

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 272**

51 Int. Cl.:

B01J 20/285 (2006.01)

B01D 15/18 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2008** **E 08800130 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015** **EP 2212004**

54 Título: **Método para recuperar compuestos bioactivos**

30 Prioridad:

10.10.2007 AU 2007905554

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

09.09.2015

73 Titular/es:

LANGTECH INTERNATIONAL PTY LTD (100.0%)
20 Heaths Court
Mill Park, VIC 3082, AU

72 Inventor/es:

LANG, TIM y
SIMPKINS, WAYNE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 545 272 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

Método para recuperar compuestos bioactivos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para separar compuestos bioactivos obtenidos de material vegetal.

10 **Antecedentes**

Las plantas y la materia vegetal contienen una gama de compuestos que son biológicamente activos en seres humanos, proporcionándoles efectos fisiológicos beneficiosos, incluyendo la reducción de los riesgos de contraer cáncer, enfermedades cardíacas y artritis.

15 Puede encontrarse una gama de compuestos bioactivos en una amplia variedad de plantas y materiales vegetales. Los frutos cítricos, por ejemplo, contienen compuestos bioactivos que pueden incluirse en dos grandes grupos; los limonoides y los flavonoides.

20 Los limonoides son compuestos triterpenoides que habitualmente se encuentran en los frutos cítricos. Los limonoides pueden existir como agliconas, o pueden estar unidos a una molécula de glucosa (el glucósido). Recientemente se ha demostrado que los glucósidos limonoides presentan potentes propiedades anticancerígenas en animales.

25 Los flavonoides son un grupo de derivados de benzopirano que aparecen ampliamente en plantas. Los flavonoides consisten normalmente en un anillo de benceno condensado con un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene un átomo de oxígeno. Muchos flavonoides también pueden existir como glicósidos. En los frutos cítricos, los flavonoides más predominantes son las flavanonas, narirutina y hesperidina (en naranjas) y naringina (en pomelos). Estos compuestos pueden disminuir los niveles de colesterol en sangre en los individuos hipercolesterolémicos.

30 Los flavonoides de los cítricos también incluyen las flavonas polimetoxiladas. Este grupo de compuestos está representado por flavonas sustituidas con grupos metoxilo y es exclusivo de los cítricos. Las flavonas polimetoxiladas tienen una amplia gama de efectos fisiológicos, incluyendo una capacidad antioxidante muy alta, que ha conducido a investigaciones acerca de su uso potencial como potentes agentes anticancerígenos y como agentes antiinflamatorios.

35 Los compuestos polifenólicos, tales como los limonoides de los cítricos y los flavonoides de los cítricos, se encuentran a concentraciones significativamente mayores en el tejido de cáscara en comparación con la concentración en el endocarpio del cual se extrae el zumo. Las altas concentraciones de estos compuestos en el tejido de la cáscara ayudan a formar la base de los mecanismos protectores de las plantas contra bacterias, mohos, levaduras e insectos.

40 La cáscara de los cítricos es amarga, muy a menudo debido a la presencia de compuestos limonoides en su forma de aglicona, y las cáscaras descartadas de las operaciones de obtención de zumo habitualmente se tratan con cal, se prensan, se deshidratan, se peletizan y se usan como alimento para animales.

45 Recientemente, ha surgido una práctica comercial en la industria del procesamiento de cítricos para extraer los compuestos solubles en agua de la cáscara de frutos cítricos usando una gama de dispositivos. El extracto acuoso diluido resultante ("zumo") es amargo y después de una clarificación (o clarificación parcial) se le quita el amargor a este zumo haciéndolo pasar sobre un adsorbente polimérico sintético. De esta manera, pueden separarse los principios amargos que se adsorben en el polímero, de los azúcares y ácidos naturales y algunos compuestos de aroma, que no se adsorben en el polímero. Sin embargo, la mayoría de los limonoides y flavonoides también pueden adsorberse preferencialmente en el polímero junto con los principios amargos. El tratamiento del polímero con una disolución de soda cáustica desorbe estos compuestos para regenerar el polímero. Sin embargo, el tratamiento también destruye los compuestos bioactivos, que se descartan como desechos junto con la disolución de soda cáustica usada.

50 En el documento PCT/AU01/01113 (WO 02/20112) se ha descrito un proceso para extraer los componentes bioactivos de frutos cítricos. En este proceso, se hace pasar un extracto cítrico crudo sobre un polímero de poliestireno – divinilbenceno y los compuestos bioactivos del material crudo se adsorben sobre el polímero. A continuación, se eluyen los componentes bioactivos sucesivamente del adsorbente polimérico para quitar el amargor mediante una concentración en gradiente constante de alcohol en una mezcla de agua y alcohol. Luego pueden recogerse tres extractos alcohólicos separados que contienen glucósidos limonoides, glicósidos de flavanona y flavonas polimetoxiladas del adsorbente polimérico.

65 Aunque este proceso permite recuperar valiosos compuestos bioactivos del adsorbente polimérico, puede producirse

cierto mezclado de los compuestos bioactivos en las fracciones de eluyente, lo que conduce a una separación incompleta de los diferentes componentes bioactivos entre sí, en particular, los glucósidos limonoides de los glicósidos de flavanona. Esto puede dar como resultado una menor pureza lo que conduce, por ejemplo, a dificultades de formulación.

5 El documento EP 0248524 (A2) da a conocer un método de (i) separación de una primera sustancia bioactiva soluble en agua o dispersable en agua, contenida en un primer medio líquido, de uno o más de otros componentes de dicho primer medio líquido, seleccionándose dichos otros componentes de impurezas y otras sustancias bioactivas solubles en agua y/o dispersables en agua, y/o (ii) purificación de dicha primera sustancia bioactiva
10 contenida en dicho primer medio líquido junto con dichos uno o más de otros componentes, caracterizado porque el método comprende:

(a) formar una mezcla que comprende el primer medio líquido y adsorbente polimérico particulado, que puede adsorber preferentemente la primera sustancia bioactiva o uno o más de los otros componentes del mismo, teniendo
15 el adsorbente un tamaño de partícula promedio de 0,01 a 5 micrómetros, con lo que el adsorbente se une reversiblemente a la primera sustancia bioactiva o dichos uno o más de otros componentes para formar un complejo;

(b) someter la mezcla de la etapa (a) a filtración por membrana, siendo la membrana impermeable a dicho complejo, con lo que la primera sustancia bioactiva mencionada se separa de dichos uno o más de otros componentes y/o se
20 purifica.

El documento US 2003064144 (A1) da a conocer un proceso para proporcionar un suministro de zumo de frutas mejorado, que comprende: proporcionar un suministro de zumo de frutas que tiene sólidos en suspensión y al menos un componente que se produce de manera natural que resta calidad al suministro de zumo de frutas; separar
25 el suministro de zumo de frutas en un líquido de zumo permeado y un material retenido que contiene un gran porcentaje de los sólidos en suspensión del suministro de zumo de frutas; hacer pasar el líquido de zumo permeado a través de una resina de adsorción retirando de ese modo del líquido de zumo permeado una cantidad de dicho componente que se produce de manera natural que resta calidad al suministro de zumo; y recoger el líquido de zumo que ha pasado a través de la resina de adsorción como suministro de zumo de frutas mejorado.

30 El documento WO 03074147 da a conocer un método para monitorizar la calidad de un medicamento herbal, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una primera muestra del medicamento herbal; (b) extraer la muestra con un disolvente polar para producir un extracto polar y un residuo apolar; (c) caracterizar el extracto polar.

35 Sería deseable abordar algunos o todos estos problemas y proporcionar un proceso mejorado para obtener compuestos bioactivos de material vegetal tal como frutos cítricos.

Sumario

40 La presente invención se refiere a un proceso para la separación selectiva de compuestos bioactivos obtenidos de material vegetal, comprendiendo el proceso las etapas de:

(a) poner una pluralidad de compuestos bioactivos en contacto con un primer adsorbente polimérico en condiciones que permitan la adsorción de al menos un compuesto bioactivo sobre el primer adsorbente mientras que al menos
45 un compuesto bioactivo no se adsorbe sobre el primer adsorbente,

(b) recoger una disolución que comprende al menos un compuesto bioactivo que no se ha adsorbido sobre el primer adsorbente, y

(c) poner la disolución obtenida en la etapa (b) en contacto con un segundo adsorbente polimérico en condiciones que permitan la adsorción de al menos un compuesto bioactivo contenido en la disolución obtenida en la etapa (b) sobre el segundo adsorbente;

50 en el que el segundo adsorbente polimérico es un adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno, y caracterizado porque el primer adsorbente polimérico es un adsorbente polimérico acrílico.

La presente invención, en un aspecto, incluye adicionalmente un proceso para purificar un compuesto bioactivo, obtenido mediante el proceso anterior, que comprende la etapa de poner el compuesto bioactivo en contacto con una resina de intercambio iónico en condiciones que permitan interacciones iónicas entre el compuesto bioactivo y la resina de tal manera que el compuesto bioactivo se adsorbe sobre la resina.
60

La presente invención, en un aspecto, incluye además un proceso de extracción selectiva de compuestos bioactivos a partir de un material vegetal, comprendiendo el proceso la etapa de poner el material vegetal en contacto con un disolvente en condiciones que permitan extraer al menos un compuesto bioactivo soluble en agua del material vegetal para proporcionar así un extracto que comprende el compuesto bioactivo soluble en agua y un residuo vegetal que comprende al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua.
65

De manera aún adicional, se da a conocer un compuesto bioactivo producido mediante un proceso tal como se describe en el presente documento.

- 5 De manera incluso adicional, se da a conocer una composición que comprende un glicósido limonoide presente a una pureza mayor de aproximadamente el 10%, el 50% o el 70%.

Breve descripción de las figuras

- 10 La figura 1 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra los componentes presentes en un extracto crudo representativo obtenido de cáscara de naranja.

La figura 2 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de azúcares y compuestos de ácidos orgánicos en una fracción de un eluato recogido después de hacer pasar extracto de cáscara de naranja sobre un adsorbente polimérico acrílico según la invención.

15 La figura 3 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de glucósido limonina (LG) en una fracción del eluato recogido.

20 La figura 4 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia del glucósido limonina, un limonoide relacionado, del glucósido nomilina y del glucósido obacunona en una fracción del eluato recogido.

La figura 5 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de los flavonoides hesperidina y narirutina en una fracción del eluato recogido.

25 La figura 6 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de los flavonoides hesperidina, narirutina y neoponcirina en una fracción del eluato recogido.

30 La figura 7 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la ausencia de glucósidos limonoides en una fracción de un eluato recogido después de hacer pasar una disolución que contiene glucósidos limonoides sobre una resina de intercambio aniónico según la invención.

35 La figura 8 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de glucósidos limonoides en una fracción de eluato recogida después de usar una disolución de sal para desplazar los glucósidos limonoides de una resina de intercambio aniónico.

La figura 9 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de glucósidos limonoides en una fracción de extracto de cáscara de naranja (OPE) eluida de un adsorbente polimérico acrílico (columna A) en un proceso según la invención.

