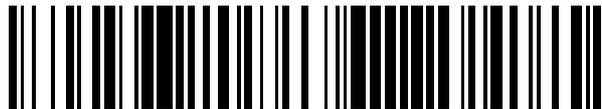


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 757**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/97** (2006.01)

**A61Q 19/08** (2006.01)

**A61K 36/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2006 E 06776215 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 1909750**

54 Título: **Extractos de semillas de uva obtenibles mediante fraccionamiento en una resina**

30 Prioridad:

**29.07.2005 IT MI20051485**

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

**28.04.2015**

73 Titular/es:

**INDENA S.P.A. (100.0%)  
VIA ORTLES, 12  
20139 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**GIORI, ANDREA y  
ANELLI, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 534 757 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Extractos de semillas de uva obtenibles mediante fraccionamiento en una resina

La presente invención se refiere a un extracto de semillas de uva obtenible mediante fraccionamiento en una resina y al procedimiento para su preparación.

- 5 El procedimiento de la invención proporciona un extracto partiendo de semillas de uva con un contenido variable en catequinas y epicatequinas (monómeros). Los productos obtenibles de acuerdo con la invención tienen acción antioxidante y se usan principalmente como cosméticos, complementos alimenticios (en particular como complementos cardioprotectores) y nutracéuticos.

### Antecedentes tecnológicos

- 10 El extracto total obtenido de la preparación de semillas de uva contiene una serie de metabolitos, en particular monómeros de catequina y epicatequina, oligómeros y polímeros de proantocianidol relacionados (procianidinas), así como polímeros y taninos de alto peso molecular.

El documento EP 275224 desvela un procedimiento de preparación de complejos fosfolipídicos de flavonoides de *Vitis vinifera*.

- 15 El documento WO 2005/36988 desvela un procedimiento de extracción de semillas de *Vitis vinifera* que consiste en la separación de la piel de las semillas inmediatamente después de preparar el extracto. Los extractos resultantes se caracterizan por un bajo contenido en polifenoles monoméricos.

- 20 El documento EP 348781, que es el estado más próximo de la técnica de la presente invención, desvela fracciones enriquecidas en oligómeros de procianidol obtenidos mediante la extracción de semillas de *Vitis vinifera* con éteres o mezclas de ésteres con hidrocarburos aromáticos y/o mediante filtración.

El documento EP 1035859 desvela el uso de complejos fosfolipídicos de extractos de *Vitis vinifera* para el tratamiento o la prevención de la aterosclerosis.

Los procedimientos conocidos tienen algunas desventajas, tales como el uso de disolventes tóxicos o la necesidad de plantas específicas o procedimientos complejos.

- 25 Existe, por lo tanto, la necesidad de un procedimiento conveniente, que se lleve a cabo industrialmente de un modo sencillo y proporcione extractos cuyos contenidos en componentes activos puedan ajustarse a voluntad.

### Divulgación de la Invención

- 30 El proceso de la invención es flexible en tanto que permite separar una serie de fracciones que difieren en los pesos moleculares (PM) de los derivados de catequina y epicatequina contenidos en su interior. Este procedimiento, permite de este modo preparar extractos ricos tanto en catequina como en epicatequina, con un contenido reducido en oligómeros y polímeros de proantocianidol (procianidinas), y extractos con características diametralmente opuestas, es decir, que tienen alto contenido en oligómeros y procianidinas y contenido reducido en monómeros (catequina y epicatequina), así como extractos que tienen cualquier contenido deseado en monómeros y procianidinas.

- 35 Dicha flexibilidad también concierne a la posibilidad de mezclar estas distintas fracciones para obtener productos finales con un contenido en monómeros predeterminado.

Los polímeros y taninos de alto peso molecular que contiene el extracto total se eliminan de las fracciones deseadas en las primeras etapas de la preparación mediante purificación parcial en agua, que se optimiza mediante el tratamiento posterior con polivinilpirrolidona (PVPP).

- 40 La purificación parcial en agua elimina solamente parte de los taninos (más del 50 % en p/p), pero solamente la purificación con PVPP reduce el contenido en taninos a menos del 5 % del peso del extracto final.

