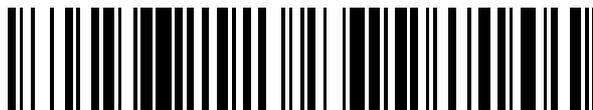


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 690**

21 Número de solicitud: 201231962

51 Int. Cl.:

A61K 36/74 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

18.12.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.07.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070876

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (51.0%)**

SERRANO, 117

28006 MADRID ES y

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA (49.0%)

72 Inventor/es:

MONAGAS JUAN, María;

SÁNCHEZ PATÁN, Fernando;

QUINTANILLA LÓPEZ, Jesús Eduardo;

LEBRÓN AGUILAR, Rosa;

BARTOLOMÉ SUALDEA, Begoña y

NAVARRO HOYOS, Mirtha

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **EXTRACTOS FENÓLICOS DE UNCARIA TOMENTOSA L. (UÑA DE GATO) QUE CONTIENEN PROCIANIDINAS, PROPELARGONIDINAS Y FLAVANOLIGNANOS, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES**

57 Resumen:

Extractos fenólicos de *Uncaria tomentosa* L. (uña de gato) que contienen procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

Esta invención se refiere a extractos fenólicos conteniendo procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos, con propiedades/actividades potencialmente beneficiosas para la salud humana, y obtenidos a partir de las partes aéreas y de la madera interna de la planta *Uncaria tomentosa* L, así como al procedimiento de obtención de dichos extractos. Estos extractos son útiles para elaborar aditivos alimentarios, composiciones cosméticas y composiciones farmacéuticas con actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y antiproliferativa.

ES 2 478 690 A1

EXTRACTOS FENÓLICOS DE *Uncaria tomentosa* L. (UÑA DE GATO) QUE CONTIENEN PROCIANIDINAS, PROPELARGONIDINAS Y FLAVANOLIGNANOS, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

DESCRIPCIÓN

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

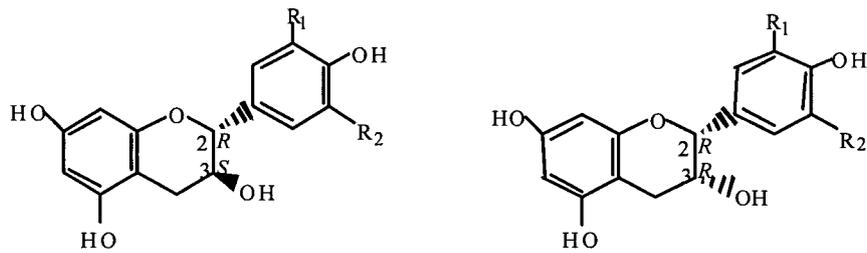
Extractos fenólicos bioactivos de aplicación en la industria alimentaria, dietética, cosmética y farmacéutica.

10

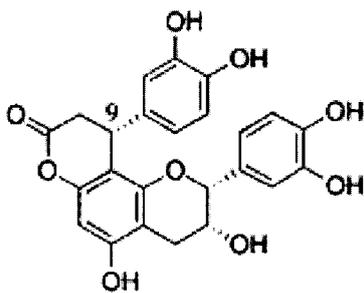
ESTADO DE LA TÉCNICA

Las proantocianidinas o taninos condensados son oligómeros y polímeros de flavan-3-ol, que se encuentran entre los polifenoles más abundantes en nuestra dieta. Las proantocianidinas presentan una gran diversidad estructural, atendiendo a los siguientes factores: a) patrón de hidroxilación del anillo B; b) estereoquímica de las posiciones C2, C3 y C4 del anillo C (anillo central); c) tipo de enlace interflavánico; y d) grado de polimerización (DP) (Aron, P. M., y Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1), 79-104). Las unidades estructurales más comúnmente encontradas en las proantocianidinas de la dieta son (+)-afzelequina, (+)-catequina y (+)-galocatequina (formas 2R:3S) y sus diastereoisómeros (-)-epiafzelequina, (-)-epicatequina y (-)-epigalocatequina (formas 2R:3R), respectivamente. Algunas de las unidades constitutivas del polímero también pueden encontrarse esterificadas con el ácido gálico. Las proantocianidinas exclusivamente formadas por (epi)catequina se denominan procianidinas. Las propelargonidinas y prodelfinidinas contienen (epi)afzelequina y (epi)galocatequina, respectivamente, y por lo general, se encuentran combinadas con unidades de (epi)catequina en forma de heteropolímeros. En relación a la naturaleza del enlace interflavanánico, pueden existir diferentes regio- y estereo-isómeros. Las proantocianidinas de tipo B son aquellas en que las unidades monoméricas se encuentran enlazadas a través de la posición C4 de la unidad superior y de las posiciones C6 o C8 de la unidad terminal, siendo los isómeros C4-C8 más abundantes que los C4-C6, y adoptando usualmente la estereoquímica 3,4-trans. Adicionalmente, los flavan-3-oles también pueden

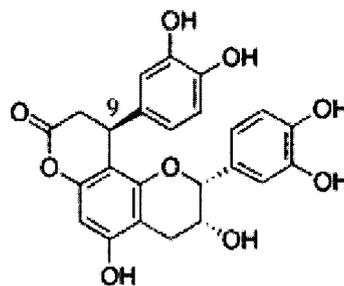
estar combinados con otras moléculas como los fenilpropanoides constituyendo derivados denominados flavanolignanos. Entre estos compuestos, cabe citar el grupo de las cinchonainas (Ia, Ib, Ic, Id), derivadas de la (-)-epicatequina (Tang, W., at al. (2007). Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. Journal of Natural Products, 70(12), 2010-2013).



Flavan-3-ol	R ₁	R ₂	C-2	C-3
(+)-Afzelequina	H	H	R	S
(+)-Catequina	H	OH	R	S
(+)-Galocatequina	OH	OH	R	S
(-)-Epiafzelequina	H	H	R	R
(-)-Epicatequina	H	OH	R	R
(-)-Epigalocatequina	OH	OH	R	R

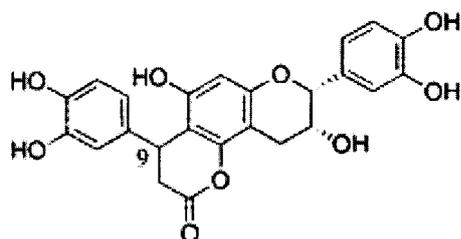


Cinchonaina Ia



Cinchonaina Ib

10



Cinchonaina Ic, C-9 (R)

Cinchonaina Id, C-9 (S)

- Considerando la abundancia de estos compuestos, las procianidinas de tipo B son las proantocianidinas más abundantes en el reino vegetal, encontrándose en frutas (uvas, manzanas, peras), legumbres, cacao y bebidas como el vino, sidra, té y cerveza; por otro lado las fuentes de propelargonidinas (i.e. fresa, frambuesa, piel de almendra, canela y algunas legumbres) y prodelfinidinas (grosella negra, uvas, avellana, pacana y pistacho) son más escasas (Gu, L., et al. (2003). Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(25), 7513-7521). De igual forma, la presencia de flavanolignanos en la naturaleza se limita a algunas plantas de uso medicinal (Qa'dan, F., et al. (2009). Cinchonain Ib isolated from *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo. Journal of Ethnopharmacology, 124(2), 224-227).
- 15 Las proantocianidinas presentan efectos potencialmente beneficiosos para la salud debido a sus propiedades antioxidantes, anti-carcinogénicas, cardioprotectoras, antimicrobianas y neuroprotectoras, (Aron, P. M. y J. A. Kennedy (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. Molecular Nutrition and Food Research 52(1), 79-104) por lo que se emplean ampliamente como ingredientes funcionales en suplementos nutricionales. Los productos ricos en proantocianidinas más comercializados actualmente se obtienen de fuentes como la semilla de uva, manzana, cacao, corteza de pino, etc., las cuales contienen mayoritariamente procianidinas de tipo B.

En particular, las propelargonidinas presentan propiedades/actividades potencialmente beneficiosas para la salud humana, tales como resistencia frente a nemátodos (Collingborn, F. M. B., et al. (2000). Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *Musa* cultivars in response to *Radopholus similis* infection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(11), 5297-5301) y actividad fitoestrogénica (Eun, J. C., et al. (2003). Proliferative effects of flavan-3-ols and propelargonidins from rhizomes of

Drynaria fortunei on MCF-7 and osteoblastic cells. Archives of Pharmacal Research, 26(8), 620-630), jugando esta última un papel fisiológico importante en la prevención de enfermedades hormonales como la osteoporosis postmenopáusica.

- 5 Por otra parte, los flavanolignanos presentan propiedades antioxidantes superiores a algunos de sus precursores ((+)-catequina)(Tang, W., et al. (2007). Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. Journal of Natural Products, 70(12), 2010-2013). También poseen efectos insulínotropicos sugiriendo su posible uso para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Qa'dan, F., et al.(2009). Cinchonain Ib isolated from
- 10 *Eriobotrya japonica* induces insulin secretion in vitro and in vivo. Journal of Ethnopharmacology, 124(2), 224-227), así como actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas (Pizzolatti, M. G., et al. (2002). Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences, 57(5-6), 483-488). Por otra parte, se destacan sus efectos protectores frente a
- 15 la citotoxicidad inducida por hidróperóxido (Uchino, T., et al. (2004). Potent protecting effects of Catuaba (*Anemopaegma mirandum*) extracts against hydroperoxide-induced cytotoxicity. Toxicology In Vitro, 18(3), 255-263).

Ahora bien, la invención y desarrollo de productos ricos en compuestos potencialmente

20 activos, requiere la búsqueda de fuentes naturales alternativas a las existentes que resulten sostenibles.

Uncaria tomentosa L., conocida como uña de gato, rangayo o bejuco de agua, es una liana propia del bosque tropical lluvioso perteneciente a la familia Rubiaceae, y que se distribuye

25 de forma natural desde Perú hasta Belice. El interés científico en esta planta se incrementó con la comprobación de sus propiedades estimulantes del sistema inmunológico, atribuida principalmente a su contenido en alcaloides (Steinberg, P. N. (1995). Cat's Claw: an herb from the Peruvian Amazon. Una de Gato: una hierba prodigiosa de la selva húmeda Peruana., 35-36). En la actualidad existe evidencia científica derivada de numerosos

30 estudios farmacológicos que demuestran un gran rango de actividades incluyendo: anticancerígena, antimutagénica, anti-inflamatoria, antiviral, inmunomodulatoria y antioxidante, así como sus efectos a nivel del sistema cardiovascular, nervioso central y

locomotor (Heitzman, M. E., et al. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 66(1), 5-29).

Estudios recientes sugieren que los compuestos fenólicos de la planta podrían ser responsables de algunos de los efectos farmacológicos de *Uncaria tomentosa*, aunque los mismos han recibido muy poca atención (Desmarchelier, C., et al. (1997). Evaluation of the in vitro antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Phytotherapy Research*, 11(3), 254-256; Sandoval, M., et al. (2002). Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine*, 9(4), 325-337). Entre los compuestos no-flavonoideos figuran mayoritariamente ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico y clorogénico) (Sekiya, N., et al. (2002). Inhibitory effects of Choto-san (Diao-teng-san), and hooks and stems of *Uncaria sinensis* on free radical-induced lysis of rat red blood cells. *Phytomedicine*, 9(7), 636-640). Los compuestos flavonoideos incluyen flavonoles (derivados de quercetina y miricetina) y flavan-3-oles (Desmarchelier, C., et al.(1997). Evaluation of the in vitro antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Phytotherapy Research*, 11(3), 254-256; Sekiya, N., et al. (2002). Inhibitory effects of Choto-san (Diao-teng-san), and hooks and stems of *Uncaria sinensis* on free radical-induced lysis of rat red blood cells. *Phytomedicine*, 9(7), 636-640). En *Uncaria tomentosa* solamente se han descrito la presencia de monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina, y las procianidinas diméricas B1, B2 y B4 (Goncalves, C., et al. (2005). Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*, 66 (1), 89-98; Sekiya, N., et al. (2002). Inhibitory effects of Choto-san (Diao-teng-san), and hooks and stems of *Uncaria sinensis* on free radical-induced lysis of rat red blood cells. *Phytomedicine*, 9(7), 636-640). De particular interés es también la presencia de flavanolignanos (i.e. epicatequinas substituidas con fenilpropanoides), como las cinchonainas Ia y Ib (Wirth, C., y Wagner, H. (1997). Pharmacologically active procyanidines from the bark of *Uncaria tomentosa*. *Phytomedicine*, 4(3), 265-266). Estos compuestos se consideran muy interesantes en *Uncaria tomentosa* ya que son poco comunes en la naturaleza, aunque se encuentran también presentes en otras plantas medicinales como la *Eriobotrya japonica* (Ito, H., et al. (2000). Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(5), 687-693).

Considerando lo anteriormente expuesto, existe un interés en encontrar nuevas fuentes naturales de proantocianidinas susceptibles de emplearse para la elaboración de productos ricos en procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos. Algunas patentes previas
5 relacionadas con la obtención de extractos de *Uncaria tomentosa* conteniendo proantocianidinas son las siguientes:

- WO 2004/033448 A2: Isolation, purification and synthesis of procyanidin B2 and uses thereof. Castillo, G.M.; Nguyen, B.P.; Choi, P.Y.; Larsen, L.; Lorimer, S.D.

10

Esta patente se refiere a metodologías para la síntesis, aislamiento y purificación de la procianidina B2, la cual se emplea para tratar la enfermedad de Alzheimer y Parkinson.

**-WO 02/42429 A2: Methods of isolating amyloid-inhibiting compounds and use of
15 compounds isolated from *Uncaria tomentosa* and related plants, Castillo, G.; Choi, P.Y.; Nguyen, B.; Snow, A.D.**

Esta patente se refiere a la metodología de fraccionamiento y cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (HPLC) para aislar, testar y caracterizar los compuestos solubles en
20 agua más activos de *Uncaria tomentosa*, presentando actividad inhibitoria de amiloide o A β fibrillogénesis.

-WO 02/076381 A2: Proanthocyanidins for the treatment of amyloid and alpha-synuclein diseases. Snow, A.D.; Castillo, G.M.; Choi, P.Y.; Nguyen, B.P.

25

La patente se refiere a un método para tratar la enfermedad amiloide, enfermedad caracterizada por la α -sinucleína o la fibrillogénesis NAC, en mamíferos. El método incluye la administración de cantidades efectivas de varias proantocianidinas protegidas o
30 proantocianidinas caracterizadas por una formula general protegida.

30

-NZ554517 (A): Flavonoid composition for treating oral diseases. Qi, J.; Yuan, Z.

Se protege una composición farmacéutica compuesta de una mezcla de al menos un flavonoide libre de anillo B, y al menos un flavano, donde el flavonoide libre de anillo B se aísla de una planta o plantas del género *Scutellaria* y el flavano se aísla de una planta o plantas del género *Acacia* o *Uncaria*. La composición es útil para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de enfermedades y condiciones de la boca, encías y dientes.

-US 006039949A: Method of preparation and composition of a water soluble extract of plant species *Uncaria*. Pero, R. W.

10

La invención se basa en un método de preparación y composición de un extracto acuoso soluble de la planta del género *Uncaria*, dirigido al uso farmacéutico de la composición para el mejoramiento del sistema inmune, anti-inflamatorio, anti-tumorogénico y reparación del ADN de las células rojas en animales.

15

-US 2012/0076849 A1: Plant composition for the treatment or prevention of viral blood-borne diseases such as diseases caused by the human immunodeficiency virus (HIV) or hepatitis C. El Kettany, S.; Mikael, Z.

20 La invención se refiere a una composición basada en plantas para el tratamiento o prevención de enfermedades virales de la sangre, tales como enfermedades causadas por el virus de la inmunodeficiencia (HIV) o la hepatitis C. La composición incluye la flor del azufre, una planta conteniendo catequinas o agente tánico, y un vehículo farmacéutico aceptable, que se selecciona de *Agrimonia Eupatoria* y *Uncaria gambir*.

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Breve descripción de la invención

30 El problema a resolver es la obtención de extractos conteniendo proantocianidinas y sus derivados flavanolignanos con propiedades/actividades potencialmente beneficiosas para la salud humana. Además, se buscan materias primas alternativas a las existentes, y procesos de producción sencillos y rentables.

La invención se refiere a extractos fenólicos conteniendo procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos, -obtenidos de la planta *Uncaria tomentosa* L. y a su procedimiento de obtención.

5

Debido a su contenido en propelargonidinas y flavanolignanos, es de esperar que estos extractos presenten propiedades diferentes, cuando no mejoradas, con respecto a los productos de otras fuentes comercializados actualmente y que contienen mayoritariamente procianidinas.

10

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en la observación de que es posible obtener, a partir de la planta *Uncaria tomentosa* L., un extracto fenólico que comprende un amplio abanico de proantocianidinas, concretamente de procianidinas y de propelargonidinas, y también de derivados flavanolignanos, no descritos anteriormente. En la actualidad los productos derivados de *Uncaria tomentosa* L. se comercializan debido a su contenido en alcaloides, no considerándose su contenido en este tipo de compuestos fenólicos. Estos compuestos bioactivos se encuentran presentes en diferentes partes de la planta (externas e internas) en distintas combinaciones de porcentajes de monómeros de flavan-3-ol, procianidinas, propelargonidinas y de flavanolignanos (ver Ejemplos 1 al 4), representando una fuente alternativa y sostenible para la obtención de extractos fenólicos de alto valor añadido ricos en proantocianidinas. Esto es así tanto en el conjunto de la planta, como en cada una de las partes aéreas y la madera interna, por separado o en mezclas de las mismas.

25

Por otro lado, las cantidades mínimas de cada compuesto existentes en las distintas partes de la planta, permiten identificar un extracto de esta planta con una mínima cantidad de cada uno de los compuestos descritos.

30

La heterogeneidad estructural de las proantocianidinas de estos extractos, constituidos por procianidinas (i.e. polímeros formados únicamente por (+)-catequina y/o (-)-epicatequina), propelargonidinas (polímeros conteniendo al menos una unidad de (+)-afzelequina y/o (-)-epiafzelequina) y flavanolignanos (derivados fenilpropanoides de los flavan-3-oles, en

particular de la (-)-epicatequina) justificarían posibles peculiaridades en las propiedades/actividades fisiológicas de los mismos. Es de esperar, por tanto, que los extractos conteniendo combinaciones de estos tres tipos de compuestos presenten propiedades diferentes, cuando no mejoradas, con respecto a los productos comercializados actualmente y que contienen únicamente procianidinas.

Los extractos obtenidos de las diferentes partes de las plantas de *Uncaria tomentosa* L., siguiendo el proceso que a continuación se detalla, presentan un contenido fenólico total mínimo de 356; 286; 283 y 80,7 mg ácido gálico/g para los extractos de hoja, tallo, corteza y madera interna, respectivamente.

Los extractos obtenidos de las diferentes partes de las plantas de *Uncaria tomentosa* L., siguiendo los procesos que a continuación se detallan, presentan un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 221; 299; 247 y 11,3 mg de cloruro de cianidina/g para los extractos de hoja, tallo, corteza y madera interna, respectivamente.

La sumatoria total de compuestos fenólicos individualizados (Σ monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos), expresados como mg/g de extracto, fue de un mínimo de: 11,1 mg/g para hojas, 11,9 mg/g para tallos, 3,3 mg/g para corteza, y 0,88 mg/g para madera interna de *Uncaria tomentosa* L.

Para evitar posibles interferencias de los compuestos menos polares presentes en las partes de la planta, principalmente lípidos, incluyendo grasas, terpenos, esteroides, así como compuestos básicos (i.e., alcaloides), se ha procedido a obtener un extracto purificado, empleando diferentes disolventes orgánicos mediante el procedimiento de extracción que se describe a continuación.

Además, se ha observado que el extracto de la invención presenta también un amplio abanico de actividades como antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y antiproliferativa (ver ejemplo 4).

Adicionalmente, debido a la heterogeneidad estructural de estos extractos, conteniendo procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos, estos extractos pueden presentar otras

5 actividades/propiedades descritas para las propelargonidinas y flavanolignanos, incluyendo por ejemplo actividad neuroprotectora, anticancerígena, anti-inflamatoria, cardioprotectora, fitoestrogénica e insulínica. Por tanto, estos extractos se podrían emplear como ingredientes en alimentos, para la elaboración de suplementos dietéticos, y de composiciones cosméticas y farmacéuticas.