40 La figura 10 muestra un gráfico que ilustra las cantidades relativas de diferentes glucósidos limonoides obtenidos en diversas fracciones de OPE eluidas del adsorbente polimérico acrílico (columna A) en un proceso según la invención.

45 La figura 11 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de flavonoides en una fracción de eluato recogida después de la elución del adsorbente polimérico acrílico (columna A) con etanol al 40% en un proceso según la invención.

50 La figura 12 muestra un gráfico que ilustra las cantidades relativas de diferentes compuestos flavonoides en diversas fracciones de eluato obtenidas después de la desorción del adsorbente polimérico acrílico (columna A) en un proceso según la invención.

55 La figura 13 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la ausencia de flavonoides y glucósidos limonoides en la fracción de zumo residual obtenida después de la elución de una fracción de OPE de un adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno (columna B) en un proceso según la invención.

La figura 14 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de compuestos de glucósidos limonoides en una fracción de eluato recogida después de la elución del adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno (columna B) con etanol al 30% en un proceso según la invención.

60 La figura 15 muestra un gráfico que ilustra las cantidades relativas de diferentes compuestos de glucósidos limonoides en diversas fracciones de eluato obtenidas después de la desorción del adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno (columna B) en un proceso según la invención.

65 La figura 16 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra la presencia de glucósidos limonoides en un eluato recogido después de la elución de una resina de intercambio aniónico débil (columna C) con cloruro de sodio 0,5 M

en un proceso según la invención.

La figura 17 muestra un gráfico que ilustra las cantidades relativas de diferentes compuestos de glucósidos limonoides en diversas fracciones de eluato obtenidas después de la desorción de la resina de intercambio aniónico débil (columna C) en un proceso según la invención.

La figura 18 muestra un cromatograma de HPLC que ilustra los compuestos de glucósidos limonoides en fracciones de eluato recogidas después de la elución de un adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno (columna D) con etanol al 50% en un proceso según la invención.

La figura 19 muestra cromatogramas de HPLC apilados que ilustran los componentes de un extracto crudo de cáscara de naranja (línea inferior en cada cromatograma) y en una fracción concentrada de glucósidos limonoides (línea superior en cada cromatograma) obtenidos mediante un proceso según la invención.

La figura 20 es un diagrama esquemático que ilustra un sistema para llevar a cabo un proceso de separación selectiva de compuestos bioactivos según una realización de la invención.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un proceso para separar compuestos bioactivos. El proceso de la invención permite separar selectivamente compuestos bioactivos entre sí.

El término “bioactivo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos o sustancias que tienen un efecto sobre un organismo, tejido o célula vivos. El experto en la técnica podrá apreciar que pueden encontrarse compuestos bioactivos en muchas fuentes de alimentos y otras sustancias naturales. Según una realización de la invención, los compuestos bioactivos se obtienen de material vegetal.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “materia vegetal” y “material vegetal” se refieren a un material que deriva de plantas. Puede encontrarse una gama de compuestos bioactivos en una amplia variedad de diferentes materias vegetales o materiales vegetales. El material vegetal del cual se obtienen los compuestos bioactivos puede estar en cualquier forma.

En una realización, el material vegetal deriva de un fruto comestible. Los ejemplos de frutos comestibles incluyen tomates, manzanas, peras, uvas, bayas, frutos con hueso y frutos cítricos. Los frutos, tales como uvas, pueden contener numerosos compuestos bioactivos, incluyendo estilbenos tales como resveratrol, flavanoles tales como quercetina y miricetina, catequinas y antocianinas. Otros frutos, tales como manzanas, también pueden ser fuentes de compuestos bioactivos tales como catequinas, flavanoles y dihidrochalconas. Además, los frutos cítricos pueden contener limonoides, flavonoides y flavonas polimetoxiladas bioactivos. El material vegetal derivado de frutos comestibles puede obtenerse de todas las partes del fruto, incluyendo la cáscara, la piel, el zumo, el endocarpio, las semillas y la carne del fruto.

En otra realización, el material vegetal deriva de un material de plantas que no proviene de frutos comestibles. Tal material de plantas incluye flores, raíces, hojas y tallos de una planta. La caña de azúcar constituye un ejemplo de material vegetal que no es un fruto comestible, que puede contener compuestos bioactivos tales como flavonas metoxiladas y ácidos fenólicos.

En otra realización, el material vegetal es un extracto vegetal que deriva de un material de plantas. El extracto vegetal es normalmente un líquido o una disolución que contiene componentes esenciales que se han recuperado del material de plantas. Un ejemplo de un extracto vegetal es el extracto de cáscara de cítricos que deriva de la cáscara de cítricos.

Aunque la siguiente discusión detallada de la invención se centrará en gran parte en compuestos bioactivos obtenidos de frutos cítricos, se comprenderá que la invención no se limita a los mismos y que también es aplicable a compuestos bioactivos obtenidos de otras plantas y materiales de plantas. En particular, la invención puede usarse para separar compuestos bioactivos con diferentes propiedades físicas.

La presente invención proporciona un proceso para separar compuestos bioactivos obtenidos de material vegetal, comprendiendo el proceso la etapa de (a) poner una pluralidad de compuestos bioactivos en contacto con un primer adsorbente polimérico en condiciones que permitan la adsorción de al menos un compuesto bioactivo sobre el primer adsorbente mientras que al menos un compuesto bioactivo no se adsorbe sobre el primer adsorbente. La pluralidad de compuestos bioactivos comprende al menos dos, y preferiblemente comprende más de dos, compuestos bioactivos. La pluralidad de compuestos bioactivos se proporciona preferiblemente en una disolución, que puede prepararse usando cualquier técnica. La disolución es un extracto obtenido de material vegetal.

En una realización, el material vegetal deriva de un fruto cítrico, tales como naranjas, limones, limas, pomelos, mandarinas, clementinas y similares. Todas las partes de los frutos cítricos, incluyendo la cáscara y el endocarpio

del fruto, pueden proporcionar el material vegetal. Preferiblemente, el material vegetal deriva de cáscaras de cítricos. El material vegetal también puede pretratarse de cualquier manera adecuada antes de su procesamiento según un aspecto de la invención que se describe en el presente documento.

5 Puede obtenerse una disolución que comprende una pluralidad de compuestos bioactivos poniendo el material vegetal en contacto con un disolvente que extrae los compuestos bioactivos del material vegetal. Puede usarse cualquier disolvente adecuado. Un disolvente preferido es agua. La extracción del material vegetal por el disolvente puede tener lugar mediante cualquier proceso adecuado conocido en la técnica. Para una disolución que es un extracto derivado de frutos cítricos, la disolución comprenderá una mezcla de compuestos, incluyendo compuestos bioactivos limonoides y de flavanona, ácidos orgánicos y azúcares naturales. Si se deseara, puede someterse a la disolución a una etapa de pretratamiento antes del procesamiento según la invención tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de pretratamientos que pueden usarse comprenden centrifugación y filtración. Tal pretratamiento puede ser deseable con el fin de minimizar la cantidad de sólidos en suspensión o de otros materiales indeseados en la disolución.

15 La pluralidad de compuestos bioactivos entra en contacto con el primer adsorbente polimérico tal como se define en las reivindicaciones. El adsorbente polimérico tiene una afinidad selectiva por al menos uno de los compuestos bioactivos presentes en la mezcla. Como resultado, el compuesto bioactivo se adsorbe sustancialmente sobre el primer adsorbente polimérico y de esa manera se retiene por el adsorbente. El adsorbente polimérico tampoco tiene afinidad por al menos un compuesto bioactivo adicional que está presente en la mezcla de compuestos bioactivos. En consecuencia, según la invención al menos un compuesto bioactivo no se adsorbe sobre el adsorbente.

20 El primer adsorbente polimérico es un compuesto acrílico. En una realización, un adsorbente polimérico adecuado es un éster acrílico. Un ejemplo de un éster acrílico es poli(metacrilato de metilo). El poli(metacrilato de metilo) puede reticularse con un agente de reticulación adecuado tal como etilenglicol. Se prefiere que el adsorbente polimérico sea no iónico. Un ejemplo de un adsorbente polimérico adecuado para su uso en la invención es el polímero adsorbente inerte Alimentech P495 suministrado por Bucher Foodtech.

25 El adsorbente polimérico puede proporcionarse en cualquier forma y disposición adecuadas. En una realización, el adsorbente polimérico es un compuesto acrílico que se proporciona en forma de perlas. Las perlas pueden ser de cualquier forma o tamaño adecuados. El adsorbente polimérico puede disponerse de cualquier manera adecuada. En una realización preferida, el adsorbente polimérico se dispone en un lugar de paso, que puede ser una columna, un contenedor, recipiente o tubo. Las columnas alimentadas por gravedad y las columnas de cromatografía ultrarrápida son ejemplos de disposiciones adecuadas. También pueden usarse otras disposiciones, tales como un aparato de cromatografía de lecho móvil. La razón de la longitud de la columna con respecto a su diámetro es de al menos 4:1, y preferiblemente al menos 8:1. El paso puede contener cualquier volumen adecuado del adsorbente.

30 En una realización, se aplica una disolución que comprende la pluralidad de compuestos bioactivos por la parte superior de una columna dispuesta verticalmente que contiene un adsorbente polimérico acrílico. Aunque las realizaciones de la invención se describen en el presente documento con referencia a la aplicación de diversas disoluciones por la parte superior de una columna dispuesta verticalmente, el experto en la técnica podrá apreciar que también pueden usarse otras disposiciones y otros medios para introducir disoluciones en las disposiciones. Por ejemplo, las disoluciones pueden alimentarse por la base de una columna dispuesta verticalmente. Como alternativa, si una columna se dispone de una manera sustancialmente horizontal, las disoluciones pueden alimentarse por un extremo de la columna horizontal.

35 Luego se permite percolar la disolución a través del adsorbente. Puede aplicarse cualquier cantidad de disolución al adsorbente y un experto en la técnica relevante podrá apreciar que la cantidad de disolución puede depender del tamaño de la columna así como del tipo de adsorbente usado. La disolución se deja pasar a través del paso a cualquier velocidad que permita un contacto suficiente de la disolución con el adsorbente. Un experto en la técnica podrá comprender que la velocidad adecuada dependerá de numerosos factores, incluyendo el tamaño del aparato y si el proceso se lleva a cabo a escala de laboratorio o industrial.

40 A medida que la disolución que comprende la pluralidad de compuestos bioactivos pasa a través de la columna que contiene el adsorbente polimérico, al menos un compuesto bioactivo se adsorbe sustancialmente sobre el adsorbente polimérico. La retención del al menos un compuesto bioactivo por el adsorbente retira el compuesto de la disolución.

45 Tras haber pasado la disolución a través de la columna, sale de la columna y se recoge. Al menos un compuesto bioactivo presente en la disolución que no se ha adsorbido sobre el primer adsorbente polimérico también sale de la columna con la disolución. La disolución que eluye y sale de la columna también se conoce como eluato. Por consiguiente, el proceso de la invención también comprende la etapa de (b) recoger una disolución que comprende el al menos un compuesto bioactivo que no se ha adsorbido sobre el primer adsorbente. El al menos un compuesto bioactivo que no se ha adsorbido sobre el adsorbente puede recogerse en una sola fracción de disolución de eluato o en múltiples fracciones. También pueden estar presentes otros componentes que no se han adsorbido sobre el adsorbente polimérico en las fracciones recogidas. Puede analizarse la disolución recogida (eluato) para determinar

la presencia de un compuesto bioactivo mediante cualquier método adecuado. Un método preferido implica el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Tal como se describirá más adelante, el compuesto bioactivo eluido puede someterse a un tratamiento adicional para purificar adicionalmente el compuesto bioactivo.

