidos de diversas concentraciones, con la adición de dextranos o maltodextrinas, o polvo inerte tal como silicio, según la propuesta.

Ciclo de lavado de la membrana.

5 Al final del ciclo de trabajo, los módulos de membrana se deben reacondicionar para llevar a cabo el siguiente ciclo de trabajo. Esto permite eliminar cualquier depósito que se forma sobre la membrana para restaurar el mejor flujo de permeado, esto es, la productividad de estos filtros. Para lavar las membranas de cerámica de MF es necesario primero enjuagar el módulo con agua de grifo durante 5 minutos y después hacer lavado químico con una disolución base (sosa 0,5 M) a 35°C durante 25 minutos en modo continuo. Después se lleva a cabo un segundo lavado para eliminar el reactivo químico hasta que se obtiene la neutralización de la disolución de lavado.

10 Para la UF, la operación de enjuague se lleva a cabo con agua de grifo durante 5-10 minutos, sin reciclar el agua, seguida de tratamiento con sosa 0,25 M durante 15 minutos. Al final de esta operación, el módulo se lava con agua de grifo y se comprueba su permeabilidad.

Para la RO, el protocolo de lavado simplemente prevé enjuagar con agua de grifo, seguido de lavado con agua destilada.

15 Análisis cromatográfico del concentrado de RO seco.

En la figura 4 adjunta se muestra el cromatograma del polvo obtenido por secado del concentrado de RO.

Cada molécula se cuantifica individualmente y la titulación del extracto se define como derivados cafeoilquínicos totales y como flavonoides totales, además de los polifenoles totales presentes.

20 La tabla 4 siguiente muestra los resultados cuantitativos de las moléculas individuales identificadas en relación con el extracto acuoso inicial y el concentrado de RO después del proceso basado en separación por membrana. Los datos se obtienen por análisis HPLC/DAD.

Tabla 4

Compuestos individuales en extractos de alcachofa, ppm

	Extracto acuoso	RO concentrado
Ácido clorogénico	262,7	466,7
MCQ (mono cafeoilquínicos)	496,0	895,4
Cinarina	46,0	81,3
Otros DCQ (di cafeoilquínicos)	42,0	38,0
Luteolin 7-O-rutinosido	47,9	63,9
Luteolin 7-O-glucosido	14,0	21,0
Luteolin 7-O-malonil glucosido	8,5	13,0
Luteolin	2,9	3,3
Polifenoles totales	920,7	1.582,6

25 La capacidad de antirradicales libres del extracto que se puede correlacionar con las propiedades antioxidantes se evalúa espectrofotométricamente por medio de los radicales estables DPPH. Estudios previos sobre hojas o brácteas de alcachofa mostraron un efecto dependiente de la dosis, que también está correlacionado con el tipo de moléculas presentes, sobre LDL humano (Coinu et al. 2006, *loc. cit.*).

30 La mayoría de la cinarina presente en los extractos acuosos de alcachofa deriva de ácido 1, 3-dicafeoilquínico, inicialmente encontrado en la planta fresca después de transesterificación intramolecular causada por calentamiento (Panizzi L. & Scarpati M.L., *Gazz. Chim. Ital.*, 95, 71-82, 1965). El ácido 1,3-dicafeoilquínico es el componente más numeroso de ésteres de dicafeoilquínico en extractos hidroalcohólicos obtenidos en frío, donde el componente más numeroso es el derivado de 5-cafeoilquínico monosustituido.

35 La tabla 5 siguiente muestra los resultados cuantitativos de los compuestos simples analizados por HPLC/DAD obtenidos por secado por pulverizado de concentrado de RO, considerando la muestra 1 como el polvo que es, y la muestra 2 después de añadir 25g/l de dextrano al concentrado de RO.

Tabla 5

Compuestos individuales en polvo de concentrado de RO seco, mg/l

	Muestra 1	Muestra 2
Ácido clorogénico	34,4	17,2
MCQ (mono cafeoilquínicos)	64,8	32,6
Cinarina	5,5	2,9
Otros DCQ	3,1	1,0
Luteolin 7-O-rutinosido	5,0	2,5
Luteolin 7-O-glucosido	2,0	1,0
Luteolin 7-O-malonil glucosido	1,2	0,5
Luteolin	0,3	0,2
Polifenoles totales	116,3	57,9

5 Tanto el extracto acuoso inicial como todas las disoluciones intermedias, incluyendo el concentrado de RO y producto secado por pulverizado, se analizaron HPLC/DAD/MS para establecer el contenido en los derivados cafeoilquínicos y flavonoides presentes. Se estandarizaron las condiciones analíticas y de cuantificación.