10 Así, un aspecto de la invención lo constituye un extracto de la planta *Uncaria tomentosa* L. obtenido a partir de cualquier parte aérea o de la madera interna de la misma, en adelante extracto de la invención, que presenta capacidad/actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y antiproliferativa, y que comprende:

- a) un contenido fenólico total mínimo de 80,7 mg de ácido gálico/g,
- b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 11,3 mg de cloruro de cianidina/g,
- c) un contenido mínimo de 0,88 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
- 15 d) un porcentaje mínimo de monómeros del 2,2%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 5,7%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 1,1% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del 1,9%.

20 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el extracto de la invención que se obtiene de las hojas y que comprende:

- a) un contenido fenólico total mínimo de 356 mg de ácido gálico/g,
- b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 221 mg de cloruro de cianidina/g,
- c) un contenido mínimo de 11,1 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
- 25 d) un porcentaje mínimo de monómeros del 9,3%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 11,6%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 31,4% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del 1,9%.

30 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el extracto de la invención que se obtiene de los tallos y que comprende:

- a) un contenido fenólico total mínimo de 286 mg de ácido gálico/g,
- b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 299 mg de cloruro de cianidina/g,

- c) un contenido mínimo de 11,9 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
d) un porcentaje mínimo de monómeros del 6,4%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 57,9%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 18,0% y un porcentaje mínimo de
5 flavanolignanos del 9,1%.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el extracto de la invención que se obtiene de la corteza y que comprende:

- a) un contenido fenólico total mínimo de 283 mg de ácido gálico/g,
10 b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 247 mg de cloruro de cianidina/g,
c) un contenido mínimo de 3,3 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
d) un porcentaje mínimo de monómeros del 5,9%, un porcentaje de procianidinas del 57,9%, un porcentaje de propelargonidinas del 6,0% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del
15 11,0%.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el extracto de la invención que se obtiene de la madera interna y que comprende:

- a) un contenido fenólico total mínimo de 80,7 de ácido gálico/g,
20 b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 11,3 de cloruro de cianidina/g,
c) un contenido mínimo 0,88 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
d) un porcentaje mínimo de monómeros del 2,2%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 5,7%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 1,1% y un porcentaje mínimo de
25 flavanolignanos del 33,1%.

Otro aspecto de la invención es el procedimiento de obtención del extracto de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que implica un fraccionamiento que permite obtener tres extractos diferenciados: un primer extracto no polar, un segundo extracto
30 alcalóidico y tres extractos polifenólicos que provienen de extracciones de los anteriores extractos o de sus marcos y que en su conjunto constituyen un tercer extracto polifenólico enriquecido total de *Uncaria tomentosa* L., y que comprende las siguientes etapas:

a) una etapa de preparación del material vegetal que comprende la separación de las distintas partes aéreas y de la madera interna, una fase de secado y una fase de molienda de las mismas;

5 b) una etapa de maceración-extracción del material vegetal que comprende las siguientes fases:

b.1.- obtención del extracto no polar empleando una extracción sólido-líquido y disolventes orgánicos, preferentemente éter metil-ter-butílico, hexano, cloroformo y metanol, tanto puros como mezclados; a una temperatura entre 5°C y 60°C, preferentemente entre 25°C y 30°C; durante un tiempo de extracción comprendido entre 8 y 72 horas; y que es
10 llevado a sequedad a una temperatura inferior a 40°C;

b.2.- obtención del extracto polar polifenólico empleando una extracción sólido-líquido y disolventes orgánicos, preferentemente metanol; con una temperatura entre 5°C y 60°C, preferentemente entre 25°C y 30°C; y con un tiempo de extracción comprendido entre 8 y 72 horas; y

15 b.3.- obtención del extracto alcalóidico empleando una extracción sólido-líquido y siguiendo los siguientes pasos:

b.3.1.-empleo de disolventes orgánicos, preferentemente éter metil-ter-butílico y metanol, tanto solos como en combinación con amoníaco; a una temperatura entre 5°C y 60°C, preferentemente entre 25°C y 30°C; y durante un tiempo de extracción comprendido entre 8
20 y 72 horas,

b.3.2.- empleo de disolventes acidulados con ácidos de tipo inorgánico como HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, o con cualquier ácido orgánico como ácido acético, cítrico o tartárico,

b.3.3.- empleo de disolventes basificados con bases de tipo inorgánico, como carbonato de sodio o de tipo orgánico como amoníaco, hasta alcanzar un pH de 10,

25 b.3.4.- empleo de disolventes orgánicos como éter metil-ter-butílico, y

b.3.5.- secado del extracto alcalóidico con agentes desecantes como sulfato de sodio y posteriormente llevado a sequedad utilizando temperaturas inferiores a 40°C; conservándolo para su tratamiento;

30 b.4.- obtención del extracto polifenólico total, constituido por el extracto obtenido en la fase de obtención del extracto polar polifenólico (b.2) y los extractos obtenidos mediante los siguientes pasos:

b.4.1.- después de la fase de obtención del extracto no polar (b.1), el extracto no polar obtenido se somete a extracción sólido-líquido con solventes orgánicos, preferentemente metanol, para obtener un extracto polifenólico con los polifenoles remanentes,

5 b.4.2.- después de la fase de obtención del extracto alcalóidico (b.3), el marco alcalóidico se somete a extracción sólido-líquido con solventes orgánicos, preferentemente metanol, para obtener un extracto polifenólico con los polifenoles remanentes;

b.5.- secado del extracto polifenólico total (b.4) a temperatura inferior a 40°C.

10 c) una etapa de purificación del extracto polifenólico total (b.4) sea mediante extracción sólido-líquido con solventes orgánicos, como éter metil-ter-butílico y cloroformo, y/o mediante cromatografía de fase reversa (RP) con polímeros no polares de adsorción-desorción tal como Diaion HP20 y/o mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o filtración en gel con medios tal como Sephadex LH-20; y

d) una etapa de secado del extracto polifenólico total purificado (c) a temperatura inferior a 40°C.

15

Un aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la fase de secado perteneciente a la etapa de preparación del material vegetal (a), se lleva a cabo colocando inicialmente el material vegetal en una superficie plana en un cuarto con ventilación durante 120 horas y, posteriormente, en una estufa a 40°C durante 72 horas.

20

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde la extracción sólido-líquido de la etapa de maceración-extracción (b) se realiza utilizando un sistema elegido a título ilustrativo y no limitativo, de entre los siguientes: incubador, reflujo o baño de ultrasonidos.

25

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde en la fase de obtención del extracto no polar (b.1) se utiliza una mezcla MTBE:MeOH (90:10 v/v).

30

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención donde en el paso de obtención del extracto alcalóidico empleando disolventes orgánicos (b.3.1) se utiliza una mezcla de amoníaco al 20% en MeOH.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención, donde para la obtención del extracto alcalóidico de la etapa de maceración-extracción en la que utilizan disolventes acidulados(b.3.2), los alcaloides se extraen con ácido tartárico al 20%, y en el paso de empleo de disolventes basificados (b.3.3.), las fases acuosas se basifican hasta pH 10 con carbonato de sodio.

Otro aspecto particular de la invención que optimiza la etapa de maceración-extracción del material vegetal (b) y reduce la pérdida de los compuestos polifenólicos, es la extracción sólido-líquido de los extractos menos polares secos (b.4.1) y del marco alcalóidico (b.4.2) con solventes polares como metanol, de forma a extraer los polifenoles remanentes en dichas fases, así como realizar varias extracciones sólido-líquido con metanol de la muestra de planta inicial, filtrando el solvente y extrayendo con metanol fresco cada vez.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención, en el que en la etapa de purificación del extracto total polifenólico seco (c), se utiliza un procedimiento de extracción sólido-líquido con empleo de disolventes orgánicos como MTBE y/o cloroformo.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que en la etapa de purificación del extracto total polifenólico seco (c), se utiliza una técnica seleccionada, a título ilustrativo y no limitativo, de entre las siguientes: purificación por extracción sólido-líquido; cromatografía de adsorción sobre resinas tipo Diaion HP20; cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), sobre geles de filtración tipo Sephadex LH-20, por elución en gradiente de solventes de distinta polaridad, incluyendo agua y solventes orgánicos, como acetato de etilo, acetona, metanol, o sus mezclas en distintos porcentajes.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que en la etapa de secado del extracto polifenólico purificado (d), se utiliza una técnica seleccionada, a título ilustrativo y no limitativo, de entre las siguientes: liofilización, concentración y/o secado a vacío, secado con aire, concentración y secado con rotavapor, y atomización.

Otro aspecto de la invención lo constituye un producto alimentario funcional que comprende un extracto de la invención, útil para la prevención y tratamiento de procesos de envejecimiento fisiológico, procesos patológicos relacionados con la edad o con el estrés oxidativo.

5

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el mismo producto alimentario funcional con capacidad, a título ilustrativo y no limitativo, antioxidante, fitoestrogénica, insulino-trópica, antimutagénica, neuroprotectora, anticancerígena, anti-inflamatoria, antiviral y cardioprotectora.

10

Otro aspecto de la invención lo constituye una composición cosmética que comprende un extracto de la invención, útil para la prevención y tratamiento de procesos de envejecimiento fisiológico, procesos patológicos relacionados con la edad o con el estrés oxidativo.

15

Otro aspecto particular de la invención lo constituye la misma composición cosmética con capacidad, a título ilustrativo y no limitativo, antioxidante, anticancerígena y anti-inflamatoria.

Otro aspecto de la invención lo constituye una composición farmacéutica que comprende un extracto de la invención, útil para la prevención y tratamiento de tumores e infecciones y cardioprotectora.

20

Otro aspecto particular de la invención lo constituye la misma composición farmacéutica con capacidad, a título ilustrativo y no limitativo, antioxidante, fitoestrogénica, insulino-trópica, antimutagénica, neuroprotectora, anticancerígena, anti-inflamatoria y antiviral.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Cromatograma MRM obtenido por UPLC-DAD-ESI-TQ MS de los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina (m/z 289/245), dímeros de procianidinas (m/z 577/289), dímeros de propelargonidinas (m/z 561/289), y flavanolignanos tipo cinchonaina (m/z 451/341) correspondientes al extracto nº 1.

30

FIGURA 2A. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 3-4 correspondientes al extracto nº 1.

5 **FIGURA 2B.** Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 5-6 correspondientes al extracto nº 1.

FIGURA 2C. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 7-8 correspondientes al extracto nº 1.

10 **FIGURA 3.** Cromatograma MRM obtenido por UPLC-DAD-ESI-TQ MS de los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina (m/z 289/245), dímeros de procianidinas (m/z 577/289), dímeros de propelargonidinas (m/z 561/289), y flavanolignanos tipo cinchonaina (m/z 451/341) correspondientes al extracto nº 2.

15 **FIGURA 4A.** Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 3-4 correspondientes al extracto nº 2.

FIGURA 4B. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 5-6 correspondientes al extracto nº 2.

20

FIGURA 4C. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 7-8 correspondientes al extracto nº 2.

25 **FIGURA 5.** Cromatograma MRM obtenido por UPLC-DAD-ESI-TQ MS de los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina (m/z 289/245), dímeros de procianidinas (m/z 577/289), dímeros de propelargonidinas (m/z 561/289), y flavanolignanos tipo cinchonaina (m/z 451/341) correspondientes al extracto nº 3.

30 **FIGURA 6A.** Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 3-4 correspondientes al extracto nº 3.

FIGURA 6B. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 5-6 correspondientes al extracto nº 3.

FIGURA 6C. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 7-8 correspondientes al extracto nº 3.

5 **FIGURA 7.** Cromatograma MRM obtenido por UPLC-DAD-ESI-TQ MS de los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina (m/z 289/245), dímeros de procianidinas (m/z 577/289), dímeros de propelargonidinas (m/z 561/289), y flavanolignanos tipo cinchonaina (m/z 451/341) correspondientes al extracto nº 4.

10 **FIGURA 8A.** Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 3-4 correspondientes al extracto nº 4.

FIGURA 8B. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 5-6 correspondientes al extracto nº 4.

15

FIGURA 8C. Espectro de masas obtenido por HPLC-ESI-qTOF MS de las proantocianidinas con DP 7-8 correspondientes al extracto nº 4.

20 **FIGURA 9A.** Representación del espectro MS/MS de los dímeros de procianidinas y dímeros de propelargonidinas.

FIGURA 9B. Representación del espectro MS/MS flavanolignanos de tipo cinchonaina.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

25

Para una mejor comprensión de la invención se adjuntan cuatro ejemplos que no son limitantes en cuanto a su aplicación.

30 **Ejemplo 1: Extracto de hoja de *Uncaria tomentosa* L. conteniendo procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos.**

En general, para la preparación del material vegetal utilizado en los ejemplos de esta invención se ha trabajado con las partes aéreas de planta fresca húmeda, así como con la

madera interna de la misma, obtenida directamente de la recolección de la planta en los lugares de siembra.

Se utilizaron muestras de hojas de *Uncaria tomentosa* L. desprendidas de los tallos, después de la recolección de las partes aéreas de la planta y se cortaron en piezas más pequeñas con un cuchillo o machete para facilitar el secado, y se pusieron a secar por separado sobre papel en una superficie plana en un cuarto con ventilación adecuada durante cinco días. El secado se terminó en una estufa a 40°C durante 3 días. Las muestras secas de las hojas se molieron por separado con un molino de bolas para obtener en cada caso un polvo fino, el cual se almacenó en recipientes plásticos individuales debidamente rotulados para su posterior uso.

La muestra molida se colocó en una mezcla de MTBE:MeOH (90:10 v/v) y se mantuvo con agitación en un baño de ultrasonidos a 25 °C durante 30 min. Se dejó reposar un día, y posteriormente se filtró. El líquido filtrado, que constituye la primera parte del extracto no polar, se retiró para su posterior tratamiento. El marco de hojas que quedó después de la filtración, se extrajo nuevamente repitiéndose la operación con la mezcla de MTBE:MeOH (90:10 v/v), con agitación en un baño de ultrasonidos a 25 °C durante 30 min y dejándose reposar un día, luego de lo cual se filtró y el líquido filtrado, que constituye la segunda parte del extracto no polar, se retiró y se combinó con el anterior filtrado no polar, llevándose a sequedad a baja presión en un rotavapor a una temperatura inferior a 40 °C, obteniéndose un extracto no polar que se guarda para su posterior tratamiento.

Al marco de hojas se le agregó MeOH y se mantuvo con agitación en un baño de ultrasonidos a 25 °C durante 30 min. Se dejó reposar un día y se procedió a su filtración. El líquido filtrado, que constituye la primera parte del extracto polar polifenólico, se retiró para su posterior tratamiento. El marco de hojas que quedó tras la filtración, se extrajo nuevamente repitiéndose la operación con MeOH, manteniéndose con agitación en un baño de ultrasonidos a 25 °C durante 30 min. Posteriormente se dejó reposar un día y se filtró. Se retiró el líquido filtrado, que constituye la segunda parte del extracto polar polifenólico, que se guardó para su posterior tratamiento. Se repitió la extracción del marco de hojas una tercera vez con MeOH, manteniéndose con agitación en un baño de ultrasonidos a 25°C durante 30 min, para posteriormente dejar reposar un día y proceder a filtrar, obteniéndose

un líquido que constituye la tercera parte del extracto polar polifenólico, el que se combinó con los dos anteriores líquidos filtrados polares polifenólicos, guardándose para su posterior tratamiento.

5 Al marco de hojas resultante del extracto polar polifenólico se le agregó una mezcla de amoníaco al 20% en MeOH y se mantuvo con agitación en un baño de ultrasonidos a 25 °C durante 30 min. Se dejó reposar un día y se procedió a su filtración. El líquido filtrado, que constituye la primera parte del extracto alcalóidico, se guardó para su posterior tratamiento. El marco de hojas que quedó después de la filtración, se extrajo con MTBE, manteniéndose
10 con agitación en un baño de ultrasonidos a 25 °C durante 30 min, para posteriormente dejar reposar un día y filtrar, obteniéndose un líquido que constituye la segunda parte del extracto alcalóidico. El marco de hojas que quedó después de la filtración, se extrajo nuevamente con MTBE, manteniéndose con agitación en un baño de ultrasonidos a 25 °C durante 30 min, para posteriormente dejar reposar un día y filtrar, obteniéndose un líquido que
15 constituye la tercera parte del extracto alcalóidico; el que se combinó con los dos anteriores líquidos filtrados alcalóidicos, concentrándose en rotavapor y pasándose a un embudo separador. Se extrajeron los alcaloides tres veces con una disolución previamente preparada de ácido tartárico al 20%, retirándose las fases orgánicas. Las fases acuosas se basificaron hasta un pH 10 con una disolución saturada de carbonato de sodio (Na_2CO_3).
20 Las disoluciones basificadas se extrajeron tres veces con MTBE, retirándose las fases acuosas. Se eliminó el agua de las fases orgánicas de MTBE, secándolas con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y tras eliminar este desecante por filtración, se llevaron a sequedad a baja presión en un rotavapor a una temperatura inferior a 40 °C, obteniéndose el extracto de alcaloides que se guarda para su posterior tratamiento y purificación.

25 Al extracto no polar se le agregó una pequeña cantidad de MeOH para extraer los polifenoles remanentes, se separó el líquido y se repitió dos veces más la extracción del extracto no polar con MeOH. Se combinaron las fases líquidas de extracción conteniendo los polifenoles remanentes en el extracto no polar, las cuales constituyen la cuarta parte del
30 extracto polar polifenólico.

Al marco alcalóidico también se le agregó una pequeña cantidad de MeOH para extraer los polifenoles remanentes, se separó el líquido y se repitió dos veces más la extracción del

marco alcalóidico con MeOH. Se combinaron las fases líquidas de extracción conteniendo los polifenoles remanentes en el marco alcalóidico, las que constituyen la quinta parte del extracto polar polifenólico.

- 5 Se unen estas dos fases líquidas conteniendo los polifenoles remanentes en el extracto no polar y en el marco alcalóidico, con el líquido conteniendo las tres primeras fases líquidas polares polifenólicas, constituyendo estas cinco fases líquidas combinadas el extracto polar polifenólico total, el que se lleva a sequedad a baja presión en un rotavapor a una temperatura inferior a 40 °C, de forma a obtenerse el extracto total polifenólico seco para su
- 10 posterior purificación.

La purificación del extracto total polifenólico se llevó a cabo agregando una pequeña cantidad de hexano para eliminar grasas y pigmentos. Se retiró el líquido y al extracto polifenólico se le agregó una pequeña cantidad de MTBE para extraer compuestos no

15 polares remanentes. Se retiró el líquido y al extracto polifenólico se le agregó una pequeña cantidad de cloroformo para extraer compuestos de mediana polaridad remanentes. Posteriormente, el extracto polifenólico se llevó a sequedad a baja presión en rotavapor a una temperatura inferior a 40 °C, para obtener un extracto rico en polifenoles purificado y seco, constituyendo el extracto nº 1.

20 El contenido en polifenoles de este extracto nº 1 fue de 364.0 ±8.0 mg/g (media ± DE, n= 3 plantas de diferentes localidades). Igualmente, el contenido en proantocianidinas fue de 339.7±109.6 mg/g. El rendimiento del proceso fue de 11-21%.

25 La concentración de polifenoles individualizados del extracto nº 1, utilizando la técnica de UPLC-DAD-ESI-TQ MS descrita en el apartado de métodos de análisis, se recoge en la tabla 1 (ver Figura 1). La distribución porcentual de los diferentes grupos de compuestos fue la siguiente: 15,0 % de monómeros de flavan-3-ol; 27,3 % de procianidinas (dímeros + trímeros); 40,5% de propelargonidinas y 17,2% de flavanolignanos.

