

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 649**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3562 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

C09K 15/00 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 36/889 (2006.01)

C09K 15/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 08800093 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2209392**

54 Título: **Conservantes naturales y agentes antimicrobianos**

30 Prioridad:

05.10.2007 AU 2007905459

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

11.04.2014

73 Titular/es:

**HORIZON SCIENCE PTY LTD (100.0%)
UNIT 6 84-90 LAKEWOOD BOULEVARD
BRAESIDE VIC 3195, AU**

72 Inventor/es:

**KANNAR, DAVID y
KITCHEN, BARRY JAMES**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 454 649 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

Conservantes naturales y agentes antimicrobianos

5 **Campo de aplicación**

La presente invención se refiere a conservantes y agentes antimicrobianos. En particular la presente invención se refiere a conservantes derivados de extractos de caña de azúcar que se pueden utilizar para preservar alimentos, productos cosméticos, fármacos y otras composiciones análogas y a agentes antimicrobianos derivados de extractos de caña de azúcar que se pueden emplear en productos de higiene oral.

Antecedentes de la presente invención

Cualquier referencia a un documento, acto o artículo o discusión de los mismos, mencionada o expuesta en esta descripción, no significa la admisión de que en la fecha de prioridad el documento, acto o artículo de conocimiento o cualquier combinación de los mismos estuviera disponible públicamente, fuera conocido del público, formara parte del conocimiento común general o se considerara relevante como intento de resolver cualquier problema tratado en esta descripción.

20 *Conservantes*

Un conservante es una sustancia natural o sintética que se añade a productos tales como alimentos, fármacos, muestras biológicas, madera, etc., para evitar la descomposición por crecimiento microbiano o por cambios químicos no deseados.

La conservación de alimentos es el proceso de tratarlos y manipularlos de modo que mantengan su valor comestible y nutritivo. El esfuerzo principal va dirigido a frenar o retardar en gran medida su deterioro, para evitar enfermedades causadas por la comida (p.ej. mediante salazón, refrigeración, cocción). Sin embargo en algunos procedimientos se usan bacterias benignas, levaduras u hongos para proporcionar cualidades específicas y conservar el alimento (p.ej. queso, vino). Además de mantener o crear valor nutritivo, textura y sabor, son importantes para preservar su valor como comida, pues se trata de un factor cultural según el cual un producto alimenticio puede considerarse adecuado para el consumo humano en una cultura y no en otra.

La conservación consiste normalmente en impedir el crecimiento de bacterias, hongos y otros microorganismos, y también en retardar la oxidación de las grasas causantes del enranciamiento. También incluye procesos para inhibir el envejecimiento natural y la posible variación de color durante la preparación de los alimentos, como por ejemplo la reacción de oscurecimiento enzimático por la cual las manzanas se ponen de color marrón al cortarlas. Algunos métodos de conservación requieren el envasado hermético del producto alimenticio para evitar la recontaminación con microbios; otros, como el secado, permiten guardarlo durante periodos de tiempo prolongados sin necesidad de recipientes especiales.

Los métodos corrientes de aplicar estos procesos incluyen el secado, el secado por atomización, la liofilización, la congelación, el envasado al vacío, el enlatado, la conservación en jarabe, la cristalización de azúcares, la irradiación de productos alimenticios, la adición de conservantes o de gases inertes como el dióxido de carbono. Otros métodos que además de ayudar a conservar los alimentos, también añaden sabor son el encurtido, la salazón, el ahumado, la conservación en jarabe o en alcohol, la cristalización de azúcares y el curado.

Los aditivos conservantes de alimentos se pueden usar solos o combinados con otros métodos de preservación. Los conservantes pueden ser agentes antimicrobianos, que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, o antioxidantes tales como los absorbentes de oxígeno, que inhiben la oxidación de los componentes del producto alimenticio. Los conservantes antimicrobianos comunes incluyen propionato cálcico, nitrato sódico, nitrito sódico, sulfitos (dióxido de azufre, bisulfito sódico, bisulfito potásico, etc.) y EDTA disódico. Los antioxidantes comunes incluyen BHT (hidroxitolueno butilado) y BHA (hidroxianisol butilado). Otros conservantes son el formaldehído (normalmente en solución), el glutaraldehído (mata los insectos), el etanol y la metilcloroisotiazolinona. Las ventajas y la seguridad de muchos aditivos alimentarios sintéticos (incluyendo los conservantes) son tema de debate entre científicos y autoridades especializadas en la ciencia y tecnología alimentaria.

Los antioxidantes se usan en una amplia gama de productos, incluyendo, sin estar limitado a ellos, los productos cárnicos, avícolas, grasas, aceites, margarinas, pescado, marisco y productos horneados, para inhibir la degradación de grasas y aceites o de sus productos de oxidación. Actualmente el mercado está dominado por los conservantes sintéticos, como BHT y BHA, que están empezando a ser sustituidos por conservantes naturales tales como romero, extractos de té, tocoferol y ascorbato. Sin embargo los conservantes naturales actuales pueden ser caros, lo cual limita su uso más amplio en alimentos y mantiene el empleo de los conservantes sintéticos.

Los agentes antimicrobianos también se usan actualmente como conservantes en la industria alimentaria con el fin de prolongar la vida útil del producto, mejorar su seguridad, mantener su calidad, reducir los costes de proceso y

5 aumentar la capacidad global de distribución de los productos en cadenas de suministro complejas. Debido a la preocupación del consumidor sobre el uso de aditivos sintéticos, el mercado de agentes antimicrobianos sintéticos está disminuyendo y siendo reemplazado por los de tipo natural.

5 Sustancias naturales tales como la sal, el azúcar, el vinagre y las tierras de diatomeas también se emplean como conservantes tradicionales. Otro grupo de conservantes va dirigido contra los enzimas que continúan metabolizando frutas y verduras después de cortarlas. Por ejemplo, los ácidos cítrico y ascórbico del limón u otros zumos cítricos pueden inhibir la acción del enzima fenolasa, que vuelve de color marrón las superficies de las manzanas y patatas cortadas.

10 *Rancidez*

15 El enranciamiento es la descomposición de grasas, aceites y otros lípidos por hidrólisis u oxidación, o por ambas. En los glicéridos la hidrólisis separa las cadenas de ácido graso del esqueleto de glicerina. Luego estos ácidos grasos libres pueden sufrir una auto-oxidación. En las grasas insaturadas la oxidación se produce principalmente mediante un proceso inducido por radicales libres. Estos procesos químicos pueden generar moléculas muy reactivas en los alimentos y aceites rancios, que son las causantes de olores y sabores desagradables y nocivos. Estos procesos químicos también pueden destruir nutrientes del producto alimenticio. En algunas circunstancias el enranciamiento y la destrucción de vitaminas ocurre muy rápidamente.

20 Cuando una sustancia grasa está expuesta al aire, sus componentes insaturados se convierten en hidroperóxidos que se descomponen en aldehídos, ésteres, alcoholes, cetonas e hidrocarburos volátiles, algunos de los cuales tienen olores desagradables. La mantequilla se enrancia por dicho proceso y por hidrólisis, liberando ácidos volátiles y malolientes, sobre todo ácido butírico. Las grasas saturadas, como el sebo de buey, son resistentes a la oxidación y raramente se enrancian a temperaturas normales.

25 Como factores que aceleran la oxidación de las grasas cabe mencionar las trazas de metales (hierro, cinc, etc.), la sal, la luz, el agua, las bacterias y los mohos. La oxidación de las grasas se puede retardar con el uso de especias como salvia y romero, manteniendo las grasas y los aceites en un lugar fresco y oscuro poco expuesto al oxígeno o a los radicales libres, pues el calor y la luz aceleran la velocidad de reacción de las grasas con el oxígeno.

30 Los antioxidantes suelen añadirse a los productos alimenticios que contienen grasa para retardar el enranciamiento causado por la oxidación. Los antioxidantes naturales incluyen flavonoides, polifenoles, ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferoles (vitamina E). Los antioxidantes sintéticos comprenden BHA, BHT, 3,4,5-trihidroxibenzoato de propilo (también conocido como galato de propilo) y etoxiquina. Los antioxidantes naturales tienden a ser de vida corta y por tanto se usan antioxidantes sintéticos si se prefiere una mayor vida útil. La efectividad de los antioxidantes solubles en agua es limitada para evitar la oxidación directa en las grasas, pero sirve para interceptar los radicales libres que atraviesan las partes acuosas de los productos alimenticios.

40 *Antioxidantes naturales*

45 Algunos antioxidantes sintéticos modernos son controvertidos, porque se ha demostrado que producen problemas respiratorios u otras molestias de salud. Algunos estudios señalan que los conservantes sintéticos y los colorantes artificiales agravan los síntomas de ADD y ADHD (*trastorno de déficit de atención, sin y con hiperactividad*) en los afectados. Varios estudios importantes demuestran un mayor rendimiento escolar y menos problemas disciplinarios en grandes poblaciones de estudiantes sin ADD al eliminar los ingredientes artificiales, incluidos los conservantes, de los programas de alimentación escolar. Los conservantes alérgenos en la alimentación o en medicina pueden provocar un choque anafiláctico en personas susceptibles, un estado que sin tratamiento urgente suele resultar fatal en cuestión de minutos.

50 Por consiguiente ahora se tiende a usar antioxidantes naturales. Las plantas contienen muchas sustancias químicas que poseen propiedades antioxidantes. Polifenoles es un nombre genérico de un grupo de sustancias fitoquímicas que incluye flavonoides, antocianinas y ácidos fenólicos de origen natural, en una gran variedad de plantas. En su mayoría son coloreados y confieren los colores encontrados en los frutos y en otras partes de las plantas. Sobre todo actúan bioquímicamente como antioxidantes que ayudan a proteger la planta del daño tisular y de la invasión de microorganismos.

55 La literatura sobre sustancias fenólicas vegetales es extensa y varios polifenoles asociados a distintas especies de plantas han sido bien identificados y estudiados. También se han examinado clínicamente los efectos fisiológicos de muchos de estos polifenoles y se ha comprobado que no solo tienen acción antioxidante, sino también propiedades antiinflamatorias y vasodilatadoras.

60 Alimentos de consumo corriente tales como café, té, cacao (chocolate), vino tinto, bayas (arándanos, moras, fresas) y frutas (mangostinos, nonis, granadas, asaís, uvas) se presentan y comercializan actualmente por sus elevados niveles de antioxidantes y por sus propiedades salutíferas.

En general las plantas y los productos vegetales tienen un contenido de antioxidantes mucho mayor que los productos alimenticios de origen animal. Algunas especies, bayas, frutas, frutos secos, productos que contienen chocolate, verduras y cereales son buenas fuentes de antioxidantes dietéticos. Las bebidas de café, té verde y té negro, el vino tinto y varias bayas y zumos de fruta también son buenas fuentes de antioxidantes.

5 Actualmente se suministran jarabes de antioxidantes y productos en polvo de las fuentes arriba mencionadas como ingredientes alimentarios y aditivos para una gran variedad de sistemas alimenticios. Los jarabes y productos en polvo con alto contenido de polifenoles (p.ej. los derivados de uva Vinlife, de Tarac Technologies en Australia del sur, y Polyphenolics, de California, USA) se están empleando en productos tales como chocolate (Cocoa Farm, Melbourne Australia), bebidas de cacao, tés y helados (Wendy's Vinlife Ice Cream, Australia). No obstante estos ingredientes alimentarios se usan normalmente para aumentar el contenido de antioxidantes en el producto, con el fin de beneficiar la salud, y no como conservantes de los alimentos.

15 Es sabido que la caña de azúcar contiene polifenoles y otras sustancias fitoquímicas de propiedades beneficiosas. Como ejemplos de publicaciones que contemplan estas propiedades cabe mencionar las solicitudes de patente internacional nº WO 2005/117608, PCT/AU2006/000769 y PCT/AU2007/001382. Sin embargo estos documentos no revelan el empleo de extractos de caña de azúcar de bajo color como conservantes de alimentos.

20 En Payet y otros, "Comparison of the Concentrations of Phenolic Constituents in Cane Sugar Manufacturing Products with their Antioxidant Activities" [*Comparación de las concentraciones de componentes fenólicos en productos manufacturados de caña de azúcar con sus actividades antioxidantes*], J Agric Food Chem, 2006, 54, 7270-7276, se mide la acción antioxidante de varios productos fabricados a partir de caña de azúcar. En este documento se supone que la acción antioxidante puede ser debida al efecto de los productos de la reacción de Maillard y al gran aumento de color. Los conservantes de color elevado tendrían un uso limitado como aditivos alimentarios. No hay ninguna revelación del uso de extractos de caña de azúcar de bajo color como conservantes alimentarios.

30 La publicación de patente japonesa nº 2001-112439 revela que un extracto de azúcar moreno con contenido de melanoidinas tiene un efecto antioxidante que se puede aprovechar para disminuir la grasa corporal y mejorar el estado de la piel. Sin embargo las melanoidinas son polímeros heterogéneos de alto peso molecular y color marrón que se forman cuando se combinan azúcares y aminoácidos (mediante una reacción de Maillard) a temperaturas altas y baja actividad acuosa. Por consiguiente el extracto tendría un color elevado que limitaría su uso como aditivo alimentario. Además el extracto puede tener un sabor fuerte que limite aún más su uso como aditivo alimentario. No hay ninguna revelación del uso de extractos de caña de azúcar de bajo color como conservantes alimentarios.

35 La publicación de patente japonesa nº 2002-161046 revela que de la espiga de caña de azúcar se pueden extraer polifenoles que poseen propiedades antioxidantes. No hay ninguna revelación del uso de extractos de caña de azúcar de bajo color como conservantes alimentarios.

40 La publicación de patente japonesa nº 2001-200250 revela que los extractos de caña de azúcar tienen propiedades antioxidantes que se pueden usar como conservantes alimentarios. Sin embargo no hay ninguna revelación del uso de extractos de caña de azúcar de bajo color como conservantes alimentarios.

45 Los antioxidantes naturales como el romero, los extractos de té, el tocoferol y el ascorbato se usan actualmente para conservar alimentos, pero tienden a ser caros. El tocoferol también tiene aplicaciones prácticas porque es hidrófobo; el ascorbato porque añade un sabor ácido a los alimentos.

Agentes antimicrobianos

50 Los agentes que matan o inhiben los microorganismos se pueden clasificar como desinfectantes, antisépticos o antibióticos. Los antibióticos son moléculas producidas por un microorganismo que matan (bactericidas) o inhiben (bacteriostáticos) otros microorganismos. Los antisépticos y los desinfectantes son productos químicos elaborados comercialmente y la diferencia entre ellos es que los antisépticos se pueden aplicar sobre las superficies de las mucosas, al menos por poco tiempo, y en cambio los desinfectantes no, porque producirían daños.