5 En una realización, la pluralidad de compuestos bioactivos contiene una mezcla de compuestos bioactivos de flavonoides y limonoides, y el primer adsorbente polimérico puede separar los compuestos flavonoides y limonoides. Preferiblemente, el adsorbente polimérico es un éster acrílico e incluso más preferiblemente poli(metacrilato de metilo). Se ha encontrado que un adsorbente polimérico acrílico se une selectivamente a las flavanonas bioactivas y sus derivados, tal como los glicósidos de flavanona, con mayor grado que a los compuestos limonoides, tales como los glucósidos limonoides. Esta adsorción selectiva permite una retención sustancial de las flavanonas por el adsorbente mientras que los compuestos de glucósidos limonoides no se retienen por el adsorbente. De esta manera, se separan sustancialmente los dos grupos de compuestos bioactivos. En una forma del método, se separan completamente los dos grupos de compuestos bioactivos. Otros compuestos, tales como ácidos orgánicos y azúcares naturales, tampoco se retienen por el adsorbente. Por tanto, cuando el adsorbente acrílico se dispone en una columna, los azúcares naturales y los ácidos orgánicos pasan rápidamente a través de la columna delante de los glucósidos limonoides mientras que los compuestos flavonoides no pasan. Por tanto, según un aspecto de la invención, puede separarse sustancialmente un glicósido de flavanona de un glicósido limonoide.

20 En otra realización, la pluralidad de compuestos bioactivos también pueden contener otros compuestos bioactivos tales como las flavonas polimetoxiladas y las agliconas limonoides además de los compuestos flavonoides y glucósidos limonoides. En esta realización, el adsorbente polimérico puede adsorber flavonas polimetoxiladas y agliconas limonoides junto con los compuestos flavonoides. Por ello, el método de la invención también permite separar sustancialmente estos compuestos de los glucósidos limonoides y los constituyentes polares de molécula pequeña, tales como ácidos orgánicos y azúcares que se producen de manera natural.

25 Según la invención, el proceso puede comprender las etapas de poner el al menos un compuesto bioactivo adsorbido sobre el adsorbente polimérico de la etapa (a) en contacto con un eluyente en condiciones que permitan la desorción del al menos un compuesto bioactivo del adsorbente y eluir el al menos un compuesto bioactivo del adsorbente.

30 Cuando el adsorbente polimérico se dispone en un paso, tal como una columna, el eluyente se introduce normalmente en alícuotas o como una corriente continua por la parte superior de la columna y se permite percolar a través del adsorbente. Cuando se introducen alícuotas, puede emplearse una o más alícuotas de eluyente. El eluyente actúa desorbiendo el al menos un compuesto bioactivo del adsorbente y llevando el compuesto bioactivo a través de la columna. El eluyente se alimenta preferiblemente al paso a una velocidad predeterminada, que puede variar entre 1 y 5 volúmenes de lecho por hora y, preferiblemente, es de entre 1 a 2 volúmenes de lecho por hora.

35 El eluyente puede comprender cualquier disolvente o mezcla de disolventes adecuado. Preferiblemente, el disolvente o la mezcla de disolventes se selecciona entre los que están permitidos para su uso en productos de calidad alimentaria. Un disolvente preferido es un disolvente soluble en agua. En una realización, el eluyente comprende alcohol y agua.

40 Cuando el eluyente comprende alcohol, puede usarse cualquier concentración de alcohol. En una realización, la concentración de alcohol en el eluyente se encuentra en el intervalo de entre aproximadamente el 10 y el 80% (v/v). Un experto en la técnica comprenderá sin embargo que la concentración de alcohol usada puede variar dependiendo de la naturaleza del compuesto bioactivo y el resultado deseado. Además, puede emplearse cualquier alcohol adecuado en el eluyente. En una realización, el alcohol es etanol.

45 En una realización, la concentración de alcohol en el eluyente permanece sustancialmente constante durante la desorción del al menos un compuesto bioactivo del adsorbente. Una concentración preferida de alcohol es de aproximadamente el 40% (v/v). En otra realización, la concentración de alcohol en el eluyente aumenta durante la desorción del al menos un compuesto bioactivo del adsorbente. Preferiblemente, la concentración de alcohol aumenta desde aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 80% (v/v). La concentración de alcohol puede aumentar a una velocidad sustancialmente constante o puede aumentar de manera gradual. Cuando el eluyente proporciona una concentración en gradiente de alcohol, pueden introducirse alícuotas de eluyente de un contenido creciente de alcohol de manera sucesiva por la parte superior de la columna.

50 Al salir de la columna, el eluato resultante puede recogerse luego en fracciones. Se recoge al menos una fracción, y preferiblemente múltiples fracciones, correspondientes a la presencia de los compuestos bioactivos desorbidos.

60 Cabe destacar que aunque puede ser de utilidad el uso de métodos de recogida fraccionada en algunas realizaciones del método, el alcance de la presente invención incluye métodos de recogida no fraccionada. Por ejemplo, puede permitirse que el compuesto bioactivo objetivo se adsorba al adsorbente polimérico, mientras que se permite que las moléculas contaminantes simplemente pasen a través de la columna para desecharse. Después de retirar sustancialmente todas las moléculas contaminantes de la matriz del adsorbente polimérico (por ejemplo, mediante lavado de la matriz con una disolución que no desorba el compuesto bioactivo objetivo), el compuesto

bioactivo objetivo puede desorberse mediante la aplicación de una disolución apropiada, y la recogida a granel del compuesto objetivo recogido en un solo volumen.

5 Las fracciones o los volúmenes recogidos a granel pueden analizarse para determinar la presencia o cantidad de compuestos bioactivos. Un método de análisis preferido implica el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En una realización, cuando se han adsorbido flavanonas y sus derivados sobre el adsorbente polimérico, la fracción recogida contiene por tanto los compuestos flavonoides desorbidos.

10 Cuando también se han adsorbido flavonas polimetoxiladas y agliconas limonoides sobre el adsorbente polimérico además de los compuestos bioactivos flavonoides, el eluyente usado para retirar los compuestos flavonoides puede no desorber las flavonas polimetoxiladas y las agliconas limonoides del adsorbente. Por consiguiente, las flavonas polimetoxiladas y agliconas limonoides pueden permanecer unidas al adsorbente polimérico durante la desorción de los compuestos flavonoides. Así, según otro aspecto de la invención puede separarse sustancialmente un compuesto flavonoide de una flavona polimetoxilada y/o una aglicona limonoide.

15 Si se deseara, después de la desorción de los compuestos flavonoides, el adsorbente polimérico puede lavarse con una disolución adecuada para retirar toda flavona polimetoxilada y aglicona limonoide adsorbida del adsorbente polimérico con el fin de regenerar el adsorbente polimérico para su uso posterior. Puede usarse cualquier disolución adecuada para retirar las flavonas polimetoxiladas y las agliconas limonoides adsorbidas del adsorbente polimérico.
20 Un ejemplo de una disolución que puede usarse para desorber las flavonas polimetoxiladas y agliconas limonoides es hidróxido de sodio 0,5 M.

25 En un aspecto adicional de la invención, puede purificarse adicionalmente el compuesto bioactivo que no se ha adsorbido sobre el adsorbente polimérico. Según este aspecto de la invención, el proceso puede comprender la etapa de (c) poner la disolución que comprende el al menos un compuesto bioactivo obtenido de la etapa (b) en contacto con un segundo adsorbente polimérico en condiciones que permitan la adsorción de el al menos un compuesto bioactivo contenido en la disolución obtenida en la etapa (b) sobre el segundo adsorbente, y opcionalmente (f) recoger la disolución eluida del segundo adsorbente polimérico.

30 A diferencia del primer adsorbente polimérico usado anteriormente, el segundo adsorbente polimérico empleado en la etapa (c) es poliestireno-divinilbenceno. Los componentes polares tales como ácidos orgánicos simples y azúcares naturales que también pueden estar presentes en la disolución no se adsorben por el adsorbente polimérico y se portan por la disolución a medida que sale del adsorbente polimérico y se eluye. Un ejemplo de un adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno disponible comercialmente es Amberlite XAD-16 fabricado por
35 Rohm y Haas.

El segundo adsorbente polimérico empleado en la etapa (c) puede proporcionarse en cualquier forma y disposición adecuadas. En una realización, el adsorbente polimérico es un polímero de poliestireno-divinilbenceno en forma de perlas. Las perlas pueden ser de cualquier forma o tamaño adecuados. Las perlas pueden disponerse de cualquier
40 manera adecuada. Las perlas se disponen preferiblemente en el paso, que puede proporcionarse empaquetando las perlas en una columna, un contenedor, un recipiente o un tubo. El paso puede contener cualquier volumen adecuado de las perlas. En una realización preferida de la invención, el volumen de lecho del segundo adsorbente polimérico usado en la etapa (c) es equivalente al volumen de lecho del primer adsorbente polimérico usado en la etapa (a) anterior. Por ejemplo, cuando el volumen de lecho del primer adsorbente polimérico usado en la etapa (a)
45 es de al menos aproximadamente 250 litros, el volumen de lecho del segundo adsorbente polimérico empleado en la etapa (c) también puede ser de al menos aproximadamente 250 litros. Sin embargo, un experto en la técnica relevante comprenderá que puede variarse el volumen de adsorbente polimérico usado en la etapa (c) dependiendo de la naturaleza de los compuestos bioactivos y el resultado deseado.

50 En una realización, la disolución obtenida de la etapa (b), que comprende el al menos un compuesto bioactivo, se aplica por la parte superior de una columna que contiene el segundo adsorbente polimérico y se permite percolar a través del adsorbente para que entre en contacto con el adsorbente polimérico en la etapa (c). En una realización, cuando la disolución comprende compuestos bioactivos limonoides y derivados tales como glucósidos limonoides, los limonoides se unen al segundo adsorbente polimérico durante el paso de la disolución a través del adsorbente y
55 de esa manera se retiran de la disolución. La disolución atraviesa el paso y cuando sale del paso y el segundo adsorbente polimérico, se recoge como un eluato. En una realización, cuando la disolución recogida (o eluato) contiene azúcares y ácidos orgánicos simples, la disolución eluida puede considerarse como un componente de "zumo" purificado. Se ha encontrado que el zumo obtenido según el proceso de la invención es neutro y no amargo. Se contempla que puede aislarse el componente de "zumo" purificado y, si se deseara, tratarse adicionalmente para
60 su uso como un suplemento en productos alimenticios tales como bebidas.