La presente invención difiere de los procedimientos de la técnica anterior para la preparación de productos derivados de semillas de uva en las siguientes características fundamentales:

- 45 i. La extracción de las semillas de uva se lleva a cabo sin la necesidad de controlar el pH, ya que no se usan productos químicos ácidos o básicos.  
 ii. La extracción y procedimiento de producción completo pueden llevarse a cabo usando solamente agua y etanol como disolventes.  
 iii. El proceso es flexible ya que permite ajustar a voluntad el contenido en el extracto final en monómeros y oligómeros.  
 iv. Se eliminan los polímeros y taninos de alto peso molecular.

50

En su conjunto, el procedimiento de la invención implica cuatro etapas principales:

- a) Extracción de semillas de uva con un disolvente (extracto total);
- b) Eliminación de taninos insolubles en agua;
- c) Eliminación de taninos solubles en agua;
- 5 d) Separación de productos con distinto PM, a través de purificación cromatográfica en una columna.

La etapa (a) se efectúa mediante la extracción de semillas de uva con acetona o un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, o mezclas o soluciones acuosas de los mismos disolventes siempre que el contenido en agua no exceda el 90 % (v/v). Se prefiere una solución de agua-etanol del 40 % en v/v.

- 10 La temperatura de extracción puede variar de 0 °C a la temperatura de ebullición del disolvente, y preferentemente es de 70 °C.

La etapa (b), que permite eliminar del extracto los taninos insolubles en agua, en particular los de alto peso molecular, se efectúa enfriando el extracto de la etapa (a) y filtrando o centrifugando los materiales insolubles.

La etapa (c) puede llevarse a cabo para eliminar cualquier tanino que esté aún presente del extracto de la etapa (b). Estos metabolitos se eliminan usando polivinilpirrolidona (PVPP).

- 15 La etapa (d) permite fraccionar el extracto eliminando la mayor parte de los metabolitos secundarios no útiles (azúcares y similares), mientras que conserva las procianidinas. Esta etapa consiste en una separación cromatográfica a través de adsorción a una resina polimérica. Son ejemplos de resinas para este fin las resinas de estireno-DVB tales como AmberliteHP20<sup>®</sup> o Rohm y Haas XAD1180<sup>®</sup>, o resinas acrílicas tales como Rohm y Haas XAD7HP<sup>®</sup>.

- 20 El extracto total obtenido de las semillas de uva se concentra hasta un residuo seco que varía del 5 % al 50 % en p/p, preferentemente el 10 % (p/p), y se deja reposar a una temperatura que varía de 1 °C a 25 °C, preferentemente a 4 °C, sin agitar, durante un tiempo que varía de 1 hora a 24 horas, preferentemente 16 horas.

- 25 La suspensión resultante se centrifuga a 4 °C hasta eliminar el precipitado residual de la solución acuosa. La solución acuosa transparente se concentra en un evaporador rotatorio y se añade agua para obtener un residuo seco que varía del 5 % al 50 % en p/p, preferentemente el 10 % (p/p). En algunos casos, la solución puede ser bien de agua-alcohol o agua-acetona, en lugar de solamente acuosa. Esto depende del producto acabado deseado: por ejemplo, cuando se desea un producto con un alto contenido en monómeros y oligómeros de catequina, se usa preferentemente una solución acuosa, de otro modo se usan bien las soluciones de agua-alcohol o de agua-acetona.

- 30 Por lo tanto, cuando se van a eliminar fracciones de bajo peso molecular del producto final, la solución a cargar en la columna debe tener un residuo seco que varíe del 5 % al 50 % en p/p, así como un contenido en alcohol (alcoholes C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) o acetona que varíe del 5 % al 30 % en v/v, preferentemente un 10 % en v/v. La solución preparada de este modo se adsorbe en la resina, mientras que la solución no retenida se elimina.