10 Los resultados previos muestran como este tipo de procesos pueden dar extractos tanto líquidos como en polvo de diferentes contenidos en compuestos de polifenol. Los extractos pueden, en realidad, venir de una mezcla de todo el material de desecho del procesado de alcachofa o es posible concebir la idea de un sistema de aire comprimido que separa los tallos y cabezas de los tejidos más ligeros, que consisten en brácteas y hojas. De este modo, el procesado de las cabezas y tallos dará un extracto rico en derivados cafeoilquínicos, mientras que se puede obtener un extracto rico en estos componentes y en flavonoides a partir de las brácteas y hojas.

Así pueden usar las mismas tecnologías y condiciones de extracción para tejidos de cardo tanto cultivado como salvaje para obtener extractos que son cuantitativamente y cualitativamente diferentes de los de alcachofa.

15 Específicamente, la figura 5 adjunta muestra un cromatograma HPLC de un extracto hidroalcohólico de cardo salvaje, que da las proporciones específicas de los diversos compuestos de polifenol presentes.

20 También es importante especificar que los componentes bioactivos de los extractos previos se pueden expresar tanto por el contenido total obtenido espectrofotométricamente como por el contenido en las tres subclases diferentes (ésteres mono- y dicafeoilquínico y flavonoides) evaluado por medio de HPLC/DAD. Como se describió anteriormente, cada fracción también se puede evaluar por la actividad antirradicales libres específica por medio de DPPH que se puede correlacionar con las propiedades antioxidantes del propio extracto.

25 Como se puede ver de lo anterior, una de las principales ventajas de la presente invención es la posibilidad de valorar y reutilizar las grandes cantidades de biomasa vegetal que resultan de desechos de la producción de alcachofa, obteniendo así productos de alto valor añadido para la industria alimentaria y farmacéutica, por medio de un proceso que respeta el medio ambiente y ecosistema.

Se ha descrito la presente invención con referencia particular a algunas de sus realizaciones específicas, pero debería entenderse que personas expertas en la técnica pueden hacer modificaciones y cambios sin salirse del ámbito de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de extractos refinados de plantas del género *Cynara*, que comprende, en orden, las siguientes operaciones:
 - 5 a) obtener una decocción de material vegetal a partir de residuos de alcachofa o a partir de otras plantas del género *Cynara*, por calentamiento de dicho material en agua, con una proporción peso/volumen entre 10 y 35% a una temperatura entre 80°C y 95°C, durante un tiempo global que está en el intervalo entre 15 y 45 minutos;
 - b) separar mecánicamente el material vegetal obtenido en la fase previa a partir de la fase líquida filtrada;
 - 10 c) tratar dicha fase líquida filtrada que resulta de la operación previa por medio de microfiltración tangencial (MF), para producir una fase de retenido y una fase de permeado;
 - d) tratar el permeado que proviene de la operación anterior por medio de ultrafiltración tangencial (UF), para producir una fase de retenido y una fase de permeado;
 - 15 e) tratar el permeado que proviene de la operación d) por medio de ósmosis inversa (RO), para producir una fase de retenido rica en ingredientes de polifenoles activos y una fase de permeado que consiste en agua desmineralizada;