55 El Consejo de asuntos científicos de la ADA ha resaltado las ventajas para la salud oral de otros productos aceptados por la ADA, tales como los enjuagues bucales antimicrobianos y las pastas dentífricas que pueden contribuir a evitar y reducir la placa dental y la gingivitis, y los enjuagues bucales fluorados que pueden proporcionar una protección extra contra la caries, además de la que ya ofrece de por sí la pasta dentífrica fluorada.

60 Los enjuagues están clasificados en general por la Food and Drug Administration (FDA) de USA como productos cosméticos o terapéuticos o como combinación de ambos. Los enjuagues cosméticos son productos comerciales sin prescripción médica (OTC) que ayudan a eliminar los restos orales antes o después del cepillado, suprimen el mal aliento temporalmente, disminuyen las bacterias en la boca y la refrescan dejando un sabor agradable. Los enjuagues terapéuticos tienen las ventajas de sus equivalentes cosméticos, pero también contienen un ingrediente activo añadido que contribuye a la protección contra algunas afecciones bucales. Los enjuagues terapéuticos están regulados por la FDA y son aprobados voluntariamente por la Asociación dental americana (ADA).

5 La mayor parte de enjuagues bucales son, como mínimo, antisépticos orales eficaces que refrescan la boca y contienen el mal aliento hasta tres horas. No obstante su capacidad de evitar la caries, la gingivitis (inflamación del tejido blando gingival) y las enfermedades periodontales es limitada. En cambio se ha demostrado clínicamente que los enjuagues terapéuticos anticaries con fluoruro combaten hasta un 50 por ciento más de bacterias causantes de caries. La mayor parte de los enjuagues anticaries llevan fluoruro sódico, que tomado o ingerido excesivamente puede producir con el tiempo toxicidad por fluoruro.

10 La mayor parte de enjuagues bucales sin prescripción médica contienen cinco componentes estándar:

- un ingrediente antibacteriano tal como compuestos de amonio cuaternario, ácidos bórico y benzoico, compuestos fenólicos;
- un agente saborizante tal como sacarina o glicerina;
- astringentes como cloruro de cinc, para dar una sensación de gusto agradable y contraer los tejidos;
- alcohol etílico del 18 hasta el 26 por ciento; y
- 15 • agua.

Los enjuagues también pueden contener tampones para reducir la acidez, disolver películas de mucosa y aliviar el dolor del tejido blando. Los enjuagues anticaries suelen contener 0,05 por ciento de fluoruro sódico, o 0,1 por ciento de fluoruro estannoso, lo cual está aprobado por la FDA.

20 Los ingredientes activos de los enjuagues antiplaca varían. Algunos contienen clorhexidina (el fármaco de mayor efectividad para combatir la placa, probado hasta la fecha; solo obtenible por prescripción médica), sales de metales pesados o extractos de hierbas como la sanguinaria, procedente de la planta tormentila.

25 Los enjuagues bucales y dentífricos antimicrobianos reducen el recuento bacteriano e inhiben la actividad de las bacterias en la placa, que puede causar gingivitis, una forma temprana y reversible de enfermedad periodontal (de las encías). Los enjuagues bucales y dentífricos antimicrobianos aceptados por la ADA han ratificado estas aseveraciones mediante disminuciones importantes de la placa y la gingivitis. La concentración de sustancia activa en los enjuagues bucales antimicrobianos excede con frecuencia las concentraciones mínimas determinadas como inhibitorias y por tanto produce un rápido efecto letal sobre las bacterias, que puede ser de utilidad en estados infecciosos.

30 Sin embargo mucha gente es recelosa de usar colutorios comerciales por miedo a la toxicidad y a dañarse los dientes. Las alternativas naturales incluyen el enjuague con una solución salina y el enjuague con una solución de bicarbonato sódico.

35 Por consiguiente se necesita una fuente alternativa de conservantes naturales y agentes antimicrobianos.

40 **Resumen de la presente invención**

Las melazas y otros productos del procesado de la caña de azúcar son mezclas complejas de productos fitoquímicos que normalmente comprenden polifenoles, polisacáridos, péptidos y proteínas, minerales, ácidos orgánicos y mono y disacáridos. La presente invención proporciona extractos de bajo color procedentes de la caña de azúcar que poseen propiedades conservantes de los alimentos y acción antimicrobiana. En concreto se ha encontrado sorprendentemente que los extractos de bajo color procedentes de la caña de azúcar tienen una gran actividad antioxidante, lo cual los hace útiles como inhibidores de la descomposición de las grasas y de los aceites o de sus productos de oxidación y como agentes antimicrobianos.

50 Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un conservante constituido por un extracto de melazas de caña de azúcar enriquecido con polifenoles de bajo color, que tiene gran acción antioxidante y un contenido mínimo de polifenoles de unos 50 µg/ml de equivalentes de catequina, siendo el color del extracto bajo en comparación con las melazas.

55 Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de conservación de alimentos, cosméticos o fármacos que comprende la etapa de añadir al alimento, cosmético o fármaco una cantidad conservante efectiva de un extracto de bajo color procedente de la caña de azúcar, que tiene una gran acción antioxidante, tal como se ha dicho arriba.

60 El extracto de bajo color empleado según este aspecto de la presente invención proporciona características tanto antioxidantes como antimicrobianas. Anteriormente había que usar diferentes conservantes para lograr cada uno de estos efectos.

65 Tal como se usa aquí, el término “bajo color” se refiere a un extracto derivado de la caña de azúcar que tiene un valor de absorbancia menor o igual aproximadamente a 0,010 cuando se mide a 750 nm.

Tal como se usa aquí, el término “gran acción antioxidante” se refiere a un extracto derivado de la caña de azúcar que tiene un nivel de antioxidante de al menos 50 µg/ml de equivalentes de catequina cuando se ensaya del modo descrito en el ejemplo 4. Preferiblemente el extracto derivado de la caña de azúcar tiene un nivel de antioxidante de 0,99 a 6 g/l de equivalentes de catequina, con mayor preferencia de 4 a 5 g/l de equivalentes de catequina.

5 Según un tercer aspecto, la presente invención ofrece el uso de un extracto de bajo color procedente de la caña de azúcar que tiene una gran actividad como antioxidante en alimentos, cosméticos o fármacos, tal como se ha descrito arriba.

10 Según este aspecto de la presente invención se usa un extracto que es económico, que constituye una rica fuente de antioxidantes y que puede utilizarse para reemplazar los costosos antioxidantes sintéticos empleados actualmente en la industria alimentaria.

15 Según un cuarto aspecto, la presente invención ofrece el uso de un extracto de bajo color procedente de la caña de azúcar que tiene una gran actividad antioxidante como agente antimicrobiano en alimentos, cosméticos o fármacos, tal como se ha descrito arriba.

20 Según este aspecto de la presente invención se usa un extracto rico en polifenoles que puede servir para satisfacer la demanda creciente de agentes antimicrobianos naturales en la industria alimentaria global. Además los extractos según la presente invención pueden tener un precio ventajoso sobre los agentes antimicrobianos empleados actualmente.

25 El término “cantidad efectiva de conservante” significa una cantidad que minimiza o inhibe de manera sustancial el enranciamiento de grasas y aceites (propiedades antioxidantes) y/o minimiza o inhibe de modo sustancial el crecimiento microbiano (agente antimicrobiano). La cantidad concreta utilizada dependerá de la composición particular y de la vida útil deseada. Normalmente las proporciones empleadas están comprendidas en el intervalo del 0,0001 hasta el 5% en peso, sobre todo del 0,01 hasta el 2,5%.

30 El conservante de la presente invención se puede incorporar directamente y sin posterior modificación a los alimentos, cosméticos o fármacos (productos enterales y parenterales), usando técnicas tales como mezclado, infusión, inyección, combinación, dispersión, conchado, emulsión, inmersión, pulverización, aglomeración y amasado. Según un quinto aspecto, la presente invención proporciona un conservante para mejorar la higiene oral y/o inhibir, tratar y/o prevenir la formación de caries dental, añadiendo una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto de bajo color procedente de caña de azúcar, que tiene una gran acción antioxidante, tal como se ha descrito arriba.

40 Tal como se usa aquí, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad que minimice o inhiba sustancialmente el crecimiento microbiano y/o mate los microbios en la cavidad oral. Normalmente las proporciones empleadas están comprendidas en el intervalo del 0,0001 hasta el 5% en peso de composición total, sobre todo del 0,01 hasta el 2,5%.

Tal como se usa aquí, el término “productos de higiene oral” incluye, sin limitarse a ellos, productos de limpieza dental tales como pastas dentífricas, colutorios (enjuagues bucales) y chicles.

45 Según un sexto aspecto, la presente invención ofrece el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un extracto de bajo color procedente de la caña de azúcar, que tal como se ha descrito arriba tiene una gran acción antioxidante, en la preparación de un producto para mejorar la higiene oral y/o inhibir, tratar y/o evitar la formación de caries dental.

50 El extracto empleado en la presente invención puede proceder de cualquier producto derivado de la caña de azúcar, incluyendo el proceso de molienda de la caña de azúcar, el proceso de refinación para elaborar azúcar y otros procesos en los que se utilizan productos de caña de azúcar, tales como la fabricación de etanol a partir de melazas, como parte de la elaboración de ron. El extracto puede proceder de las materias primas, de los productos en fase de elaboración, de productos secundarios, de productos finales y de flujos residuales. Por ejemplo, el extracto de caña de azúcar puede provenir del flujo de alimentación de jugo crudo de caña de azúcar, del jugo clarificado y del jarabe de jugo concentrado, de melazas (obtenidas de un molino primario o de una refinería), sirope dorado, azúcar moreno, bagazo, vinaza, de despojos de campo, puntas de crecimiento, pulpa, peladuras de caña, médula, extractos de regeneración (neutralizados y sin neutralizar) y lodos de molienda. Conforme a la presente invención el extracto proviene de melazas.

60 Las características físicas de los extractos utilizables en la presente invención dependen de su composición química global. Según los métodos de elaboración empleados, los extractos se pueden concentrar por evaporación para dar un jarabe o, como alternativa, se pueden secar totalmente para producir un polvo. Esta posibilidad de preparar extractos con diferentes propiedades físicas aumenta su utilidad comercial. Los extractos serán adecuados para varios usos en función de sus características físicas y de su composición química. Por ejemplo, los requerimientos para la industria alimentaria pueden ser muy diferentes de los requerimientos para la industria cosmética.

5 Tal como se usa aquí, el término "alimento" incluye, sin limitarse a ellos, cualquier producto comestible como golosinas, suplementos, tentempiés (dulces, salados), productos que contienen cacao y café, saborizantes, bebidas (incluyendo las de tipo instantáneo, premezclas), productos nutracéuticos, suplementos dietéticos y formulaciones, incluyendo los suplementos utilizados en salud y nutrición animal; productos lácteos como p.ej. leche, yogur, helados; productos de panadería y bollería, condimentos alimentarios y piensos.

- 10 El conservante de la presente invención se puede incorporar a los alimentos, incluyendo sin limitación los siguientes:
- productos lácteos como quesos, mantequilla, leche y otras bebidas lácteas, pastas de untar y mezclas lácteas, helados y yogur;
 - productos grasos como margarinas, patés, mayonesa, mantecas, aceites de cocinar y freír y aliños;
 - 15 • productos basados en cereales, incluyendo los que están cocidos, horneados (como por ejemplo pan y pastas) o procesados de cualquier otra manera;
 - dulces como chocolate, caramelos, chicles, postres, coberturas no lácteas, sorbetes, glaseados y otros rellenos;
 - 20 • productos de nutrición deportiva, incluyendo polvos, premezclas, zumos, barras energéticas, bebidas isotónicas y gelatina, jaleas de almidón o pectina;
 - bebidas calientes o frías (café, té, cacao, cereales, achicoria y otras bebidas basadas en extractos vegetales), alcohólicas o sin alcohol, incluyendo las colas y otros refrescos, zumos, suplementos dietéticos, premezclas instantáneas y bebidas sustitutivas de comidas; y
 - 25 • productos diversos, incluyendo huevos y productos a base de huevo, alimentos procesados como sopas y pastas precocinadas.

30 *Método de preparación de los extractos utilizados en la presente invención*

Los extractos empleados en la presente invención son derivados de productos de la caña de azúcar, preferiblemente de melazas procedentes de los procesos de refinación de la caña de azúcar. El extracto se puede obtener del producto de caña de azúcar por varios métodos o combinaciones de métodos, tales como:

- 35 • extracción con disolvente y a contracorriente, usando disolventes no acuosos o acuosos;
- separación de los componentes comprendidos en un margen concreto de pesos moleculares mediante métodos de exclusión por tamaños, tales como cromatografía de permeación a través gel o ultrafiltración; y
- 40 • separación de los componentes de peso molecular bajo y alto mediante técnicas cromatográficas o combinaciones de técnicas tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba y cromatografía de intercambio iónico con elución fraccionada por aumento gradual del pH o con disolventes tales como el etanol.
- 45 • Los extractos se pueden seguir procesando mediante técnicas estándar como microfiltración, ósmosis inversa, evaporación al vacío y liofilización, secado por atomización y secado en túnel.

50 En las solicitudes de patente internacional nº WO 2005/117608 y PCT/AU2007/001382 se revelan ejemplos de métodos de preparación de los extractos.

Descripción breve de las figuras

55 La figura 1 muestra la filtración por gel de melazas a través de Bio-Gel P-2, con A_{420} y la actividad antioxidante, para la tanda 3 del ejemplo 1.

La figura 2 muestra la filtración por gel de melazas a través de Bio-Gel P-2, con A_{420} y el total de compuestos fenólicos, para la tanda 3 del ejemplo 1.

60 La figura 3 muestra la filtración por gel de melazas a través de Bio-Gel P-2, con A_{420} y sacarosa, para la tanda 3 del ejemplo 1.

La figura 4 muestra la filtración por gel de melazas a través de Bio-Gel P-2, con A_{420} y sacarosa + fructosa, para la tanda 3 del ejemplo 1.

La figura 5 es una fotografía del fraccionamiento de melazas obtenido a través de Bio-Gel P-2 (grupos 1 – 5 del ejemplo 1).

5 La figura 6 muestra la filtración por gel de melazas a través de Bio-Gel P-2, con los perfiles de A_{420} , empleando tampón de formiato/acetonitrilo de pH 5,0 y tampón Tris-HCl de pH 7,5 del ejemplo 1.

La figura 7 muestra la distribución en la placa de 96 pocillos del ejemplo 4.

10 La figura 8 muestra los valores de la absorbancia bruta A_{750} del ejemplo 4.

La figura 9 muestra los valores de la absorbancia corregida del ejemplo 4.

15 La figura 10 muestra la distribución en la placa de 96 pocillos de las diluciones de melaza de partida y de las fracciones 3-23 del ejemplo 4.

La figura 11 muestra los valores de absorbancia a 750 nm de la distribución del ejemplo 4.

La figura 12 muestra un cromatograma del ejemplo 4.

20 La figura 13 muestra la curva estándar de catequina del ejemplo 4.

La figura 14 muestra la equivalencia en catequina del total de polifenoles en cada una de las fracciones 3-26 del ejemplo 4, con el error ± 2 SD.