- 35 Después de eso, la resina se lava con agua-alcohol (alcoholes C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, preferentemente etanol) o con solución de agua-acetona para eliminar los metabolitos secundarios no deseados. El disolvente debe tener un contenido en agua que varíe del 100 % al 70 % en v/v, preferentemente un 90 % en v/v. La solución de lavado que sale de las columnas se deshecha.

- 40 El producto se eluye con una solución de agua-alcohol (alcoholes C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>), preferentemente con etanol, con un contenido en agua que varía del 50 % al 5 % en v/v, preferentemente un 30 % en v/v. La solución de alcohol puede reemplazarse opcionalmente con una solución de agua-acetona con un contenido en agua que varía del 50 % al 0 % en v/v, preferentemente un 30 % en v/v,

La invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

#### Extracción de semillas de uva con una solución de agua-alcohol (etapa a)

- 45 En esta etapa, se prepara el extracto total que se usa como material de partida para la separación en cromatografía de columna posterior.

- 50 Se cubren 1000 g de semillas de uva con 1,5 litros de etanol (40 % en v/v) a 70 °C durante 4 horas en un percolador estático recubierto. Después de 4 horas se recupera el percolado y se extrae 7 veces más en las mismas condiciones, pero usando 1 litro de disolvente para cada extracción, para obtener aproximadamente 8 litros de percolado total. Los percolados combinados se filtran en caliente con succión y se concentran mediante un evaporador rotatorio a 60 °C a presión reducida. Este extracto tiene un residuo seco total de 228 g, siendo el rendimiento del material de partida del 22,8 % en p/p. El percolado se concentra para obtener 2,28 kg de una suspensión totalmente acuosa con el 10 % de residuo seco en p/p.

**Ejemplo 2**

Extracción de semillas de uva con una solución de agua-acetona (etapa a)

En esta etapa, se prepara el extracto total que puede usarse como material de partida para la separación cromatografía de columna posterior.

- 5 Se cubren 1000 g de semillas de uva con 1,5 litros de acetona al 40 % en v/v a 70 °C durante 4 horas en un percolador estático recubierto o en un reactor recubierto equipado con un agitador. Después de 4 horas se recupera el percolado y se extrae 7 veces más en las mismas condiciones, pero usando 1 litro de disolvente para cada extracción, para obtener aproximadamente 8 litros de percolado total. Los percolados combinados se filtran en caliente con succión y se concentran mediante un evaporador rotatorio a 60 °C a presión reducida. Este extracto tiene un residuo seco total de 235,6 g, siendo el rendimiento del material de partida del 23,56 % en p/p.

El percolado se concentra para obtener 2,35 kg de una suspensión totalmente acuosa con un residuo seco del 10 % en p/p.

**Ejemplo 3**

Purificación del extracto obtenido de semillas de uva (etapa b): eliminación de los materiales insolubles en agua

- 15 La suspensión acuosa resultante de la extracción en agua-alcohol de la etapa (a) (Ejemplo 1) se enfría a 4 °C y se deja reposar durante 16 horas, después, la suspensión acuosa aún fría se centrifuga a 3000 g durante 20 minutos para separar el residuo precipitado de la solución acuosa transparente. El residuo, rico en productos de alto peso molecular, se desecha.

- 20 La solución transparente resultante tiene un residuo seco equivalente a 168 g de extracto parcialmente purificado que tiene un contenido en catequinas por HPLC del 3,74 %, y un contenido en epicatequinas por HPLC del 2,87 %, y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) del 6,62 % en p/p. El rendimiento en peso del material de partida es del 16,8 % en p/p.

- 25 Todos los procedimientos de purificación en columnas cromatográficas que se describen en lo sucesivo en el presente documento (4 procedimientos distintos) pueden aplicarse a esta solución. Para abreviar, solamente el Ejemplo 5 (haciendo uso del procedimiento 2), que no es parte de la invención, se notificará a modo de ejemplo de purificación directa de esta solución. Todos los demás procedimientos que se describen posteriormente se aplicarán a la solución tratada con PVPP.