dicha decocción de material vegetal obtenido a partir de separación mecánica, se empobrece en compuestos de polifenol amargos, y se reutiliza como alimento para animales, y dichas fases de retenido de MF y UF que vienen de las operaciones c) y d) se reutilizan en el sector de alimentación humana.
- 20 2. Un proceso según la reivindicación 1, donde dicha fase de retenido de ósmosis inversa rica en ingredientes activos de polifenol purificados que se obtienen a partir de la operación e) se somete a secado por pulverizado o a liofilizado.
3. Un proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicho material vegetal del que se obtiene la decocción deriva de hojas, brácteas externas, tallos y cabezas de alcachofa, *Cynara scolymus*, o bien tomados separadamente o intermezclados.
- 25 4. Un proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, donde dicho material vegetal del que se obtiene la decocción deriva de hojas, brácteas externas, tallos y cabezas del cardo cultivado, *C. cardunculus* L. var. *altilis*, o bien tomados separadamente o intermezclados.
5. Un proceso según la reivindicación 1 ó 2, donde dicho material vegetal del que se obtiene la decocción deriva de hojas, brácteas externas, tallos y cabezas del cardo salvaje, *C. cardunculus* L. var. *sylvestris*, o bien tomados separadamente o intermezclados.
- 30 6. Un proceso según la reivindicación 5, donde dicho material vegetal se calienta a una temperatura de 85°C durante un periodo de tiempo global de 30 minutos.
7. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicha operación b) de separación mecánica del material vegetal obtenido de la fase previa se lleva a cabo por filtración mecánica sobre un filtro de malla de alambre de 2-10 mm.
- 35 8. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde después de dicha fase b) de separación mecánica, el material vegetal separado se somete a una segunda fase de decocción seguida de más separación mecánica del material vegetal obtenido, para dar una fase de líquido filtrado.
9. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicha operación c) de microfiltración tangencial se lleva a cabo por medio de membranas de polímero en espiral o membranas cerámicas con un límite molecular en el intervalo de 0,10-3,0 µm.
- 40 10. Un proceso según la reivindicación 9, donde dichas membranas de polímero están hechas de polietersulfona, acetato de celulosa regenerado o nylon.
11. Un proceso según la reivindicación 9, donde dichas membranas cerámicas para microfiltración están hechas de un monolito cerámico celular de alúmina con un recubrimiento interno de zirconio u óxido de titanio.
- 45 12. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde al final de dicha operación c) de microfiltración tangencial (MF) se lleva a cabo una diafiltración, alimentando la membrana con agua desmineralizada que se obtiene a partir de dicha operación e) de ósmosis inversa, que se añade al retenido de MF.

ES 2 401 203 T3

13. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que dicha operación d) de ultrafiltración tangencial se lleva a cabo con membranas de polímero con un límite molecular entre 500 Dalton y 50 kDalton.
14. Un proceso según la reivindicación 13, en el que dichas membranas de polímero para UF son espirales.
- 5 15. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que al final de dicha operación d) de ultrafiltración tangencial (UF) se lleva a cabo una diafiltración, alimentando la membrana con agua desmineralizada obtenida a partir de dicha operación e) de ósmosis inversa, que se añade la retenido de UF.
16. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicha operación e) de ósmosis inversa se lleva a cabo con membranas de polímero en espiral con rechazo salino bajo o alto a una presión de trabajo entre 0,7 y 5 MPa (7 y 50 bar).
- 10 17. Un proceso según la reivindicación 16, en el que dichas membranas de polímero en espiral tienen un espaciador de malla con espesor en el intervalo entre 0,51 y 0,97 mm (20-38 mil), y tamaño de los módulos de filtrado de 10,16 cm de diámetro x 101,6 cm de longitud (4 pulgadas x 40 pulgadas), 15,24 cm de diámetro x 101,6 cm de longitud (6 pulgadas x 40 pulgadas), ó 20,32 cm de diámetro x 101,6 cm de longitud (8 pulgadas x 40 pulgadas).
- 15 18. Un proceso según las reivindicaciones 16 ó 17, en el que dichas membranas de polímero son planas, en espiral, de fibra hueca o membrana en cajón.
19. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 2-17, en el que dicha operación de secado del retenido de ósmosis inversa (RO) se lleva a cabo por secado por pulverizado.
- 20 20. Un proceso según la reivindicación 19, en el que dicha operación de secado por pulverizado se lleva a cabo después de añadir dextranos o maltodextrinas a dicho retenido de RO.
21. Una materia prima para alimentar ganado que consiste en dicha decocción de material vegetal obtenido por separación mecánica de la etapa b) del proceso de la reivindicación 1.
22. Una materia prima para preparaciones alimentarias de alimentación humana que consiste en dichas fases de retenido de MF y UF obtenidas a partir de las operaciones c) y d) del proceso de la reivindicación 1.