25 La figura 15 muestra la equivalencia en catequina del total de polifenoles de cada placa en las fracciones 3-26 del ejemplo 4, con el error ± 2 SD.

La figura 16 muestra las fracciones coloreadas recogidas en el ejemplo 4.

30 **Ejemplos**

A continuación se describen varias formas de ejecución/aspectos de la presente invención, haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

35 **Lista de abreviaciones**

BDL por debajo del límite detectable

40 CE equivalentes de catequina

DW peso seco

GAE equivalentes de ácido gálico

45 GI índice glicémico

IC o ICUMSA Comisión internacional de métodos uniformes para el análisis del azúcar

50 MF microfiltración

N/D no detectado

N/T no analizado

55 **Ejemplo 1**

Este ejemplo investiga el uso de la permeación de gel para producir extractos utilizables en la presente invención.

Métodos

60 Se usó la filtración preparativa por gel en una columna de Bio-Gel P-2 para fraccionar melazas diluidas (50% p/v) en un intervalo de peso molecular de 100 a 1800 daltons (Da). Se recogieron cinco fracciones de peso molecular de seis tandas de cromatografía y se liofilizaron. Se analizaron las fracciones para determinar la actividad antioxidante, los compuestos fenólicos totales, el perfil de HPLC y los azúcares.

65

Las melazas se diluyeron al 50% (p/v) en tampón de filtración de gel (formiato amónico 20 mM de pH 5,0 con 10% de acetonitrilo) y se centrifugaron a 6000 g durante 1 h a 10°C. El sobrenadante se separó por filtración a través de un filtro GF/A de 1,6 µm (Whatman) y se congeló en alícuotas de 30 ml a -80°C para utilizarlos en la cromatografía de filtración por gel.

5

Filtración por gel

Una columna de vidrio (26 mm x 1000 mm) se llenó con Bio-Gel P-2 (BioRad, USA) a una altura de lecho de 910 mm para un caudal de 60 ml/h. El lecho se equilibró a 30 ml/h a la temperatura ambiente en un tampón de formiato amónico 20 mM de pH 5,0 con 10% de acetonitrilo. Las melazas diluidas (20 ml de 50% p/v) se pasaron por la columna y se recogieron fracciones de 5 ml. Se realizaron seis filtraciones de gel con un total de 120 ml de melazas diluidas. Las fracciones de las primeras tres tandas se analizaron para determinar el color (A_{420}), los compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante. Para las últimas tres tandas se omitieron los análisis de antioxidante. Los volúmenes de fracción se determinaron gravimétricamente pesando unos 20 tubos por tanda y calculando el volumen medio de fracción para una densidad de 1 g/ml.

10

15

La columna de filtración de gel se calibró con tres patrones: sacarosa (360 kDa), NADH (663 kDa) y vitamina B12 (1355 kDa). El coeficiente de distribución (KDa) de cada patrón se calculó según $KDa = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$. El volumen vacío se determinó con albúmina de suero bovino. El intervalo de fraccionamiento del Bio-Gel P-2 es de 100-1800 Da (BioRad).

20

Fracciones grandes liofilizadas: de cada tanda de filtración de gel se recogieron fracciones individuales agrupadas en cinco fracciones mayores según los perfiles de color (A_{420}), compuestos fenólicos totales y antioxidantes. Las fracciones agrupadas de cada tanda figuran en la tabla 1:

25

Tabla 1: lista de fracciones agrupadas de cada tanda

Tanda nº	Volumen de fracción (ml)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1	4,88	34-50	51-66	67-82	83-100	101-120
2	4,74	35-54	55-72	73-83	84-104	105-120
3	4,95	35-52	53-68	69-79	80-100	101-120
4	4,69	35-53	54-71	72-81	82-100	101-120
5	4,52	37-56	57-76	77-87	88-103	104-120
6	4,71	35-51	52-71	72-81	82-99	100-120
Volumen total (ml)		447	435	270	452	470

Tras seis tandas de filtración de gel se combinaron las seis muestras en cada grupo (grupos 1-5). De cada grupo final se tomó una muestra de 10 ml y el resto se liofilizó.

30

Color (A_{420}): las fracciones de la filtración de gel se diluyeron con agua ultrapura (Arium Model 611, Sartorius) y se leyó la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro Heliosλ (Unicam).

Compuestos fenólicos totales: los compuestos fenólicos totales se determinaron según un procedimiento colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Kim y otros, 2003). A 50 µl de muestra diluida en un tubo de ensayo de 75 mm se añadieron 650 µl de agua desionizada. Se agregó reactivo de Folin-Ciocalteu no diluido (50 µl) a cada tubo. La solución se mezcló y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se mezclaron 500 µl de Na_2CO_3 al 7% con la solución reactiva y tras 90 minutos a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 750 nm. El contenido total de compuestos fenólicos se expresó en µg de equivalentes de catequina por ml de muestra no diluida. Los patrones de catequina se prepararon en el intervalo de 0-250 µg/ml.

35

40

Actividad antioxidante: primero se preparó un sustrato que contenía volúmenes iguales de ABTS (2, 2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) diamónico) 14 mM y persulfato potásico 4,9 mM y se guardó en la oscuridad durante la noche a temperatura ambiente. Antes del ensayo esta solución se diluyó aproximadamente 60 veces con agua ultrapura y se ajustó para dar una absorbancia de 0,99-1,01 a 734 nm. Se preincubó sustrato de ABTS (1 ml) en tubo de ensayo de 75 mm a 26°C durante 5 minutos en un baño de agua y se añadieron 50 µl de muestra o de patrón. La solución se mezcló y se mantuvo a 26°C durante 45 minutos y luego se leyó la absorbancia a 734 nm. La actividad antioxidante se expresó en µg de equivalentes de ácido gálico por ml de muestra no diluida. Los patrones de ácido gálico se prepararon en el intervalo de 0-25 µg/ml.

45

50

Perfiles de RP-HPLC: se obtuvieron huellas cualitativas de extractos de melazas en un sistema Shimadzu dotado de un controlador (modelo SCL-10AVP), bombas duales (modelo LC10-AD), detector de fotodiodos en serie (PDA) (modelo SPD-M10AVP) y programa Class Vp versión 6.14 para adquisición y análisis de datos. Las muestras (10 µl) se eluyeron a 30°C en una columna Luna 3 µm C18(2) de 30 x 4,6 mm (Phenomenex). El caudal fue de 1,5 ml/min. Las fases móviles fueron: fase A, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v) en agua y fase B, acetonitrilo al 60% en TFA al 0,085%. El perfil del gradiente fue de 5-35% de B durante 12 min; 35-100% de B durante 1 min y 100% de B

55

durante 3 min, 100-5% de B durante 0,3 min y 5% de B para reequilibración durante 4,7 min. Los picos eluidos se detectaron con un PDA, midiendo el espectro de absorbancia entre 200-400 nm a tramos de 4 nm de longitud de onda y canales individuales a 214, 254, 280, 340 y 400 nm, reportando rutinariamente el cromatograma de 214 nm. Las muestras de filtración de gel se prepararon a partir de cinco grupos liofilizados y contenían concentraciones iguales de compuestos fenólicos totales (1 mg de equivalentes de catequina por ml). La muestra de melazas usada en la filtración de gel tenía 2 mg de CE/ml.

Análisis de azúcares: se analizaron mono- y disacáridos por HPLC de fase inversa con un sistema Shimadzu dotado de un controlador (modelo SCL-10AVP), bomba (modelo LC10-ADVP), detector de índice de refracción (modelo RID-14A) y programa Class Vp versión 6.12. Las muestras (10 µl) se inyectaron en una columna Supelcosil LC-NH2 5 µm (250 mm x 4,6 mm, Phenomenex) funcionando a 40°C. La fase móvil fue acetonitrilo al 85% y el caudal 1 ml/min. Las muestras se eluyeron isocráticamente durante 20 min y se analizaron por duplicado. Se prepararon curvas estándar para glucosa, fructosa y sacarosa en el intervalo de 0,3 a 1,2 mg/ml, empleando cuatro soluciones estándar que contenían iguales concentraciones gravimétricas de los respectivos azúcares. Para cada solución estándar se hicieron inyecciones por triplicado.

SDS-PAGE: la electroforesis en SDS-PAGE se llevó a cabo sobre geles de 12% de acrilamida, empleando el sistema de placa de gel mini-Protean II (BioRad). Las muestras liofilizadas de la filtración de gel se disolvieron en agua (200 mg/ml) y se digirieron 30 µl en un volumen igual de tampón de carga. Se cargó sobre el gel un volumen de 15 µl (1,5 mg de sólidos). La electroforesis se paró cuando el frente de colorante azul de bromofenol llegó a la base del gel. El gel se tiñó en azul de Coomassie al 0,25% y se escaneó en un escáner de sobremesa (ScanJet 5400C, Hewlett Packard).

Resultados

Calibración del Bio-Gel P-2:

Se preparó una curva de calibración para determinar los pesos moleculares en la columna de Bio-Gel P-2.

Perfiles de filtración de gel

En las figuras 1 y 2 se muestran los perfiles de filtración de gel de color (A_{420}), antioxidantes y compuestos fenólicos totales a partir de melazas (tanda 3). El perfil de color A_{420} presentó un pico cerca del volumen vacío de la columna y un pico agudo en la fracción 62 (PM 832 Da). Luego la absorbancia disminuyó gradualmente hasta la línea base. Los perfiles de antioxidantes y compuestos fenólicos totales coincidieron estrechamente entre sí. Los dos primeros picos de antioxidantes/compuestos fenólicos se coeluyeron con los picos de A_{420} . Sin embargo un pico ancho de antioxidantes/compuestos fenólicos para la fracción 80 (PM 352) no correspondía a un pico de color. Este pico, que comprende las fracciones 69-100, tiene un intervalo de peso molecular de 135-599 Da y puede ser una mezcla de flavonoides y ácidos polifenólicos de bajo color.

En las figuras 3 y 4 se muestran respectivamente los perfiles de sacarosa y monosacáridos (glucosa + fructosa). La columna fue capaz de separar parcialmente sacarosa y monosacáridos. La sacarosa se eluyó en el borde frontal del pico de antioxidantes (prefracción 80) y los monosacáridos en el borde terminal (postfracción 80). Por tanto el pico de antioxidantes que tiene color bajo comprende todos los azúcares simples de las melazas.

Para las aplicaciones de filtración de membrana, que requieren un producto antioxidante de bajo color, sería necesario dirigirse a la región de pesos moleculares inferiores a 600 Da. Los antioxidantes podrían separarse de los azúcares por cromatografía de exclusión iónica.

Grupos globales de filtración de gel

Los cinco grupos de cada una de las seis tandas de filtración de gel se derritieron y combinaron antes liofilizarlos. La figura 5 muestra los colores de los grupos combinados (grupos 1-5) antes de la liofilización. Los grupos 1 y 2 eran muy oscuros, el grupo 1 era algo turbio y el grupo 2 translúcido. Los grupos 3-5 presentaban un color decreciente, desde marrón claro hasta amarillo pálido.

La tabla 2 muestra la composición de los grupos combinados antes de la liofilización y el intervalo de peso molecular medio de cada grupo. De los cálculos de masa resulta que el pico de antioxidantes/compuestos fenólicos de bajo color (figuras 1 y 2) contenía el 49% de la actividad antioxidante y el 50% de los compuestos fenólicos respectivamente. El pico de color oscuro que se eluye junto al volumen vacío (grupo 1) contenía el 14% de la actividad antioxidante y el pico agudo de color oscuro (grupo 2) 28%. La recuperación de actividad antioxidante de la columna fue del 70%.

Tabla 2: composición de los grupos combinados de la filtración de gel a través de Bio-Gel P-2 antes de la liofilización

Componente	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Volumen (ml)	437	425	260	442	460
Sólidos totales (g/100 ml)	0,56	1,36	7,3	3,24	0,15
Fenólicos totales ($\mu\text{g CE/ml}$)	324	555	761	550	141
Actividad antioxidante ($\mu\text{g GAE/ml}$)	92	183	229	173	49
Fructosa (mg/ml)	BDL	BDL	4,0	5,1	BDL
Glucosa (mg/ml)	BDL	BDL	5,1	4,2	BDL
Sacarosa (mg/ml)	BDL	0,70	50	12	BDL
Sólidos totales (g)	2,45	5,78	18,98	14,32	0,69
Fenólicos totales (mg CE)	142	236	198	243	65
Antioxidantes (mg GAE)	40	78	60	76	23
Intervalo de PM medio	>1800-1444	1377-636	604-373	356-156	150-65

Composición de las melazas cargadas: sólidos totales = 35,6 g/100 ml; A_{420} = 43,7;

5 Compuestos fenólicos totales = 10340 $\mu\text{g/ml}$; actividad antioxidante 3390 $\mu\text{g/ml}$.

Volumen total de melazas para 6 tandas 120 ml.

La tabla 3 muestra la composición de los grupos combinados después de la liofilización. En cuanto a propiedades físicas el grupo 1 resultó ser un producto esponjoso que difería considerablemente del grupo 2, el cual tenía una textura dura y crujiente. Los grupos 3 y 4 resultaron crujientes e higroscópicos y contenían 71% y 64% de azúcares respectivamente. El grupo 5 era oscuro y pegajoso y fue difícil de quitar de la bandeja de secado, perdiéndose buena parte de producto. Respecto a una base sólida (mg GAE/g de sólidos) hubo una pérdida importante de actividad antioxidante durante la liofilización de los grupos 2 (26%) y 5 (34%).

15 Tabla 3: composición de los grupos combinados de la filtración de gel a través de Bio-Gel P-2 tras la liofilización

Componente	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Peso de producto secado (g)	2,62	5,23	18,17	13,74	0,5
Fenólicos totales (g/100 g)	5,60	4,1	0,99	1,70	5,42
Actividad antioxidante (g/100 g)	1,6	0,99	0,29	0,55	2,1
Fructosa (g/100 g)	BDL	BDL	5,0	16	BDL
Glucosa (g/100 g)	BDL	BDL	7,1	14	BDL
Sacarosa (g/100 g)	BDL	6,7	59	34	BDL
Fenólicos totales (mg CE)	147	214	180	234	27
Antioxidantes (mg GAE)	42	52	53	76	11
Textura	esponjosa	crujiente	crujiente	crujiente	pegajosa
Color	negro	negro	marrón claro	marrón claro	negro

Composición de las melazas cargadas: sólidos totales = 35,6 g/100 ml; A_{420} = 43,7;

20 Compuestos fenólicos totales = 10340 $\mu\text{g/ml}$; actividad antioxidante 3390 $\mu\text{g/ml}$.

Volumen total de melazas para 6 tandas 120 ml.