**Ejemplo 4**

Purificación del extracto obtenido de semillas de uva (etapa b): eliminación de los materiales insolubles en agua

- 30 La suspensión acuosa resultante de la extracción con agua-acetona de la etapa (a) (Ejemplo 2) se enfría 4 °C y se deja reposar durante 16 horas, después, la suspensión acuosa aún fría se centrifuga a 3000 g durante 20 minutos para separar el residuo precipitado de la solución acuosa transparente. El residuo, rico en productos de alto peso molecular, se desecha.

- 35 La solución transparente resultante tiene un residuo seco de 173 g de extracto parcialmente purificado que tiene un contenido en catequinas por HPLC del 4,21 %, un contenido en epicatequinas por HPLC del 2,70 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 6,91 % en p/p. El rendimiento en peso del material de partida de este extracto es del 17,3 % en p/p.

- 40 Todos los procedimientos de purificación cromatográfica que se describen en lo sucesivo en el presente documento (4 procedimientos distintos) se pueden aplicar a esta solución. Para abreviar, solamente el Ejemplo 6 (haciendo uso del procedimiento 3), que no es parte de la invención, se notificará a modo de ejemplo de purificación directa de esta solución. Todos los demás procedimientos que se describen posteriormente se aplicarán a la solución tratada con PVPP.

**Ejemplo 5 (no forma parte de la invención)**

Purificación del extracto obtenido de semillas de uva: procedimiento 1 (etapa d)

- 45 La solución acuosa transparente que tiene un residuo seco de 168 g, obtenida al final del procedimiento de purificación parcial que se describe en la etapa (b) (Ejemplo 3), se concentra hasta un residuo seco del 10 % en p/p. Esta solución transparente de extracto parcialmente purificado tiene un residuo seco que tiene un contenido en catequinas por HPLC del 3,75 %, un contenido en epicatequinas por HPLC del 2,87 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 6,62 % en p/p.

- 50 Esta solución acuosa se calienta a temperatura ambiente, después, se carga en una columna cromatográfica que contiene 3300 ml de resina Rohm y Haas XAD7HP® acondicionada con agua. La solución de agua se adsorbe a la

resina, mientras que la solución no retenida que sale de la columna se deshecha. La resina se lava después con 6,6 litros de agua, eliminando también esta solución ya que su contenido en monómeros es despreciable y el contenido en procianidinas es bajo. Estas soluciones acuosas descartadas (producto 1) tienen un residuo seco total de 69 g (rendimiento en peso del material de partida: 6,9 % en p/p.), un contenido en catequinas por HPLC del 0,09 %, y un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,10 %, siendo el contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) del 0,19 % en p/p.

La columna se eluye con 9 litros de etanol acuoso al 90 % en v/v. El eluato resultante se recupera y se seca a 60 °C a presión reducida, para rendir 98 gramos de producto seco (producto 2), que corresponden a un rendimiento sobre el material de partida del 9,80 % en p/p. Este producto tiene un contenido en catequinas por HPLC del 6,25 %, un contenido en epicatequinas por HPLC del 4,77 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 11,02 % en p/p.

### **Ejemplo 6 (no forma parte de la invención)**

#### Purificación del extracto obtenido de semillas de uva: procedimiento 2 (etapa d)

La solución acuosa transparente que tiene un residuo seco de 173 g, obtenida mediante una extracción en agua-acetona (etapa a; Ejemplo 2) seguida de la purificación parcial tal como se describe en la etapa (b) (Ejemplo 4), se concentra hasta un residuo seco del 10 % en p/p.

Después de eso, esta solución acuosa se lleva a temperatura ambiente, después, se carga en una columna cromatográfica que contiene 3300 ml de resina Rohm y Haas XAD1180®; la solución no retenida se elimina. La resina se lava con 6 litros de agua, y la solución de lavado se combina con la no retenida. La solución acuosa resultante se seca para obtener el producto 3, que tiene un residuo seco de 99,4 g, un contenido en catequinas por HPLC del 1,29 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,46 % en p/p.

La resina se lava después con 6 litros de acetona al 10 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 4). Dicho producto tiene un residuo seco de 23,9 g, un contenido en catequinas por HPLC del 13,5 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 8,41 % en p/p.