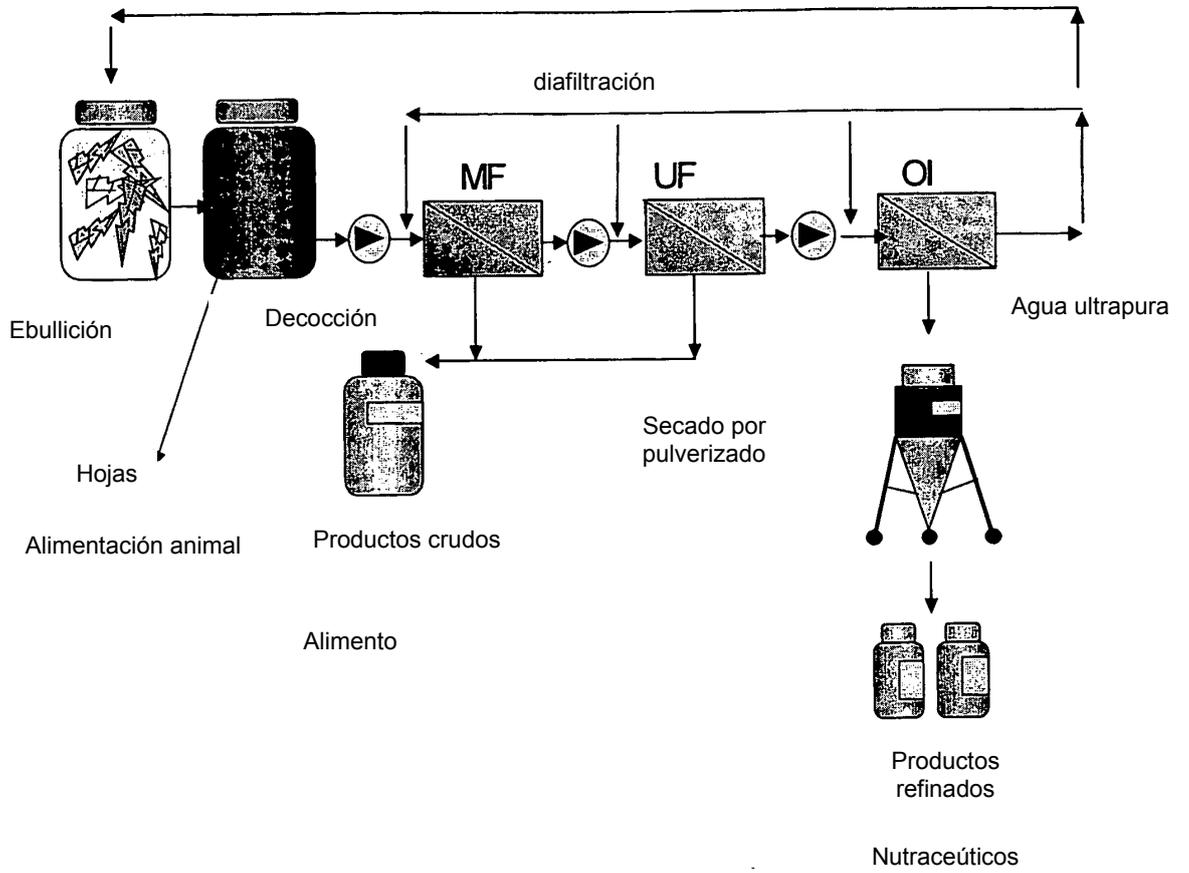


Fig. 1

MF DE LA DECOCCIÓN