Perfiles de RP-HPLC: se examinaron los perfiles de HPLC de fase inversa de los grupos de filtración de gel liofilizados (perfiles b-f). Había notables diferencias entre todos los perfiles que podían emplearse para caracterizar los grupos. El grupo 1 presentó un perfil gradualmente creciente con un solo pico pequeño. Esta muestra contiene presumiblemente material polimérico heterogéneo que no se pudo separar en picos individuales por la columna de HPLC. El grupo 2 representa el intervalo de peso molecular de 636-1377 Da e incluye el pico agudo de material marrón oscuro. Este grupo mostró el material más hidrófilo, que se eluyó en menos de 1 minuto, y una serie de picos bien separados con el gradiente. Los grupos 3 y 4 representan el pico de antioxidante de bajo color y mostraron diferencias considerables entre sus respectivos perfiles. El grupo 5 mostró una serie de picos que podían representar ácidos fenólicos de bajo peso molecular y compuestos de un peso molecular mayor que habían estado débilmente unidos a la columna y no se eluyeron según sus pesos moleculares. La proporción de material hidrófilo en este grupo fue baja, dando lugar a picos más altos en la región hidrófoba del perfil. La muestra de carga de melazas permite emparejar algunos picos con ciertos intervalos de peso molecular en los grupos y también mostrar qué picos de melazas están unidos débilmente al gel y se eluyen en el grupo 5. Todas las muestras presentaron un pico significativo a los 14,5 minutos, que no es relevante para la cromatografía y representa una descarga de acetonitrilo para eliminar todo el material unido a la columna al final de la tanda. Lo interesante es que este pico representa los compuestos más hidrófobos de las melazas y disminuye con el peso molecular de los grupos.

SDS-PAGE: para detectar el material proteico en los extractos se usó la electroforesis desnaturante de los grupos liofilizados. Por encima de 14 kDa no apareció ninguna banda en los extractos. En el grupo 1 (calle 2) se observó un ligero manchado cerca del frente de colorante, pero es incierto que sea proteína teñida o restos de azul

de Coomassie de un frente de colorante irregular. Para detectar polipéptidos de bajo peso molecular (<10 kDa) se necesitaría un gel del 16% con un tampón de Tris-tricina.

Conclusión

5 Los perfiles de filtración de gel demostraron que los colorantes oscuros de las melazas medidos a 420 nm se eluyeron en el volumen vacío de la columna (>1800 Da) y a 832 Da. La actividad antioxidante y los compuestos fenólicos totales se coeluyeron con estos dos picos de color. Un pico ancho de antioxidantes/compuestos fenólicos se eluyó entre 135 y 599 kDa, pero no correspondía a un pico de color. Este pico de antioxidante contenía toda la sacarosa y monosacáridos. Comprendía el 49% de la actividad antioxidante eluida y el 50% de compuestos fenólicos totales. Por consiguiente la eliminación de los colorantes oscuros de las melazas reduciría aproximadamente a la mitad la actividad antioxidante del producto. El material polimérico de color oscuro que se eluye cerca del volumen vacío llevaba el 14% de la actividad antioxidante eluida.

15 Las cantidades de grupos de filtración de gel liofilizados variaron desde 0,5 g hasta 18 g, obteniéndose masas elevadas en los dos grupos que contenían azúcares. La recuperación de la actividad antioxidante fue superior al 92% en tres de los grupos liofilizados, pero en los grupos 2 y 5 se encontraron mermas importantes de actividad antioxidante.

20 Las huellas de HPLC de los grupos liofilizados mostraron distintas diferencias que pudieron utilizarse para caracterizar las muestras. En el análisis de proteínas por desnaturalización en gel de poliácridamida no se encontró material proteico por encima de 14 kDa en todas las muestras liofilizadas. El grupo 1 dio una traza de mancha proteica cerca del frente de colorante, que podría ser proteína asociada con taninos hidrolizables.

25 Las muestras liofilizadas se analizan luego para determinar los polisacáridos y el polifenol, y su capacidad para inhibir enzimas intestinales.

30 El ejemplo demuestra que los niveles de color obtenidos mediante la filtración de gel de las melazas dependían del pH y/o de la composición del tampón y que se puede producir un extracto muy antioxidante de menor color conforme a la presente invención. A pH 7,5 la mayor parte del color oscuro se eluyó en el volumen vacío, mientras que a pH 5,0 se observó un segundo pico de color oscuro a menor peso molecular. El tampón de pH 5,0 contenía 10% de acetonitrilo, que podría haber contribuido a cambiar las propiedades de permeación del gel.

35 Este extracto tan antioxidante de bajo color será útil como aditivo alimentario para reducir el GI y la carcinogenicidad, para cambiar la composición corporal y servirá de antioxidante o agente antimicrobiano sin interferir en el color ni en las características organolépticas de los alimentos. Un extracto de bajo color conforme a la presente invención también es útil para usos farmacéuticos, sobre todo cuando el color y el amargor son temas importantes.

Ejemplo 2

40 En este ejemplo se investiga además la composición de polifenoles de los grupos 1 a 4 del ejemplo 1. Este ejemplo también demuestra el contenido en polifenoles de un extracto de vinaza.

Métodos

45 *Extracción con disolvente:* se disolvió un alícuota de cada muestra (~200 mg) en agua (10 ml) acidulada (pH 1,6). Luego las mezclas se extrajeron con acetato de etilo (3 x 15 ml), el disolvente se evaporó al vacío (a 40°C) y las mezclas se reconstituyeron en metanol acuoso (1:1, 2 ml) antes de analizarlas por HPLC.

50 *HPLC análisis:* la HPLC se llevó a cabo con un sistema Shimadzu provisto de dos bombas de alta presión LC-10ADPV, un cargador automático de muestras SIL-10ADVP (bucle de muestreo 250 µl), un horno de columna CTO-1-ADVP y un detector de fotodiodos en serie SPD-M10ADVP (Shimadzu Inc., Rydalmere, NSW, Australia). Para la separación de los polifenoles se usó una columna Luna C18, (d.i. 4,6 mm x 250 mm de largo, 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex, Lane Cove, NSW, Australia). La fase móvil utilizada para la separación fue ácido acético al 2% en agua (A) y ácido acético al 0,5% en acetonitrilo : agua (1:1) (B) a un caudal de 1 ml·min⁻¹. Los analitos se eluyeron utilizando un gradiente lineal: 10 - 100% de B durante 59 minutos y 100% de B durante otros 5 minutos. La detección se efectuó a 280, 320 y 370 nm. Los analitos se identificaron comparando su tiempo de elución (y su perfil UV característico) con el de patrones auténticos (Sigma- Aldrich, Castle-Hill, NSW, Australia).

Resultados y discusión

60 Cada compuesto se cuantificó basándose en el máximo de absorbancia UV respecto a una de las tres longitudes de onda especificadas (280 nm, 320 nm y 370 nm). La cuantificación basada en estas longitudes de onda se obtuvo a partir de curvas de calibración de ácido siríngico, ácido p-cumárico y quercetina respectivamente. Los niveles de los ocho compuestos identificados por HPLC-DAD en las muestras están detallados abajo (tabla 4).

Tabla 4: concentraciones de compuestos polifenólicos encontradas en las cinco muestras de melazas y detectadas por HPLC-DAD

Compuestos buscados	Concentración (mg/kg)				
	Vinazas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Ácido cinámico	473,6	N/D	N/D	2,5	6,2
Epicatequina	N/D	3,1	6,1	69,1	268,2
Mircetina	N/D	N/D	N/D	0,9	62,9
Ácido siríngico	799,7	2,4	5,9	68,3	261,9
Ácido vainílico	N/D	N/D	3,5	7,1	82,9
Ácido p-hidroxibenzoico	N/D	N/D	N/D	N/D	23,4
Apigenina	11,8	N/D	N/D	N/D	N/D
Ácido ferúlico	N/D	N/D	N/D	N/D	1,9

5 Todas las muestras contenían distintos niveles de ácido siríngico, el compuesto predominante en la mayoría de ellas. La epicatequina se halló en la mayoría de muestras.

Tabla 5: concentración de compuestos fenólicos detectada por HPLC-DAD a cada longitud de onda en las 4 muestras

10

Longitud de onda	Concentración (mg/kg)				
	Vinazas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
280 nm	4176,6	68,7	460,4	341,0	1277,8
320 nm	406,3	36,3	64,3	58,2	199,8
370 nm	287,7	22,8	10,4	0,0	16,9

En la tabla 5 anterior puede verse que todas las muestras tienen una mayor concentración de componentes con un máximo de absorción a 280 nm, seguida de los componentes que absorben más a 320 nm y luego a 370 nm, lo cual indica que en las muestras predominan los ácidos fenólicos.

15

Conclusión

En las muestras analizadas por HPLC-DAD se identificaron ocho compuestos fenólicos. El elevado contenido de compuestos fenólicos en estas muestras indica que serían apropiadas para usarlas como conservantes de alimentos o fármacos.

20

Ejemplo 3

En este ejemplo se compara la capacidad antioxidante de un extracto de melazas con la de un extracto de té verde (empleado actualmente como antioxidante alimentario).

25

Materiales y métodos

Preparación de muestras: se molieron las muestras y se disolvieron aproximadamente 50 mg en 5 ml de metanol. Las muestras se agitaron con vórtex, se sonicaron durante 30 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos (1900 FCR). El sobrenadante se recogió y se llevó a sequedad. Las muestras se redisolviéron en metanol a 10 mg/ml. Los extractos de té verde y de melazas fueron solubles en agua.

30

Ensayo de capacidad de absorción de oxígeno radical (ORAC): el ensayo ORAC empleado en este estudio midió la actividad del antioxidante en la muestra ensayada para captar radicales peróxido inducidos por dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) a 37°C.

35

Como sonda fluorescente se usó fluoresceína. Se determinaron los valores ORAC hidrófilos de las muestras.

40

Los extractos/muestras se ensayaron por el procedimiento ORAC mediante dilución en serie (x 4) con AAA (acetona: agua : ácido acético; 70:29,5:0,5) y por cuadruplicado, empezando con la concentración relevante para la muestra según la capacidad antioxidante aproximada vista en un sondeo inicial. Como control positivo se incluyó un extracto de té verde dispuesto como en la preparación de muestras.

45

Como control positivo también se incluyó un extracto metanólico de té verde disuelto en tampón de fosfato (pH 7,4).

Como patrón de referencia se usó Trolox, un análogo hidrosoluble de vitamina E. Se construyó una curva estándar de Trolox a partir de patrones de Trolox preparados a 100, 50, 25 y 12,5 µM en AAA.

Brevemente, en cada pocillo se introdujeron 20 µl de muestras/patrones/control/blanco (AAA), 10 µl de fluoresceína ($6,0 \times 10^{-7}$ M) y 170 µl de AAPH (20 mM). Inmediatamente después de haberla cargado, la placa se transfirió al lector de placas preajustado a 37°C y se midió 35 veces la fluorescencia a intervalos de un minuto. Las lecturas de fluorescencia se normalizaron respecto a los pocillos del blanco de disolvente. Los valores ORAC finales se calcularon mediante una ecuación de regresión entre la concentración de Trolox y el área neta bajo la curva de declinación de fluoresceína, y se expresaron como micromoles de equivalentes de Trolox (TE) por g de muestra.

Resultados y discusión

En la tabla 4 se muestra el rendimiento de cada producto.

Tabla 4: rendimiento del extracto de cada muestra

Muestra	Masa de muestra (mg)	Masa de extracto (mg)	Rendimiento (%)
Extracto de melazas	49,8	34,3	69
Té verde	48,5	16,3	34

Capacidad antioxidante: en la tabla 5 se presentan las capacidades antioxidantes de las muestras preparadas como extractos metanólicos. El extracto de melazas manifestó la mayor capacidad antioxidante, con un valor ORAC de 4395 µmoles de TE / g de muestra al generar un extracto o de 5020 µmoles de TE / g de muestra al disolverlo directamente en tampón (tabla 6). Ambos valores fueron considerablemente superiores a los del correspondiente extracto de té verde.

Tabla 5: capacidad antioxidante de una muestra de extracto metanólico de melazas, comparada con la de un extracto metanólico de té verde

Muestra	Valor ORAC en µmoles de TE / g de muestra
Extracto de melazas	4395 ± 229
Té verde	1793 ± 93,5
Valores medios ± error estándar de la media	

Tabla 6: capacidad antioxidante de un extracto de melazas disuelto directamente en tampón de fosfato (pH 7,4), comparada con la de un extracto metanólico de té verde

Muestra	Valor ORAC en µmoles de TE / g de muestra
Extracto de melazas	5020 ± 375
Té verde	1467 ± 90
Valores medios ± error estándar de la media	

Este ejemplo demuestra claramente que los extractos procedentes de melazas son potentes antioxidantes, con una actividad ORAC superior a la de los antioxidantes alimentarios naturales corrientes del comercio, tales como el té verde, lo cual indica que los extractos producidos según la presente invención podrían ser útiles como antioxidantes y agentes antimicrobianos en alimentos y fármacos.

Ejemplo 4

En este ejemplo se investiga la distribución de los compuestos polifenólicos en las fracciones de melazas respecto al color, con el fin de producir un antioxidante alimentario de bajo color.

Método

Reactivos:

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (sin diluir)
- Carbonato sódico (anhidro) al 7%
- Patrón de catequina (1 mg/ml)

Se prepararon los siguientes patrones y muestras para una placa de 96 pocillos.

- Añadir 14 µl de muestra o patrones diluidos a los tubos de ensayo.
- Añadir 182 µl de agua ultrapura y mezclar.

- Añadir 14 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Mezclar y dejar reposar 5 minutos.
- 5 • Añadir 14 µl de carbonato sódico al 7%.
- Mezclar y dejar reposar 90 minutos a temperatura ambiente.
- 10 • Leer a λ_{750} nm. Procurar leer los tubos a los 90 ± 5 minutos tras la adición del carbonato sódico.

Curva estándar para el ensayo de los compuestos polifenólicos: Patrones congelados de 1 mg/ml de catequina. Las diluciones estándar se prepararon como sigue:

Tabla 7: diluciones de muestra para la Curva estándar de catequina

Catequina (µl de 1 mg/ml)	Agua (µl)	Concentración de catequina (µg/ml)
0	1000	0
50	950	50
100	900	100
150	850	150
200	800	200
250	750	250

Muestras: las muestras escogidas para el ensayo fueron las fracciones 3-26 de la siguiente permeación en gel.

- Las melazas se diluyeron según la relación 1 :4 en solución de cloruro sódico 0,1 M.
- Se inyectaron 0,35 ml de muestra y se cromatografiaron a través de un gel P2 a 0,35 ml/min, recogiendo 3 fracciones.
- Las fracciones se guardaron a 4°C durante 36 horas antes del análisis.
- Las fracciones se dejaron subir a temperatura ambiente y se mezclaron agitando con vórtex antes del muestreo.
- Las muestras se ensayaron en una placa de 96 pocillos que incluía los patrones de catequina.
- Cada etapa de mezclado se realizó con el mecanismo mezclador existente en el lector de microplacas.
- La placa se leyó con un lector de microplacas BioRad modelo 680XR, usando la función de punto final en modo de lectura simple con un filtro de 750 nm.