Según la invención, una vez que la disolución ha eluido del adsorbente, el al menos un compuesto bioactivo puede desorberse del segundo adsorbente polimérico de la etapa (c). Por consiguiente, la presente invención puede comprender además la etapa de (g) poner el al menos un compuesto bioactivo adsorbido sobre el segundo
65 adsorbente polimérico empleado en la etapa (c) en contacto con un eluyente en condiciones que permitan la desorción de el al menos un compuesto bioactivo del segundo adsorbente y (h) eluir el al menos un compuesto

bioactivo del segundo adsorbente. Puede emplearse una o más alícuotas de eluyente, o una corriente continua de eluyente, para desorber el al menos un compuesto bioactivo del adsorbente polimérico.

5 De manera similar al eluyente usado para desorber los compuestos bioactivos del primer adsorbente polimérico tal como se describió anteriormente, el eluyente empleado en la etapa (g) puede comprender cualquier disolvente o mezcla de disolventes adecuados. Preferiblemente, el disolvente o la mezcla de disolventes se selecciona entre los que están permitidos para su uso con productos alimenticios. En una realización, el eluyente comprende alcohol y agua. Cuando el eluyente comprende alcohol, puede usarse cualquier concentración de alcohol adecuada. En una realización, la concentración de alcohol en el eluyente se encuentra en el intervalo de desde aproximadamente el 10 hasta el 80% (v/v). Un experto en la técnica comprenderá sin embargo que la concentración de alcohol usada puede variar dependiendo de la naturaleza del compuesto bioactivo y el resultado deseado. Además, puede usarse cualquier tipo de alcohol. Un alcohol preferido es etanol.

15 En una realización, la concentración de alcohol en el eluyente permanece sustancialmente constante durante la desorción del al menos un compuesto bioactivo del adsorbente. Preferiblemente, el eluyente comprende aproximadamente el 40% (v/v) de alcohol. En otra realización, la concentración de alcohol en el eluyente aumenta durante la desorción del al menos un compuesto bioactivo del adsorbente. Preferiblemente, la concentración de alcohol aumenta desde aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 80% (v/v). La concentración de alcohol puede aumentar a una velocidad sustancialmente constante o puede aumentar de manera gradual. Cuando el eluyente proporciona una concentración en gradiente de alcohol, pueden introducirse alícuotas de eluyente de un contenido creciente de alcohol de manera sucesiva por la parte superior de la columna que contiene el adsorbente polimérico.

25 El compuesto bioactivo eluido del adsorbente polimérico según la etapa (h) se recoge normalmente en una fracción de eluato. La fracción de eluato es una disolución que comprende el compuesto bioactivo junto con el disolvente usado para eluir el compuesto bioactivo del segundo adsorbente polimérico. Se recoge al menos una fracción, y preferiblemente una pluralidad de fracciones eluidas, correspondientes a la presencia del compuesto bioactivo. En una realización preferida de la invención, la fracción de eluato recogida contiene compuestos limonoides tales como glucósidos limonoides. Cuando se recoge más de una fracción de eluato, pueden combinarse las fracciones de eluato para formar una sola fracción. Además, tal como se comentó previamente, si se deseara también pueden usarse métodos de recogida no fraccionada que permiten recoger la molécula bioactiva objetivo en un solo volumen a granel.

35 En el caso de los limonoides, puede ser ventajoso el uso de un eluyente en el que la concentración de alcohol aumenta durante la desorción de los limonoides cuando se desea separar compuestos limonoides seleccionados entre sí. Los diferentes compuestos limonoides presentan diferentes polaridades debido a diferencias en su estructura química. Por consiguiente, el uso de un gradiente de alcohol puede ayudar a separar los compuestos limonoides basado en diferencias de polaridad. En términos del orden de elución a medida que aumenta la concentración de alcohol en el eluyente, el glucósido limonina, que es el compuesto más polar, eluye primero del adsorbente polimérico, seguido por el glucósido nomilina, el glucósido ácido nomilínico y el glucósido obacunona. Un experto en la técnica relevante podrá ajustar la concentración de alcohol en el eluyente y determinar si se logra la separación deseada mediante la monitorización de la elución de los compuestos limonoides usando métodos analíticos tales como HPLC.

45 En algunas realizaciones de la invención, pueden tratarse adicionalmente los compuestos bioactivos que se eluyen de los adsorbentes poliméricos para purificar y concentrar los compuestos bioactivos.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para purificar un compuesto bioactivo, comprendiendo el proceso la etapa de poner el compuesto bioactivo en contacto con una resina de intercambio iónico en condiciones que permitan interacciones iónicas entre el compuesto bioactivo y la resina de tal manera que el compuesto bioactivo se adsorbe sobre la resina.

55 Cuando se ha eluido al menos un compuesto bioactivo de un adsorbente polimérico según el proceso de la invención, el proceso puede comprender además la etapa de poner el compuesto bioactivo eluido en contacto con una resina de intercambio iónico en condiciones que permitan interacciones iónicas entre el al menos un compuesto bioactivo y la resina de tal manera que el al menos un compuesto bioactivo se adsorbe sobre la resina.

60 En una realización, el compuesto bioactivo que va a purificarse es un componente bioactivo obtenido después de la elución del segundo adsorbente polimérico, según la etapa (h) descrita previamente. En esta realización, el compuesto bioactivo se proporciona normalmente en una disolución con el disolvente de elución. Una ventaja de la presente invención es que la disolución (o eluato) que comprende el compuesto bioactivo puede aplicarse directamente a la resina de intercambio iónico sin necesidad de retirar el exceso de alcohol de la disolución mediante evaporación u otros procesos antes de exponer el compuesto bioactivo a la resina de intercambio iónico.

65 En una realización, la resina de intercambio iónico es una resina de intercambio aniónico y preferiblemente, es una resina de intercambio aniónico débil. Un ejemplo de una resina de intercambio aniónico débil que puede usarse en la

presente invención es la resina Diaion WA-30 suministrada por Supelco.

5 La resina de intercambio iónico puede proporcionarse en cualquier forma y disposición adecuadas. Hay una variedad de formas y disposiciones adecuadas que serán evidentes para un experto en la técnica relevante. La resina puede disponerse en el paso, que puede proporcionarse empaquetando la resina en una columna tal como una columna alimentada por gravedad o una columna de cromatografía ultrarrápida. El paso puede contener cualquier volumen adecuado de la resina. En una realización, el volumen de lecho de la resina de intercambio iónico es aproximadamente el 20% del volumen de lecho de adsorbente polimérico usado en la etapa (a) anterior. Por ejemplo, si se usan 100 litros de adsorbente polimérico en la etapa (a), entonces solamente se necesitarían 20 litros de resina de intercambio iónico. Un experto en la técnica comprenderá, sin embargo, que el volumen requerido de resina de intercambio iónico puede variar dependiendo de la naturaleza de los compuestos bioactivos y el resultado deseado.

10 En una realización, se introduce una disolución que contiene el compuesto bioactivo por la parte superior de la resina contenida en una columna y se permite percolar a través de la resina. De esta manera, se logra el contacto entre el compuesto bioactivo y la resina de intercambio iónico.

15 Se cree que las interacciones iónicas entre la resina y los compuestos bioactivos, tales como los glucósidos limonoides, conducen a la adsorción selectiva de los compuestos bioactivos sobre la resina. Otros componentes que pueden estar presentes y que no pueden participar en las interacciones iónicas no se unirán a la resina. Por consiguiente, los compuestos bioactivos pueden concentrarse y separarse adicionalmente de cualquier componente indeseado que pudiera contaminar los compuestos bioactivos.

20 Los compuestos bioactivos que se han adsorbido sobre la resina de intercambio iónico pueden recuperarse poniendo la resina de intercambio iónico en contacto con una disolución que comprende un soluto adecuado en condiciones que permitan el desplazamiento del compuesto bioactivo de la resina. El soluto puede seleccionarse entre cualquiera de los que pueden competir con el compuesto bioactivo por sitios de unión en la resina de intercambio iónico. Un soluto preferido es una sal, tal como cloruro de sodio. El soluto puede estar presente a cualquier concentración adecuada. En una realización, la disolución es una disolución de cloruro de sodio 0,5 M.

25 En una realización, cuando el compuesto bioactivo es un glucósido limonoide, puede hacerse pasar una disolución de soluto que comprende una sal como soluto a través de un paso que contiene la resina de intercambio iónico. Puede introducirse una o más alícuotas de la disolución de soluto, o una corriente continua de la disolución de soluto, en el paso que contiene la resina de intercambio iónico. La sal se une competitivamente a la resina y desplaza al glucósido limonoide de la resina. Los glucósidos limonoides desorbidos se recogen a continuación a medida que los volúmenes de la disolución de soluto salen del paso. Los glucósidos limonoides desorbidos pueden recogerse en una sola fracción o en múltiples fracciones, o en un volumen a granel de la disolución de soluto eluida.

30 Después de la recogida del compuesto bioactivo, se retira preferiblemente cualquier soluto presente en las fracciones recogidas. El soluto puede retirarse mediante cualquier proceso adecuado. En una realización preferida, el soluto se retira poniendo las fracciones en contacto con un adsorbente polimérico. Las fracciones entran en contacto con el adsorbente en condiciones que permitan la adsorción del compuesto bioactivo sobre el adsorbente.

35 Puede usarse cualquier adsorbente polimérico adecuado. Preferiblemente, el adsorbente polimérico puede adsorber compuestos apolares. Un adsorbente polimérico preferido es poliestireno-divinilbenceno. Un ejemplo de un adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno adecuado es Amberlite XAD-16 fabricado por Rohm y Haas. De manera similar a los adsorbentes poliméricos descritos previamente, el adsorbente puede proporcionarse como perlas en un paso tal como una columna. Puede usarse cualquier volumen adecuado del adsorbente polimérico adecuado. En una realización, el volumen de lecho de la resina polimérica de poliestireno-divinilbenceno puede ser aproximadamente el 20% del volumen de lecho de adsorbente polimérico usado en la etapa (a) anterior. Un experto en la técnica comprenderá, sin embargo, que el volumen requerido de resina polimérica puede variar dependiendo de la naturaleza de los compuestos bioactivos y el resultado deseado.

40 En una realización, se aplica un volumen recogido de disolución de soluto que comprende el compuesto bioactivo por la parte superior de la columna y se permite percolar a través del adsorbente. Cuando el compuesto bioactivo comprende compuestos limonoides, los limonoides se unen al adsorbente polimérico y se retienen sustancialmente por el adsorbente polimérico. Entre tanto, el soluto no se une al adsorbente y se eluye del adsorbente. De esta manera, se separan los compuestos limonoides bioactivos del soluto indeseado.

45 El compuesto bioactivo puede desorberse luego del adsorbente polimérico poniendo el adsorbente polimérico en contacto con un eluyente y eluyendo el compuesto bioactivo del adsorbente según procedimientos descritos previamente. Un eluyente preferido comprende una mezcla de alcohol y agua. Puede usarse cualquier concentración adecuada de alcohol. En una realización, el eluyente comprende alcohol en una cantidad en el intervalo de desde aproximadamente el 10 hasta aproximadamente el 80% (v/v). Además, puede usarse cualquier alcohol adecuado. Un alcohol preferido es etanol.