30

Tabla 1.- Extracto nº 1: Composición fenólica individualizada

No.		Concentración (µg/g extracto)	
		media	DE
	Monómeros		
1	(+)-Catequina	1004,2	600,4
2	(-)-Epicatequina	1718,0	653,9
	TOTAL	2722,2	1052,3
	Dímeros de procianidinas		
3	Procianidina B3	1217,4	975,1
4	Procianidina B1	467,6	315,4
5	Procianidina B4	1922,7	1194,0
6	Procianidina B2	722,1	328,1
7	Procianidina B (Rt=5,47 min)	88,3	53,1
8	Procianidina B7	109,3	73,8
9	Procianidina B5	220,7	137,6
10	Procianidina B (Rt=9,27 min)	132,9	83,4
	TOTAL	4881,0	3111,0
	Dímeros de propelargonidinas		
11	Dímero properlagonidina (Rt=4,43 min)	3291,1	1948,0
12	Dímero propelargonidina (Rt=5,01 min)	2407,7	874,7
13	Dímero propelargonidina (Rt=5,65 min)	1005,1	494,6
14	Dímero propelargonidina (Rt=9,27 min)	621,3	320,2
	TOTAL	7325,2	2658,8
	Trímeros de procianidinas		
15	Trímero T2	2,0	3,4

16	Procianidina C1	12,7	11,4
17	Trímero B (Rt=4,78 min)	38,7	33,8
	TOTAL	53,4	46,4
	Flavanolignanos		
18	Cinchonaina (Rt=7,37 min)	558,4	463,0
19	Cinchonaina (Rt=9,05 min)	855,0	961,5
20	Cinchonaina (Rt=9,30 min)	1074,4	1104,9
21	Cinchonaina (Rt=12,27 min)	635,0	521,7
	TOTAL	3122,9	2994,7
	TOTAL DE FLAVAN-3-OLES	18104,7	9863,3

A continuación se indican las señales m/z correspondientes a los iones $[M-H]^-$ de las proantocianidinas detectadas (Tabla 2) utilizando la técnica de HPLC-ESI-qTOF MS descrita en el apartado de métodos de análisis. Algunas ampliaciones del espectro de masas resultante se presentan en las Figuras 2A, 2B y 2C.

Tabla 2.- Extracto nº 1. Caracterización de proantocianidinas

DP	(epi)cat	(epi)afz	M	m/z teórico $[M-H]^-$	m/z experimental $[M-H]^-$
DP3	3	0	866,206	865,198	865,183
	2	1	850,211	849,203	849,188
	1	2	834,216	833,208	833,193
	0	3	818,221	817,213	817,196
DP4	4	0	1154,269	1153,261	1153,245
	3	1	1138,274	1137,266	1137,249
	2	2	1122,279	1121,272	1121,255
	1	3	1106,284	1105,277	1105,260
	0	4	1090,290	1089,282	1089,264
DP5	5	0	1442,333	1441,325	1441,308
	4	1	1426,338	1425,330	1425,311

ES 2 478 690 A1

	3	2	1410,343	1409,335	1409,316
	2	3	1394,348	1393,340	1393,321
	1	4	1378,353	1377,345	1377,326
	0	5	1362,358	1361,350	1361,331
DP6	6	0	1730,396	1729,388	1729,373
	5	1	1714,401	1713,393	1713,375
	4	2	1698,406	1697,398	1697,378
	3	3	1682,411	1681,403	1681,383
	2	4	1666,416	1665,409	1665,387
	1	5	1650,421	1649,414	1649,393
	0	6	1634,427	1633,419	1633,396
DP7	7	0	2018,459	2017,452	2017,435
	6	1	2002,464	2001,457	2001,438
	5	2	1986,470	1985,462	1985,443
	4	3	1970,475	1969,467	1969,445
	3	4	1954,480	1953,472	1953,452
	2	5	1938,485	1937,477	1937,452
	1	6	1922,490	1921,482	1921,460
	0	7	1906,495	1905,487	1905,457
DP8	8	0	2306,523	2305,515	2305,505
	7	1	2290,528	2289,520	2289,516
	6	2	2274,533	2273,525	2273,507
	5	3	2258,538	2257,530	2257,515
	4	4	2242,543	2241,535	2241,514
	3	5	2226,548	2225,540	2225,520
	2	6	2210,553	2209,545	2209,521
	1	7	2194,558	2193,551	2193,522
	0	8	2178,563	2177,556	2177,515
DP9	9	0	2594,586	2593,578	2593,596
	8	1	2578,591	2577,583	2577,579
	7	2	2562,596	2561,589	2561,578
	6	3	2546,601	2545,594	2545,586

	5	4	2530,607	2529,599	2529,582
	4	5	2514,612	2513,604	2513,587
	3	6	2498,617	2497,609	2497,585
	2	7	2482,622	2481,614	2481,588
	1	8	2466,627	2465,619	2465,579
	0	9	2450,632	2449,624	
DP10	10	0	2882,650	2881,642	
	9	1	2866,655	2865,647	
	8	2	2850,660	2849,652	
	7	3	2834,665	2833,657	2833,696
	6	4	2818,670	2817,662	2817,626
	5	5	2802,675	2801,667	2801,656
	4	6	2786,680	2785,672	2785,670
	3	7	2770,685	2769,677	2769,657
	2	8	2754,690	2753,682	2753,680
	1	9	2738,695	2737,687	2737,666
	0	10	2722,700	2721,693	

DP, grado de polimerización

(epi)cat, unidades de (epi)catequina

(epi)afz, unidades de (epi)afzelequina

M, masa molecular monoisotópica

5

El extracto nº 1 está compuesto por proantocianidinas homogéneas constituidas exclusivamente por unidades de (epi)catequinas (i.e., procianidinas) o por unidades de (epi)afzelequinas (i.e., propelargonidinas) hasta un grado de polimerización (DP) de 10 unidades (decámeros). Igualmente se detectan señales correspondientes a proantocianidinas heterogéneas formadas por (epi)catequinas y (epi)afzelequinas conteniendo de 1 hasta DP-1 unidades unidades de (epi)afzelequinas, para cada DP.

10

Ejemplo 2: Extracto de tallo de *Uncaria tomentosa* L. conteniendo procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos.

15

Se utilizaron muestras de tallos de *Uncaria tomentosa* L., una vez desprendidas las hojas, después de la recolección de las partes aéreas de la planta, que se secaron y molieron, según se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Para la fase de extracción se utilizó exactamente el mismo método que se describe para el Ejemplo 1.

5

El contenido en polifenoles de este extracto nº 2 fue de 373.7 ± 86.5 mg/g (media \pm DE, n=3 plantas de diferentes localidades). Igualmente, el contenido en proantocianidinas fue de 355.3 ± 50.9 mg/g. El rendimiento del proceso fue de 2-3%.

10 La concentración de polifenoles individualizados del extracto nº 2, utilizando la misma técnica empleada en el Ejemplo 1, se recoge en la Tabla 3 (ver Figura 3). La distribución porcentual de los diferentes grupos de compuestos fue la siguiente: 7,5 % de monómeros de flavan-3-ol; 59,6 % de procianidinas (dímeros + trímeros); 20,1% de propelargonidinas y 12.8% de flavanolignanos.

15

Tabla 3.- Extracto nº 2: Composición fenólica individualizada

No.		Concentración (μ g/g extracto)	
		Media	DE
	Monómeros		
1	(+)-Catequina	181,7	50,2
2	(-)-Epicatequina	974,2	147,4
	TOTAL	1155,9	106,1
	Dímeros de procianidinas		
3	Procianidina B3	1022,5	159,4
4	Procianidina B1	355,0	44,6
5	Procianidina B4	4407,1	990,3
6	Procianidina B2	1694,7	466,0
7	Procianidina B (Rt=5,47 min)	162,4	43,2
8	Procianidina B7	148,1	22,1
9	Procianidina B5	390,8	167,2

10	Procianidina B (Rt=9,27 min)	24,2	21,5
	TOTAL	8204,7	1449,7
	Dímeros de propelargonidinas		
11	Dímero properlagonidina (Rt=4,43 min)	599,9	178,8
12	Dímero propelargonidina (Rt=5,01 min)	1857,5	50,4
13	Dímero propelargonidina (Rt=5,65 min)	394,4	492,5
14	Dímero propelargonidina (Rt=9,27 min)	234,6	44,2
	TOTAL	3086,3	330,9
	Trímeros de procianidinas		
15	Trímero T2	40,9	55,1
16	Procianidina C1	468,3	547,4
17	Trímero B (Rt=4,78 min)	440,6	476,3
	TOTAL	949,8	1078,6
	Flavanolignanos		
18	Cinchonaina (Rt=7,37 min)	812,3	320,0
19	Cinchonaina (Rt=9,05 min)	252,4	102,7
20	Cinchonaina (Rt=9,30 min)	223,0	107,7
21	Cinchonaina (Rt=12,27 min)	684,8	336,0
	TOTAL	1972,5	865,0
	TOTAL DE FLAVAN-3-OLES	15369,2	3830,3

Para la caracterización de la fracción de proantocianidinas con un DP \geq 3, se empleó la misma técnica que para el ejemplo 1. Algunas ampliaciones del espectro de masas resultante se presentan en las Figuras 4A, 4B y 4C. A continuación (Tabla 4) se indican las 5 señales m/z correspondientes a los iones $[M-H]^-$ de las proantocianidinas detectadas.

Tabla 4.- Extracto nº 2. Caracterización de proantocianidinas

DP	(epi)cat	(epi)afz	M	<i>m/z</i> teórico [M-H] ⁻	<i>m/z</i> experimental [M-H] ⁻
DP3	3	0	866,206	865,198	865,082
	2	1	850,211	849,203	849,086
	1	2	834,216	833,208	833,092
	0	3	818,221	817,213	
DP4	4	0	1154,269	1153,261	1153,105
	3	1	1138,274	1137,266	1137,111
	2	2	1122,279	1121,272	1121,117
	1	3	1106,284	1105,277	1105,130
	0	4	1090,290	1089,282	
DP5	5	0	1442,333	1441,325	1441,129
	4	1	1426,338	1425,330	1425,136
	3	2	1410,343	1409,335	1409,142
	2	3	1394,348	1393,340	1393,151
	1	4	1378,353	1377,345	
	0	5	1362,358	1361,350	
DP6	6	0	1730,396	1729,388	1729,154
	5	1	1714,401	1713,393	1713,161
	4	2	1698,406	1697,398	1697,168
	3	3	1682,411	1681,403	1681,175
	2	4	1666,416	1665,409	1665,178
	1	5	1650,421	1649,414	
	0	6	1634,427	1633,419	
DP7	7	0	2018,459	2017,452	2017,179
	6	1	2002,464	2001,457	2001,187
	5	2	1986,470	1985,462	1985,194
	4	3	1970,475	1969,467	1969,202
	3	4	1954,480	1953,472	1953,201
	2	5	1938,485	1937,477	
	1	6	1922,490	1921,482	

ES 2 478 690 A1

	0	7	1906,495	1905,487	
DP8	8	0	2306,523	2305,515	2305,206
	7	1	2290,528	2289,520	2289,213
	6	2	2274,533	2273,525	2273,217
	5	3	2258,538	2257,530	2257,224
	4	4	2242,543	2241,535	2241,231
	3	5	2226,548	2225,540	
	2	6	2210,553	2209,545	
	1	7	2194,558	2193,551	
	0	8	2178,563	2177,556	
DP9	9	0	2594,586	2593,578	2593,231
	8	1	2578,591	2577,583	2577,242
	7	2	2562,596	2561,589	2561,242
	6	3	2546,601	2545,594	2545,245
	5	4	2530,607	2529,599	2530,257
	4	5	2514,612	2513,604	
	3	6	2498,617	2497,609	
	2	7	2482,622	2481,614	
	1	8	2466,627	2465,619	
	0	9	2450,632	2449,624	
DP10	10	0	2882,650	2881,642	2881,264
	9	1	2866,655	2865,647	2865,274
	8	2	2850,660	2849,652	2849,272
	7	3	2834,665	2833,657	2833,274
	6	4	2818,670	2817,662	
	5	5	2802,675	2801,667	
	4	6	2786,680	2785,672	
	3	7	2770,685	2769,677	
	2	8	2754,690	2753,682	
	1	9	2738,695	2737,687	
	0	10	2722,700	2721,693	

DP, grado de polimerización

(epi)cat, unidades de (epi)catequina

(epi)afz, unidades de (epi)afzelequina

M, masa molecular monoisotópica

- 5 El extracto nº 2 está compuesto por proantocianidinas homogéneas constituidas exclusivamente por unidades de (epi)catequinas (i.e., procianidinas) hasta un grado de polimerización (DP) de 10 unidades (decámeros), así como por proantocianidinas heterogéneas formadas por (epi)catequinas y (epi)afzelequinas conteniendo de 1 hasta DP-1 unidades unidades de (epi)afzelequinas, hasta DP6 (hexámeros). Para polímeros con un
10 DP \geq 7, se detectan un menor número de unidades de (epi)afzelequinas a medida que aumenta el DP, variando entre: 1 y DP-2 unidades de (epi)afzelequinas para DP7; 1 y DP-3 unidades para DP8; 1 y DP-5 para DP9, y entre 1 y DP-7 unidades para DP10.

**Ejemplo 3: Extracto de corteza de *Uncaria tomentosa* L. conteniendo procianidinas,
15 propelargonidinas y flavanolignanos.**

Se utilizaron muestras de corteza de *Uncaria tomentosa* L. desprendidas de la madera interna con un cuchillo o machete, después de la recolección de las partes aéreas de la planta, que se secaron y se molieron con un molino de bolas para obtener un polvo fino, el
20 cual se almacenó en recipientes plásticos separados debidamente rotulados para su uso posterior como se ha descrito anteriormente. Para la fase de extracción se utilizó exactamente el mismo método que se describe para los ejemplos 1 y 2.

El contenido en polifenoles de este extracto nº 3 fue de $373,7 \pm 86,5$ mg/g (media \pm DE, n=3
25 plantas de diferentes localidades). Igualmente, el contenido en proantocianidinas fue de $355,3 \pm 50,9$ mg/g. El rendimiento del proceso fue de 3-11%.

La concentración de polifenoles individualizados del extracto nº 3, siguiendo la misma técnica descrita para los ejemplos 1 y 2, se recoge en la Tabla 5 (ver Figura 5). La
30 distribución porcentual de los diferentes grupos de compuestos fue la siguiente: 11,2 % de monómeros de flavan-3-ol; 56,4 % de procianidinas (dímeros + trímeros); 18,8% de propelargonidinas y 13,6% de flavanolignanos.

Tabla 5.- Extracto nº 3: Composición fenólica individualizada

No.		Concentración (µg/g extracto)	
		Media	DE
	Monómeros		
1	(+)-Catequina	120,5	106,9
2	(-)-Epicatequina	893,2	610,2
	TOTAL	1013,7	716,7
	Dímeros de procianidinas		
3	Procianidina B3	181,7	170,6
4	Procianidina B1	172,1	133,8
5	Procianidina B4	2266,2	1652,1
6	Procianidina B2	1554,8	683,8
7	Procianidina B (Rt=5,47 min)	100,3	99,9
8	Procianidina B7	61,2	55,5
9	Procianidina B5	325,4	219,7
10	Procianidina B (Rt=9,27 min)	21,6	24,4
	TOTAL	4683,3	3022,4
	Dímeros de propelargonidinas		
11	Dímero properlagonidina (Rt=4,43 min)	139,3	150,2
12	Dímero propelargonidina (Rt=5,01 min)	651,4	734,8
13	Dímero propelargonidina (Rt=5,65 min)	82,8	84,0
14	Dímero propelargonidina (Rt=9,27 min)	165,3	185,8
	TOTAL	1038,8	1058,9

Trímeros de procianidinas			
15	Trímero T2	0,3	0,5
16	Procianidina C1	260,6	157,5
17	Trímero B (Rt=4,78 min)	35,5	43,0
	TOTAL	296,5	139,6
Flavanolignanos			
18	Cinchonaina (Rt=7,37 min)	557,2	394,7
19	Cinchonaina (Rt=9,05 min)	63,8	59,5
20	Cinchonaina (Rt=9,30 min)	64,3	59,6
21	Cinchonaina (Rt=12,27 min)	545,1	357,1
	TOTAL	1972,5	865,0
	TOTAL DE FLAVAN-3-OLES	9729,7	9388,0

Para la caracterización de la fracción de proantocianidinas con un DP \geq 3, se empleó idéntico procedimiento al indicado para los ejemplos 1 y 2. Algunas ampliaciones del espectro de masas resultante se presentan en las Figuras 6A, 6B y 6C. A continuación se indican las señales m/z correspondientes a los iones $[M-H]^-$ de las proantocianidinas detectadas (Tabla 6).

Tabla 6.- Extracto nº 3. Caracterización de proantocianidinas

DP	(epi)cat	(epi)afz	M	m/z teórico $[M-H]^-$	m/z experimental $[M-H]^-$
DP3	3	0	866,206	865,198	865,185
	2	1	850,211	849,203	849,189
	1	2	834,216	833,208	833,192
	0	3	818,221	817,213	
DP4	4	0	1154,269	1153,261	1153,245
	3	1	1138,274	1137,266	1137,249
	2	2	1122,279	1121,272	

ES 2 478 690 A1

	1	3	1106,284	1105,277	
	0	4	1090,290	1089,282	
DP5	5	0	1442,333	1441,325	1441,305
	4	1	1426,338	1425,330	1425,310
	3	2	1410,343	1409,335	1409,314
	2	3	1394,348	1393,340	
	1	4	1378,353	1377,345	
	0	5	1362,358	1361,350	
DP6	6	0	1730,396	1729,388	1729,366
	5	1	1714,401	1713,393	1713,370
	4	2	1698,406	1697,398	1697,373
	3	3	1682,411	1681,403	1681,381
	2	4	1666,416	1665,409	
	1	5	1650,421	1649,414	
	0	6	1634,427	1633,419	
DP7	7	0	2018,459	2017,452	2017,425
	6	1	2002,464	2001,457	2001,430
	5	2	1986,470	1985,462	1985,437
	4	3	1970,475	1969,467	1969,438
	3	4	1954,480	1953,472	
	2	5	1938,485	1937,477	
	1	6	1922,490	1921,482	
	0	7	1906,495	1905,487	
DP8	8	0	2306,523	2305,515	2305,487
	7	1	2290,528	2289,520	2289,494
	6	2	2274,533	2273,525	2273,496
	5	3	2258,538	2257,530	2257,487
	4	4	2242,543	2241,535	2241,489
	3	5	2226,548	2225,540	
	2	6	2210,553	2209,545	
	1	7	2194,558	2193,551	
	0	8	2178,563	2177,556	

DP9	9	0	2594,586	2593,578	2593,547
	8	1	2578,591	2577,583	2577,547
	7	2	2562,596	2561,589	2561,553
	6	3	2546,601	2545,594	2545,560
	5	4	2530,607	2529,599	
	4	5	2514,612	2513,604	
	3	6	2498,617	2497,609	
	2	7	2482,622	2481,614	
	1	8	2466,627	2465,619	
	0	9	2450,632	2449,624	
DP10	10	0	2882,650	2881,642	2881,618
	9	1	2866,655	2865,647	2865,606
	8	2	2850,660	2849,652	2849,642
	7	3	2834,665	2833,657	2833,641
	6	4	2818,670	2817,662	
	5	5	2802,675	2801,667	
	4	6	2786,680	2785,672	
	3	7	2770,685	2769,677	
	2	8	2754,690	2753,682	
	1	9	2738,695	2737,687	
	0	10	2722,700	2721,693	
DP11	11	0	3170,713	3169,705	3169,693
	10	1	3154,718	3153,710	3153,685
	9	2	3138,723	3137,715	3136,719

DP, grado de polimerización

(epi)cat, unidades de (epi)catequina

(epi)afz, unidades de (epi)afzelequina

M, masa molecular monoisotópica

5

El extracto nº 3 está compuesto por proantocianidinas homogéneas constituidas exclusivamente por unidades de (epi)catequinas (i.e., procianidinas) hasta un grado de polimerización (DP) de 11 unidades (undécámeros), así como por proantocianidinas heterogéneas formadas por (epi)catequinas y (epi)afzelequinas conteniendo un número

variable de unidades de (epi)afzelequinas (entre 1 y 4 cuatro) unidades, dependiendo del DP.

5 Ejemplo 4: Extracto de madera interna de *Uncaria tomentosa* L. conteniendo procianidinas, propelargonidinas y flavanolignanos.

Se utilizaron muestras de madera interna de *Uncaria tomentosa* L., una vez desprendida la corteza, después de la recolección de las partes aéreas de la planta, que se secaron y molieron, según se describió anteriormente para la corteza. Para la fase de extracción se
10 utilizó exactamente el mismo método que se describe para los ejemplos 1, 2 y 3.

El contenido en polifenoles de este extracto nº 4 fue de 115,1±47,2 mg/g (media±DE, n=3 plantas de diferentes localidades). Igualmente, el contenido en proantocianidinas fue de 54,9±68,6 mg/g. El rendimiento del proceso fue de 2-6%.