La resina se lava después con 6 litros de acetona al 20 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 5). Dicho producto tiene un residuo seco de 15,3 g, un contenido en catequinas por HPLC del 14,3 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 10,9 % en p/p.

La resina se lava después con 6 litros de acetona al 30 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 6). Dicho producto tiene un residuo seco de 14,95 g, un contenido en catequinas por HPLC del 2,21 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 2,04 % en p/p.

La resina se lava después con 6 litros de acetona al 40 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 7). Dicho producto tiene un residuo seco de 14,2 g, un contenido en catequinas por HPLC del 1,06 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 0,66 % en p/p.

La resina se lava después con 6 litros de acetona al 50 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 8). Dicho producto tiene un residuo seco de 3,51 g, un contenido en catequinas por HPLC del 0,67 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 0,46 % en p/p.

Los productos resultantes pueden mezclarse a voluntad para obtener un producto con el contenido deseado en monómeros. Por ejemplo, puede obtenerse un producto con un contenido en monómeros reducido mezclando 3,51 g del producto 8 con 14,2 g del producto 7 para obtener 17,71 g de un producto que tenga un contenido en catequinas por HPLC del 0,98 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 0,62 % en p/p, un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) del 1,60 % en p/p. Como alternativa, 3,51 g del producto 8 pueden mezclarse con 14,2 g del producto 7 y con 15,0 g del producto 4 para obtener 32,71 g de un producto que tenga un contenido en catequinas por HPLC del 1,12 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,55 % en p/p y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 1,67 % en p/p.

Por otro lado, puede obtenerse un producto con un alto contenido mezclando 23,9 g del producto 4 con 15,3 g del producto 5, para obtener 39,2 g de un producto que tenga un contenido en catequinas por HPLC del 13,81 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 9,38 % en p/p, y contenido total de monómeros por HPLC (catequina + epicatequina) del 23,19 % en p/p.

### **Ejemplo 7**

#### Eliminación de los taninos solubles en agua del extracto obtenido de semillas de uva (etapa c)

La solución acuosa transparente obtenida de la purificación parcial de la etapa b (Ejemplo 3), que tiene un residuo seco de 168 g, se trata para eliminar los taninos solubles en agua. A la solución se le añaden 34 g de PVPP, que corresponden a aproximadamente el 20 % en p/p del peso del residuo seco del extracto a tratar.

Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la PVPP se filtra a través de un filtro plisado. La solución resultante tiene un residuo seco de 160 g de extracto parcialmente purificado que tiene un contenido en taninos del 2,7 % en p/p.

El rendimiento en peso del material de partida es del 16,0 % en p/p.

#### 5 **Ejemplo 8**

##### Eliminación de los taninos solubles en agua del extracto obtenido de semillas de uva (etapa c)

La solución acuosa transparente obtenida de la purificación parcial de la etapa b (Ejemplo 4) y que tiene un residuo seco de 168 g, se trata para eliminar los taninos solubles en agua. A la solución se le añaden 52 g de PVPP, que corresponden a aproximadamente el 30 % en p/p del peso del residuo seco del extracto a tratar.

10 Después de agitar durante 1 h a temperatura ambiente, la PVPP se filtra a través de un filtro plisado.

La solución resultante tiene un residuo seco de 163 g de extracto parcialmente purificado que tiene un contenido en taninos del 1,5 %,

El rendimiento en peso del material de partida es del 16,3 % en p/p.

#### **Ejemplo 9**

15 Purificación del extracto obtenido de semillas de uva: procedimiento 1 (etapa d)

La solución acuosa transparente que tiene un residuo seco de 160 g, obtenida de la purificación parcial de la etapa (c) (Ejemplo 7), se concentra hasta un residuo seco del 10 % en p/p. Esta solución transparente de extracto parcialmente purificado tiene un residuo seco con un contenido en catequinas por HPLC del 3,87 %, un contenido en epicatequinas por HPLC del 2,96 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 6,83 % en p/p.