Resultados y discusión

Se compararon dos relaciones de “datos brutos” para determinar si había un cambio significativo en las muestras debido al tiempo extra antes de la segunda lectura. Las lecturas de absorbancia fueron completamente similares y por tanto se consideró que el resultado era exacto.

Los resultados están representados en las figuras 7 a 16 y en las tablas 8 a 12.

La distribución de la placa y las lecturas de absorbancia se encuentran en las figuras 7 a 9. En la figura 7 todos los blancos (Bik), patrones de catequina (CS...) y muestras de las fracciones (F) son por triplicado y los pocillos vacíos están señalados como “Emp”. La figura 9 muestra los valores de absorbancia corregidos después de realizar los blancos y restarlos de los patrones y de las muestras.

La curva estándar de catequina resultante es muy lineal, dado el valor R^2 de 0,999 (véase tabla 8 y figura 13).

Tabla 8: datos para la curva estándar de catequina

Conc. (µg/ml)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs media	SD	% CV
0	-0,003	0,004	-0,001	0,0000	0,0036	#DIV/0!
50	0,149	0,161	0,139	0,1497	0,0110	15%
100	0,321	0,322	0,298	0,3137	0,0136	9%
150	0,451	0,469	0,465	0,4617	0,0095	4%
200	0,630	0,631	0,667	0,6427	0,0211	7%
250	0,829	0,808	0,801	0,8127	0,0146	4%

Tabla 9: datos brutos para las muestras de las fracciones con su equivalencia de catequina en la columna derecha (véase figura 8)

Fracción	Abs 1	Abs 2	Abs 3	ABS media	SD	2SD	%CV	Eq. de cat.
3	-0.005	0.006	-0.002	-0.0003	0.0057	0.0114	-3412%	2.8384
4	0.117	0.143	0.165	0.1417	0.0240	0.0481	34%	45.8687
5	0.242	0.252	0.257	0.2503	0.0076	0.0153	6%	78.7980
6	0.148	0.144	0.155	0.1490	0.0056	0.0111	7%	48.0909
7	0.151	0.161	0.161	0.1577	0.0058	0.0115	7%	50.7172
8	0.195	0.192	0.160	0.1823	0.0194	0.0388	21%	58.1919
9	0.181	0.180	0.198	0.1863	0.0101	0.0202	11%	59.4040
10	0.188	0.183	0.180	0.1837	0.0040	0.0081	4%	58.5960
11	0.249	0.270	0.274	0.2643	0.0134	0.0269	10%	83.0404
12	0.211	0.226	0.219	0.2187	0.0075	0.0150	7%	69.2020
13	0.113	0.117	0.119	0.1163	0.0031	0.0061	5%	38.1919
14	0.057	0.088	0.096	0.0920	0.0057	0.0113	12%	30.8182
15	0.062	0.064	0.059	0.0617	0.0025	0.0050	8%	21.6263
16	0.043	0.034	0.047	0.0413	0.0067	0.0133	32%	15.4646
17	0.048	0.049	0.048	0.0483	0.0006	0.0012	2%	17.5859
18	0.041	0.080	0.043	0.0420	0.0014	0.0028	7%	15.6667
19	0.037	0.034	0.033	0.0347	0.0021	0.0042	12%	13.4444
20	0.022	0.043	0.036	0.0337	0.0107	0.0214	64%	13.1414
21	0.026	0.032	0.024	0.0273	0.0042	0.0083	30%	11.2222
22	0.023	0.027	0.030	0.0267	0.0035	0.0070	26%	11.0202
23	0.015	0.015	0.014	0.0147	0.0006	0.0012	8%	7.3838
24	0.010	0.013	0.014	0.0123	0.0021	0.0042	34%	6.6768
25	0.004	0.006	0.001	0.0037	0.0025	0.0050	137%	4.0505
26	0.001	0.003	0.017	0.0070	0.0087	0.0174	249%	5.0606

5 La representación gráfica de la equivalencia de catequina de las fracciones con $\pm 2D$ como error requiere cambiar cada absorbancia triplicada a equivalencia de catequina y a la SD de esos números para representar el error.

10 Los valores de la tabla 9 se recalcaron con esta finalidad, sacando de los cálculos F14 rep1 y F18 rep2, porque se notaron errores.

Tabla 10: datos para las muestras de las fracciones en equivalentes de catequina (placa 1)

Fracción	CE1	CE2	CE3	CE medio	SD	2SD	%CV
3	1.424	4.758	2.333	2.8384	1.7231	3.4462	121%
4	38.394	46.273	52.939	45.8687	7.2811	14.5623	32%
5	76.273	79.303	80.818	78.7980	2.3144	4.6289	6%
6	47.788	46.576	49.909	48.0909	1.6872	3.3744	7%
7	48.697	51.727	51.727	50.7172	1.7495	3.4991	7%
8	62.030	61.121	51.424	58.1919	5.8786	11.7572	20%
9	57.788	57.485	62.939	59.4040	3.0655	6.1309	10%
10	59.909	58.394	57.485	58.5960	1.2247	2.4494	4%
11	78.394	84.758	85.970	83.0404	4.0693	8.1387	10%
12	66.879	71.424	69.303	69.2020	2.2744	4.5488	7%

15

(continuación)

Fracción	CE1	CE2	CE3	CE medio	SD	2SD	%CV
13	37.182	38.394	39.000	38.1919	0.9258	1.8515	5%
14	20.212	29.606	32.030	30.8182	1.7142	3.4284	11%
15	21.727	22.333	20.818	21.6263	0.7626	1.5252	7%
16	15.970	13.242	17.182	15.4646	2.0177	4.0354	26%
17	17.485	17.788	17.485	17.5859	0.1750	0.3499	2%
18	15.364	27.182	15.970	15.6667	0.4285	0.8571	5%
19	14.152	13.242	12.939	13.4444	0.6308	1.2616	9%
20	9.606	15.970	13.848	13.1414	3.2402	6.4804	49%
21	10.818	12.636	10.212	11.2222	1.2616	2.5232	22%
22	9.909	11.121	12.030	11.0202	1.0642	2.1284	19%
23	7.485	7.485	7.182	7.3838	0.1750	0.3499	5%
24	5.970	6.879	7.182	6.6768	0.6308	1.2616	19%
25	4.152	4.758	3.242	4.0505	0.7626	1.5252	38%
26	3.242	3.848	8.091	5.0606	2.6418	5.2835	104%

5

Las placas se repitieron dos veces más para asegurar una buena representatividad de los resultados.

Tabla 11: datos para las muestras de las fracciones en equivalentes de catequina (placa 2)

Fracción	CE1	CE2	CE3	CE medio	SD	2SD	%CV
3	-0.118	2.235	0.176	0.7647	1.2820	2.5641	335%
4	36.647	44.000	44.294	41.6471	4.3326	8.6652	21%
5	76.941	79.000	75.765	77.2353	1.6376	3.2752	4%
6	44.882	50.765	50.765	48.8039	3.3962	6.7924	14%
7	43.706	47.235	50.765	47.2353	3.5294	7.0588	15%
8	51.059	52.529	55.765	53.1176	2.4075	4.8149	9%
9	55.765	59.000	57.529	57.4314	1.6199	3.2397	6%
10	53.412	57.235	61.353	57.3333	3.9715	7.9430	14%
11	76.059	68.706	74.294	73.0196	3.8386	7.6772	11%
12	64.882	40.471	67.529	66.2059	1.8718	3.7435	6%
13	35.765	35.176	36.647	35.8627	0.7402	1.4804	4%
14	26.059	29.882	28.412	28.1176	1.9287	3.8573	14%
15	20.765	21.059	21.941	21.2549	0.6123	1.2245	6%
16	14.000	15.471	15.471	14.9804	0.8490	1.6981	11%
17	15.471	17.529	19.000	17.3333	1.7729	3.5457	20%
18	14.588	14.588	15.765	14.9804	0.6792	1.3585	9%
19	11.353	10.471	10.471	10.7647	0.5094	1.0189	9%
20	7.529	11.941	13.412	10.9608	3.0613	6.1225	56%
21	11.059	10.176	11.059	10.7647	0.5094	1.0189	9%
22	8.118	7.529	9.294	8.3137	0.8985	1.7971	22%
23	6.353	6.647	6.941	6.6471	0.2941	0.5882	9%
24	4.588	4.294	4.588	4.4902	0.1698	0.3396	8%
25	3.412	2.824	2.529	2.9216	0.4493	0.8985	31%
26	1.353	1.353	5.765	2.8235	2.5471	5.0943	180%

10





ES 2 454 649 T3

Tabla 12: datos para las muestras de las fracciones en equivalentes de catequina (placa 3)

Fracción	CE 1	CE2	CE 3	CE medio	SD	2SD	%CV
3	-3.800	4.200	-0.371	1.9143	3.2325	6.4650	338%
4	36.771	44.486	42.771	41.3429	4.0507	8.1014	20%
5	73.343	65.057	75.057	71.1524	5.3478	10.6955	15%
6	46.200	50.771	48.200	48.3905	2.2917	4.5833	9%
7	49.343	51.057	49.343	49.9143	0.9897	1.9795	4%
8	52.486	55.629	54.486	54.2000	1.5908	3.1816	6%
9	54.486	57.057	51.343	54.2952	2.8619	5.7238	11%
10	58.200	54.200	65.343	59.2476	5.6448	11.2896	19%
11	81.057	78.200	78.486	79.2476	1.5736	3.1472	4%
12	63.057	62.200	65.057	63.4381	1.4662	2.9323	5%
13	35.914	36.486	37.057	36.4857	0.5714	1.1429	3%
14	25.057	27.914	27.343	26.7714	1.5119	3.0237	11%
15	19.629	20.200	20.486	20.1048	0.4364	0.8729	4%
16	13.914	13.629	14.200	13.9143	0.2857	0.5714	4%
17	15.914	16.771	15.343	16.0095	0.7190	1.4381	9%
18	15.629	15.057	14.200	14.9619	0.7190	1.4381	10%
19	11.343	11.057	12.771	11.7238	0.9184	1.8369	16%
20	8.200	11.343	11.343	10.2952	1.8145	3.6291	35%
21	10.486	8.771	10.771	10.0095	1.0817	2.1634	22%
22	8.486	9.914	9.629	9.3429	0.7559	1.5119	16%
23	5.914	5.629	6.486	6.0095	0.4364	0.8729	15%
24	3.629	3.914	3.914	3.8190	0.1650	0.3299	9%
25	2.200	2.771	1.914	2.2952	0.4364	0.8729	38%
26	0.771	3.343	4.771	2.9619	2.0270	4.0541	137%

- 5 Las muestras se ensayaron por triplicado, cada placa con su propia curva de referencia estándar de catequina. En la figura 9 se representan los resultados de los compuestos polifenólicos de cada fracción de cada placa y se confirma la exactitud del ensayo.
- 10 No hay resultados significativamente apartados respecto al error $\pm 2D$ de cada una de las fracciones. Esto indica que el ensayo es bastante exacto, aunque las lecturas de absorbancia de cada triplicado de fracción no sean del todo precisas, tal como se aprecia por los valores de % de CV.
- 15 La absorbancia de las fracciones se analizó mediante un lector de microplacas a 750 nm con muestras de 0,35 ml. La figura 10 muestra la distribución en la placa de 96 pocillos de las diluciones de alimentación de melazas y de las fracciones 3-23. (En la figura 10: ND – sin diluir; D1:2 – dilución por 2; F – número de fracción; Emp – pocillo vacío). La figura 11 muestra los valores de absorbancia a 750 nm para la distribución de la figura 10.
- 20 La figura 12 muestra un cromatograma de la tanda descrita arriba. Hay trazas de color naranja, púrpura, verde y azul a λ 405, 350, 280 y 214 nm respectivamente.

Leyenda de la figura 12

Estilo de línea	Longitud de onda (nm)
	214
	280
	350
	405

- 5 A esta longitud de onda (750 nm) las fracciones 8 y siguientes tienen valores de absorbancia inferiores a 0,010, lo cual se considera "bajo color".

10 En la figura 15 puede verse que la fracción 12 da un contenido bastante elevado de compuestos polifenólicos con respecto a la equivalencia en catequina y que esta fracción también coincide con un pico secundario de la señal a λ 280 nm en la figura 12. La señal a λ 405 nm de la fracción 12 en la figura 12 es bastante baja, lo cual indica color bajo. Esta diferencia de color entre fracciones puede apreciarse en la figura 16.

Conclusión

- 15 Las fracciones consideradas "muy antioxidantes" tenían un contenido de compuestos polifenólicos de 50 μ g/ml de equivalencia en catequina o superior, en estas condiciones de ensayo.

Las fracciones consideradas como de "bajo color" tenían una lectura de absorbancia de 0,010 o inferior en estas condiciones de ensayo.

20 Esta longitud de onda de 750 nm se usó para la reacción polifenólica. La absorbancia del color real de las fracciones se hubiera analizado mejor a 415 nm, porque a esta longitud de onda el color absorbe más energía, haciéndolo más sensible a las diferencias entre fracciones. No obstante las mediciones a 750 nm proporcionan una indicación útil para la medición del color.

25 Este experimento demuestra que a partir de las melazas se puede aislar un rango de fracciones de bajo color muy antioxidantes. La figura 16 muestra algunas de las fracciones de bajo color comparadas con el control (melazas). Ninguna de las muestras de bajo color tiene un olor apreciable. El bajo color de las fracciones muy antioxidantes puede ser útil para diversas aplicaciones, sin interferir con aspectos organolépticos de los productos alimenticios terminados, gracias a su poco color.

Ejemplo 5

- 35 Se preparó una pasta dentífrica aplicable al método de tratamiento o prevención de la caries dental y de higiene oral según la presente invención, del modo siguiente:

	Ingredientes	% p/p
A)	Sorbitol USP Fosfopéptido de caseína (CPP) Extracto de melazas de bajo color muy antioxidante	15,0 7,5 0,5
B)	Glicerina USP Triclosano Sacarina-Na USP 40/60 mallas Veegum D-gránulos Aceite de menta Stepanol WA/100 (lauril sulfato Na)	10,0 0,3 0,2 2,0 1,1 2,2
C)	Veegum HF-6% (silicato de Ag/Al) Azul # FD+C (0,6%)	16,64 0,06
D)	CMC-Na 7 H 5%	45,0

El extracto de melazas de bajo color y gran poder antioxidante fue suministrado en forma de polvo suelto marrón claro, soluble en agua. Se combinaron los componentes de A, luego se añadieron todos los de B a la mezcla de A y

se mezcló a 70°C hasta quedar uniforme. Después se agregó C y se mezcló hasta quedar uniforme. Por último se incorporó D lentamente, mezclando hasta quedar uniforme. Se añadió ácido cítrico c.s. hasta pH 5,9 - 6,3.