La concentración de alcohol en el eluyente puede permanecer sustancialmente constante. En una realización preferida, el eluyente comprende al menos aproximadamente el 40% (v/v) de alcohol y, más preferiblemente, comprende aproximadamente el 70% (v/v) de alcohol. Como alternativa, la concentración de alcohol puede aumentar durante la desorción de al menos un compuesto bioactivo del adsorbente. Cuando la concentración de alcohol aumenta durante la desorción del compuesto bioactivo, el contenido de alcohol puede aumentar a una velocidad sustancialmente constante o de manera gradual. En una realización, la concentración de alcohol en el eluyente puede aumentar desde aproximadamente el 10 hasta el 80% (v/v) durante la desorción de al menos un compuesto bioactivo del adsorbente.

El compuesto bioactivo eluido se recoge posteriormente en al menos una, y preferiblemente en múltiples fracciones, correspondientes a la presencia del compuesto bioactivo. Puede analizarse la presencia del compuesto bioactivo mediante cualquier método adecuado. Un ejemplo de un método adecuado es HPLC. Se ha encontrado que el compuesto bioactivo es de mayor pureza que los componentes bioactivos preparados usando procesos de la técnica anterior.

Se da a conocer además un compuesto bioactivo purificado preparado mediante un proceso tal como se describe en el presente documento. El compuesto bioactivo puede ser un compuesto limonoide, más preferiblemente un glucósido limonoide. En otra realización, el compuesto bioactivo purificado también puede ser un compuesto flavonoide, preferiblemente un glicósido de flavonona.

También se da a conocer un proceso para la extracción selectiva de compuestos bioactivos a partir de un material vegetal, comprendiendo el proceso la etapa de poner el material vegetal en contacto con un disolvente en condiciones que permitan la extracción de al menos un compuesto bioactivo soluble en agua del material vegetal para proporcionar así un extracto que comprende el compuesto bioactivo soluble en agua y un residuo vegetal que comprende al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua. El disolvente usado para el contacto del material vegetal puede ser agua. Por consiguiente, en esta realización se forma un extracto acuoso que contiene el al menos un compuesto bioactivo soluble en agua.

El término "material vegetal" se usa en el presente documento para hacer referencia a un material derivado de plantas. El material vegetal puede estar en cualquier forma tal como se describe en el presente documento. El material vegetal también puede pretratarse de cualquier manera adecuada antes de su procesamiento según la invención tal como se describe en el presente documento. En una realización, el material vegetal puede derivar de un fruto comestible, tal como los que se describen en el presente documento. El material vegetal puede derivar de un fruto cítrico, tal como naranjas, limones, limas, pomelos, mandarinas, clementinas y similares. Todas las partes de los frutos cítricos, incluyendo la cáscara y el endocarpio del fruto, pueden proporcionar el material vegetal. En una realización, el material vegetal puede derivar de la cáscara de cítricos. El material vegetal también puede ser un extracto vegetal derivado de un material de plantas.

El contacto del disolvente con el material vegetal puede tener lugar usando cualquier técnica adecuada. En una realización, se usa un extractor a contracorriente para el contacto del disolvente con el material vegetal y extraer así el al menos un compuesto bioactivo soluble en agua del material vegetal. El material vegetal también puede tratarse de manera que da como resultado que el material vegetal se encuentra en una forma finamente dividida. El material vegetal digerido se hace pasar luego a través de un rodillo para exprimir los zumos que contienen los compuestos bioactivos solubles en agua. El material vegetal puede comprender limonoides tales como glucósidos limonoides y compuestos flavonoides tales como glicósidos de flavanona como compuestos bioactivos solubles en agua.

La extracción de los materiales bioactivos solubles en agua del material vegetal puede realizarse en cualquier condición adecuada. En una realización, el material vegetal puede tratarse a una temperatura de al menos 70°C, normalmente durante un corto periodo. El material vegetal puede tratarse a una temperatura de al menos 70°C durante aproximadamente 2 minutos. Sin limitaciones a la teoría, se cree que la etapa de tratamiento a alta temperatura ayuda a destruir las enzimas oxidativas y los microbios, que pueden ser nocivos para el producto final deseado. La alta temperatura también puede ayudar en la ruptura de la estructura celular del material vegetal, permitiendo que los compuestos solubles en el material vegetal difundan en el disolvente que fluye en sentido contrario. Después de esto, puede disminuirse la temperatura del material vegetal para optimizar la extracción de los compuestos deseados.

Después de la extracción de los compuestos bioactivos solubles en agua del material vegetal, queda un residuo vegetal. El residuo vegetal puede comprender al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua, que no se retira mediante el procedimiento de extracción con disolventes inicial. El residuo vegetal puede estar en forma de un sólido o un líquido, dependiendo de la forma inicial del material vegetal.

El residuo vegetal resultante puede ponerse en contacto con una disolución de extracción que comprende alcohol con el fin de extraer al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua del residuo vegetal. La disolución puede entrar en contacto con el residuo vegetal durante cualquier tiempo y en cualquier condición que sea suficiente para extraer al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua del residuo y proporcionar así un extracto alcohólico que comprende el al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua. El material vegetal y por ende el residuo vegetal

puede comprender flavonas polimetoxiladas como compuestos bioactivos insolubles en agua.

Puede usarse cualquier técnica adecuada para el contacto de la disolución de extracción con el residuo vegetal y extraer así al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua del residuo. En una realización preferida, se usa un extractor a contracorriente.

La disolución de extracción que entra en contacto con el residuo vegetal puede comprender cualquier cantidad adecuada de alcohol. En una realización, la disolución de extracción puede comprender una mezcla de agua y alcohol. Preferiblemente, la disolución de extracción comprende al menos aproximadamente el 10% de alcohol y más preferiblemente al menos aproximadamente el 20% de alcohol. Puede usarse cualquier alcohol adecuado. Un alcohol preferido es etanol.

Si fuera necesario, el extracto alcohólico que contiene el al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua puede ponerse en contacto a continuación con un adsorbente polimérico en condiciones que permitan la adsorción del compuesto bioactivo insoluble en agua sobre el adsorbente. Esto ayuda a purificar adicionalmente los compuestos bioactivos insolubles en agua al separar los compuestos bioactivos insolubles en agua de toda impureza que no pueda retenerse por el adsorbente. El polímero adsorbente es preferiblemente uno que se adsorbe a compuestos apolares. Un adsorbente polimérico preferido es poliestireno-divinilbenceno. Un ejemplo de un adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno adecuado es Amberlite XAD-16 fabricado por Rohm y Haas.

El adsorbente polimérico puede proporcionarse en cualquier forma y disposición adecuadas. El adsorbente polimérico puede ser un polímero de poliestireno-divinilbenceno en forma de perlas. Las perlas pueden ser de cualquier forma o tamaño adecuados. Las perlas pueden disponerse en el paso, que puede proporcionarse empaquetando las perlas en una columna, un contenedor, recipiente o tubo. Las columnas alimentadas por gravedad y las columnas de cromatografía ultrarrápida son ejemplos de columnas adecuadas. El paso puede contener cualquier adecuado volumen de las perlas. El experto en la técnica comprenderá que el volumen de adsorbente polimérico usado puede depender de numerosos factores, tales como por ejemplo, la cantidad de material que se aplicará al adsorbente. También pueden usarse otras disposiciones, tales como un aparato de cromatografía de lecho móvil.

El extracto alcohólico que comprende el al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua puede introducirse por la parte superior de una columna que comprende el adsorbente y se permite percolar a través del adsorbente. De esta manera, el al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua puede entrar en contacto con el adsorbente polimérico. El compuesto bioactivo insoluble en agua, siendo en general de naturaleza apolar, se retiene por el adsorbente mientras que los componentes polares que pueden estar presentes en el extracto no se retienen y pasan a través del paso y se recogen. En una realización, el al menos un compuesto bioactivo insoluble en agua comprende flavonas polimetoxiladas. Por tanto, las flavonas polimetoxiladas se adsorben sobre el adsorbente polimérico.

Los compuestos bioactivos insolubles en agua pueden retirarse posteriormente del adsorbente poniendo en contacto del adsorbente con un eluyente en condiciones que permiten la desorción de los compuestos bioactivos insolubles en agua del adsorbente, y eluyendo los compuestos bioactivos insolubles en agua del adsorbente.

Cuando el adsorbente polimérico se dispone en una columna, el eluyente puede introducirse en alícuotas, o en una corriente continua, por la parte superior de la columna y se permite percolar a través del adsorbente. Cuando el eluyente proporciona una concentración en gradiente de alcohol, pueden introducirse alícuotas de eluyente de un contenido creciente de alcohol de manera sucesiva por la parte superior de la columna. El eluyente actúa desorbiendo los compuestos bioactivos del adsorbente y llevando los compuestos bioactivos a través de la columna. El eluyente se alimenta preferiblemente al paso a una velocidad predeterminada, que puede variar entre 1 y 5 volúmenes de lecho por hora. Sin embargo, un experto en la técnica podrá comprender que la velocidad adecuada dependerá de numerosos factores, incluyendo el tamaño del aparato y si el proceso se lleva a cabo a escala de laboratorio o industrial.

El eluyente puede comprender cualquier disolvente o mezcla de disolventes adecuados. Preferiblemente, el disolvente o la mezcla de disolventes se selecciona entre los que están permitidos para su uso en productos alimenticios. En una realización, el eluyente comprende alcohol y agua. Cuando el eluyente comprende alcohol, puede usarse cualquier concentración de alcohol. Las concentraciones preferidas de alcohol se encuentran en el intervalo de desde aproximadamente el 10 hasta el 80% (v/v). Sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que la concentración de alcohol usada puede variar dependiendo de la naturaleza del compuesto bioactivo y el resultado deseado. Además, puede emplearse cualquier alcohol adecuado en el eluyente. Un alcohol preferido es etanol.

La concentración de alcohol en el eluyente puede permanecer sustancialmente constante. El eluyente puede comprender al menos aproximadamente el 40% (v/v) de alcohol, preferiblemente al menos aproximadamente el 50% de alcohol y más preferiblemente aproximadamente el 70% (v/v) de alcohol. Como alternativa, la concentración de alcohol puede aumentar durante la desorción de el al menos un compuesto bioactivo del adsorbente. El contenido

de alcohol puede aumentar a una velocidad sustancialmente constante o de manera gradual. En una realización, la concentración de alcohol en el eluyente puede aumentar desde aproximadamente el 10 hasta el 80% (v/v) durante la desorción de al menos un compuesto bioactivo del adsorbente.

5 Al salir de la columna, entonces se recoge el eluyente. Se recoge al menos una fracción, y preferiblemente múltiples fracciones, de eluyente correspondientes a la presencia de los compuestos bioactivos insolubles en agua desorbidos. Además, también pueden emplearse métodos de recogida no fraccionada. Puede analizarse la disolución recogida para determinar la presencia de compuestos bioactivos. Un método de análisis preferido implica el uso de HPLC.

10 Los compuestos bioactivos insolubles en agua derivados del material vegetal y el residuo vegetal comprenden flavonas polimetoxiladas. Por ello, la fracción recogida del adsorbente polimérico puede contener los compuestos de flavonas polimetoxiladas desorbidos. Las flavonas polimetoxiladas se han separado de otros compuestos bioactivos presentes en el material vegetal.