20 Esta solución acuosa se lleva a temperatura ambiente, después, se carga en una columna cromatográfica que contiene 3200 ml de resina Rohm y Haas XAD7HP® acondicionada con agua. La solución acuosa se adsorbe a la resina, mientras que la solución no retenida que sale de la columna se deshecha. La resina se lava después con 6,4 litros de agua, eliminando también esta solución ya que su contenido en monómeros es despreciable y el de procianidinas es bajo. Estas soluciones acuosas desechadas (producto 9) tienen un residuo seco total de 65 g (rendimiento en peso del material de partida: 6,5 % en p/p.), un contenido en catequinas por HPLC del 0,09 %, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,10 %, siendo el contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) del 0,19 % en p/p.

25 La columna se eluye con 9 litros de etanol acuoso al 90 % en v/v. El eluato resultante se recupera y se seca a 60 °C a presión reducida, para rendir 95 gramos de producto seco (producto 10), que corresponde a un rendimiento del 9,50 % en p/p del material de partida. Este producto tiene un contenido en catequinas por HPLC del 6,34 %, un contenido en epicatequinas por HPLC del 4,85 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 11,19 % en p/p.

#### **Ejemplo 10**

##### Purificación del extracto obtenido de semillas de uva: procedimiento 3 (etapa d)

35 La solución acuosa transparente que tiene un residuo seco de 160 g, obtenida de la purificación parcial de la etapa (c) (Ejemplo 7), se concentra hasta un residuo seco del 10 % en p/p.

40 Esta solución acuosa transparente se lleva a temperatura ambiente, después, se carga en una columna cromatográfica que contiene 1600 ml de resina Rohm y Haas XAD1180®. La solución acuosa se adsorbe a la resina, mientras que la solución no retenida que sale de la columna se elimina. La resina se lava después con 3 litros de agua, y se recoge la solución de lavado que se combina con la no retenida. La solución acuosa resultante se seca para obtener el (producto 11). Dicho producto tiene un residuo seco de 106,2 g, un contenido en catequinas por HPLC del 1,39 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,95 % en p/p.

45 La resina se lava después con 3 litros de etanol (10 % en v/v), después, la solución resultante se recoge y se seca (producto 12). Dicho producto tiene un residuo seco de 12,0 g, un contenido en catequinas por HPLC del 12,0 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 7,80 % en p/p.

La resina se lava después con 3 litros de etanol (20 % en v/v), la solución resultante se recoge y se seca (producto 13). Dicho producto tiene un residuo seco de 14,7 g, un contenido en catequinas por HPLC del 11,5 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 9,23 % en p/p.

50 La resina se lava después con 3 litros de etanol (30 % en v/v), la solución resultante se recoge y se seca (producto 14). Dicho producto tiene un residuo seco de 20,0 g, un contenido en catequinas por HPLC del 6,49 % en p/p, un contenido

en epicatequinas por HPLC del 5,76 % en p/p.

La resina se lava después con 3 litros de etanol (40 % en v/v), la solución resultante se recoge y se seca (producto 15). Dicho producto tiene un residuo seco de 5,08 g, un contenido en catequinas por HPLC del 2,84 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 2,59 % en p/p.

- 5 La resina se lava después con 3 litros de etanol (50 % en v/v), la solución resultante se recoge y se seca (producto 16). Dicho producto tiene un residuo seco de 1,55 g, un contenido en catequinas por HPLC del 0,51 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,35 % en p/p.

Los productos resultantes pueden mezclarse a voluntad para obtener un producto con el contenido deseado en monómeros. Por ejemplo, puede obtenerse un producto con un contenido en monómeros reducido mezclando 1,55 g del producto 16 con 5,08 g del producto 15 para obtener 6,63 g de un producto que tenga un contenido en catequinas por HPLC del 2,26 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 2,11 % en p/p y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC de 4,37 % en p/p o pueden mezclarse 1,55 g del producto 16 con 7,00 g del producto 11 para obtener 8,55 g de un producto que tiene un contenido en catequinas por HPLC del 1,19 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,89 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 2,08 % en p/p.