15 La concentración de polifenoles individualizados del extracto nº 4, utilizando la misma técnica descrita para los ejemplos 1,2 y 3 se recoge en la Tabla 7 (ver Figura 7). La distribución porcentual de los diferentes grupos de compuestos fue la siguiente: 6,0% de monómeros de flavan-3-ol; 29,5% de procianidinas (dímeros + trímeros); 4,2% de
20 propelargonidinas y 60,4% de flavanolignanos.

Tabla 7.- Extracto nº 4: Composición fenólica individualizada

No.		Concentración (µg/g extracto)	
		Media	DE
	Monómeros		
1	(+)-Catequina	10,1	10,2
2	(-)-Epicatequina	69,7	54,4
	TOTAL	79,8	64,6
	Dímeros de procianidinas		
3	Procianidina B3	18,5	31,9

4	Procianidina B1	7,0	12,2
5	Procianidina B4	194,6	311,7
6	Procianidina B2	127,9	204,7
7	Procianidina B (Rt=5,47 min)	5,3	9,2
8	Procianidina B7	5,2	9,0
9	Procianidina B5	20,1	30,1
10	Procianidina B (Rt=9,27 min)	1,9	3,2
	TOTAL	380,4	611,9
	Dímeros de propelargonidinas		
11	Dímero properlagonidina (Rt=4,43 min)	7,1	12,3
12	Dímero propelargonidina (Rt=5,01 min)	39,0	61,6
13	Dímero propelargonidina (Rt=5,65 min)	0,0	0,0
14	Dímero propelargonidina (Rt=9,27 min)	9,4	13,1
	TOTAL	55,6	87,0
	Trímeros de procianidinas		
15	Trímero T2	0,0	0,0
16	Procianidina C1	11,3	19,5
17	Trímero B (Rt=4,78 min)	1,2	1,0
	TOTAL	12,4	20,0
	Flavanolignanos		
18	Cinchonaina (Rt=7,37 min)	378,3	33,7
19	Cinchonaina (Rt=9,05 min)	23,2	6,6
20	Cinchonaina (Rt=9,30 min)	26,5	1,3
21	Cinchonaina (Rt=12,27 min)	377,3	50,8
	TOTAL	805,2	85,8

	TOTAL DE FLAVAN-3-OLES	1333,4	869,4
--	-------------------------------	---------------	--------------

Para la caracterización de la fracción de proantocianidinas con un DP \geq 3, se empleó idéntico procedimiento al indicado para los ejemplos 1,2 y 3. Algunas ampliaciones del espectro de masas resultante se presentan en las Figuras 8A, 8B y 8C. A continuación se indican las señales m/z correspondientes a los iones $[M-H]^-$ de las proantocianidinas detectadas (Tabla 8).

Tabla 8.- Extracto nº 4. Caracterización de proantocianidinas

DP	(epi)cat	(epi)afz	M	m/z teórico $[M-H]^-$	m/z experimental $[M-H]^-$
DP3	3	0	866,206	865,198	865,193
	2	1	850,211	849,203	849,203
	1	2	834,216	833,208	
	0	3	818,221	817,213	
DP4	4	0	1154,269	1153,261	1153,255
	3	1	1138,274	1137,266	1137,269
	2	2	1122,279	1121,272	
	1	3	1106,284	1105,277	
	0	4	1090,290	1089,282	
DP5	5	0	1442,333	1441,325	1441,318
	4	1	1426,338	1425,330	1425,332
	3	2	1410,343	1409,335	
	2	3	1394,348	1393,340	
	1	4	1378,353	1377,345	
	0	5	1362,358	1361,350	
DP6	6	0	1730,396	1729,388	1729,382
	5	1	1714,401	1713,393	1713,399
	4	2	1698,406	1697,398	1697,446
	3	3	1682,411	1681,403	

ES 2 478 690 A1

	2	4	1666,416	1665,409	
	1	5	1650,421	1649,414	
	0	6	1634,427	1633,419	
DP7	7	0	2018,459	2017,452	2017,455
	6	1	2002,464	2001,457	2001,464
	5	2	1986,470	1985,462	1985,531
	4	3	1970,475	1969,467	
	3	4	1954,480	1953,472	
	2	5	1938,485	1937,477	
	1	6	1922,490	1921,482	
	0	7	1906,495	1905,487	
DP8	8	0	2306,523	2305,515	
	7	1	2290,528	2289,520	
	6	2	2274,533	2273,525	
	5	3	2258,538	2257,530	
	4	4	2242,543	2241,535	
	3	5	2226,548	2225,540	
	2	6	2210,553	2209,545	
	1	7	2194,558	2193,551	
	0	8	2178,563	2177,556	
DP9	9	0	2594,586	2593,578	
	8	1	2578,591	2577,583	
	7	2	2562,596	2561,589	
	6	3	2546,601	2545,594	
	5	4	2530,607	2529,599	
	4	5	2514,612	2513,604	
	3	6	2498,617	2497,609	
	2	7	2482,622	2481,614	
	1	8	2466,627	2465,619	
	0	9	2450,632	2449,624	
DP10	10	0	2882,650	2881,642	
	9	1	2866,655	2865,647	

	8	2	2850,660	2849,652	
	7	3	2834,665	2833,657	
	6	4	2818,670	2817,662	
	5	5	2802,675	2801,667	
	4	6	2786,680	2785,672	
	3	7	2770,685	2769,677	
	2	8	2754,690	2753,682	
	1	9	2738,695	2737,687	
	0	10	2722,700	2721,693	

DP, grado de polimerización

(epi)cat, unidades de (epi)catequina

(epi)afz, unidades de (epi)afzelequina

M, masa molecular monoisotópica

5

El extracto nº 4 está compuesto por proantocianidinas homogéneas constituidas exclusivamente por unidades de (epi)catequinas (i.e., procianidinas) con un grado de polimerización (DP) entre 4 y 7 unidades, así como por proantocianidinas heterogéneas con un DP=5, formadas por (epi)catequinas y (epi)afzelequinas conteniendo un máximo de 2 unidades (epi)afzelequinas.

10

Ejemplo 5.- Determinación de las propiedades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y antiproliferativa del extracto de de la invención

15 La capacidad antioxidante de los extractos de la invención se ha evaluado in vitro por el método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) empleando fluoresceína como sustancia fluorescente. En esta técnica, los antioxidantes presentes en el extracto neutralizan los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica de AAPH, evitando así su reacción con la fluoresceína (Prior, R. L., et al. (2005). Standardized
20 methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290-4302). Los resultados se expresan como mmoles de Trolox/g de extracto, siendo el Trolox un compuesto sintético, análogo hidrosoluble de la vitamina E. Uno de los extractos comerciales con mayor capacidad antioxidante es el de pepita de uva, que suele presentar

un valor ORAC entre 2,71 - 26,4 mmol Trolox/g (n=16) (Monagas, M., et al. (2005). Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutrition and Cancer*, 53(2), 244-254).

- 5 En la determinación de capacidad antimicrobiana se comprueba la inhibición del crecimiento de bacterias tales como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* V583, y *Pseudomonas aeruginosa* PSP, las cuales son bacterias asociadas con la cavidad oral y el sistema respiratorio. El método se basa en la realización de incubaciones a 37 °C durante 20 h, tomando la absorbancia a 660 nm como medida de crecimiento para finalmente calcular
- 10 la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento microbiano o valor IC50 (µg/mL) (Cueva, C., et al. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5), 372-382). Para extractos ricos en proantocianidinas procedentes de la pepita de uva, se han descrito valores de IC50 de 87.5 µg/mL para *S. aureus*, 184 µg/mL para *E. faecalis* y 583 µg/mL para
- 15 *P. aeruginosa* (Cueva, C., et al. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5), 372-382). En el caso de compuestos puros como el ácido gálico valores IC50 encontrados fueron 18,4 µg/mL para *S. aureus*, 440 µg/mL para *E. faecalis* y 205 µg/mL para *P. aeruginosa*.
- 20 Para la determinación de la citotoxicidad se empleó el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y dos líneas celulares, una de células epiteliales de adenocarcinoma gástrico (AGS) y la otra de células epiteliales de adenocarcinoma colorectal (SW620). El método MTT se utiliza para determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales ó cultivos primarios de células normales. Este
- 25 ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Los resultados se expresan como la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular o valor IC50 (µg/mL) (Diaz, G., et al. (2007). Localization of MTT formazan in lipid droplets. An
- 30 alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates. *European Journal of Histochemistry*, 51(3), 213-218). En el caso de los extractos de pepita de uva se han reportado valores IC50 de 57,53 mg/L para células YAC-1 de linfoma de ratón (Zhang, X. Y., Li, W. G., Wu, Y. J., Zheng, T. Z., Li, W., Qu, S. Y., & Liu, N. F. (2005).

Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. *International Immunopharmacology*, 5(7-8), 1247-1257).

5 Para la determinación de proliferación celular se empleó el método de Hoechst 33342 y las líneas celulares de cáncer hormonal, incluyendo cáncer de próstata (LNCaP), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer cervical (HeLa). Hoechst 33342 es un fluorocromo permeable a la membrana plasmática por lo que entra en todas las células. Tiene especificidad por los pares de bases A-T uniéndose y tiñendo el DNA, y por tanto permite cuantificar la cantidad de DNA y por consiguiente la proliferación celular (Shapiro, H. M. (1981). Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y. *Cytometry*, 2(3), 143-150). Los resultados se expresan como la concentración necesaria para inhibir el 50% de la proliferación celular o valor IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). En el caso de extractos de pepitas de uva, se ha descrito una inhibición de la proliferación celular de un 40% para una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en células de cáncer de vejiga BIU87 (Liu, J., et al. (2009).
10
15 Role of survivin in apoptosis induced by grape seed procyanidin extract in human bladder cancer BIU87 cells. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 8(7), 420-425).

5.1.- Actividad biológica del extracto nº 1

20 En cuanto a la capacidad antioxidante, el extracto nº 1 presentó un valor ORAC de $16,1 \pm 0,8$ mmoles de Trolox/g de extracto (media \pm DE, n=2 plantas de diferentes localidades).

También se realizó la determinación de citotoxicidad en líneas de cáncer gástrico (AGS) y colónico (SW620), encontrándose valores IC50 de $172,7 \pm 30,0$ y $170,7 \pm 29,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (media \pm DE, n=3 plantas de diferentes localidades). Para la actividad antiproliferativa en líneas de cáncer de próstata (LNCaP), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer cervical (HeLa), los valores IC50 fueron de 1,4; 68,2 y 98,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (n=1, planta de una sola localidad).
25

30 La actividad antimicrobiana de este extracto nº 1 frente a *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* V58, y *P. aeruginosa* PSP presentó valores IC50 de $559,6 \pm 61,6$, $1769,5 \pm 460,3$ y $498,0 \pm 32,8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (media \pm DE, n=3 plantas de diferentes localidades).

5.2.- Actividad biológica del extracto nº 2

En cuanto a la capacidad antioxidante el extracto nº 2 presentó un valor ORAC de $12,2 \pm 3,7$ mmoles de Trolox/g de extracto (media \pm DE, n=2 plantas de diferentes localidades).

5

También se realizó la determinación de la citotoxicidad en líneas de cáncer gástrico (AGS) y colónico (SW620), encontrándose valores IC50 de 187,8 y 179,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (n=1 planta de una sola localidad). Para la actividad antiproliferativa en líneas de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer cervical (HeLa) los valores IC50 fueron de 54,3 y 53,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (n=1 planta de una sola localidad).

10

La actividad antimicrobiana de este extracto nº 2 frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *E. faecalis* V58, presentó valores IC50 de $387,7 \pm 11,5$ y $4107,0 \pm 3852,3$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (media \pm DE, n=2 plantas de diferentes localidades). Frente a *P. aeruginosa* PSP fue de 416,5 $\mu\text{g/mL}$ (n=1 planta de una sola localidad).

15

5.3.- Actividad biológica del extracto nº 3

En cuanto a la capacidad antioxidante, el extracto nº 3 presentó un valor ORAC de $15,1 \pm 5,2$ mmoles de Trolox/g de extracto (media \pm DE, n=2 plantas de diferentes localidades).

20

También se realizó la determinación de la citotoxicidad en líneas de cáncer gástrico (AGS) y colónico (SW620), encontrándose valores IC50 de $162,7 \pm 51,9$ y $129,1 \pm 14,0$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (media \pm DE, n=2 plantas de diferentes localidades). Para la actividad antiproliferativa en línea de cáncer de próstata (LNCaP) el valor IC50 fue de 0,098 $\mu\text{g/mL}$ (n=1 planta de una sola localidad).

25

La actividad antimicrobiana de este extracto nº 3 frente a *S. aureus* ATCC 25923 presentó valores IC50 de $311,5 \pm 253,1$ $\mu\text{g/mL}$ (media \pm DE, n=2 plantas de diferentes localidades). Frente a *E. faecalis* V58 y *P. aeruginosa* PSP fue de 395,3 y 151,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (n=1 planta de una sola localidad).

30

5.4.- Actividad biológica del extracto nº 4

En cuanto a la capacidad antioxidante el extracto nº 4 presentó un valor ORAC de $3,1 \pm 2,3$ mmoles de Trolox/g de extracto (media \pm DE, n= 2 plantas de diferentes localidades).

- 5 También se realizó la determinación de citotoxicidad en líneas de cáncer gástrico (AGS) y colónico (SW620), encontrándose valores IC50 de $>500 \mu\text{g/mL}$, para ambos casos (n= 1 planta de una sola localidad). Para la actividad antiproliferativa en líneas de cáncer de mama (MCF-7) y cervical (HeLa) el valor IC50 fue de 58,5 y $40,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (n=1 planta de una sola localidad).

10

La actividad antimicrobiana de este extracto nº 4 frente a *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* PSP presentó valores IC50 de $2231,0 \pm 767,9$ y $630,1 \pm 256,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (media \pm DE, n=2 plantas de diferentes localidades). Frente a *E. faecalis* V58 el valor IC50 fue de $1112,0 \mu\text{g/mL}$ (n=1 planta de una sola localidad).

15

Métodos de análisis de los compuestos descritos de la invención

El contenido fenólico total del extracto se determina por el método colorimétrico de Singleton y Rossi (Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdicphosphotungstic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144-158). Los resultados se expresan como mg de ácido gálico /g de extracto.

20

El contenido de proantocianidinas totales del extracto se determina por el método de Bath-Smith (Ribéreau-Gayon, P., y Stonestreet, E. (1966). Dósage des tannins du vin rouges et détermination du leur structure. Chem. Anal. 48, 188-196).

25

Para determinar la presencia de monómeros de flavan-3-oles, de procianidinas y propelargonidinas hasta un grado de polimerización (DP) de tres unidades (DP 3 o trímeros), y de flavanolignanos, se empleó un sistema de cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UPLC, Ultra Performance Liquid Chromatography) acoplado a un detector de fotodiodos alineados (DAD) y a un espectrómetro de masas con fuente de ionización a presión atmosférica por electronebulización y un analizador de triple cuadrupolo (UPLC-DAD-ESI-TQ MS). La separación se llevó a cabo en una columna Waters BEH C18 (2.1 x 100 mm; 1.7

30

µm) a 40°C. Se empleó un gradiente compuesto por: eluyente A- agua:ácido acético (98:2, v/v) y B-acetonitrilo:ácido acético (98:2, v/v) a un flujo de 0,5 mL/min de la siguiente forma: 0-1,5 min: 0,1% B; 1,5-11,17 min: 0,1-16,3% B; 11,17-11,5 min: 16,3-18,4% B; 11,5-14 min: 18,4% B; 14-14,1 min: 18,4-99,9% B; 14,1-15,5 min: 99,9% B; 15,5-15,6 min: 99,9-0,1% B; 5 15,6-18 min: 0,1% B.

Para la cuantificación mediante el detector de masas se empleó el modo de monitorización de reacciones múltiples (multiple reaction monitoring o MRM) con las transiciones m/z 289/245 (monómeros de flavan-3-ol, (+)-catequina y (-)-epicatequina), 577/289 (dímeros de procianidinas), m/z 561/289 (dímeros de propelargonidinas), m/z 865/577 (trímeros de procianidinas), y m/z 451/341 (flavanolignanos de tipo cinchonaina). Se emplearon los patrones comerciales de la (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidinas B1 [(-)-epicatequina-(4β→8)-(+)-catequina], B2 [(-)-epicatequina-(4β→8)-(-)-epicatequina], y C1 [(-)-epicatequina-(4β→8)-(-)-epicatequina-(4β→8)-(-)-epicatequina] para las optimizaciones de 15 los parámetros del detector de masas y elaboración de curvas de calibrado. La asignación de otras estructuras correspondientes a las procianidinas B3 [(+)-catequina-(4α→8)-(+)-catequina], B5 [(-)-epicatequina-(4β→6)-(-)-epicatequina], B7 [(-)-epicatequina-(4β→6)-(+)-catequina], y T2 [(-)-epicatequina-(4β→8)-(-)-epicatequina-(4β→8)-(+)-catequina], se llevó a cabo con patrones aislados de otras plantas y mediante confirmación del espectro MS/MS 20 (Figuras 9A y 9B). Debido a la ausencia de patrones comerciales para las propelargonidinas y flavanolignanos, se realizó un espectro de MS/MS para los iones moleculares a m/z 561 y m/z 451 para confirmar la estructura de ambos tipos de compuestos, respectivamente. La cuantificación de las propelargonidinas y de los flavalignanos se efectuó sobre la curva de calibrado de la procianidina B1 y de la (-)-epicatequina, respectivamente.

25 A partir de la técnica anterior, se realizó la cuantificación de monómeros [(+)-catequina y (-)-epicatequina], dímeros de procianidina [procianidinas B3, B1, B4, B2, B7, B5, y dos dímeros adicionales de estructura desconocida en tiempos de retención (Rt), Rt= 5,37 y 9,37 min], dímeros de propelargonidinas [Rt= 4,43; 5,01; 5,65; 9,27 mins], trímeros de procianidinas 30 [trímeros T2, C1 y trímeros de estructura desconocida a Rt= 4,78 min] y flavanolignanos de tipo cichonaina [Rt= 7,37; 9,05; 9,30; 12,27 mins].

Para la fracción de proantocianidinas de alto peso molecular igual o superior a trímeros (DP 3), se empleó un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización a presión atmosférica por electronebulización y analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (HPLC-ESI-qTOF MS). Los análisis se realizaron sin separación cromatográfica previa (inyección directa), inyectando 20 µL en una corriente de 100 µL/min de acetonitrilo:agua (75:25). Esta se hacía llegar a una fuente de electronebulización, trabajando en modo negativo a un voltaje de 4500 V. El gas de nebulización (N₂) se utilizó a una presión de 30 psi, y el de secado (N₂) a un caudal de 6 L/min y una temperatura de 300 °C. En cuanto a los voltajes de transmisión iónica, se aplicaron 500 V al fragmentador, y 300 V al skimmer. Finalmente, el analizador trabajó en modo barrido de masas (Full Scan), registrando entre m/z 100 y 5000.

En la Tabla 9 se indican las masas monoisotópicas correspondientes a procianidinas y propelargonidinas de tipo B que se encontrarían en los extractos objeto de esta patente. La asignación de la estructura a la relación m/z observada [M-H]⁻ se hace teniendo en cuenta el cálculo teórico: $m/z = 290.0790*(CAT) + 274.0841*(AFZ) - 2.0156*(B) - 1.0078$; donde CAT y AFZ corresponden, respectivamente, al número de unidades de (epi)catequina y (epi)afzelequina que componen la molécula de proantocianidina; y B corresponde al número de enlaces de tipo B entre las unidades constitutivas. La asignación de una estructura a la masa observada (m/z, [M-H]⁻) se hace por comparación con los valores teóricos de la masa molar monoisotópica (M).

Tabla 9.- Masas monoisotópicas correspondientes a procianidinas y propelargonidinas de tipo B.