Ejemplo 6

5 La pasta dentífrica del ejemplo 5 anterior, con la adición de 0,3% de monofluorofosfato sódico para niños.

Ejemplo 7

10 La pasta dentífrica del ejemplo 5 anterior, con la adición de un compuesto blanqueador dental.

Ejemplo 8

15 Esta composición proporciona un enjuague bucal.

Ingredientes	% p/p
Fosfato cálcico	2,0
Extracto de melazas muy antioxidante de bajo color	0,5
Poloxámero	1,0
Saborizante	c.s.
Agua/etanol	c.s. hasta 100%

Ejemplo 9

20 Esta composición proporciona un chicle.

Ingredientes	% p/p
Azúcar de caña o azúcar de bajo GI citado en WO 2005/117608	2,0
Extracto de melazas muy antioxidante de bajo color	1,5
Base de chicle	c.s.
Jarabe de glucosa de trigo	0,5
Ácido alimentario (296)	1,0
Humectante (422)	2,0
Saborizante	c.s.
Emulsionante (322 de soja)	0,5
Colorantes (100, 133)	0,0002
Antioxidante (BHT)	0,1

Ejemplo 10

25 Esta composición proporciona un dulce de gelatina blanda.

Ingredientes	% p/p
Jarabe de glucosa de trigo	36%
Azúcar de caña o azúcar de bajo GI citado en WO 2005/117608	32%
Almidón de trigo o maíz	23%
Gelatina	6%
Ácido cítrico	0,95%
Concentrado de zumo de fruta	c.s.
Saborizantes naturales	c.s.
Colorantes naturales	c.s.
Extracto de melazas muy antioxidante de bajo color	2,0%

Ejemplo 11

30 Esta composición proporciona una bebida de agua saborizada.

Ingredientes	Peso (g)
Azúcar	8,50
Extracto de melazas muy antioxidante de bajo color	2,00
Ácido cítrico al 50% p/p	2,00
Saborizante	0,30
Benzoato sódico	0,10
Agua	hasta 1000 ml

ES 2 454 649 T3

Preparación

- Disolver el benzoato sódico agitando en 50 ml de agua
- Añadir la solución de ácido cítrico y el extracto de melazas muy antioxidante de bajo color
- 5 • Agitar hasta que el extracto de melazas muy antioxidante de bajo color se disuelva
- Añadir el azúcar y agitar hasta su disolución, luego agregar el saborizante y agitar hasta que quede mezclado
- Añadir agua hasta llegar a un litro

Ejemplo 12

10

Esta composición proporciona un tentempié de puré de frutas

Ingredientes	% p/p
Puré de manzana	79,00
Puré de frambuesa	12,00
Concentrado de zumo de manzana	7,6
Extracto de melazas muy antioxidante de bajo color	1,2
Saborizante de frambuesa	0,2
Total	100

Preparación

15

Mezclar los purés y el zumo concentrado
Añadir el extracto de melazas y el saborizante. Mezclar bien hasta que quede homogéneo.

Ejemplo 13

20

Esta composición proporciona un aceite con antioxidante de melazas añadido

Ingredientes	% p/p
Aceite de girasol	98,8
Extracto de melazas muy antioxidante de bajo color	1,2
Total	100

Ejemplo 14

25

Esta composición proporciona una barra de cereales

Ingredientes	% p/p
Leche descremada en polvo	2,00
Extracto de melazas muy antioxidante de bajo color	0,50
Rosetas de arroz	20,00
Rosetas de trigo	10,00
Manzanas secas y troceadas	6,00
Sultanas	3,00
Almendras tostadas y troceadas	4,00
Jarabe de glucosa DE38, 43°Be	11,00
Jarabe de azúcar invertido (74-76%)	5,25
Jarabe de sorbitol	20,00
Grasa de nuez de palma	2,00
Lecitina	0,15
Azúcar	12,00
Agua	4,00
Sal	0,10
Total	100

Preparación

30

- Mezclar el extracto de melazas muy antioxidante de bajo color con la leche descremada en polvo e introducir en un mezclador Hobart
- Añadir las rosetas de arroz y de trigo y mezclar suavemente con los ingredientes en polvo. Agregar luego las frutas y mezclar
- 35 • Mezclar los jarabes de glucosa, azúcar invertido y sorbitol y calentar hasta 113°C. Después enfriar en baño de agua fría para detener el proceso de cocción
- Derretir la grasa de nuez de palma y la lecitina en un baño de agua a 75°C

- Agregar la mezcla de grasas a la combinación de jarabes
- Mezclar el azúcar, el agua y la sal y calentar hasta 110°C
- Incorporar las grasas a la disolución de azúcar
- Añadir la masa líquida a los ingredientes secos en un mezclador tipo Kenwood y mezclar bien
- 5 • Poner la masa sobre una placa de mármol y enrollar hasta el grosor deseado. Dejar enfriar la masa hasta la temperatura ambiente
- Cortar en porciones individuales y envasar

Ejemplo 15

10 Determinación de la actividad antimicrobiana de polifenoles en polvo de extractos de melazas contra el deterioro de los alimentos y los microorganismos en la higiene oral.

Métodos

15 *Polifenoles en polvo de extractos de melazas*: el polvo de polifenoles de melazas (5 g), tal como está descrito en la solicitud de patente internacional nº WO 2005/117608, fue suministrado por Horizon Science Pty Ltd.

20 *Cepas bacterianas y condiciones de cultivo*: los microorganismos usados en este ensayo, *Staphylococcus aureus* cepa 6571 (NCTC - National Collection of Type Cultures, Health Protection Agency Centre for Infection [Colección nacional de cultivos tipo, Centro de infecciones de la agencia de protección sanitaria], Londres, UK), *Streptococcus mutans* ACM 969 y *Proteus vulgaris* ACM 4730 fueron suministrados por la Australian Collection of Microorganisms (ACM) de la universidad de Queensland. Los microorganismos de ensayo se cultivaron durante 24 h en caldo de triptona de soja-extracto de levadura (TSYEB) (Oxoid CM 129B, Basingstoke, UK), 30 g/l; extracto de levadura (Oxoid CMI 9), 6 g/l. El inóculo se cuantificó midiendo la densidad óptica (absorbancia) a 540 nm y se ajustó a 0,5 de absorbancia con TSYEB.

30 *Preparación y dilución de las cepas bacterianas*: se preparó un inóculo diluyendo en serie (1:1) 22 veces el cultivo de los microorganismos de ensayo en caldo TSYEB efectuado durante una noche. Las diluciones de 11-22 se usaron en la placa de microvaloración de 96 pocillos. Una vez efectuadas las diluciones, la dilución más baja se aplicó sobre una placa de agar de recuento (Oxoid CM0463) para todos los microorganismos de ensayo, a fin de confirmar el recuento bacteriano.

35 *Preparación de los polifenoles en polvo de melazas*: el polvo de polifenoles de melazas (0,1 g) se disolvió en 10 ml de TSYEB. Esta solución se diluyó en TSYEB, empezando a una concentración del 1% (p/v) y diluyendo hasta un 0,0005% (p/v).

40 *Preparación de las soluciones de antibióticos*: en este estudio se usaron los antibióticos penicilina G y oxitetraciclina hidrocloreuro de Sigma- Aldrich (St. Louis, MO). Se disolvieron respectivamente 0,01 g de penicilina G y oxitetraciclina en 20 ml de TSYEB.

Las soluciones de los antibióticos penicilina G y oxitetraciclina se diluyeron en TSYEB (1:1), empezando a una concentración del 0,05% (p/v) y diluyendo hasta $2,44 \times 10^{-5}$ % (p/v).

45 *Procedimiento de ensayo en microplaca*: en este estudio se utilizaron placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo plano, con tapa, a fin de evitar la contaminación cruzada (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania). En cada placa de microvaloración de 96 pocillos había una fila de pocillos que solo contenía el medio (control de esterilidad y control negativo). Tres filas a partir de la primera contenían diluciones 1:1 de los microorganismos de ensayo (controles bacterianos equivalentes a 10^5 ufc/ml en el pocillo más a la izquierda hasta 10^2 ufc/ml en el pocillo más a la derecha) y la solución de polifenoles de melazas desde la concentración más alta hasta la más baja (1% hasta 0,0005% p/v). Cada una de las combinaciones de solución de polifenoles con células bacterianas se midió por triplicado. Las tres filas siguientes de pocillos contenían el mismo número de diluciones bacterianas, pero la solución de polifenoles iba desde la concentración más baja hasta la más alta (0,0005% hasta 1% p/v). Cada una de las combinaciones de solución de polifenoles con células bacterianas se midió por triplicado. La fila restante contenía el mismo número de diluciones bacterianas con medio de cultivo y solución de polifenoles, y se designó como control positivo. En una placa aparte se probaron duplicados (n = 6) del control positivo sin solución de polifenoles para los microorganismos de ensayo. Cada pocillo de 300 µl contenía 50 µl de inóculo y 150 µl de solución de polifenoles. Cada control de esterilidad o control negativo contenía 200 µl de caldo de TSYEB. Cada control positivo contenía 50 µl de inóculo y 150 µl de caldo de TSYEB.

60 Para determinar la sensibilidad de los microorganismos de ensayo y comparar la actividad antimicrobiana de la solución de polifenoles con la de los antibióticos se usó penicilina G y oxitetraciclina hidrocloreuro como patrones de referencia.

La densidad óptica (DO) se determinó en un espectrofotómetro Sunrise-Basic Tecan (Grödig, Austria) a 540 nm. La DO se determinó antes de la incubación y representa la lectura espectrofotométrica en el tiempo cero (T_0). Las placas se colocaron en un incubador a 37°C y se incubaron durante 22 h. El *Streptococcus mutans* se incubó a 37°C durante 22 y 44 h. Las soluciones en las placas se mezclaron con una pipeta multicanal para evitar formación de

Análisis de los resultados: los cálculos del porcentaje de inhibición se basaron en el estudio de Casey y otros 2004; Patton y otros 2006. Porcentaje de inhibición = $1 - (\text{DO del pocillo ensayado} / \text{DO del respectivo pocillo de control positivo}) \times 100$.

- MIC₀ es la mayor concentración de solución de polifenoles o de antibiótico que no inhibe el crecimiento;
- MIC₅₀ es la concentración de solución de polifenoles o de antibiótico que inhibe el 50% del crecimiento;
- MIC₁₀₀ es la concentración más baja de solución de polifenoles o de antibiótico que inhibe al 100%

Resultados

Tabla 13: resultados del análisis de la actividad antibacteriana en polifenoles en polvo de melazas

Microorganismo ensayado	Concentración mínima inhibitoria (MIC) % p/v (concentración de polifenoles en polvo)			Tinción de Gram	Tipo de cultivo (respiración)
	MIC ₀	MIC ₅₀	MIC ₁₀₀		
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 0,001	0,28	> 1	Positiva	Aeróbico
<i>Proteus vulgaris</i>	0,02	1	> 1	Negativa	Aeróbico
<i>Streptococcus mutans</i>	0,06	0,50	1	Positiva	Anaeróbico facultativo

Tabla 14: resultados del análisis de la actividad antibacteriana en penicilina G

Microorganismo ensayado	Concentración mínima inhibitoria (MIC) % p/v (concentración de penicilina)		
	MIC ₀	MIC ₅₀	MIC ₁₀₀
<i>Staphylococcus aureus</i>	< $2,44 \times 10^{-5}$	$4,88 \times 10^{-5}$	$9,77 \times 10^{-5}$
<i>Proteus vulgaris</i>	$4,88 \times 10^{-5}$	$1,95 \times 10^{-4}$	$7,81 \times 10^{-4}$
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	< $2,44 \times 10^{-5}$

Tabla 15: resultados del análisis de la actividad antibacteriana en oxitetraciclina

Microorganismo ensayado	Concentración mínima inhibitoria (MIC) % p/v (concentración de oxitetraciclina)		
	MIC ₀	MIC ₅₀	MIC ₁₀₀
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	< $2,44 \times 10^{-5}$
<i>Proteus vulgaris</i>	$2,44 \times 10^{-5}$	$3,91 \times 10^{-4}$	$7,88 \times 10^{-4}$
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	< $2,44 \times 10^{-5}$

Discusión

El examen preliminar de la actividad antibacteriana de la solución de polifenoles se realizó frente a *Staphylococcus aureus*. Mediante este examen se determinó la mayor concentración de la solución de polifenoles que se podía usar. Una concentración de polifenoles en polvo superior al 1% (p/v) dio una lectura de densidad óptica mayor de 1, lo cual supera el intervalo recomendado para el análisis espectrofotométrico. La solución de polifenoles inhibió el *Staphylococcus aureus* a MIC₀ < 0,001%, MIC₅₀ 0,28% y MIC₁₀₀ > 1% (p/v); véase tabla 13.

El *Proteus vulgaris* es un microorganismo que descompone los alimentos. Su inhibición por la solución de polifenoles dio un resultado de MIC₀ 0,02%, MIC₅₀ 1% y MIC₁₀₀ > 1% (p/v); véase tabla 13. El *Streptococcus mutans* no creció en 22 horas y por tanto el periodo de cultivo se prolongó hasta 44 h. El *Streptococcus mutans* reveló una inhibición completa al 1%, MIC₅₀ al 0.5% y MIC₀ al 0,06% (p/v); véase tabla 13.

Los antibióticos usados como patrones de referencia indican concentraciones mucho más bajas para una inhibición completa; sin embargo otros microorganismos necesitaron concentraciones diferentes. El *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus mutans* fueron inhibidos a la concentración más baja de oxitetraciclina ($2,44 \times 10^{-5}$ (p/v)); véase tabla 15. Estos dos microorganismos Gram positivos también fueron inhibidos por polifenoles en polvo de extracto de melazas.

Conclusión

El *Proteus vulgaris*, un microorganismo que descompone los alimentos, fue inhibido por los polifenoles en polvo de extracto de melazas.

5 Tanto el *Streptococcus mutans* como el *Staphylococcus aureus* son agente patógenos y su crecimiento fue inhibido por los polifenoles en polvo de extracto de melazas.

10 El nivel del 1% necesario para la inhibición mediante los polifenoles en polvo de extracto de melazas se pudo considerar muy bajo, en comparación con otros extractos vegetales que resultan eficaces para evitar el crecimiento microbiano. El lote utilizado en este estudio no había sido preparado recientemente; un lote fresco de polifenoles en polvo de extracto de melazas puede dar mejores resultados, pues los polifenoles tienden a oxidarse rápidamente sin un almacenamiento adecuado.

15 Aunque en el ejemplo se usa un extracto de melazas de color alto, cabe esperar que los polifenoles importantes se encuentren en los extractos muy antioxidantes de bajo color empleados en los métodos según la presente invención. De estos resultados se puede deducir que los extractos muy antioxidantes de bajo color procedentes de la caña de azúcar serán útiles para inhibir la formación de caries dental y mejorar la higiene bucal.

Referencias

20 Casey JT, O'Cleirigh C, Walsh PK, O'Shea DG, Development of a robust microtiter plate- based assay method for assessment of bioactivity [*Desarrollo de un método de ensayo consistente basado en placas de microvaloración para la determinación de bioactividad*], Journal of Microbiological Methods 58 (2004) 327-334.