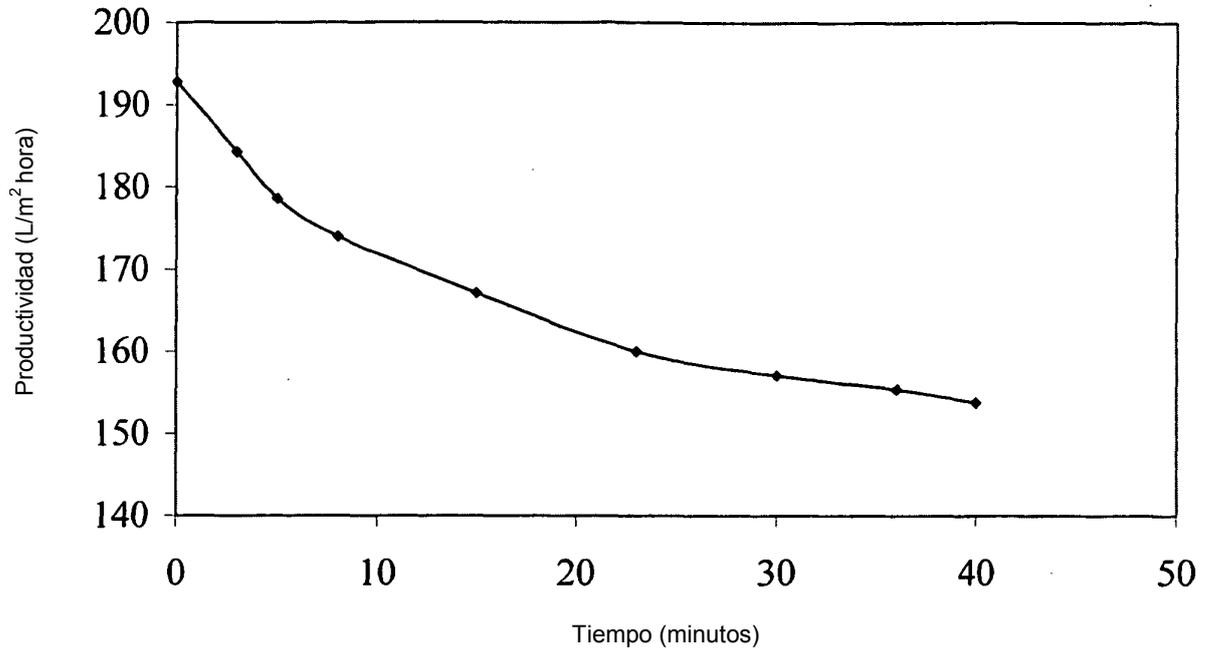


Fig. 2

UF DEL PERMEADO DE MF