DP	(epi)cat	(epi)afz	enlaces	M	m/z [M-H] ⁻
DP2	2	0	1	578,142	577,135
	1	1	1	562,148	561,140
	0	2	1	546,153	545,145
DP3	3	0	2	866,206	865,198
	2	1	2	850,211	849,203
	1	2	2	834,216	833,208

ES 2 478 690 A1

	0	3	2	818,221	817,213
DP4	4	0	3	1154,269	1153,261
	3	1	3	1138,274	1137,266
	2	2	3	1122,279	1121,272
	1	3	3	1106,284	1105,277
	0	4	3	1090,290	1089,282
DP5	5	0	4	1442,333	1441,325
	4	1	4	1426,338	1425,330
	3	2	4	1410,343	1409,335
	2	3	4	1394,348	1393,340
	1	4	4	1378,353	1377,345
	0	5	4	1362,358	1361,350
DP6	6	0	5	1730,396	1729,388
	5	1	5	1714,401	1713,393
	4	2	5	1698,406	1697,398
	3	3	5	1682,411	1681,403
	2	4	5	1666,416	1665,409
	1	5	5	1650,421	1649,414
	0	6	5	1634,427	1633,419
DP7	7	0	6	2018,459	2017,452
	6	1	6	2002,464	2001,457
	5	2	6	1986,470	1985,462
	4	3	6	1970,475	1969,467
	3	4	6	1954,480	1953,472
	2	5	6	1938,485	1937,477
	1	6	6	1922,490	1921,482
	0	7	6	1906,495	1905,487
DP8	8	0	7	2306,523	2305,515
	7	1	7	2290,528	2289,520
	6	2	7	2274,533	2273,525
	5	3	7	2258,538	2257,530
	4	4	7	2242,543	2241,535
	3	5	7	2226,548	2225,540

ES 2 478 690 A1

	2	6	7	2210,553	2209,545
	1	7	7	2194,558	2193,551
	0	8	7	2178,563	2177,556
DP9	9	0	8	2594,586	2593,578
	8	1	8	2578,591	2577,583
	7	2	8	2562,596	2561,589
	6	3	8	2546,601	2545,594
	5	4	8	2530,607	2529,599
	4	5	8	2514,612	2513,604
	3	6	8	2498,617	2497,609
	2	7	8	2482,622	2481,614
	1	8	8	2466,627	2465,619
	0	9	8	2450,632	2449,624
DP10	10	0	9	2882,650	2881,642
	9	1	9	2866,655	2865,647
	8	2	9	2850,660	2849,652
	7	3	9	2834,665	2833,657
	6	4	9	2818,670	2817,662
	5	5	9	2802,675	2801,667
	4	6	9	2786,680	2785,672
	3	7	9	2770,685	2769,677
	2	8	9	2754,690	2753,682
	1	9	9	2738,695	2737,687
	0	10	9	2722,700	2721,693
DP11	11	0	10	3170,713	3169,705
	10	1	10	3154,718	3153,710
	9	2	10	3138,723	3137,715
	8	3	10	3122,728	3121,720
	7	4	10	3106,733	3105,725
	6	5	10	3090,738	3089,731
	5	6	10	3074,743	3073,736
	4	7	10	3058,749	3057,741
	3	8	10	3042,754	3041,746

2	9	10	3026,759	3025,751
1	10	10	3010,764	3009,756
0	11	10	2994,769	2993,761

DP, grado de polimerización

(epi)cat, unidades de (epi)catequina

(epi)afz, unidades de (epi)afzelequina

M, masa molecular monoisotópica

5

REIVINDICACIONES

- 1.- Extracto de la planta *Uncaria tomentosa* L. obtenido a partir de cualquier parte aérea o de la madera interna de la misma, que presenta capacidad/actividad antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y antiproliferativa, y caracterizado porque comprende:
- 5
- a) un contenido fenólico total mínimo de 80,7 mg de ácido gálico/g,
 - b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 11,3 mg de cloruro de cianidina/g,
 - c) un contenido mínimo de 0,88 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
 - 10 d) un porcentaje mínimo de monómeros del 2,2%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 5,7%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 1,1% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del 1,9%.
- 2.- Extracto de la planta *Uncaria tomentosa* L. según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene de las hojas y porque comprende:
- 15
- a) un contenido fenólico total mínimo de 356 mg de ácido gálico/g,
 - b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 221 mg de cloruro de cianidina/g,
 - c) un contenido mínimo de 11,1 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
 - 20 d) un porcentaje mínimo de monómeros del 9,3%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 11,5%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 31,4% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del 1,9%.
- 3.- Extracto de la planta *Uncaria tomentosa* L. según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene de los tallos y porque comprende:
- 25
- a) un contenido fenólico total mínimo de 286 mg de ácido gálico/g,
 - b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 299 mg de cloruro de cianidina/g,
 - c) un contenido mínimo de 11,9 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y
 - 30 d) un porcentaje mínimo de monómeros del 6,4%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 57,9%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 18,0% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del 9,1%.

4.- Extracto de la planta *Uncaria tomentosa* L. según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene de la corteza y porque comprende:

a) un contenido fenólico total mínimo de 283 mg de ácido gálico/g,

b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 247 mg de cloruro de cianidina/g,

5 c) un contenido mínimo de 3,3 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y

d) un porcentaje mínimo de monómeros del 5,9%, un porcentaje de procianidinas del 57,9, un porcentaje de propelargonidinas del 6,0% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del 11%.

10

5.- Extracto de la planta *Uncaria tomentosa* L. según la reivindicación 1 caracterizado porque se obtiene de la madera interna y porque comprende:

a) un contenido fenólico total mínimo de 80,7 de ácido gálico/g,

b) un contenido mínimo de proantocianidinas totales de 11,3 de cloruro de cianidina/g,

15 c) un contenido mínimo 0,88 mg/g para la sumatoria total de monómeros, dímeros de procianidinas, dímeros de propelargonidinas, trímeros de procianidinas y flavanolignanos, y

d) un porcentaje mínimo de monómeros del 2,2%, un porcentaje mínimo de procianidinas del 5,7%, un porcentaje mínimo de propelargonidinas del 1,1% y un porcentaje mínimo de flavanolignanos del 33,1%.

20

6.- Procedimiento de obtención del extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 que implica un fraccionamiento que permite obtener tres extractos diferenciados: un primer extracto no polar, un segundo extracto alcalóidico y tres extractos polifenólicos que provienen de extracciones de los anteriores extractos o de sus marcos y que en su conjunto
25 constituyen un tercer extracto polifenólico enriquecido total de *Uncaria tomentosa* L., y caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) una etapa de preparación del material vegetal que comprende la separación de las distintas partes aéreas y madera interna, una fase de secado y una fase de molienda de las mismas;

30 b) una etapa de maceración-extracción del material vegetal que comprende las siguientes fases:

b.1.- obtención del extracto no polar empleando una extracción sólido-líquido y disolventes orgánicos, preferentemente éter metil-ter-butílico, hexano, cloroformo y metanol,

tanto puros como mezclados; a una temperatura entre 5°C y 60°C, preferentemente entre 25°C y 30°C; durante un tiempo de extracción comprendido entre 8 y 72 horas; y que es llevado a sequedad a una temperatura inferior a 40°C;

5 b.2.- obtención del extracto polar polifenólico empleando una extracción sólido-líquido y disolventes orgánicos, preferentemente metanol; a una temperatura entre 5°C y 60°C, preferentemente entre 25°C y 30°C; y durante un tiempo de extracción comprendido entre 8 y 72 horas;

b.3.- obtención del extracto alcalóidico empleando una extracción sólido-líquido y siguiendo los siguientes pasos:

10 b.3.1.- empleo de disolventes orgánicos, preferentemente éter metil-ter-butílico y metanol, tanto solos como en combinación con amoniaco; a una temperatura entre 5°C y 60°C, preferentemente entre 25°C y 30°C; y durante un tiempo de extracción comprendido entre 8 y 72 horas,

15 b.3.2.- empleo de disolventes acidulados con ácidos de tipo inorgánico como HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, o con cualquier ácido orgánico como ácido acético, cítrico o tartárico,

b.3.3.- empleo de disolventes basificados con bases de tipo inorgánico, como carbonato de sodio o de tipo orgánico como amoniaco, hasta alcanzar un pH de 10, y

b.3.4.- empleo de disolventes orgánicos como éter metil-ter-butílico, y

20 b.3.5.- secado del extracto alcalóidico con agentes desecantes como sulfato de sodio y posteriormente llevado a sequedad utilizando temperaturas inferiores a 40°C; conservándolo para su tratamiento;

b.4.- obtención del extracto polifenólico total, constituido por el extracto obtenido en la fase de obtención del extracto polar polifenólico (b.2) y los extractos obtenidos mediante los siguientes pasos:

25 b.4.1.- después de la fase de obtención del extracto no polar (b.1), el extracto no polar obtenido se somete a extracción sólido-líquido con solventes orgánicos, preferentemente metanol, para obtener un extracto polifenólico con los polifenoles remanentes,

30 b.4.2.- después del paso de empleo de disolventes orgánicos (b.3.1), el marco alcalóidico se somete a extracción sólido-líquido con solventes orgánicos, preferentemente metanol, para obtener un extracto polifenólico con los polifenoles remanentes;

b.5.- secado del extracto polifenólico total (b.4) a temperatura inferior a 40°C;

c) una etapa de purificación del extracto polifenólico total (b.4), sea mediante extracción sólido-líquido con solventes orgánicos, como éter metil-ter-butílico y cloroformo, y/o

mediante cromatografía de fase reversa (RP) con polímeros no polares de adsorción-desorción tal como Diaion HP20 y/o mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o filtración en gel con medios tal como Sephadex LH-20, y
d) una etapa de secado del extracto polifenólico purificado (c) a temperatura inferior a 40°C.

5

7.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6, caracterizado porque en la etapa de preparación del material vegetal (6.a), la fase de secado se lleva a cabo colocando inicialmente el material vegetal en una superficie plana en un cuarto con ventilación durante 120 horas y, posteriormente, en una estufa a 40°C durante 72 horas.

10

8.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6, caracterizado porque la extracción sólido-líquido de la etapa de maceración-extracción (b) se realiza utilizando un sistema elegido de entre los siguientes: incubador, reflujo o baño de ultrasonidos.

15

9.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6 caracterizado porque para la obtención del extracto no polar(b.1) se utiliza una mezcla MTBE:MeOH (90:10 v/v).

20

10.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6 caracterizado porque para la obtención del extracto alcalóidico (b.3.1) se emplea una mezcla de amoníaco al 20% en MeOH.

25

11.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6, caracterizado porque para la obtención del extracto alcalóidico de la etapa de maceración-extracción en la que utilizan disolventes acidulados (b.3.2), los alcaloides se extraen con ácido tartárico al 20%, y en la etapa de empleo de disolventes basificados (b.3.3.), las fases acuosas se basifican hasta pH 10 con carbonato de sodio.

30

12.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6, caracterizado porque utiliza extracciones sólido-líquido de los extractos menos polares secos (b.4.1) y del marco alcalóidico (b.4.2) con solventes polares como metanol, y varias extracciones sólido-líquido con metanol de la muestra de la planta inicial.

13.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6 caracterizado porque en la etapa de purificación del extracto total polifenólico seco (c) se utiliza un procedimiento de extracción sólido-líquido con empleo de disolventes orgánicos como MTBE y/o cloroformo.

5

14.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6 caracterizado porque en la etapa de purificación del extracto total polifenólico seco (c) se utiliza una técnica seleccionada de entre las siguientes: purificación por extracción solido-liquido; cromatografía de adsorción sobre resinas tipo Diaion HP20 o cromatografía de exclusión por tamaño, sobre geles de filtración tipo Sephadex LH-20, por elución en gradiente de solventes de distinta polaridad, incluyendo agua y solventes orgánicos, como acetato de etilo, acetona, metanol, o sus mezclas en distintos porcentajes.

10

15.- Procedimiento de obtención del extracto según la reivindicación 6 caracterizado porque en la etapa de secado del extracto purificado (d), se utiliza una técnica seleccionada de entre las siguientes: liofilización, concentración y/o secado a vacío, secado con aire, concentración y secado con rotavapor, y atomización.

15

16.- Producto alimentario funcional caracterizado porque comprende un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, útil para la prevención y tratamiento de procesos de envejecimiento fisiológico, procesos patológicos relacionados con la edad o con el estrés oxidativo.

20

17.- Producto alimentario funcional según la reivindicación 16, caracterizado porque presenta capacidad antioxidante, fitoestrogénica, insulínica, antimutagénica, neuroprotectora, anticancerígena, anti-inflamatoria, antiviral y cardioprotectora.

25

18.- Composición cosmética caracterizada porque comprende un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 útil para la prevención y tratamiento de procesos de envejecimiento fisiológico, procesos patológicos relacionados con la edad o con el estrés oxidativo.

30

19.- Composición cosmética según la reivindicación 18, caracterizada porque presenta capacidad antioxidante, anticancerígena y anti-inflamatoria.

5 20.- Composición farmacéutica caracterizada por contener un extracto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, útil para la prevención y tratamiento de tumores e infecciones y cardioprotectora.

10 21.- Composición farmacéutica según la reivindicación 20, caracterizada porque presenta capacidad antioxidante, fitoestrogénica, insulino-trópica, antimutagénica, neuroprotectora, anticancerígena, anti-inflamatoria, antiviral y cardioprotectora.