Por otro lado, puede obtenerse un producto con un alto contenido en monómeros mezclando 12,0 g del producto 12 con 12,0 g del producto 13 y con 15,0 g del producto 14, para obtener 39,0 g de un producto que tenga un contenido en catequinas por HPLC del 9,73 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 7,46 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 17,19 % en p/p, o pueden mezclarse 12,0 g del producto 12 con 12,0 g del producto 13 para obtener 24,0 g de producto que tienen un contenido en catequinas por HPLC del 11,75 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 8,52 % en p/p, y un contenido total de monómeros por HPLC (catequina + epicatequina) del 20,27 % en p/p.

### Ejemplo 11

#### Purificación del extracto obtenido de semillas de uva: procedimiento 4 (etapa d)

- 25 La solución acuosa transparente que tiene un residuo seco de 160 g, obtenida de la purificación parcial de la etapa (c) (Ejemplo 7), se concentra hasta un residuo seco del 10 % en p/p.

Esta solución acuosa transparente se concentra a un residuo seco (12 % en p/p), después se le añaden 320 ml de etanol (95 % en v/v), para obtener un residuo seco de aproximadamente el 10 % en p/p y un contenido en etanol de aproximadamente (20 % en p/p). Esta solución de agua-alcohol se lleva a temperatura ambiente, después, se carga en una columna cromatográfica que contiene 1600 ml de resina Rohm y Haas XAD1180®. La solución no retenida que sale de la columna se elimina. La resina se lava después con 9,60 litros de etanol al 20 % en v/v, eliminando también la solución de lavado, que tiene un residuo seco de 135,6 g, un contenido en catequinas por HPLC del 4,37 % en p/p, un contenido en catequinas por HPLC del 3,35 % en p/p, y contenido total de monómeros por HPLC (catequina + epicatequina) del 7,72 % en p/p.

- 35 La columna se eluye con 6,60 litros de etanol acuoso al 70 % en v/v y el eluato que sale de la columna se recoge y se seca a 60 °C a presión reducida, para rendir un producto (producto 17) con un residuo seco de 24,3 g, un contenido en catequinas por HPLC del 0,79 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,62 % en p/p, y contenido total de monómeros por HPLC (catequina + epicatequina) del 1,41 % en p/p.

### Ejemplo 12

- 40 Purificación del extracto obtenido de semillas de uva: procedimiento 2 (etapa d)

La solución acuosa transparente que tiene un residuo seco de 163 g, obtenida de la extracción en agua-acetona de la etapa (a) (Ejemplo 2) seguida de purificación parcial de la etapa (b) (Ejemplo 4) y eliminación de taninos de la etapa (c) (Ejemplo 8), se concentra hasta un residuo seco del 10 % en p/p.

45 Esta solución acuosa transparente se lleva a temperatura ambiente, después, se carga en una columna cromatográfica que contiene 3200 ml de resina Rohm y Haas XAD7HP® condicionada con agua. La solución de agua-alcohol se adsorbe a la resina, mientras que la solución no retenida que sale de la columna se elimina. La resina se lava después con 6,4 litros de agua, eliminando también esta solución ya que su contenido en monómeros es despreciable y el contenido en procianidinas es bajo. Estas soluciones acuosas descartadas (producto 18) tienen un residuo seco total de 62,5 g (rendimiento en peso frente al material de partida: 6,3 % en p/p.), un contenido en catequinas por HPLC del 0,11 %, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,14 %, y un contenido total de monómeros por HPLC (catequina + epicatequina) del 0,25 % en p/p.

50 La columna se eluye con 9 litros de acetona acuosa al 90 % en v/v y el eluato que sale de la columna se recoge y se seca a 60 °C a presión reducida, para rendir 99,8 g de un producto seco (producto 19) (el rendimiento frente al material de partida: 10 % en p/p.) Este producto tiene un contenido en catequinas por HPLC del 7,11 %, un contenido en

epicatequinas por HPLC del 4,52 %, y un contenido total de monómeros por HPLC (catequina + epicatequina) del 11,63 % en p/p.