15 También se dan a conocer flavonas polimetoxiladas purificadas que se prepararon mediante un proceso tal como se describe en el presente documento.

20 Con referencia ahora a la figura 20, se muestra un diagrama esquemático de un sistema para llevar a cabo un proceso según una realización de la invención. En esta realización, se alimenta un extracto vegetal obtenido de la cáscara de cítricos en un extractor (1) a contracorriente y se pone en contacto con agua para extraer los componentes solubles en agua del extracto de cáscara de cítricos. Los componentes solubles en agua, que incluyen compuestos bioactivos flavonoides y limonoides, se aíslan en un extracto acuoso. El extracto acuoso se alimenta luego a un filtro (2) para retirar todo material sólido del extracto. El extracto acuoso filtrado se carga sobre una columna empacada con un adsorbente (3) polimérico acrílico. Los compuestos flavonoides se adsorben sobre el adsorbente (3) acrílico mientras que los compuestos limonoides, que no se adhieren sustancialmente al adsorbente (3) acrílico, pasan a través del adsorbente (3) y se recogen.

30 Los compuestos flavonoides adsorbidos se desorben del adsorbente (3) acrílico mediante el paso de un eluyente que contiene etanol al 60% en agua a través de la columna (3). Luego se recogen las fracciones de eluato correspondientes a los compuestos flavonoides desorbidos. Las fracciones recogidas se hacen pasar sobre evaporadores (4) de recuperación de alcohol que retiran la mayor parte del etanol para permitir la recogida de los compuestos flavonoides purificados. El etanol retirado puede guardarse en un tanque de etanol y posteriormente destilarse para volver a usarlo si se deseara.

35 Una disolución que contiene los compuestos limonoides que han eluido del adsorbente (3) polimérico acrílico se carga luego sobre una columna empacada con un adsorbente (5) polimérico de poliestireno-divinilbenceno. Los compuestos limonoides (y posiblemente algunos otros compuestos apolares, tales como flavonoides) se adsorben sobre el adsorbente (5) de poliestireno-divinilbenceno mientras que los componentes polares, tales como los ácidos orgánicos simples y azúcares naturales, no se adsorben y eluyen del adsorbente (5) polimérico. La disolución eluida, que contiene los ácidos orgánicos simples y los azúcares naturales, forma un componente de "zumo" purificado y posteriormente se recoge. Luego se usa un eluyente que comprende etanol al 30% en agua para retirar los compuestos limonoides adsorbidos del adsorbente (5) polimérico de poliestireno-divinilbenceno y se recogen las fracciones correspondientes a la presencia de los compuestos limonoides desorbidos.

45 Después de la desorción del adsorbente (5) polimérico de poliestireno-divinilbenceno, se cargan entonces las fracciones que contienen los compuestos limonoides sobre una columna que contiene una resina (6) de intercambio aniónico. La resina (6) de intercambio aniónico adsorbe los compuestos limonoides mientras que todos los componentes que no se unen a la resina de intercambio aniónico pasan a través de la columna que contiene la resina (6) y se recogen. Luego se carga una disolución de sal sobre la resina (6) de intercambio aniónico para desorber los compuestos limonoides de la resina (6). Se recogen las fracciones que contienen los compuestos limonoides desorbidos así como la sal. Las fracciones recogidas corresponden a la presencia de los compuestos limonoides.

50 Las fracciones que contienen los compuestos limonoides desorbidos de la resina (6) de intercambio aniónico se cargan luego sobre una columna que contiene un adsorbente (7) polimérico de poliestireno-divinilbenceno. El adsorbente (7) polimérico se usa para retirar la sal presente en la disolución con los compuestos limonoides. Los compuestos limonoides se adsorben sobre el adsorbente (7) polimérico de poliestireno-divinilbenceno mientras que la sal, que no se adsorbe, pasa a través de la columna que contiene el adsorbente (7) polimérico. Los compuestos limonoides se desorben luego del adsorbente (7) polimérico haciendo pasar una disolución alcohólica a través del adsorbente (7). A continuación se recogen las fracciones de eluato correspondientes a la presencia de los compuestos limonoides desorbidos.

65 Las fracciones recogidas que comprenden los compuestos limonoides desorbidos pueden hacerse pasar sobre evaporadores (4) de recuperación de alcohol para retirar el etanol de las fracciones y permitir la recogida de los compuestos limonoides purificados. El etanol retirado puede guardarse en un tanque de etanol y posteriormente

destilarse para volver a usarlo si se deseara.

Después de la extracción de los componentes solubles en agua, el extracto de cáscara de cítricos puede extraerse adicionalmente alimentando el extracto de cáscara de cítricos a un segundo extractor (8) a contracorriente y poniéndolo en contacto con una disolución acuosa de etanol al 10% con el fin de extraer los compuestos insolubles en agua del extracto de cáscara. Este proceso proporciona un extracto alcohólico que comprende compuestos insolubles en agua, incluyendo compuestos bioactivos de flavonas polimetoxiladas.

El extracto alcohólico se carga sobre una columna que contiene un adsorbente (9) polimérico de poliestireno-divinilbenceno. Los compuestos insolubles en agua apolares, tales como las flavonas polimetoxiladas, se adsorben sobre el adsorbente (9) de poliestireno-divinilbenceno y se retienen por el adsorbente mientras que todos los componentes que no pueden adsorberse sobre el adsorbente polimérico pasan a través del adsorbente (9).

A continuación, las flavonas polimetoxiladas adsorbidas se retiran del adsorbente (9) de poliestireno-divinilbenceno haciendo pasar una disolución de etanol al 96% y agua a través de la columna. Los compuestos de flavonas polimetoxiladas desorbidos se recogen luego en fracciones de eluato correspondientes a la presencia de los compuestos bioactivos. Las fracciones de eluato recogidas pueden hacerse pasar sobre evaporadores (10) de recuperación de alcohol que retiran el etanol para permitir la recogida de las flavonas polimetoxiladas purificadas. Si se deseara, el etanol retirado puede guardarse en un tanque de etanol y posteriormente destilarse para su reutilización.

El sistema anterior puede operarse como un proceso continuo o de manera discontinua. En un proceso continuo, las columnas que contienen cada uno de los adsorbentes poliméricos requeridos y la resina de intercambio aniónico pueden disponerse en una secuencia, de tal manera que una vez que los compuestos bioactivos deseados han eluido de una columna, el eluato resultante se alimenta directamente sobre la columna siguiente.

Los compuestos bioactivos obtenidos según la presente invención también pueden tratarse de cualquier manera adecuada que facilite el subsiguiente uso o almacenamiento de los compuestos. En una realización preferida, los compuestos bioactivos pueden someterse a procesos de evaporación, tal como por ejemplo secado por congelación, para retirar el exceso de disolvente de los compuestos y poner así los compuestos bioactivos en una forma apropiada para el almacenamiento o uso adicional.

Se da a conocer además un compuesto bioactivo producido mediante un proceso tal como se describe en el presente documento. También se da a conocer una composición que comprende un glicósido limonoide. La presente invención puede mejorar significativamente la pureza de los compuestos bioactivos recuperados de materiales vegetales y extractos vegetales. La invención también puede conducir a mayores recuperaciones de los compuestos bioactivos purificados. Por ejemplo, pueden recuperarse glucósidos limonoides de frutos cítricos a una concentración de aproximadamente el 50% al 70% en una base de peso seco. Esto se compara favorablemente con procesos de la técnica anterior en los que normalmente se recuperan glucósidos limonoides en cantidades que pueden ser de tan sólo aproximadamente del 10% al 15%. Además, el proceso de la invención proporciona ventajosamente una pureza mejorada de los compuestos bioactivos recuperados. Por consiguiente, pueden recuperarse flavonas polimetoxiladas menos mezcladas con el principio amargo de limonina.

Debido a que los compuestos bioactivos preparados según el proceso de la invención son de pureza mejorada es más fácil formularlos en alimentos funcionales que permiten que dosis globales mucho menores proporcionen una dosis eficaz del componente bioactivo objetivo y por ende es menos probable la aparición de sabores indeseados en la formulación alimenticia.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención con mayor detalle, sin embargo los ejemplos no deben interpretarse como limitativos en modo alguno del alcance de la invención tal como se describe en el presente documento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto de cáscara de naranja

Lang Technologies suministró el extracto de cáscara de naranja (OPE) como una disolución de 20,4 Brix. Se determinó el grado Brix midiendo la densidad relativa y usando tablas de conversión. Brevemente, se mide la masa de 25 ml de OPE con una balanza electrónica. Se determinó la densidad relativa dividiendo esta masa entre la del mismo volumen de agua desionizada y se encontró que era de 1,085. Según las tablas de conversión, esto equivale a 20,4 Brix. El pH de OPE era de aproximadamente 4,0 (papel indicador Merck Universal). La figura 1 muestra un cromatograma de HPLC de una muestra representativa de extracto de cáscara de naranja.

Alcohol

El alcohol usado en los disolventes de elución se suministró como etanol desnaturalizado al 95%.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

5 Se usó HPLC para monitorizar el avance de la elución de los compuestos bioactivos de las resinas poliméricas adsorbentes. Se realizó HPLC en las siguientes condiciones:

10 • Aparato: Sistema de HPLC Shimadzu VP7 que consiste en un sistema de mezclado a baja presión, detector por red de diodos SPD-M10A VP y software VP para controlar el gradiente y el detector.

• Fase móvil D: Ácido fosfórico acuoso al 0,1% (v/v).

15 • Fase móvil A: Acetonitrilo

• Tiempo de ejecución de 55 minutos

• Columna: Alltima C1 8 5u, n.º de pieza 88056 con precolumna

20 • Longitud de onda de monitorización de 210 y 280 nm (datos recogidos entre 200 nm y 350 nm en escalones de 2 nm).

• Temperatura del horno: 30°C

25 • Velocidad de flujo: 1,0 ml/min (contrapresión de 2915 kgf/cm²).

• Volumen de inyección de 20 µl

30 • El gradiente de HPLC usado para determinar la presencia de compuestos limonoides se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Gradiente de HPLC usado para determinar los glicósidos limonoides.

Tiempo (minutos)	Conc. disolvente D
0,01	90,0%
35,00	70,0%
45,00	60,0%
46,00	90,0%
55,00	Fin

Se monitorizó la contrapresión entre ejecuciones para asegurarse de que el rendimiento fuera el mismo.

35 EJEMPLO 1: Separación del compuesto bioactivo con un adsorbente de un polímero acrílico

Se llenó parcialmente una columna de vidrio con un diámetro interno de 40 mm y una altura de 540 mm equipada con llave de Teflon hasta una altura de 350 mm con una resina polimérica absorbente de poli(metacrilato de metilo) reticulada con etilenglicol en forma no iónica (CAS 25777-18-5) (suministrada como polímero absorbente inerte Alimentech P495 por Bucher Foodtech). El volumen de lecho de resina era de 400 ml con un volumen muerto intersticial de 180 ml. El adsorbente polimérico acrílico se acondicionó mediante lavado con diez volúmenes de lecho de agua antes de su uso.