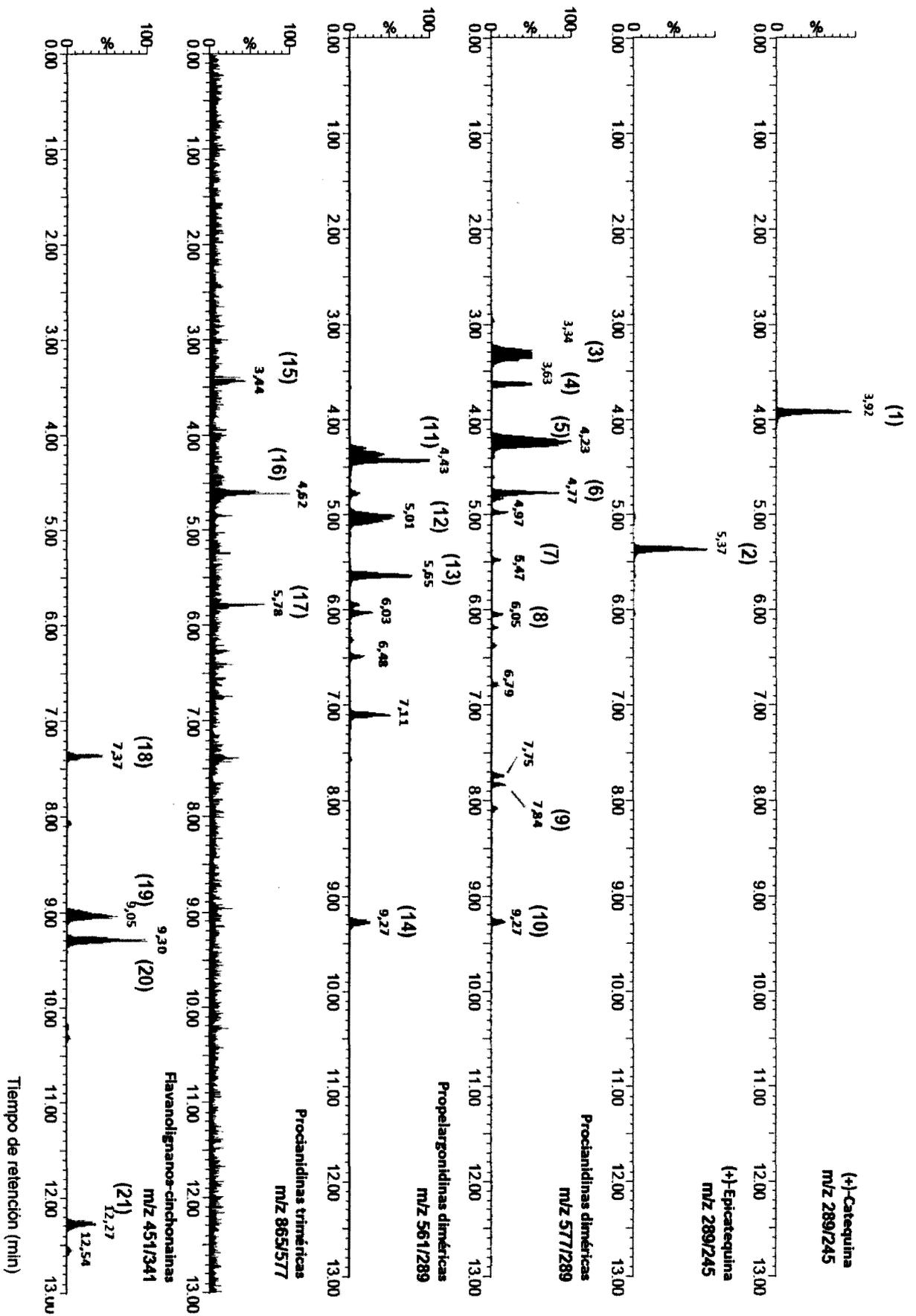


FIG. 1

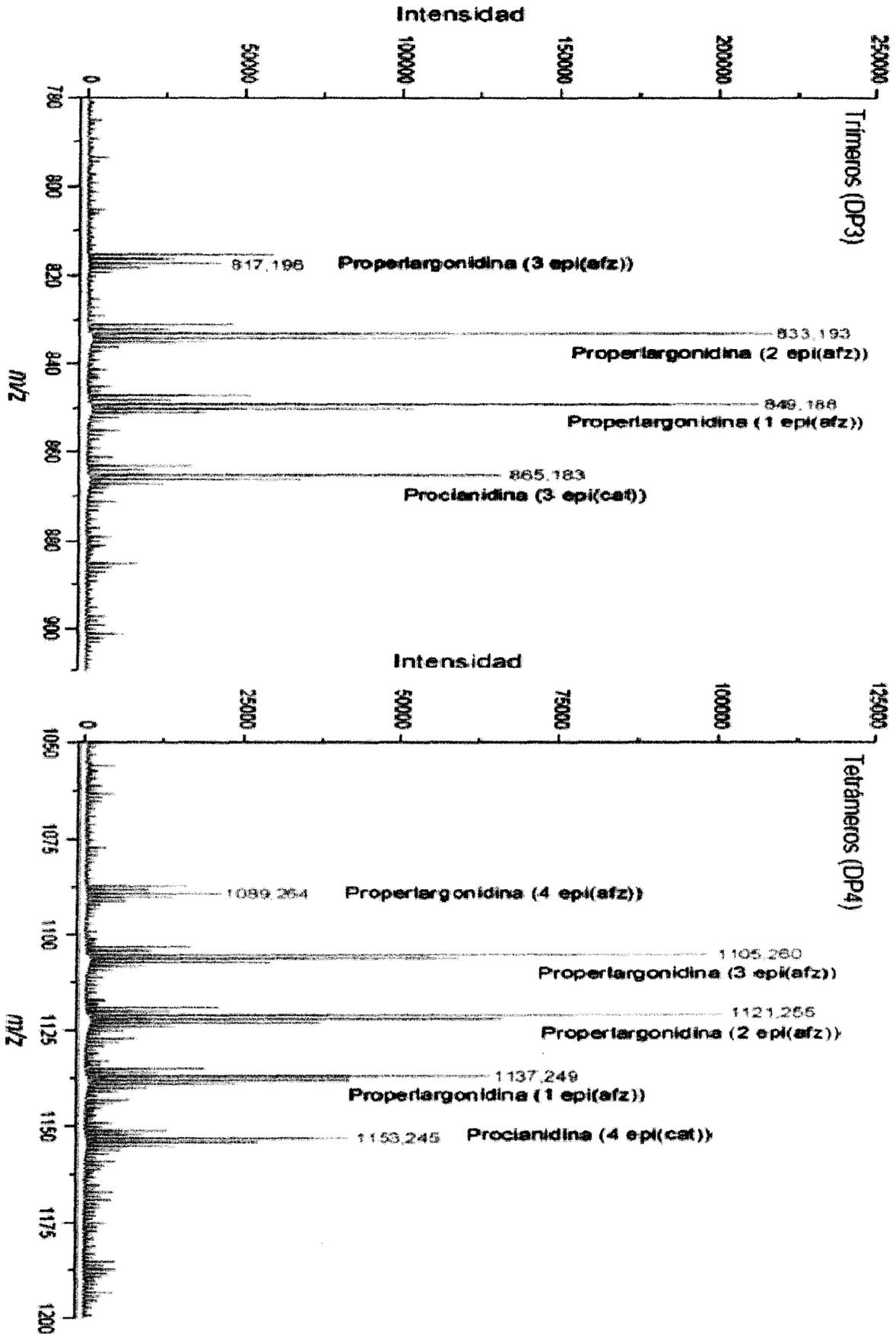


FIG. 2A

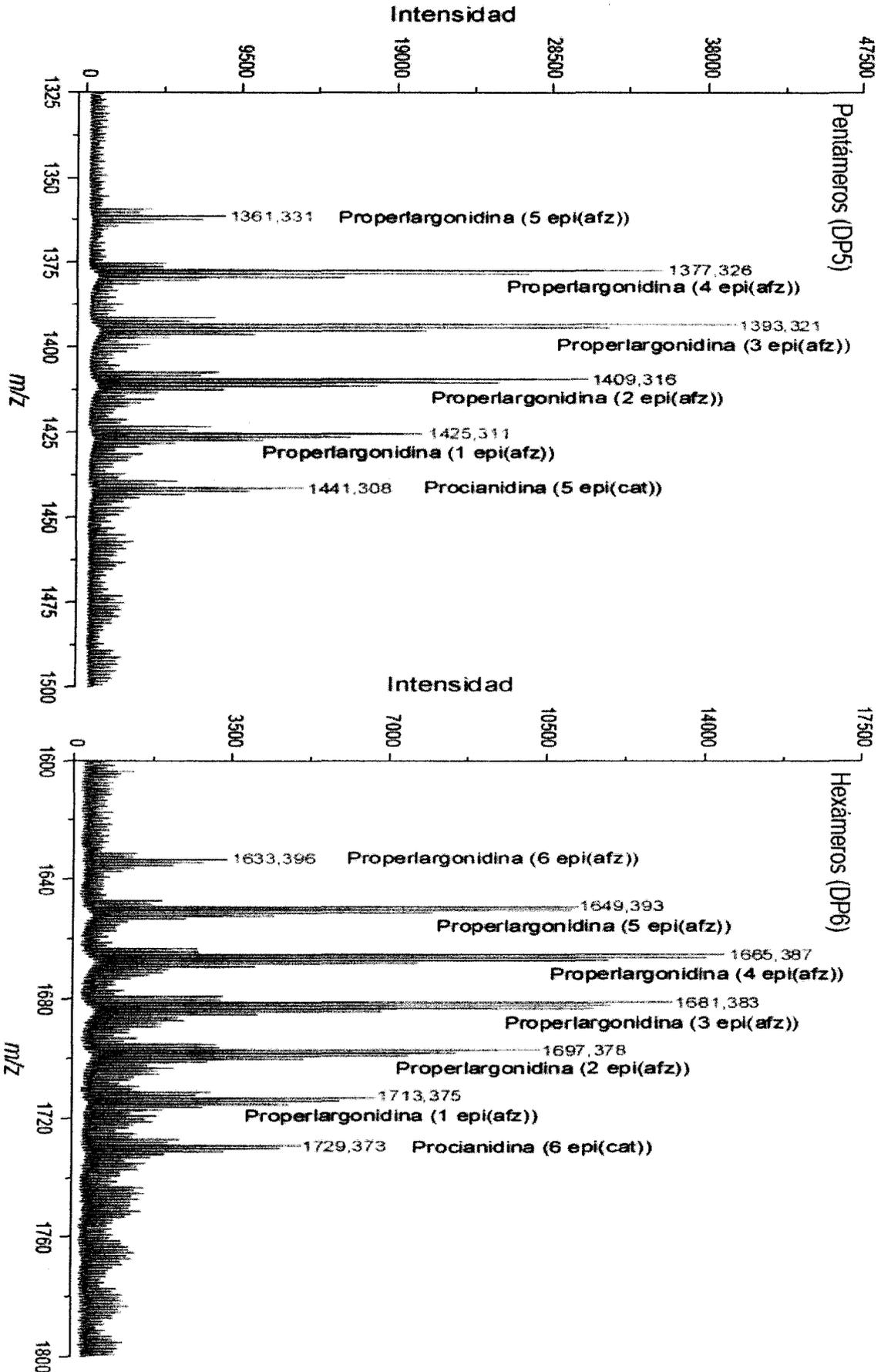


FIG. 2B

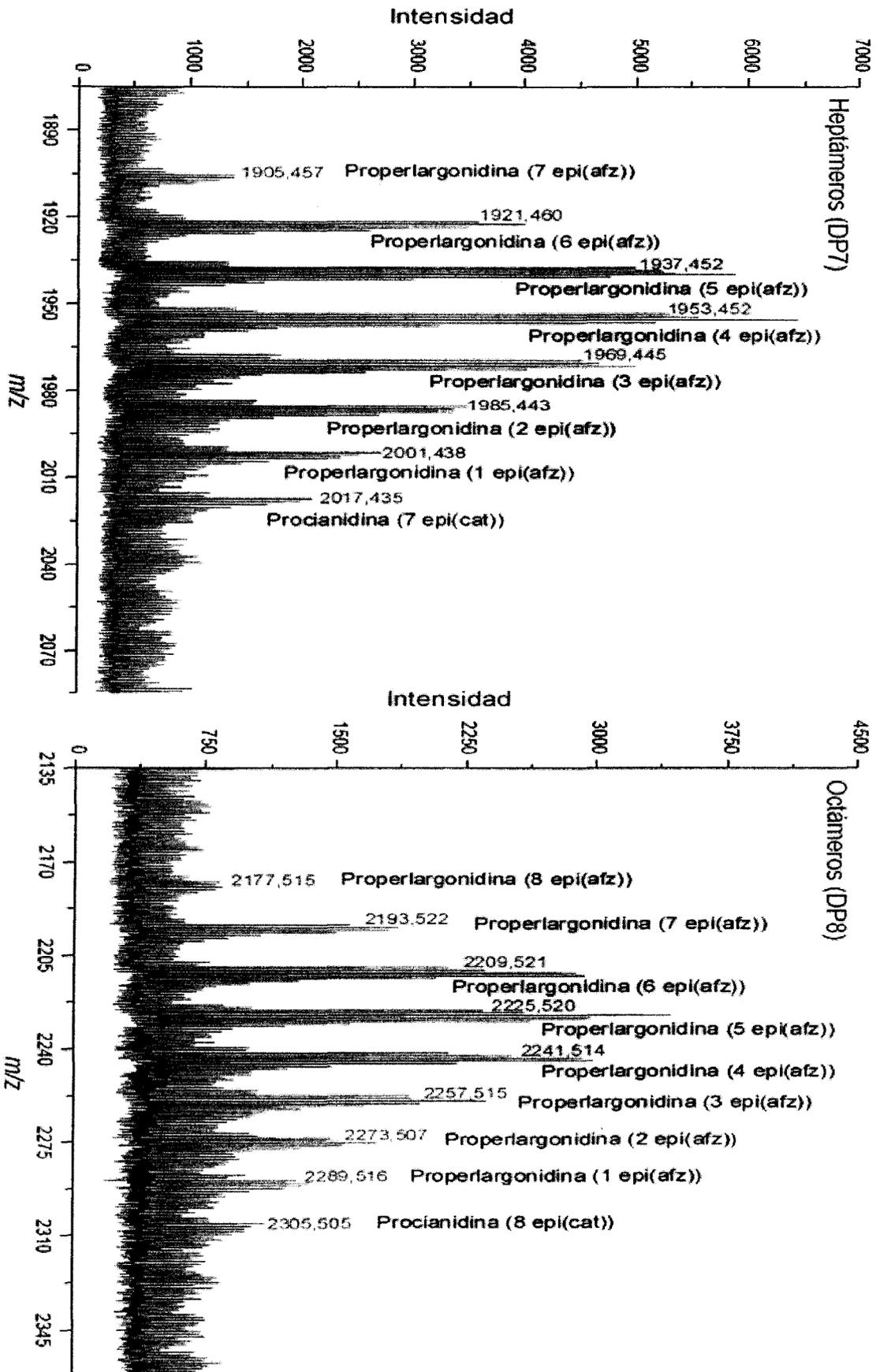


FIG. 2C

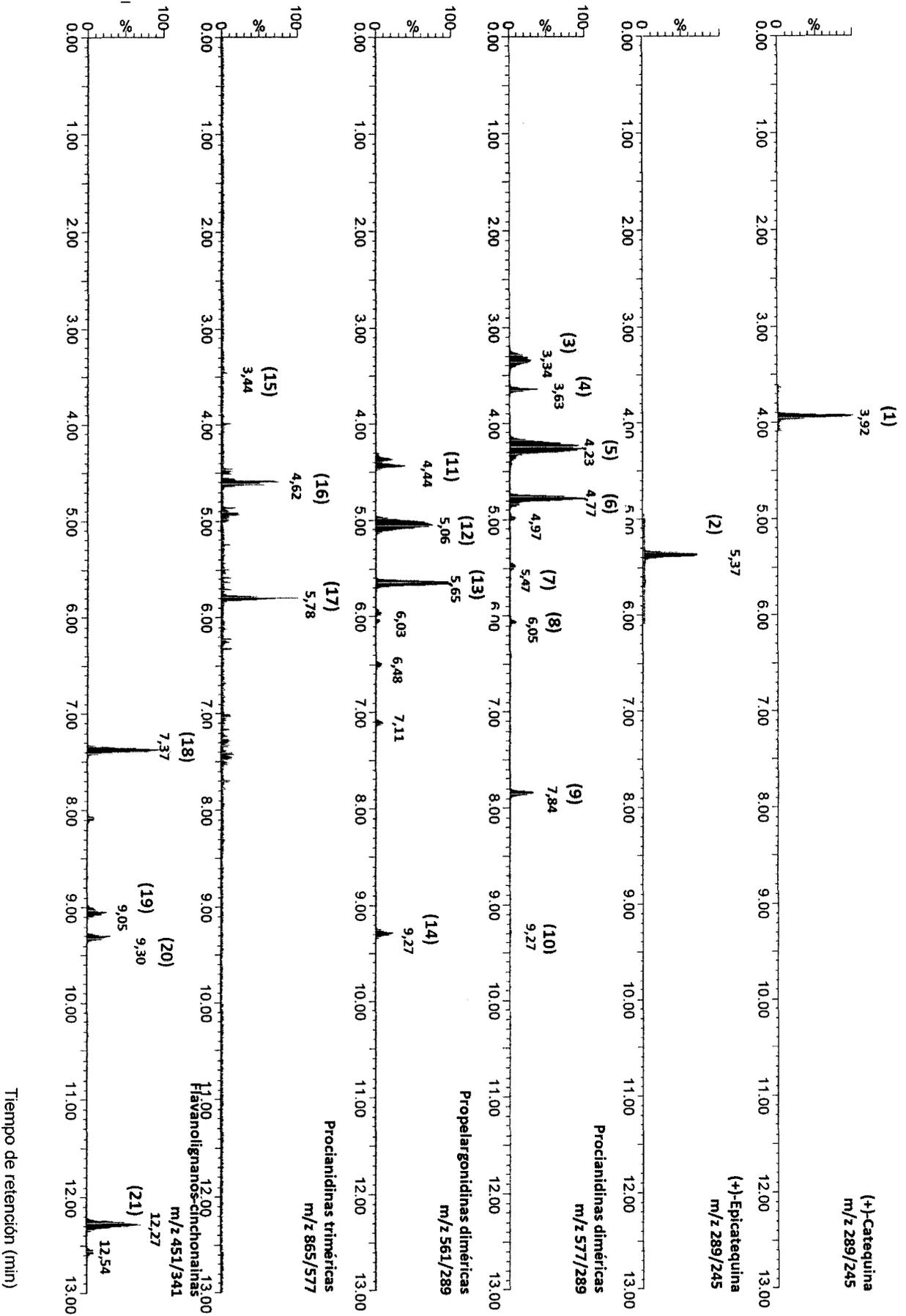


FIG. 3

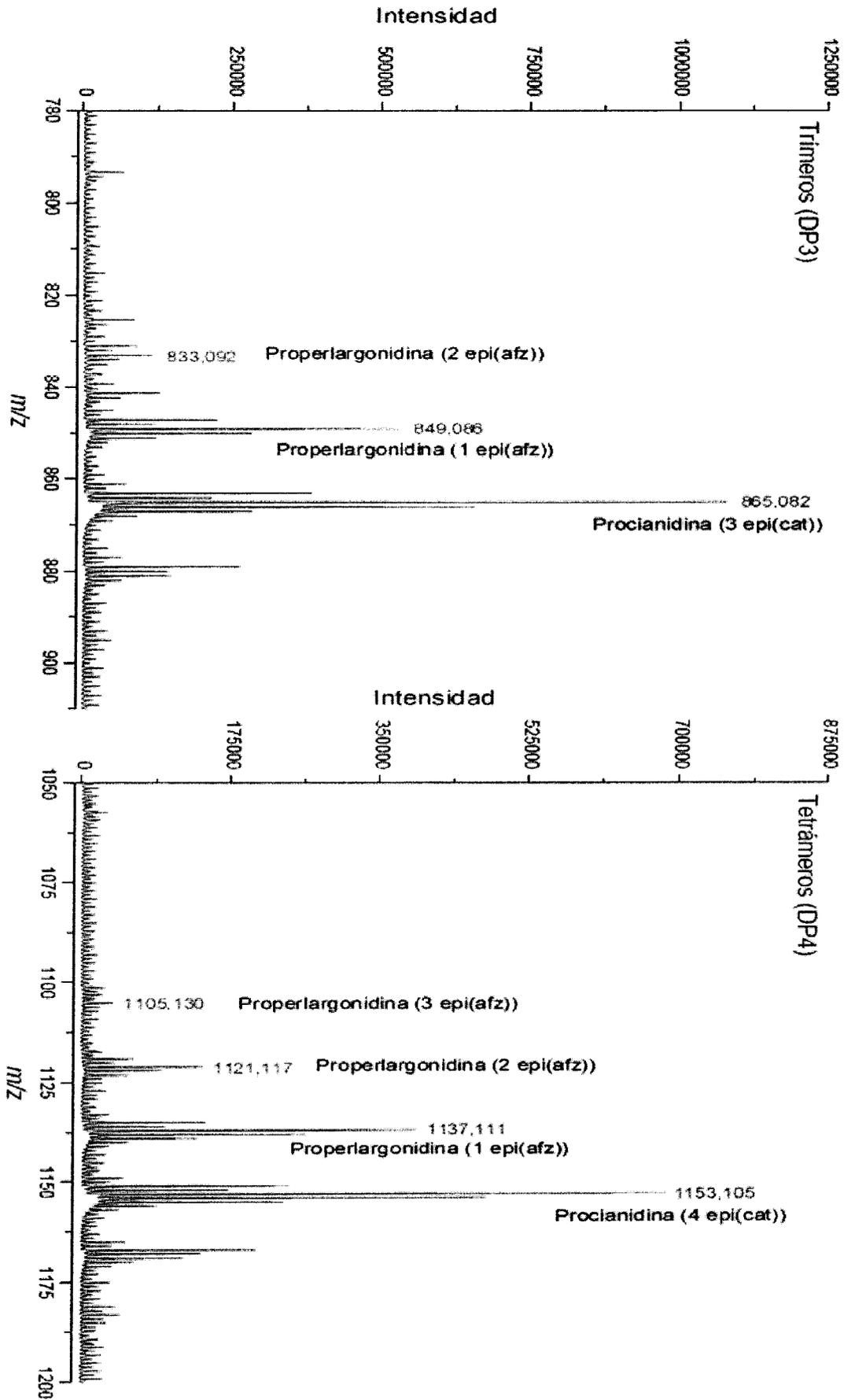


FIG. 4A