25 Patton T, Barrett J, Brennan J, Moran N, Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey [*Empleo de un ensayo biológico espectrofotométrico para determinar la sensibilidad microbiana a la miel manuka*], Journal of Microbiological Methods **64**.

30 El término "comprende" y las formas del término "comprende", tal como se emplean en esta descripción y en las reivindicaciones, no limitan la presente invención excluyendo cualquier otra variante o adiciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Conservante que comprende un extracto de melazas de bajo color enriquecido en polifenoles, procedente de caña de azúcar, que tiene una gran actividad antioxidante, de manera que el extracto posee un contenido mínimo de compuestos polifenólicos de aproximadamente 50 µg/ml de equivalentes de catequina y su color es bajo comparado con las melazas.
- 10 2. El conservante según la reivindicación 1, en que el extracto tiene un valor de absorbancia menor o igual a 0,010 aproximadamente, medido a 750 nm.
- 15 3. Método de conservación de alimentos, cosméticos y fármacos que incluye la etapa de adición al alimento, cosmético o fármaco una cantidad preservadora efectiva de un conservante según la reivindicación 1 o 2.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en el cual la cantidad preservadora efectiva está comprendida en el intervalo del 0,0001 hasta el 5,0% en peso de composición total.
- 25 5. El método según la reivindicación 4, en el cual la cantidad preservadora efectiva está comprendida en el intervalo del 0,01 hasta el 2,5% en peso de composición total.
- 30 6. Conservante para mejorar la higiene bucal y/o para inhibir, tratar y/o prevenir la formación de caries dental mediante la adición de un conservante según la reivindicación 1 o 2 en cantidad terapéuticamente efectiva a un producto de higiene oral.
- 35 7. El conservante para emplear según la reivindicación 6, cuya cantidad terapéuticamente efectiva está comprendida en el intervalo del 0,0001 hasta el 5,0% en peso de composición total.
8. El conservante para emplear según la reivindicación 6, cuya cantidad terapéuticamente efectiva está comprendida en el intervalo del 0,01 hasta el 2,5% en peso de composición total.
9. Producto de higiene oral que contiene un conservante según la reivindicación 1 o 2.
10. Uso de un conservante según la reivindicación 1 o 2 en la preparación de un medicamento como antioxidante y/o agente antimicrobiano en alimentos, cosméticos o fármacos.
11. Empleo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un conservante según la reivindicación 1 o 2 en la preparación de un producto de higiene oral para mejorar la higiene bucal y/o inhibir, tratar y/o prevenir la formación de caries dental.

Figura 1

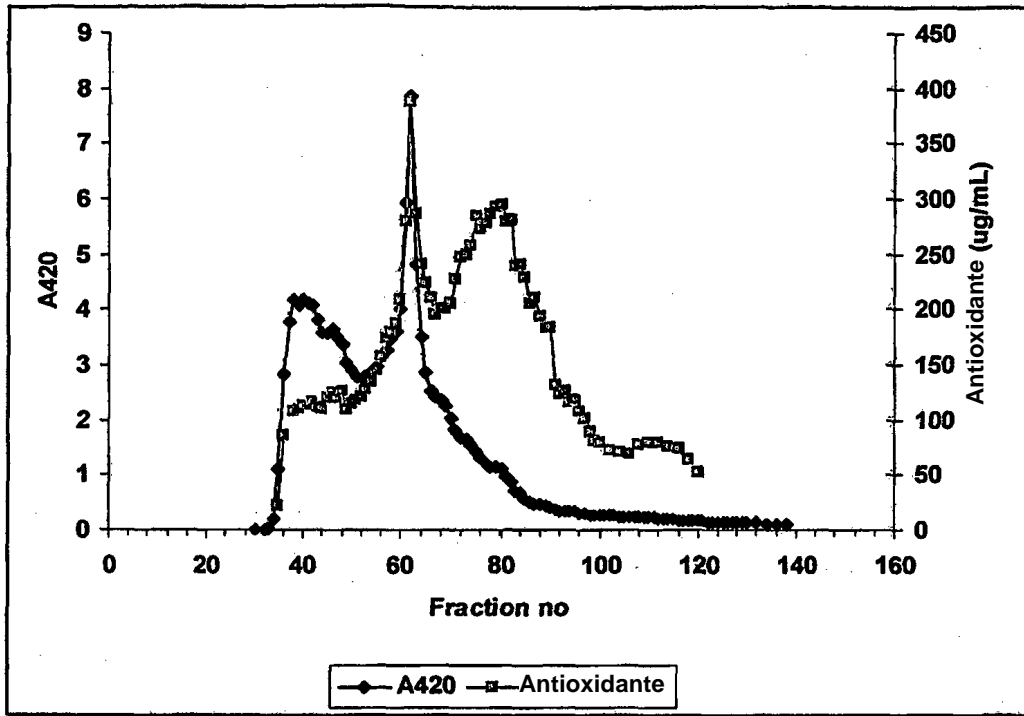


Figura 2

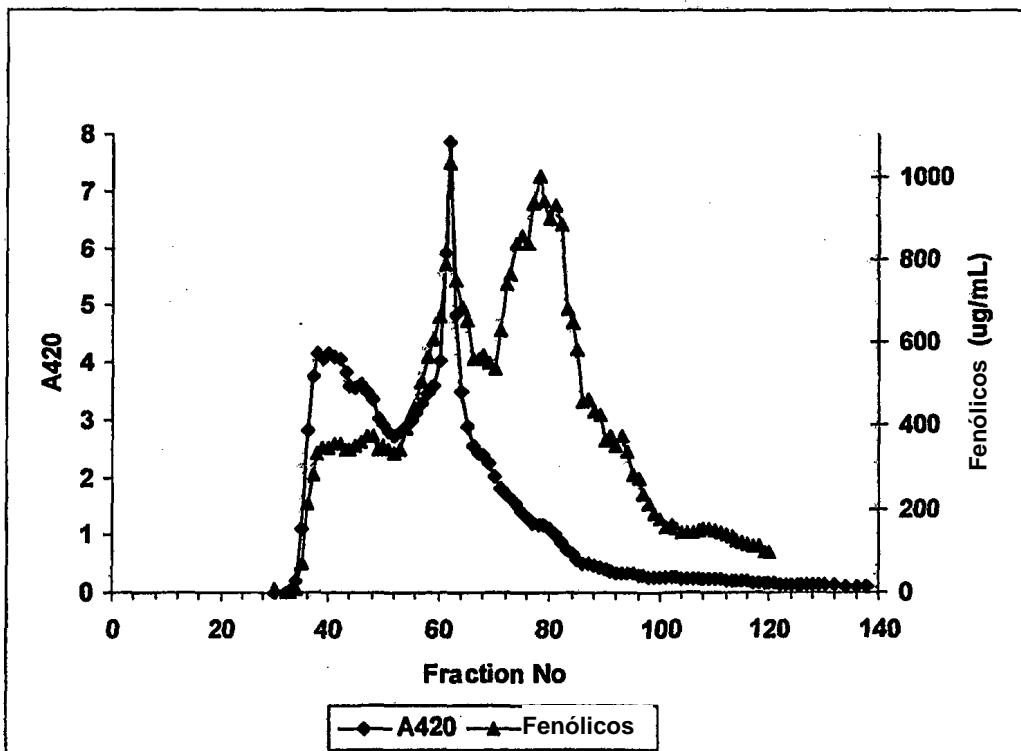


Figura 3

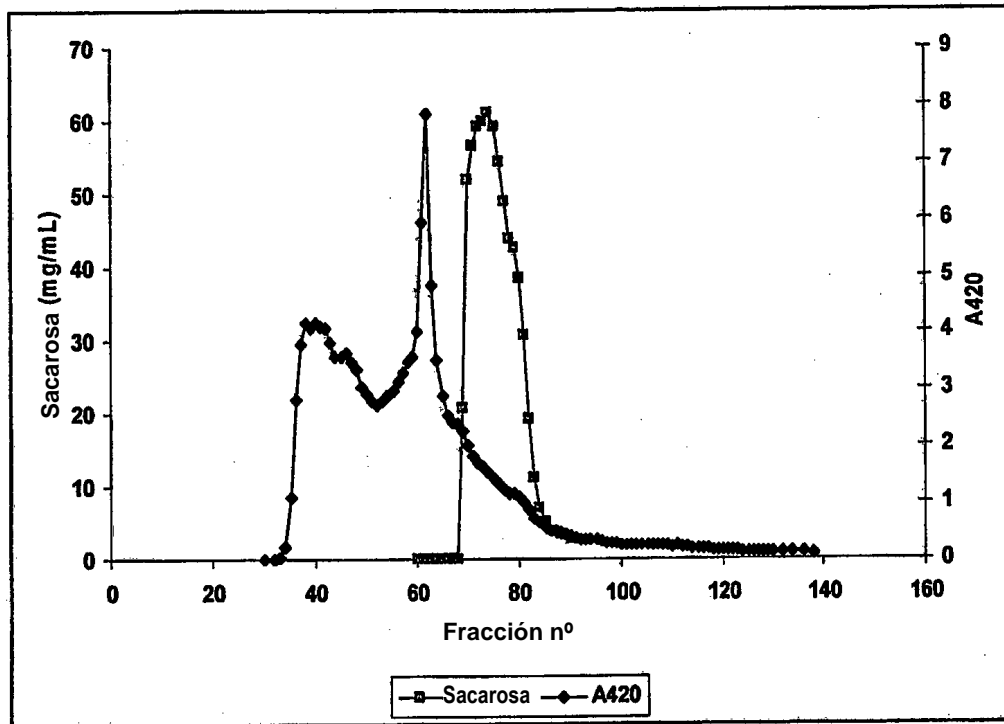


Figura 4

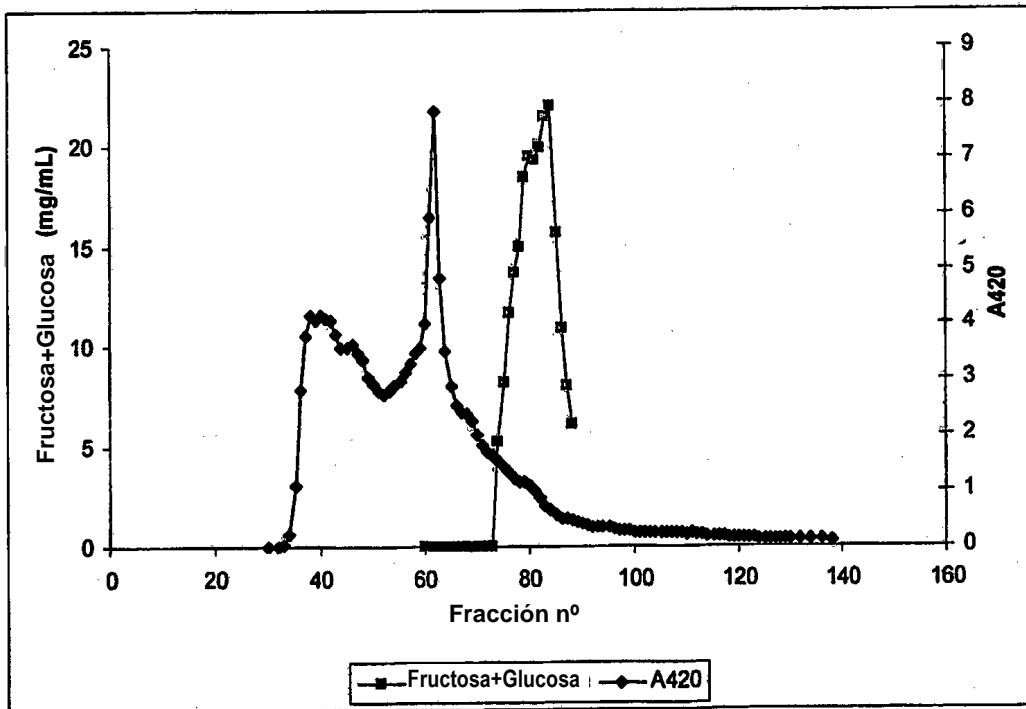


Figura 5

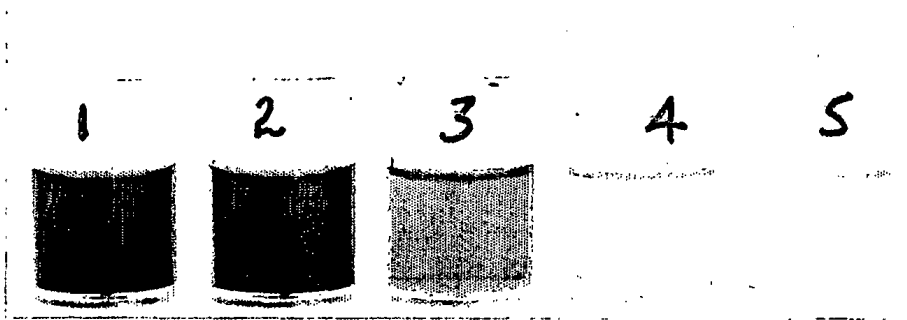


Figura 6

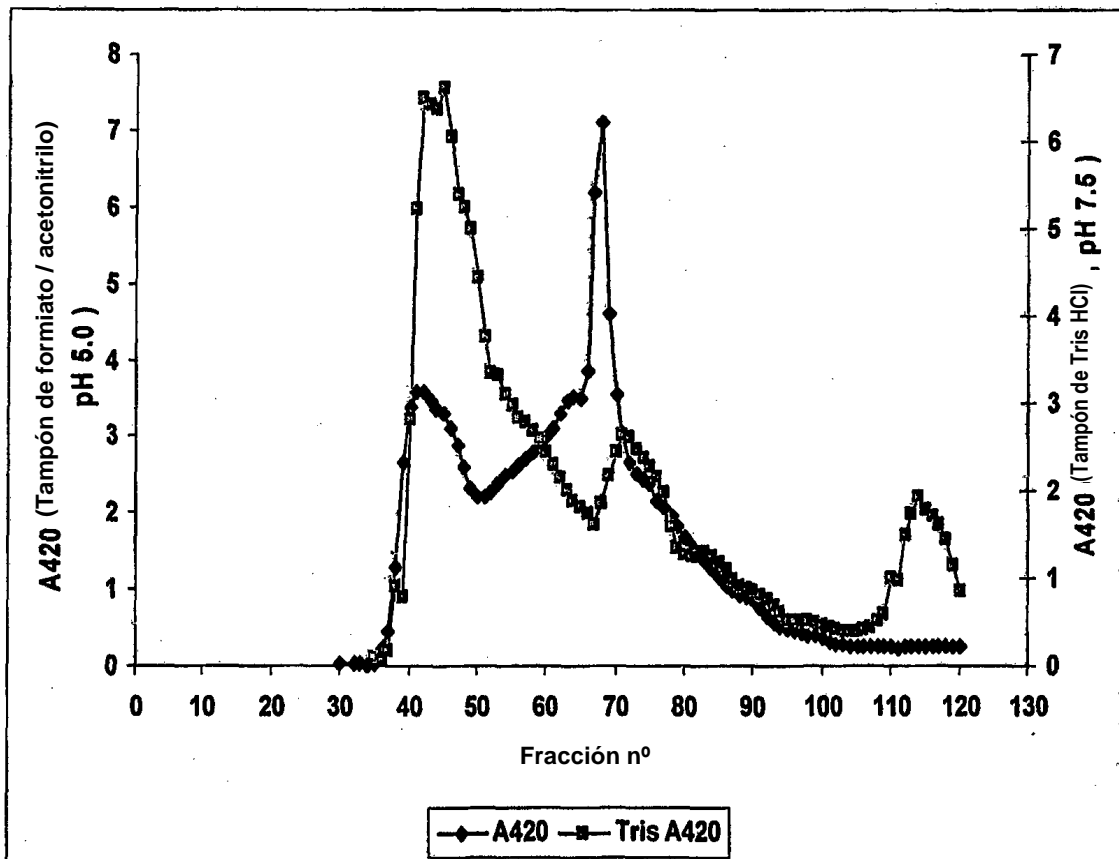


Figura 7

DISTR.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	CS50	CS100	CS150	CS200	CS250	F3	F4	F5	F6	F7	F8
B	Blk	CS50	CS100	CS150	CS200	CS250	F3	F4	F5	F6	F7	F8
C	Blk	CS50	CS100	CS150	CS200	CS250	F3	F4	F5	F6	F7	F8
D	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
E	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
F	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
G	F21	F21	F22	F22	F23	F23	F24	F24	F25	F25	F26	F26
H	F21	Emp	F22	Emp	F23	Emp	F24	Emp	F25	Emp	F26	Emp