### **Ejemplo 13**

#### Purificación del extracto obtenido de semillas de uva: procedimiento 3 (etapa d)

- 5 La solución acuosa transparente que tiene un residuo seco de 163 g, obtenida de la extracción en agua-acetona de la etapa a (Ejemplo 2) seguida de la purificación parcial de la etapa (b) (Ejemplo 4) y eliminación de taninos de la etapa c (Ejemplo 8), se concentra hasta un residuo seco del 10 % en p/p.

Esta solución acuosa se lleva a temperatura ambiente, después, se carga en una columna cromatográfica que contiene 3200 ml de resina Rohm y Haas XAD1180® acondicionada con agua.

- 10 La solución de acuosa se adsorbe a la resina, mientras que la solución no retenida que sale de la columna se elimina. La resina se lava después con 6 litros de agua, eliminando también esta solución que se combina con la no retenida. La solución acuosa resultante se seca para obtener un producto (producto 20). Dicho producto tiene un residuo seco de 106,4 g, un contenido en catequinas por HPLC del 1,58 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,47 % en p/p.

- 15 La resina se lava después con 6 litros de acetona al 20 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 22). Dicho producto tiene un residuo seco de 11,7 g, un contenido en catequinas por HPLC del 16,8 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 15,2 % en p/p.

- 20 La resina se lava después con 6 litros de acetona al 30 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 23). Dicho producto tiene un residuo seco de 11,8 g, un contenido en catequinas por HPLC del 2,20 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 2,20 % en p/p.

La resina se lava después con 6 litros de acetona al 40 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 24). Dicho producto tiene un residuo seco de 10,2 g, un contenido en catequinas por HPLC del 1,15 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,75 % en p/p.

- 25 La resina se lava después con 6 litros de acetona al 50 % en v/v, la solución resultante se recoge y se seca (producto 25). Dicho producto tiene un residuo seco de 3,04 g, un contenido en catequinas por HPLC del 0,71 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,43 % en p/p.

- 30 Los productos resultantes pueden mezclarse a voluntad para obtener un producto con el contenido deseado en monómeros. Por ejemplo, puede obtenerse un producto con un contenido en monómeros reducido mezclando 3,04 g del producto 25 con 10,2 g del producto 24 para obtener 13,24 g de producto que tenga un contenido en catequinas por HPLC del 1,05 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,68 % en p/p, y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 1,73 % en p/p, o pueden mezclarse 3,04 g del producto 25 con 10,2 g del producto 24 y con 15,0 g del producto 20 para obtener 28,24 g de un producto que tiene un contenido en monómeros por HPLC del 1,33 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 0,57 % y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 1,90 % en p/p.

- 35 Por otro lado, puede obtenerse un producto con un alto contenido en monómeros mezclando 19,6 g del producto 21 con 11,7 g del producto 22 para obtener 31,3 g de producto que tenga un contenido en catequinas por HPLC del 15,80 % en p/p, un contenido en epicatequinas por HPLC del 11,88 % en p/p, y un contenido total de monómeros (catequina + epicatequina) por HPLC del 27,76 % en p/p.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de extracción de semillas de *Vitis vinifera* que comprende:
- a) la extracción de semillas de uva con un disolvente que es un alcohol C1-C3; o mezclas o soluciones acuosas del mismo con un contenido en agua no superior al 90 % (en v/v).
  - 5 b) la eliminación de los taninos insolubles en agua enfriando el extracto de la etapa a) y filtrando o centrifugando los materiales insolubles;
  - c) la eliminación de taninos solubles en agua;
  - d) la separación de productos con distintos pesos moleculares, a través de purificación cromatográfica en una columna;
  - 10 **caracterizado porque** la etapa c) se lleva a cabo añadiendo polivinilpirrolidona (PPVP) al extracto de la etapa b).
2. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que el disolvente de extracción es una solución de agua-etanol al 40 % en v/v.
3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2 en el que la extracción se lleva a cabo a 70 °C.
- 15 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la separación cromatográfica se lleva a cabo en resinas de estireno-divinilbenceno o acrílicas.