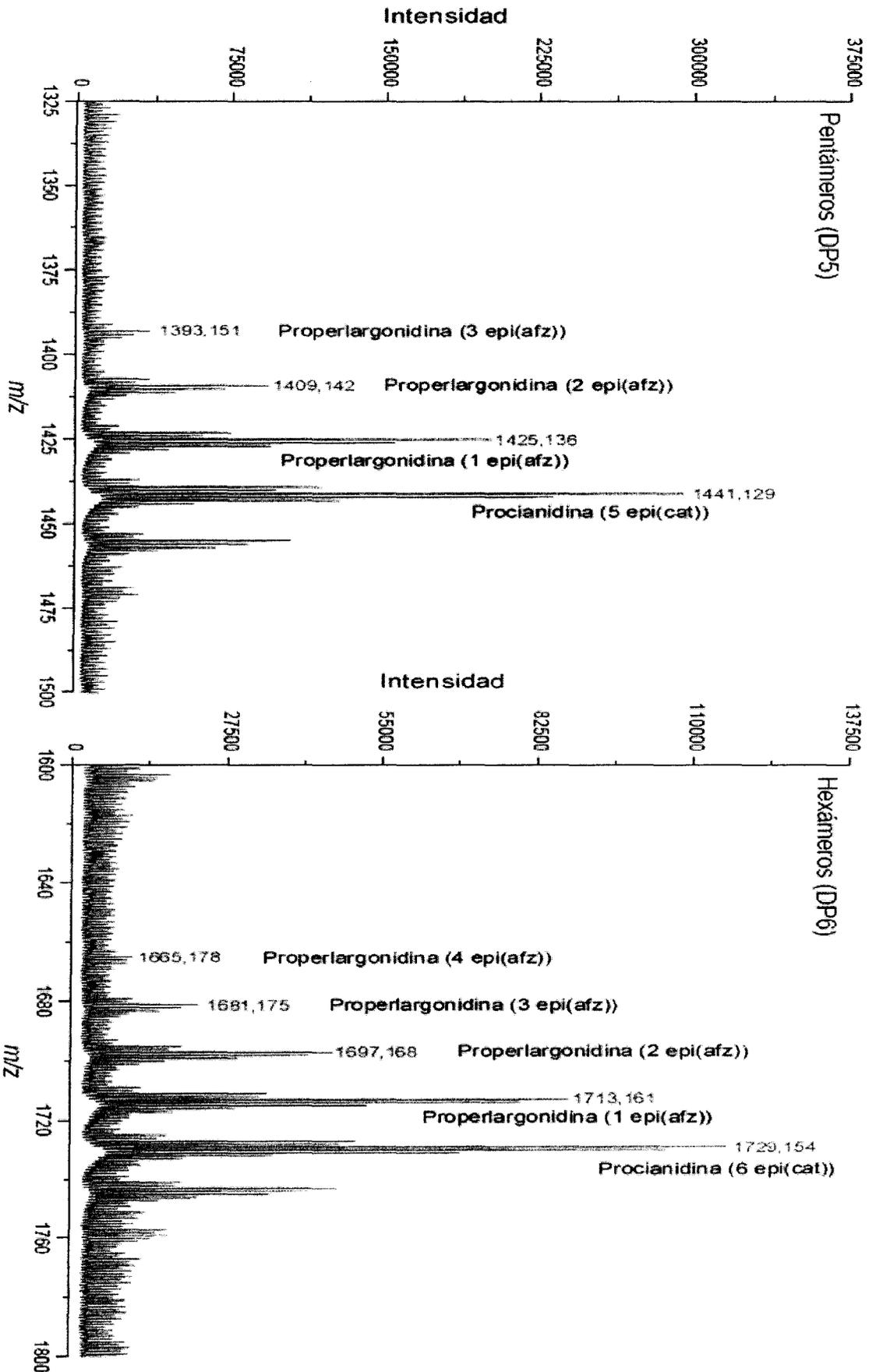


FIG. 4B

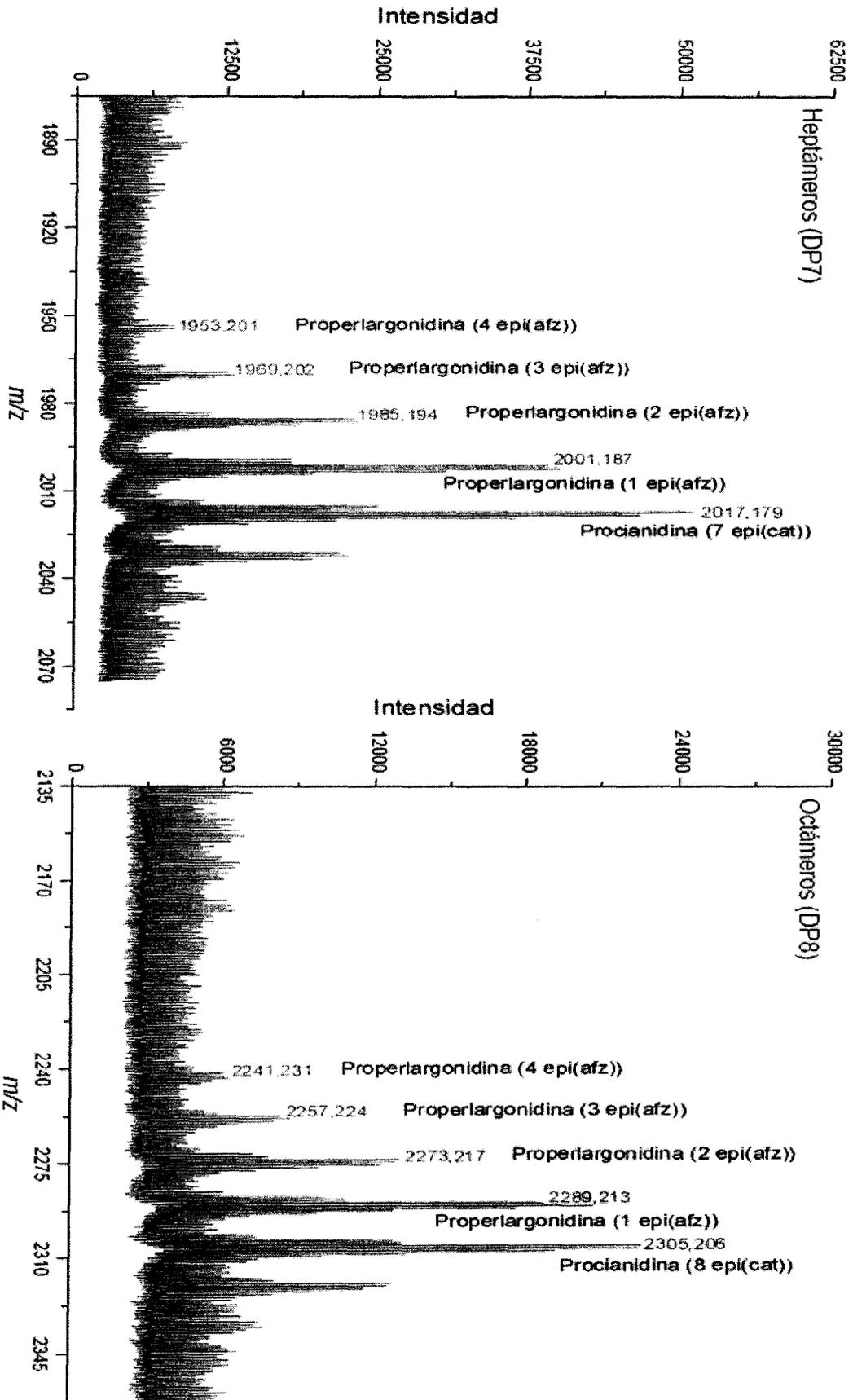


FIG. 4C

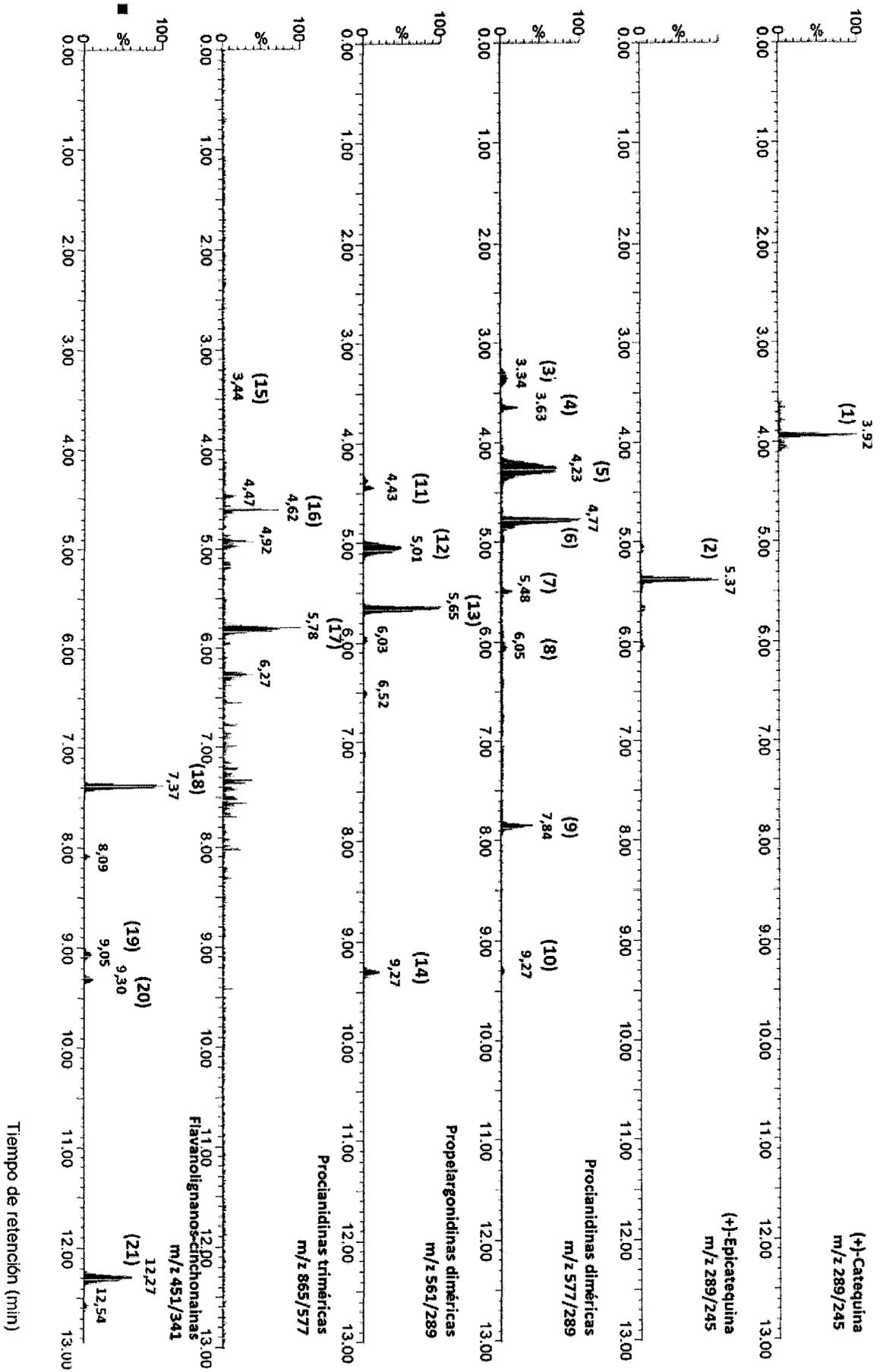


FIG. 5

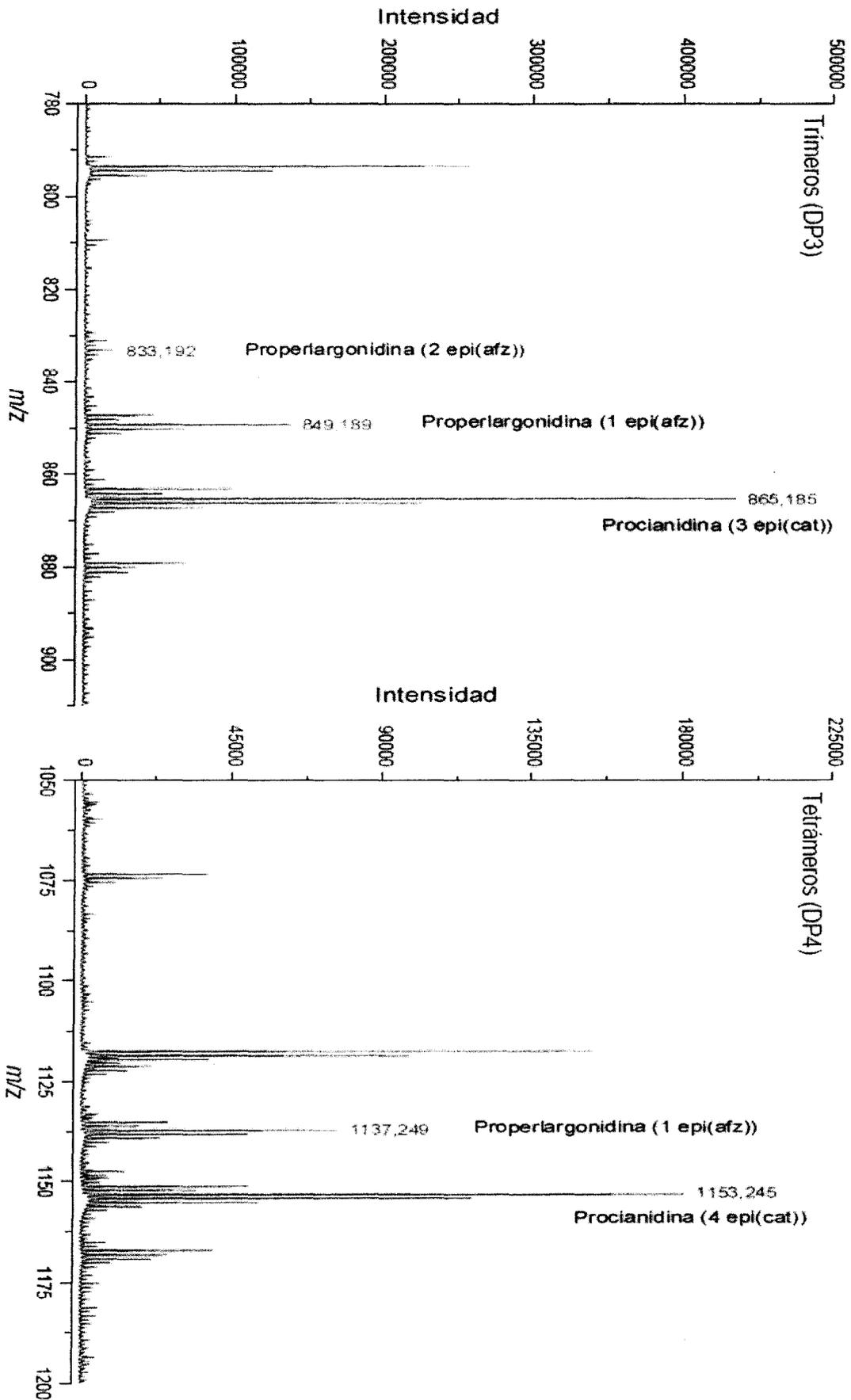


FIG. 6A

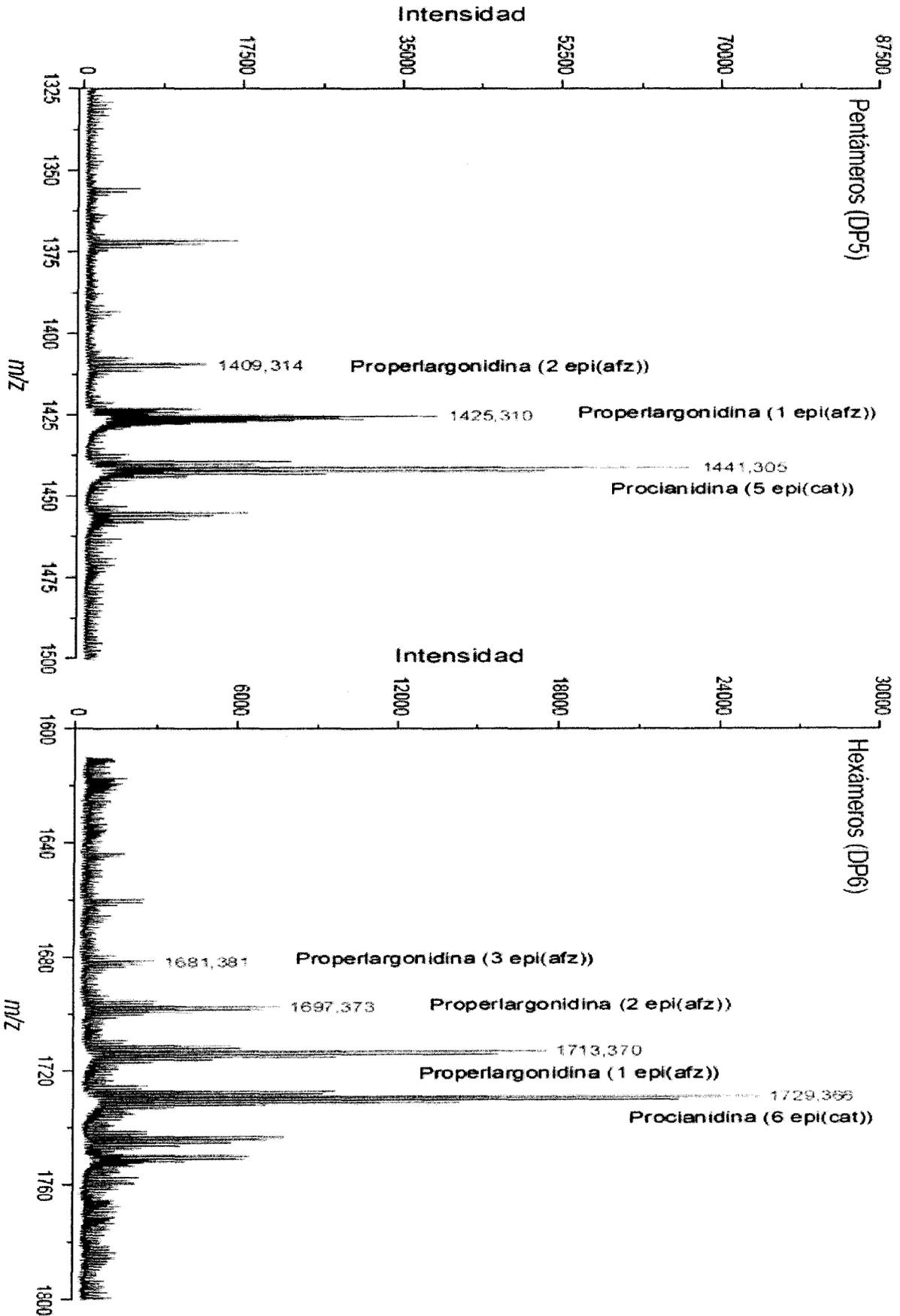


FIG. 6B

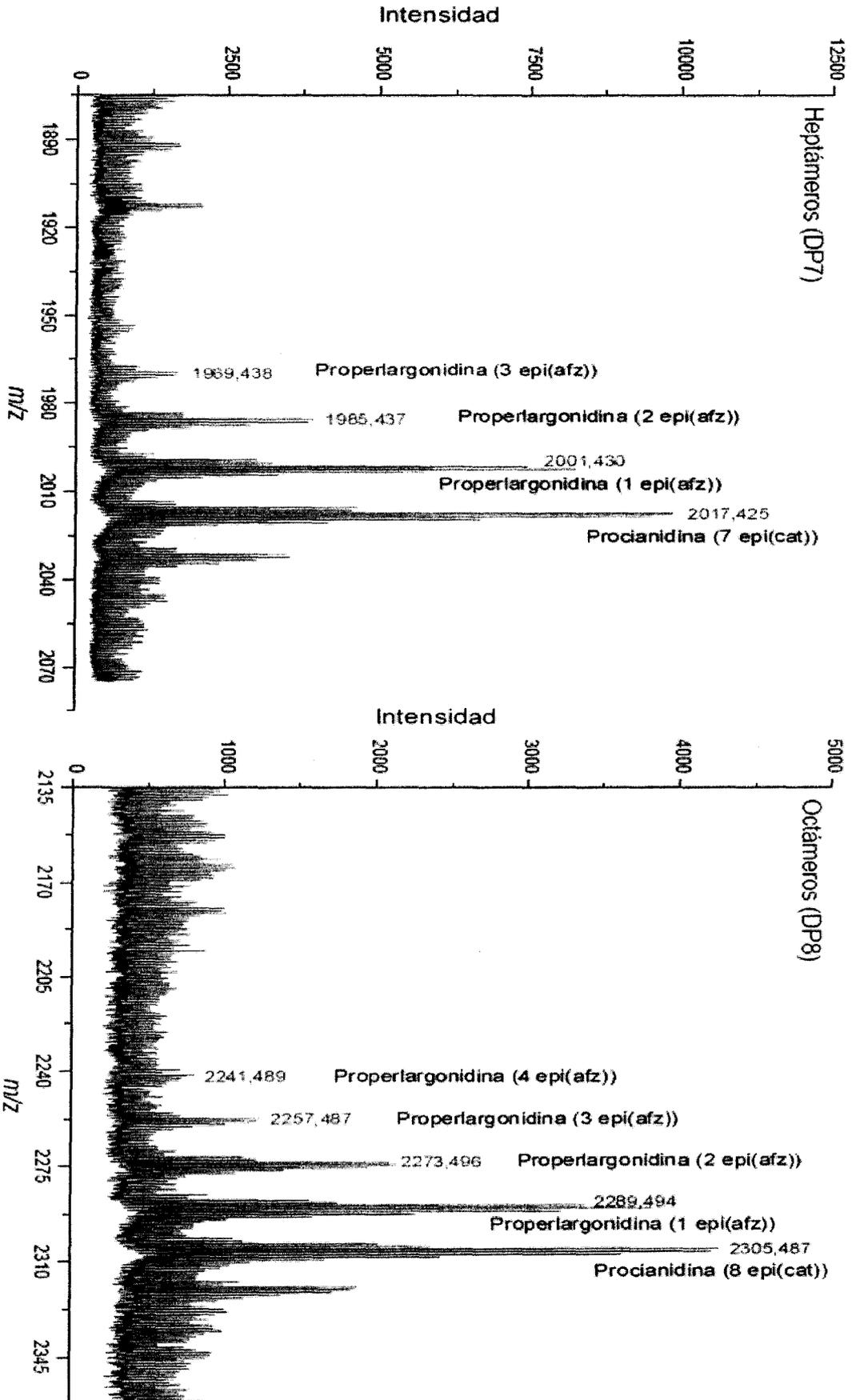


FIG. 6C