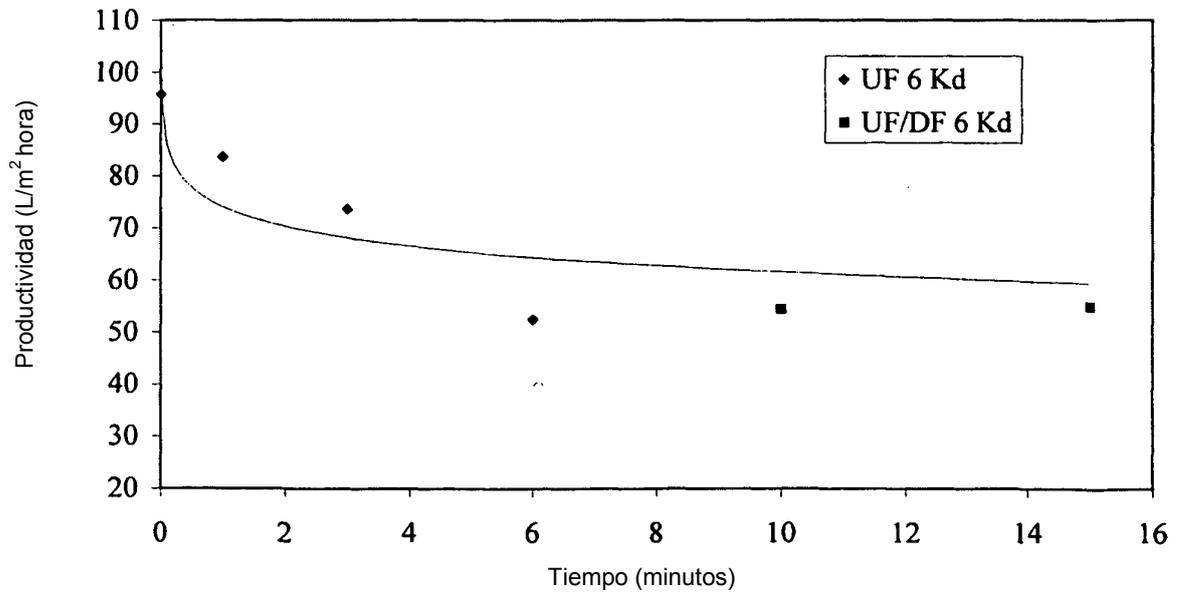
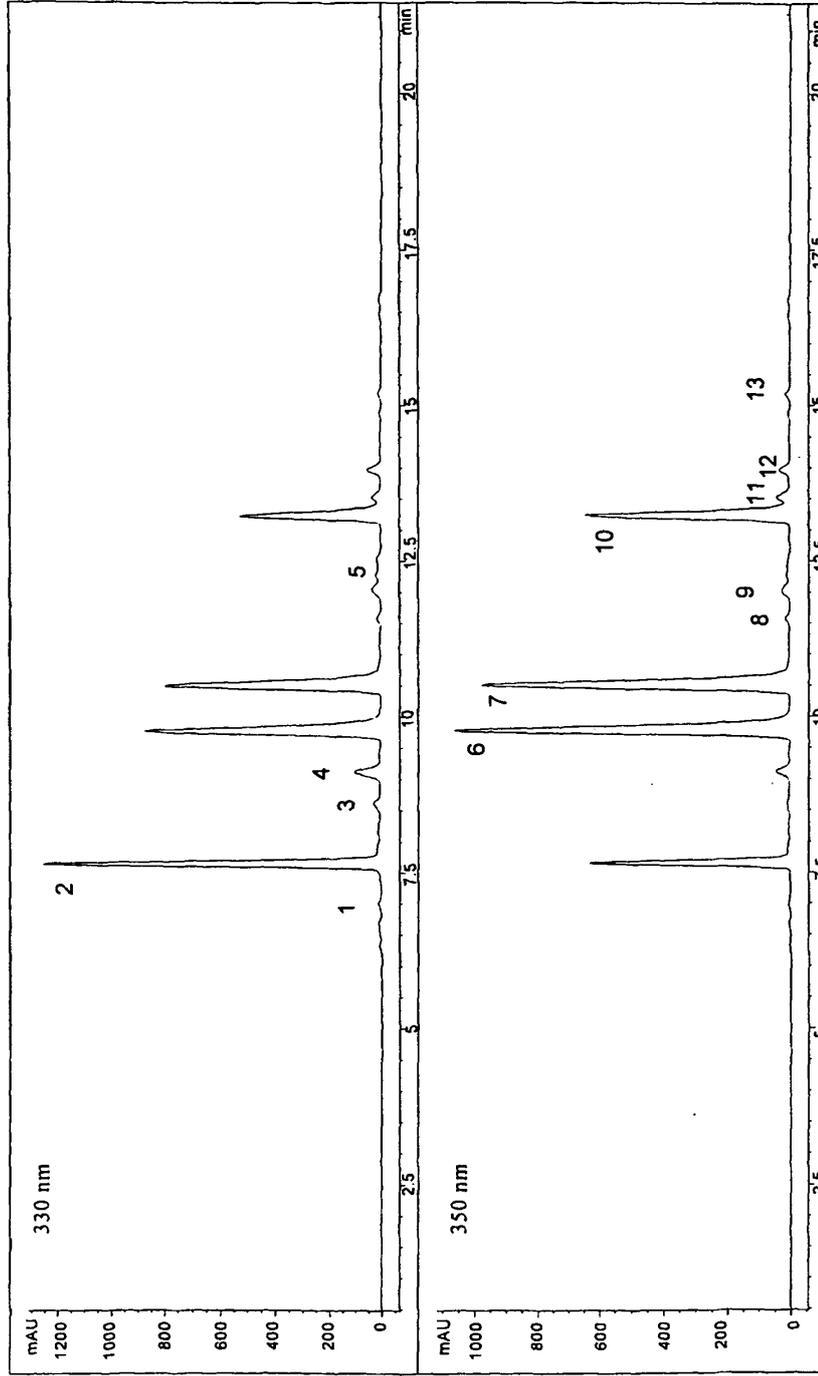