45 Se aplicaron tres alícuotas de 250 ml de OPE (750 ml de OPE en total) por la parte superior de la columna que contenía el adsorbente polimérico acrílico, permitiendo percolar cada alícuota por la columna a una velocidad de 4 ml/minuto. A esta velocidad, a cada alícuota le llevó aproximadamente una hora eluir a través de la columna. Después de la aplicación del OPE, se lavó la columna con dos alícuotas de 250 ml de agua.

50 Luego se aplicó un disolvente de elución que contenía una mezcla de alcohol y agua por la parte superior de la columna en alícuotas de 250 ml. La concentración de alcohol en el disolvente de elución aumentó con cada alícuota aplicada. Se hizo pasar el disolvente de elución a través de la columna y a continuación se recogió en fracciones y se analizó mediante HPLC.

55 Se observa que el grado alcohólico de las fracciones eluidas puede ser algo menor que el aplicado por la parte superior de la columna ya que la última se mezcla con el líquido que queda en el "volumen muerto" intersticial del

adsorbente polimérico. Se estima que la concentración de alcohol es menor en aproximadamente un tercio de la diferencia entre el grado de la fracción de eluato actual y la anterior que está reemplazando. Así, por ejemplo, si se añadió una disolución al 20% después de una disolución al 10%, la concentración de alcohol en el eluato sería de aproximadamente el 17%.

5 Se recogió un total de doce fracciones para su análisis mediante HPLC. En la tabla 2 se muestra una descripción de las mismas.

Tabla 2

Fracción	Identidad
1	Eluato después de aplicar los primeros 250 ml de OPE
2	Eluato después de aplicar los segundos 250 ml de OPE
3	Eluato después de aplicar los terceros 250 ml de OPE
4	Primer lavado con agua
5	Segundo lavado con agua
6	Etanol al 10% en agua
7	Etanol al 20% en agua
8	Etanol al 30% en agua
9	Etanol al 40% en agua
10	Etanol al 50% en agua
11	Etanol al 60% en agua
12	Etanol al 80% en agua

10

Resultados

Los cromatogramas correspondientes a los resultados del análisis mediante HPLC de las fracciones anteriores se muestran en las figuras 2 a 6. Se identificaron los componentes del OPE según el tiempo de retención. Las figuras muestran que una variedad de componentes están presentes en las fracciones que salen de la columna.

15

El cromatograma obtenido con la fracción 1 se muestra en la figura 2. Tal como se muestra en la figura 2, los picos son pequeños, eluyendo la mayor parte del material en un plazo de cuatro minutos. El primer pico a los 2 minutos corresponde a azúcares y el segundo a los 4 minutos es florina, uno de los principales constituyentes del extracto de cáscara de naranja. También se obtuvieron resultados similares para las fracciones 2 a 6.

20

En la fracción 7, los picos comienzan a aumentar de tamaño tal como se muestra en la figura 3. El pico a 25,48 es el glucósido limonina (LG).

25 En las fracciones 8 y 9, se observó un aumento del pico correspondiente al glucósido limonina. Además, tal como se observa en el cromatograma obtenido para la fracción 9 (figura 4), se observaron cuatro picos con una conformación limonoide típica, concretamente el glucósido limonina (25,39 minutos), un limonoide relacionado (29,9 minutos), el glucósido nomilina (NG) (34,16 minutos) y el glucósido obacunona (OG) a los 36,98 minutos.

30 En la fracción 10, se observó que el limonoide a los 34 minutos todavía era significativo pero habían disminuido significativamente de tamaño los que habían eluido antes.

35 A medida que la concentración de alcohol aumenta hasta aproximadamente el 60% en la fracción 11, comienzan a eluir los compuestos flavonoides tal como se muestra en la figura 5. En este caso, los dos picos principales son los flavonoides hesperidina (28,13 minutos) y narirutina (30,36 minutos).

40 En la fracción 12, la concentración de alcohol es de aproximadamente el 80%. Tal como se muestra en la figura 6, los compuestos predominantes en la fracción 12 son hesperidina y narirutina junto con otro flavonoide a los 40,04 minutos que se considera que es neoponcirina (didimina).

Determinación de la concentración del glucósido limonina

45 Dado que no hay patrones comerciales del glucósido limonina, se determinó la concentración de los glucósidos limonoides frente a limonina (Sigma Aldrich) mediante comparación de las áreas de pico y aplicación de un valor de conversión (1,4) para tener en cuenta el peso molecular de la glucosa.

Se llevó a cabo una comprobación de linealidad del sistema de HPLV usando patrones de limonina. Los resultados de la comprobación de linealidad y calibración se muestran en la tabla 3.

5 Tabla 3: Resultados de la comprobación de linealidad y calibración.

Concentración	Área de pico a 210 nm
150	9848525
300	19645424
450	2935005
600	3918728
750	4886204

Se construyó un gráfico de calibración de concentración frente a área de pico (a 210 nm) para la limonina y se usó para determinar el contenido de limonoides de las fracciones recogidas.

10 Los datos sin procesar del contenido de limonoide en las fracciones 7-10 se muestran en la tabla 4 junto con el contenido de limonoides de un ejemplo comparativo:

Tabla 4: Datos sin procesar (área).

Fracción	Áreas de pico		
	LG	NG	OG
7	2459092	245909	
8	4427660	442766	1869183
9	7236151	1269381	2532814
10	2531755		
Ejemplo comparativo	7022709	ND	

15 Mediante comparación con el gráfico de calibración, puede obtenerse una estimación de la cantidad del glucósido limonoide en el extracto de cáscara de naranja. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Concentraciones de los LG en el OPE (ppm).

Fracción	LG	NG	OG
7	375	36	
8	679	66	286
9	1110	193	387
10	387		
Ejemplo comparativo	1077		

NG y OG no se determinaron en el original por las interferencias debidas a otros compuestos.

20 Tal como se muestra en este ejemplo, parece que los limonoides se retienen con menos grado sobre la resina polimérica acrílica y eluyeron de la resina acrílica a una menor concentración de alcohol que los compuestos flavonoides. Esto permitió separar los compuestos limonoides de los compuestos flavonoides sin una contaminación cruzada significativa de las fracciones recogidas.

25 EJEMPLO 2: Separación del compuesto bioactivo con una columna con resina de intercambio aniónico

30 Se llenó una columna de 2 cm de diámetro y 20 cm de longitud hasta una altura de 200 mm con una resina de intercambio aniónico débil (resina Diaion WA-30 con un tamaño de partícula promedio de 0,47 mm, capacidad total de intercambio de 1,5 meq/ml, suministrada por Supelco). El volumen de lecho de la resina era de 50 ml. Se acondicionó la resina de intercambio aniónico (WA-30) antes de su uso mediante lavado con 2 volúmenes de lecho (100 ml) de hidróxido de sodio 0,5 M, seguido por cinco volúmenes de lecho (250 ml) de agua, seguido por 2 volúmenes de lecho de ácido clorhídrico 0,5 M, seguido por cinco volúmenes de lecho de agua. El pH del agua de lavado final era de 4,2.

35

Se trataron las fracciones 8 y 9 del ejemplo 1 para purificar adicionalmente los glucósidos limonoides en estas fracciones. Estas fracciones, con el 30 y el 40% de alcohol respectivamente, contienen convenientemente una gran proporción de LG.

- 5 Se vertió la fracción 8 sobre la parte superior de una resina de intercambio aniónico débil (WA-30) acondicionada. La disolución se permitió pasar a través de la columna y se recogió el eluato y se analizó mediante HPLC.

De manera similar, se vertió la fracción 9 sobre la parte superior de la resina WA-30 y se recogió el eluato de manera similar y se analizó mediante HPLC.

- 10 Posteriormente se lavó la resina de intercambio aniónico con 250 ml de alcohol al 30%. Luego se hicieron pasar tres alícuotas de 150 ml de NaCl 0,5 M a través de la resina de intercambio aniónico y se recogieron fracciones de la disolución de sal eluida y se analizaron mediante HPLC.

15 Resultados

En la tabla 6 se enumeran cada uno de los análisis realizados mediante HPLC.

Tabla 6: Gradiente de HPLC usado para determinar los limonoides.

Tiempo	Conc. disolvente D
0,01	90,0
35,00	70,0
45,00	60,0
46	90,0
55,00	Fin

- 20 En la figura 7 se muestra un cromatograma del eluato obtenido después de aplicar la fracción 9 sobre la columna WA-30. Los picos correspondientes a los limonoides en la fracción 9, que se habían observado previamente en la figura 4, están ausentes porque la resina WA-30 ha retenido estos compuestos. La resina no retuvo otros componentes y eluyeron de la columna. Se observó un resultado similar después de aplicar la fracción 8 a la resina WA-30. Esto muestra que los compuestos limonoides se unen a la resina WA-30.

- 25 Se usó el paso de alícuotas de NaCl 0,5 M sobre la resina WA-30 para desorber los compuestos limonoides de la resina. En la figura 8, se muestra un cromatograma de un eluato obtenido después de hacer pasar 300 ml de NaCl 0,5 M sobre la resina WA-30. Tal como se muestra en la figura 8, la fracción de eluato es rica en LG. Los LG no tienen un coeficiente de extinción de UV tan alto como los flavonoides, de modo que la pureza de los LG en esta fracción parece ser mayor del 75%.

- 30 Este resultado muestra que los glucósidos limonoides pueden purificarse adsorbiendo selectivamente los LG sobre una resina de intercambio iónico. Entonces, la disolución de sal puede retirar eficazmente los glucósidos limonoides unidos de la resina. Los glucósidos limonoides purificados resultantes parecen tener una pureza superior al 50%. Además, los glucósidos limonoides purificados no están contaminados por azúcares, o flavonoides tales como narirutina, hesperidina y neoponcirina.

40 EJEMPLO 3: Proceso para recuperar compuestos bioactivos de extractos de cáscara de naranja (OPE)

Se describe un proceso para separar compuestos bioactivos de extractos de cáscara de naranja (OPE). El proceso empleó cuatro columnas separadas que se describen a continuación:

- 45 Columna A: La columna era de vidrio con un diámetro interno de 40 mm y una altura de 540 mm equipada con una llave de Teflon. Se llenó parcialmente hasta una altura de 200 mm con resina acrílica (polímero absorbente inerte Alimentech P495 suministrado por Bucher Foodtech). El volumen de lecho de la resina era de 250 ml y el volumen muerto intersticial era de 110 ml.

- 50 Columna B: La columna era de vidrio con un diámetro interno de 23 mm y una altura de 180 mm equipada con una llave de Teflon. Se llenó parcialmente hasta una altura de 180 mm con la resina de poliestireno-divinilbenceno (Amberlite XAD-16, área superficial de 800 m²/g, diámetro de poro promedio de 100 angstroms suministrada por Sigma-Aldrich). El volumen de lecho de la resina era de 50 ml.

- 55 Columna C: La columna era de vidrio con un diámetro interno de 23 mm y una altura de 180 mm equipada con una llave de Teflon. Se llenó parcialmente hasta una altura de 200 mm con una resina de intercambio aniónico débil (resina Diaion WA-30 con un tamaño de partícula promedio de 0,47 mm, capacidad total de intercambio de

1,5 meq/ml, suministrada por Supelco). El volumen de lecho de la resina era de 50 ml.