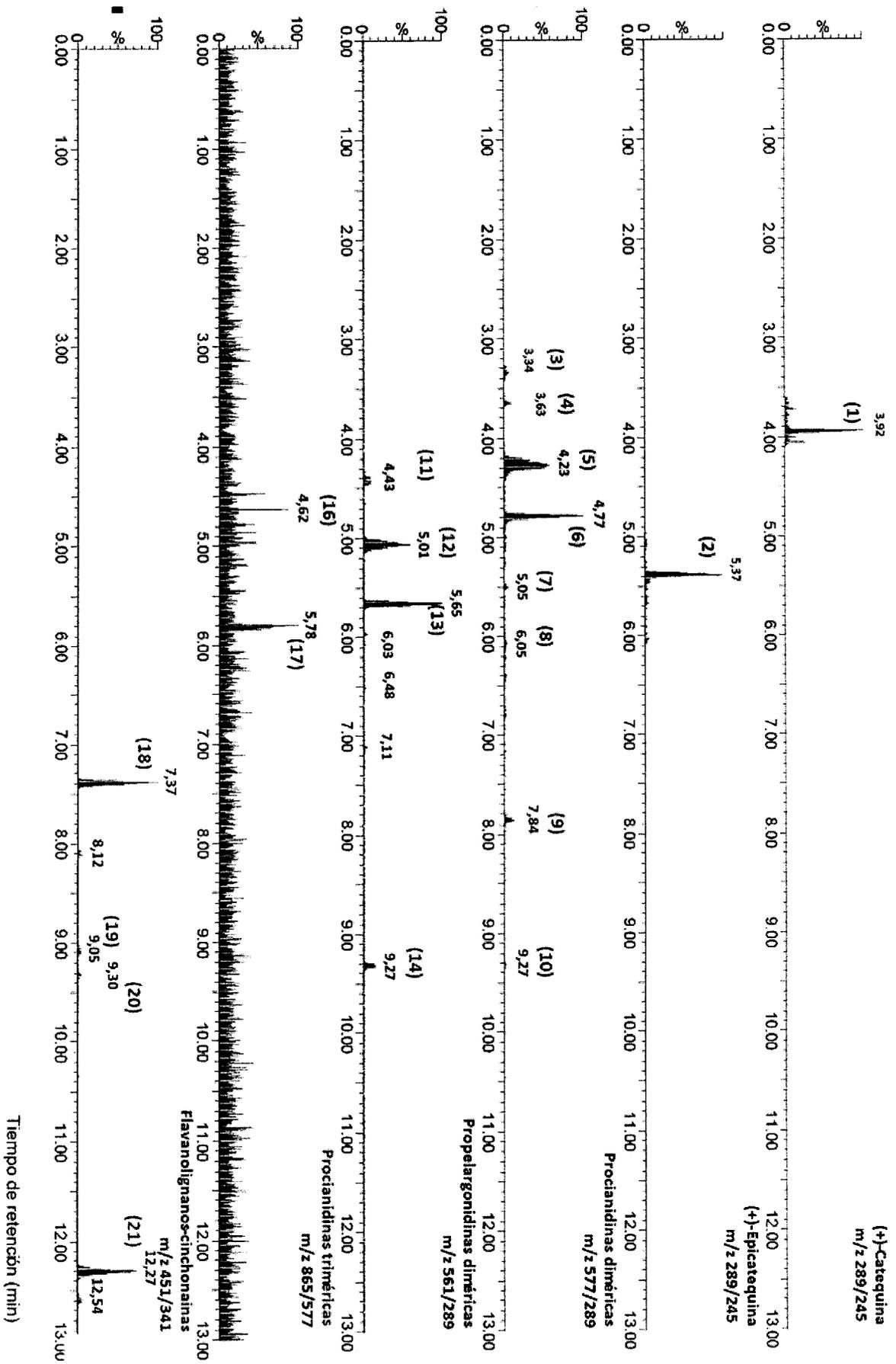


FIG. 7

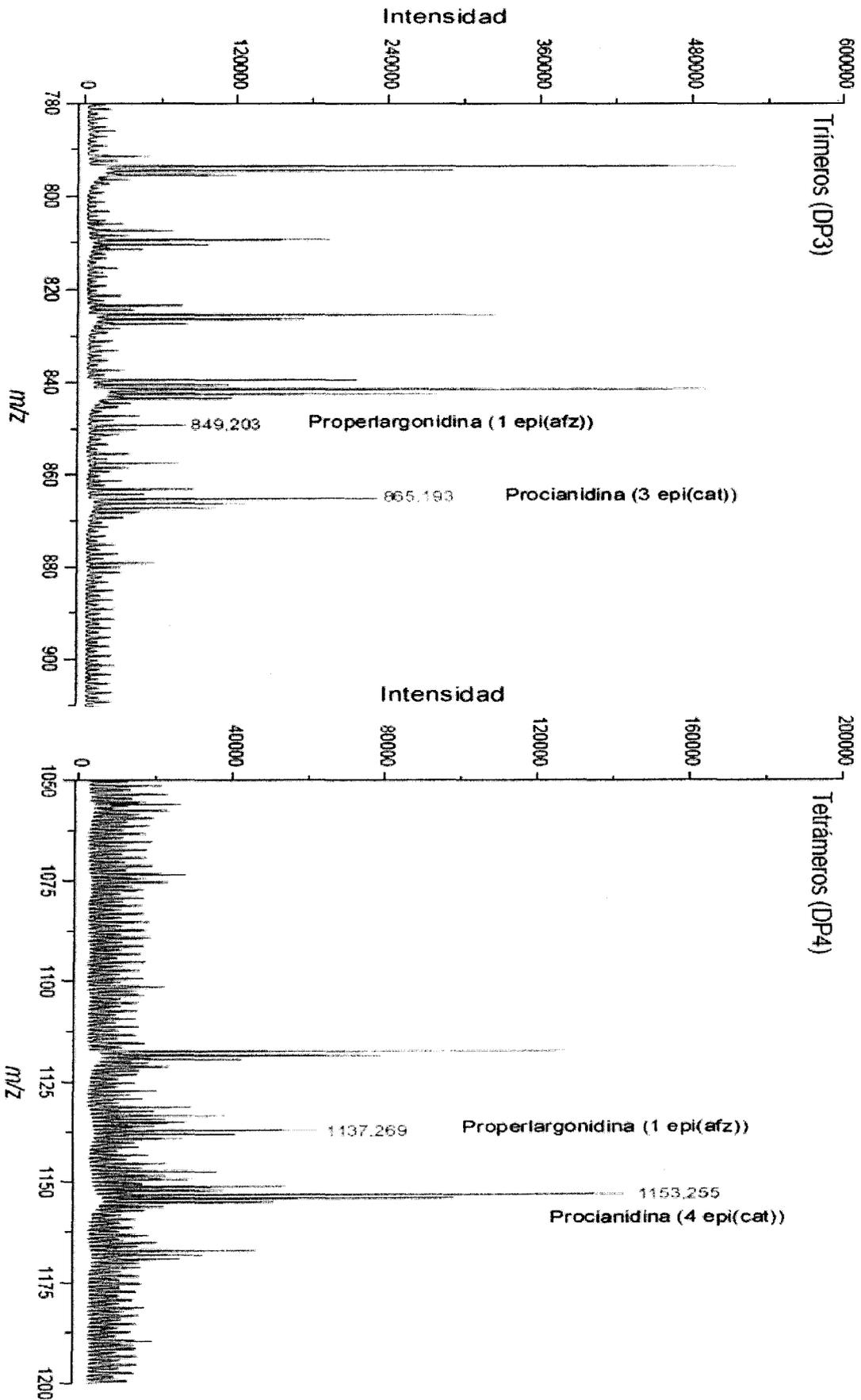


FIG. 8A

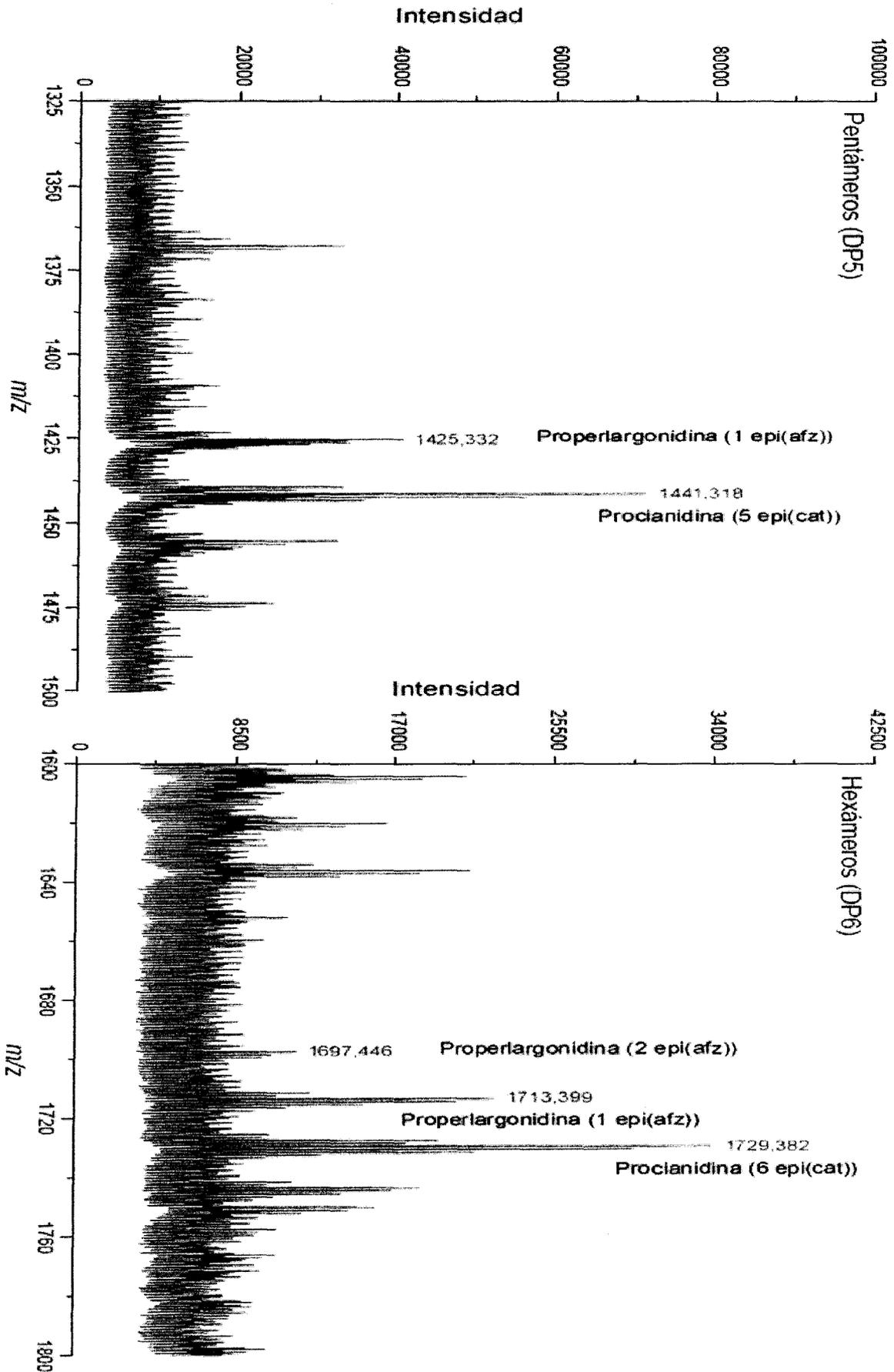


FIG. 8B

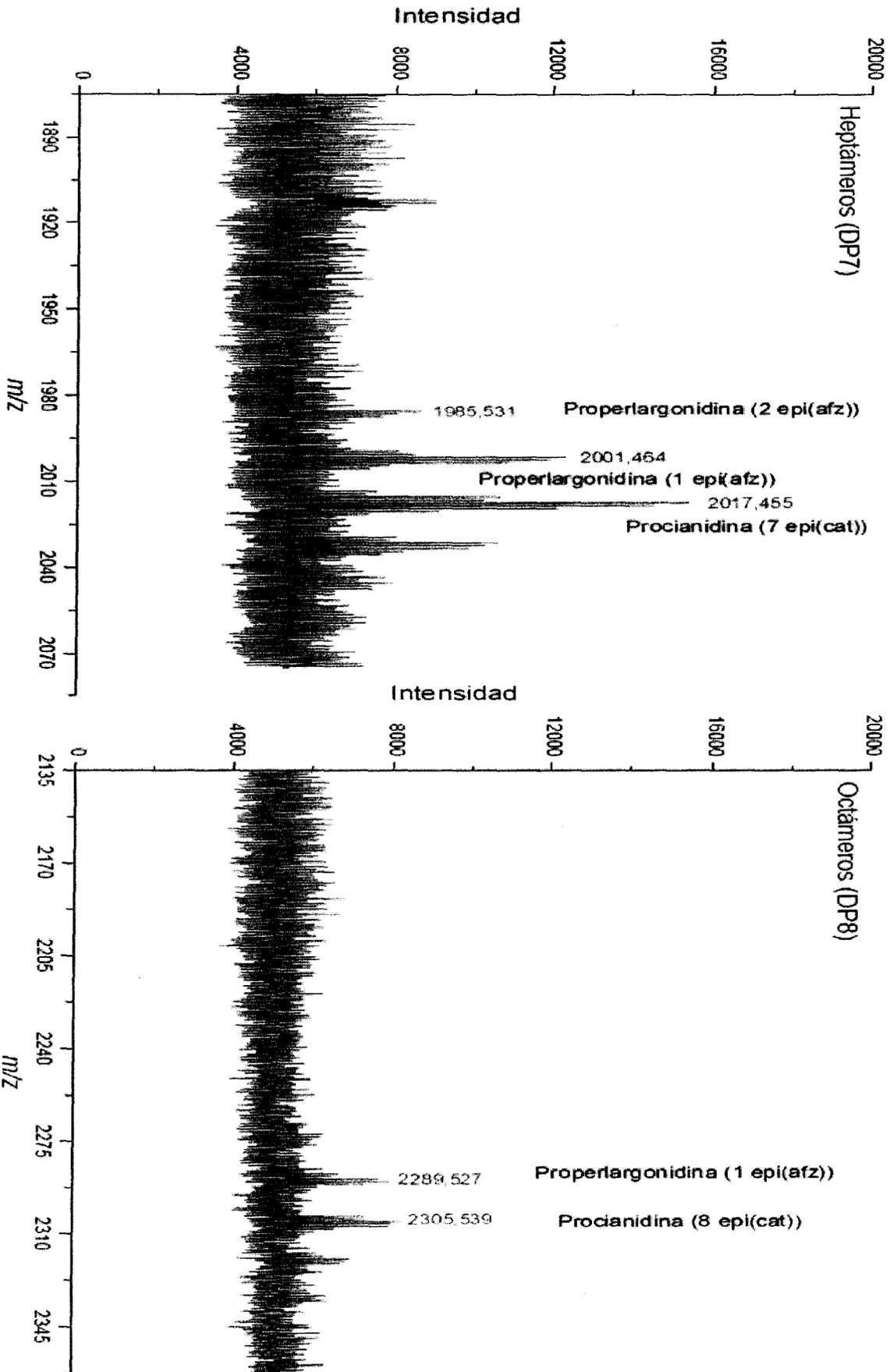


FIG. 8C

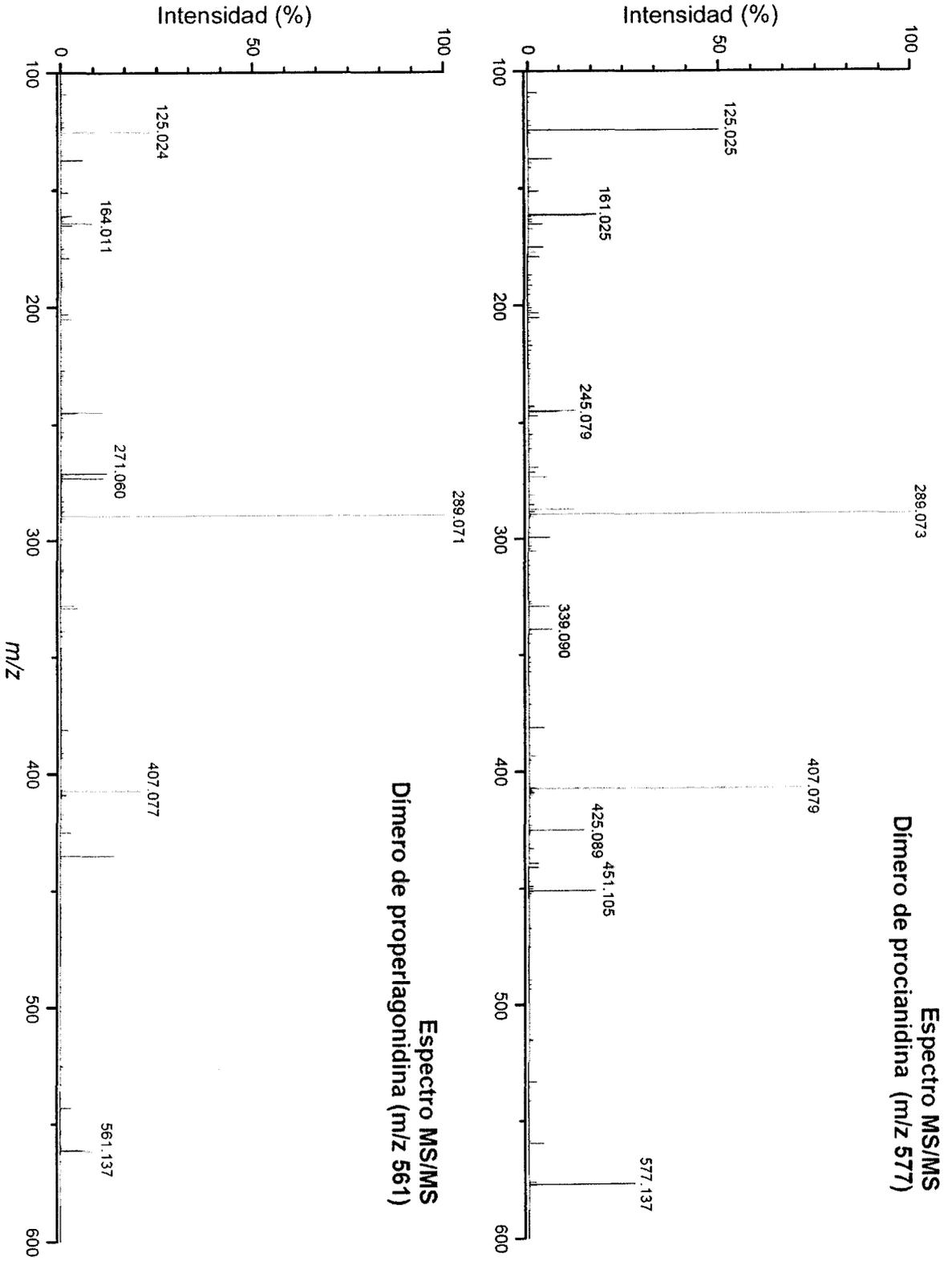


FIG. 9A

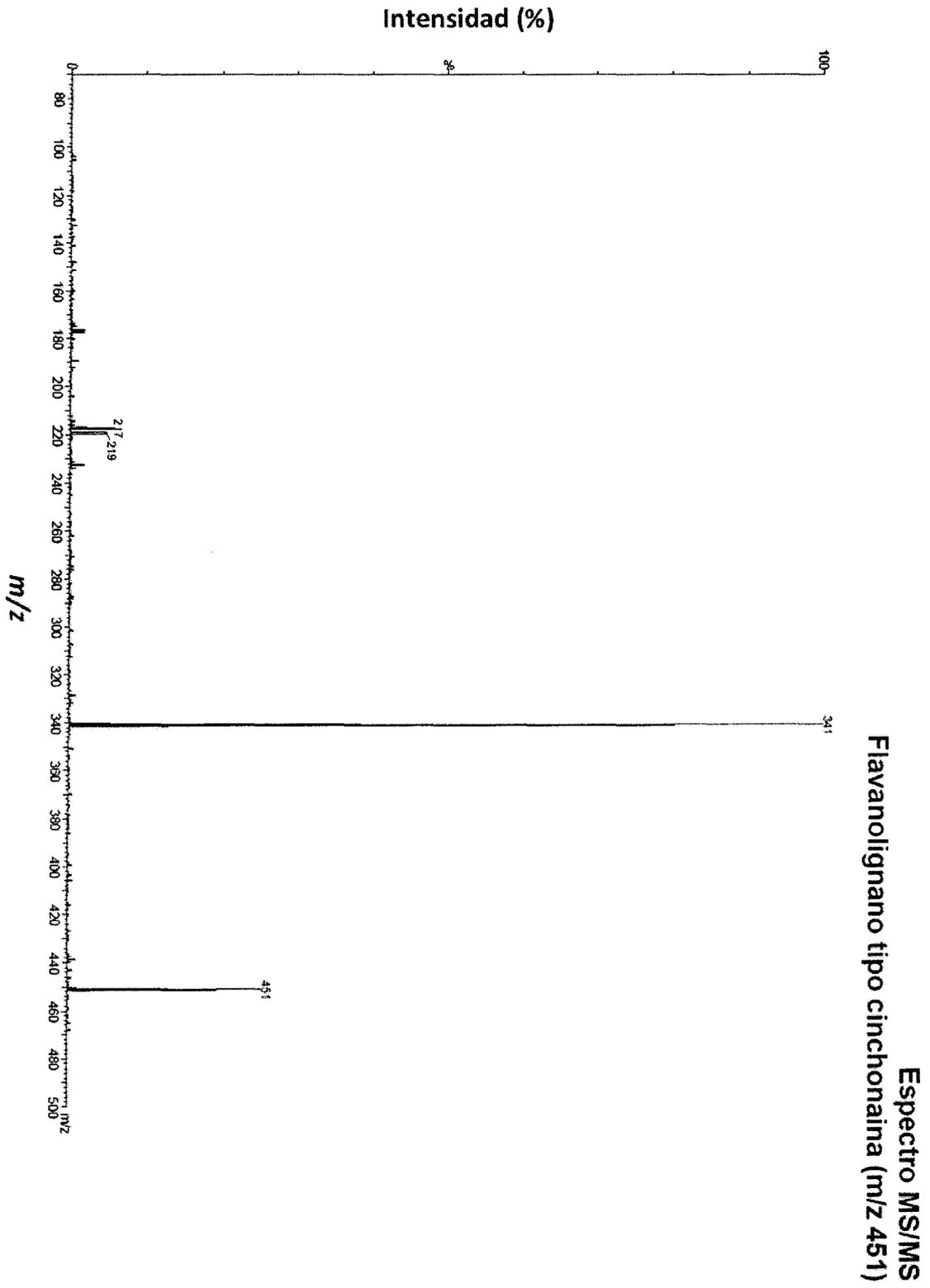


FIG. 9B