Fig. 3

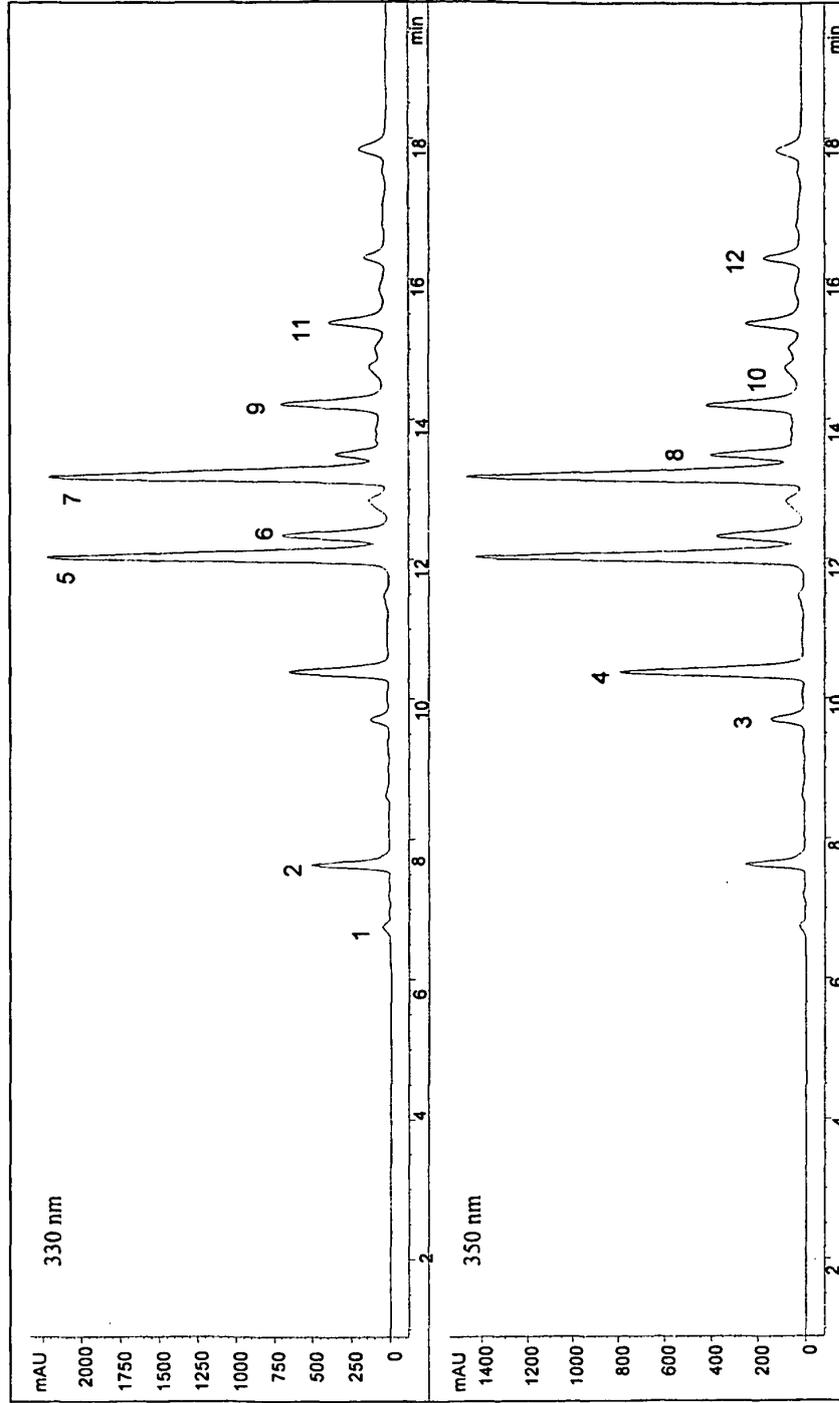
Extracto de hojas de alcachofa



Compuestos: 1. Acido monocateoiloquinico; 2. Acido clorogenico; 3. Acido p-cumariloquinico; 4. Acido feruloiloquinico; 5. Acido dicafeiloquinico; 6. Luteolin 7-O-rutinósido; 8. Apigenina 7-O-rutinósido; 9. Apigenina 7-O-glucósido; 10. Luteolin malonil glucósido; 11. Apigenina 7-O-glucurónido; 12. Luteolina; 13. Apigenina.

Fig. 4

Extracto de hojas de cardo salvaje



Compuestos: 1. Acido 1-O-cafeoilquinico; 2. Acido clorogenico; 3. Luteolin 7-O-rutinósido; 4. Luteolin 7-O-glucósido; 5, 6. Acidos dicafeoilquinico; 7. Acido succinil-dicafeoilquinico; 8. Luteolin 7-O-malonil glucósido; 9. Acido succinil-dicafeoilquinico; 10. Apigenina 7-O-rutinósido; 11. Acido disuccinil-dicafeoilquinico; 12. Luteolina

Fig. 5