Figura 8

DISTR.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.029	0.181	0.353	0.483	0.662	0.861	0.027	0.149	0.274	0.180	0.183	0.227
B	0.036	0.193	0.354	0.501	0.663	0.840	0.038	0.175	0.284	0.176	0.193	0.224
C	0.031	0.171	0.330	0.497	0.669	0.833	0.030	0.197	0.289	0.187	0.193	0.192
D	0.213	0.220	0.281	0.243	0.145	0.089	0.094	0.075	0.080	0.073	0.069	0.054
E	0.212	0.215	0.302	0.258	0.149	0.120	0.096	0.066	0.081	0.112	0.066	0.075
F	0.230	0.212	0.306	0.251	0.151	0.128	0.091	0.079	0.080	0.075	0.065	0.068
G	0.058	0.056	0.055	0.062	0.043	0.046	0.042	0.046	0.036	0.033	0.033	0.049
H	0.064	0.024	0.059	0.030	0.047	0.030	0.045	0.030	0.038	0.030	0.035	0.030

Figura 9

DISTR.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.003	0.149	0.321	0.451	0.630	0.829	-0.005	0.117	0.242	0.148	0.151	0.195
B	0.004	0.161	0.322	0.469	0.631	0.808	0.006	0.143	0.252	0.144	0.161	0.192
C	-0.001	0.139	0.298	0.465	0.667	0.801	-0.002	0.165	0.257	0.155	0.161	0.160
D	0.181	0.188	0.249	0.211	0.113	0.057	0.062	0.043	0.048	0.041	0.037	0.022
E	0.180	0.183	0.270	0.226	0.117	0.088	0.064	0.034	0.049	0.080	0.034	0.043
F	0.198	0.180	0.274	0.219	0.119	0.096	0.059	0.047	0.048	0.043	0.033	0.036
G	0.026	0.024	0.023	0.030	0.015	0.014	0.010	0.014	0.004	0.001	0.001	0.017
H	0.032	-0.008	0.027	-0.002	0.015	-0.002	0.013	-0.002	0.006	-0.002	0.003	-0.002

Figura 10

DISTR.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	ND	D1:2	D1:5	D1:10	D1:20	D1:50	D1:100	D1:200	F3	F4	F5
B	Blk	ND	D1:2	D1:5	D1:10	D1:20	D1:50	D1:100	D1:200	F3	F4	F5
C	Blk	ND	D1:2	D1:5	D1:10	D1:20	D1:50	D1:100	D1:200	F3	F4	F5
D	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17
E	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17
F	F6	F7	Emp	F9	Emp	Emp	Emp	Emp	F14	F15	Emp	F17
G	F18	F18	F19	F19	F20	F20	F21	F21	F22	F22	F23	F23
H	F18	Emp	F19	Emp	F20	Emp	F21	Emp	F22	Emp	F23	Emp

Figura 11

Abs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0.001	3.036	2.033	0.772	0.372	0.186	0.061	0.029	0.019	-0.010	0.099	0.112
B	0.001	3.106	1.731	0.773	0.394	0.188	0.065	0.033	0.016	0.001	0.108	0.122
C	0.001	3.056	1.779	0.665	0.386	0.191	0.063	0.026	0.017	0.003	0.107	0.104
D	0.016	0.012	0.009	0.004	0.005	0.001	-0.005	-0.003	0.003	0.013	0.002	0.000
E	0.020	0.014	0.003	0.004	0.009	-0.002	-0.003	-0.004	-0.006	-0.007	-0.004	0.011
F	0.017	0.006	-0.003	-0.002	0.008	0.013	-0.004	0.003	-0.008	-0.009	0.003	0.005
G	-0.005	-0.007	-0.007	-0.005	0.002	0.000	0.007	-0.003	-0.003	-0.006	0.006	0.019
H	-0.010	0.002	-0.003	0.003	0.003	0.004	-0.005	0.004	-0.006	-0.001	0.006	-0.004

Figura 12

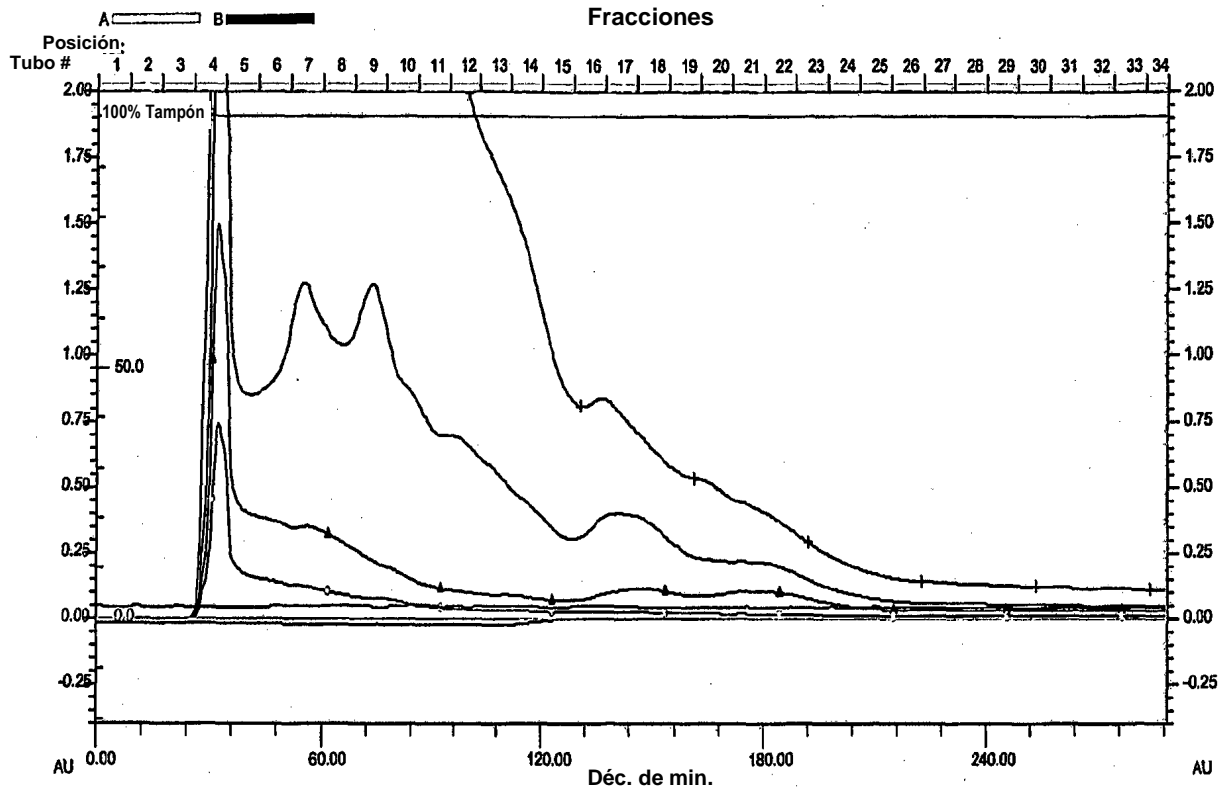


Figura 13

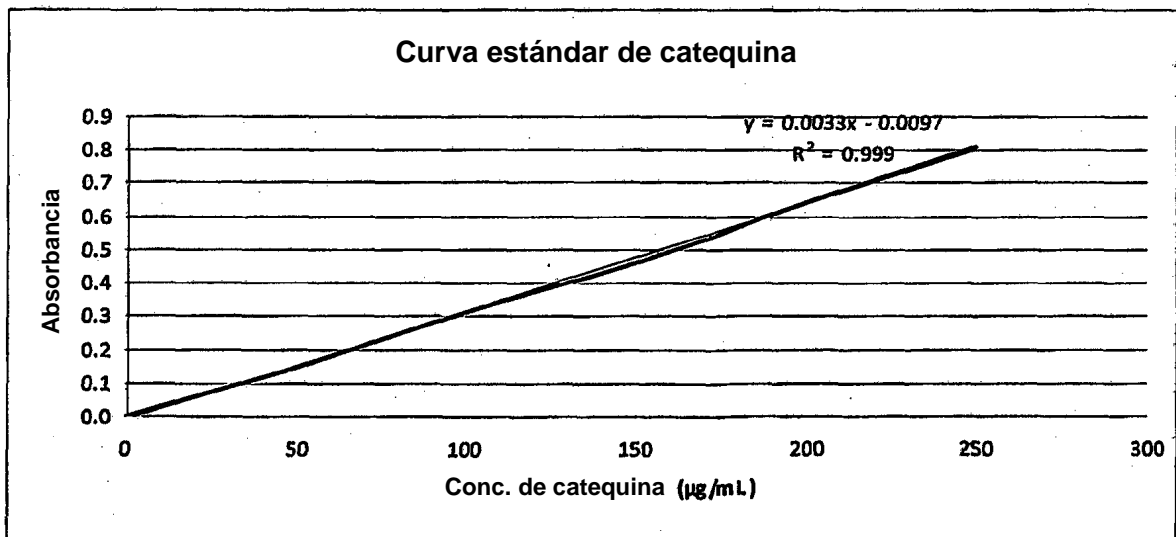


Figura 14

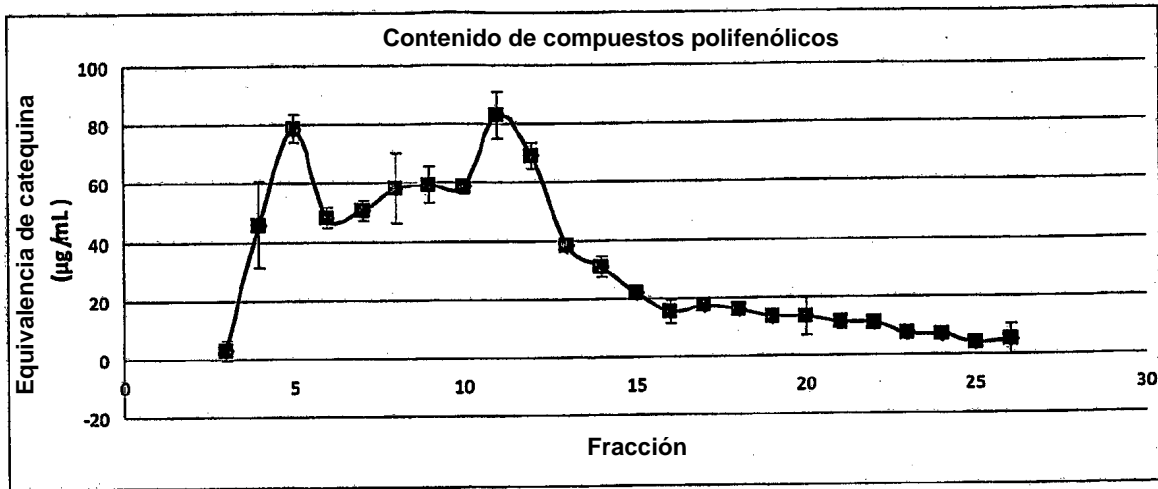


Figura 15

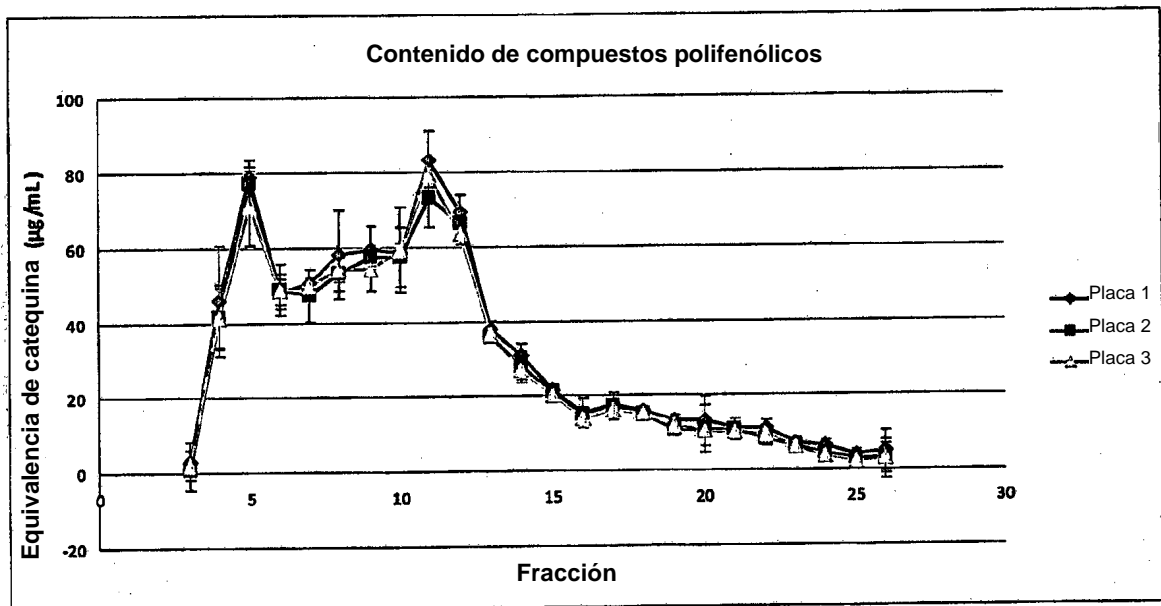


Figura 16