Columna D: La columna era de vidrio con un diámetro interno de 23 mm y una altura de 180 mm equipada con una llave de Teflon. Se llenó parcialmente hasta una altura de 180 mm con resina (Amberlite XAD-16, área superficial de 800 m²/g, diámetro de poro promedio de 100 angstroms suministrada por Sigma-Aldrich). El volumen de lecho de la resina era de 50 ml.

El OPE y las resinas adsorbentes poliméricas se usaron tal como se suministraron o se prepararon antes de su uso según los procedimientos generales que se describieron anteriormente.

Se monitorizó la elución de los compuestos bioactivos de cada columna mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (sistema de HPLC VP7 de Shimadzu que consiste en un sistema de mezclado a baja presión FCV-10AL, sistema de desgasificación DGU-14A, módulo de suministro de disolvente LC-10AD, inyector automático SIL-10AD, detector por red de diodos SPD-M10A VP y software VP.)

Columna A (adsorbente polimérico acrílico):

En este experimento se mostró que el adsorbente polimérico acrílico separa los glucósidos limonoides de los compuestos flavonoides.

Se cargaron seis litros de OPE de 4,1 Brix sobre la columna que contenía el adsorbente polimérico acrílico (columna A) en alícuotas de 1 litro. Se permitió percolar el OPE a través de la columna después de la aplicación de cada alícuota.

Inicialmente, después de que hubo pasado 1 litro del OPE a través de la columna, no eluyeron más compuestos limonoides o flavonoides de la columna. Después de haber aplicado 2 litros de OPE a la columna, se observó elución de compuestos limonoides (principalmente el glucósido limonina con un tiempo de retención de 19 minutos) de la columna. Después de haber aplicado un total de 3, 4 y 5 litros de OPE a la resina acrílica, se observaron más compuestos limonoides, principalmente el glucósido limonina (LG), el glucósido desacetilnomilina (DANG) (tiempo de retención de 24,5 minutos), el glucósido nomilina (NG) (tiempo de retención de 28,4 minutos) y el glucósido ácido nomílico (NAG) (tiempo de retención de 29 minutos) que eluían de la resina acrílica. Después de haber aplicado 6 litros de OPE a la columna, se observó que eluía el glucósido obacunona (OG) (tiempo de retención de 31 minutos) de la columna además de los compuestos limonoides identificados previamente.

En la figura 9 se muestra un cromatograma de HPLC del eluato obtenido después de haber eluido 6 litros de OPE a través de la columna (A). Pueden determinarse las cantidades relativas de cada compuesto de glucósido limonoide eluido de la resina polimérica acrílica y en la figura 10 se muestra un gráfico que ilustra las cantidades relativas de cada compuesto de glucósido limonoide.

No se detectó la presencia de ninguno de los principales compuestos flavonoides en ninguno de los eluatos recogidos. En consecuencia, se muestra que el adsorbente polimérico acrílico podía retirar sustancialmente los compuestos flavonoides del OPE mientras que los compuestos limonoides, que no se adsorbían sobre la resina acrílica, podían pasar a través de la misma.

Tal como se describirá más adelante, las fracciones de OPE que eluyeron de la columna (A) pueden cargarse sobre la columna (B) para purificar los glucósidos limonoides y también para preparar un “zum” de sabor agradable a partir de azúcares naturales y otros compuestos altamente polares presentes en el OPE.

Una vez que se había dejado pasar el OPE a través de la resina acrílica, se lavó la columna con dos volúmenes de lecho de agua. Se eluyeron cantidades adicionales de compuestos limonoides de la columna con el agua, sin embargo no se observó la presencia de compuestos flavonoides en el eluato acuoso.

Luego se aplicó una disolución de eluyente de etanol acuoso por la parte superior de la columna para eluir los compuestos flavonoides que se habían adsorbido sobre la resina polimérica acrílica. Se aplicó una concentración de alcohol en gradiente que aumentaba de manera gradual desde el 20%(v/v) hasta el 60%(v/v) según la tabla 7. Después de la aplicación, se permitió que cada alícuota de eluyente percolara a través de la columna para desorber los compuestos bioactivos flavonoides de la resina acrílica. A continuación se recogieron los compuestos desorbidos y se analizaron mediante HPLC.

Tabla 7

Fracción	Grado (% de etanol)	Volúmenes de lecho
15	20	1
16	30	1

17	40	1
18	50	1
19	60	1
20	80	1

El eluato obtenido después de desorber la resina acrílica (columna (A)) con una disolución que contenía etanol al 20% no contenía ningún compuesto flavonoide. Sin embargo, cuando la concentración de etanol en el eluyente se aumentaba al 30%, el eluato resultante contenía una cantidad pequeña de flavonoides. Un aumento adicional en la concentración de etanol en el eluato hasta el 40% y el 50% dio como resultado cantidades significativas de los compuestos flavonoides narirutina (tiempo de retención de 22 minutos) y hesperidina (tiempo de retención de 24,35 minutos) que se desorbían y eluían de la resina acrílica. Cuando la cantidad de etanol en el eluyente se aumentaba hasta el 60%, el eluato resultante contenía una cantidad significativa de narirutina y hesperidina así como de didimina a un tiempo de retención de 27 minutos.

En la figura 11 se muestra un cromatograma de HPLC de una fracción de eluato obtenida después de la desorción de los compuestos flavonoides de la columna (A) con etanol al 40%. Pueden determinarse las cantidades relativas de cada compuesto flavonoide desorbido de la resina polimérica acrílica por cada fracción de eluyente y en la figura 12 se muestra un gráfico que ilustra las cantidades relativas de compuestos flavonoides recogidos a medida que se aumentó la concentración de alcohol.

Se ha encontrado que la resina polimérica acrílica retiene los flavonoides, pero permite que pasen los glucósidos limonoides junto con componentes polifenólicos, azúcares y ácidos orgánicos más polares. Los flavonoides se podrían desorber luego de la resina acrílica usando etanol acuoso.

Columna B (adsorbente de poliestireno-divinilbenceno):

En el experimento se muestra que la columna de poliestireno-divinilbenceno es de utilidad en la separación de los glucósidos limonoides de los azúcares naturales y compuestos más polares que eluyen de la columna (A).

En este estudio, se cargó un total de seis litros de OPE de 4,1 Brix de la columna (A) sobre la columna (B) que contenía el adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno, en alícuotas de 1 l a medida que salieron de la columna con resina acrílica. Se permitió que las alícuotas de OPE percolaran a través de la resina de poliestireno-divinilbenceno y se recogieron las alícuotas eluidas y analizaron mediante HPLC.

Después de la aplicación de las primeras dos alícuotas de OPE sobre la columna (B), no se observó que eluyesen glucósidos limonoides de la columna. Después de la aplicación y elución de la tercera y cuarta alícuotas de OPE, se observó que una pequeña cantidad de glucósidos limonoides (pero no compuestos flavonoides) pasaba a través de la columna. Después de la aplicación de la quinta y sexta alícuotas de OPE sobre la columna (B), se observó elución de algo del glucósido limonina y pequeñas cantidades de otros glucósidos limonoides de la columna. Se lavó luego la columna con cuatro volúmenes de lecho de agua para retirar los azúcares naturales y otros materiales altamente polares de la columna. Se recogieron las fracciones de agua y pueden combinarse con las fracciones de OPE eluidas para formar un componente de "zumo" de sabor agradable que está libre de cualquier compuesto amargo. En la figura 13 se muestra un cromatograma de HPLC del componente de "zumo" obtenido de la columna (B). Los eluatos de OPE obtenidos de la columna (B) no tenían los principales flavonoides (principalmente hesperidina, narirutina y didimina), ni contenían cinco glucósidos limonoides, el glucósido limonina, el glucósido desacetilnomilina, el glucósido nomilina, el glucósido ácido nomílico y el glucósido obacunona. El eluato de OPE obtenido de la columna (B) contenía componentes polifenólicos más azúcares y ácidos orgánicos. El eluato es adecuado para mezclarlo en productos alimenticios tales como zumo de naranja, para suplementar el producto alimenticio.

Se desorbieron luego de la columna los glucósidos limonoides retenidos sobre la columna (B) con una disolución de eluyente de etanol acuoso. Tal como se muestra en la tabla 8, se usó como eluyente un gradiente gradual de etanol que aumentaba desde el 10%(v/v) hasta el 80%(v/v).

Tabla 8

Fracción	Grado (% etanol)	Volúmenes de lecho
21	10	2
22	20	2
23	30	2
24	50	2
25	80	2

Después de la aplicación, se permitió que cada alícuota de eluyente percolara a través de la columna para desorber los compuestos de glucósidos limonoides de la columna (B) y luego se recogieron y analizaron mediante HPLC.

5 Se observó que el eluato obtenido después de desorber la resina polimérica de poliestireno-divinilbenceno (columna B) con una disolución que contenía etanol al 10% contenía algunos glucósidos limonoides, principalmente el glucósido desacetilnomilina (tiempo de retención de 25 minutos) y el glucósido nomilina (tiempo de retención de 29 minutos).

10 Al aumentar la concentración de alcohol en el eluyente hasta el 20%, se observó que eluían otros compuestos de glucósidos limonoides, el glucósido limonina, el glucósido ácido nomilínico y el glucósido obacunona de la columna (B). Los aumentos adicionales en la concentración de etanol en el eluyente hasta el 30%, el 50% y el 80% dieron como resultado mayores cantidades de los cinco glucósidos limonoides desorbidos de la resina polimérica de poliestireno-divinilbenceno.

15 En la figura 14 se muestra un cromatograma de HPLC de una fracción de eluato obtenida después de la desorción de los compuestos de glucósidos limonoides de la columna (B). Pueden determinarse las cantidades relativas de cada compuesto de glucósido limonoide desorbido de la resina polimérica de poliestireno-divinilbenceno en cada fracción de eluato y en la figura 15 se muestra un gráfico que ilustra las cantidades relativas de cada glucósido limonoide recogido.

Columna C (resina de intercambio aniónico débil):

25 En el experimento se muestra que la columna de intercambio aniónico débil es de utilidad en la separación de los glucósidos limonoides de los compuestos más neutros que eluyen de la columna (B).

30 Los eluatos que contenían los glucósidos limonoides desorbidos de la columna (B) se combinaron y diluyeron con agua hasta un grado de etanol aproximadamente al 20% en volumen. Los eluatos combinados se aplicaron luego por la parte superior de la columna (C) y se permitió que percolaran a través de la columna a una velocidad de aproximadamente diez volúmenes de lecho por hora. Se descartó el líquido que pasaba a través de la columna. Sin embargo, se prevé que en una aplicación comercial, se podría desviar el líquido y posteriormente recuperar el alcohol. El análisis mediante HPLC mostró que el líquido que pasaba a través de la columna (C) no contenía ningún glucósido limonoide.

35 Entonces se desorbieron los glucósidos limonoides de la columna (C) usando una disolución de cloruro de sodio 0,5 M (salmuera). Casi el 100% de los glucósidos limonoides habían eluido con el paso de ocho volúmenes de lecho de salmuera por la columna. En la figura 16 se muestra un cromatograma de HPLC del eluato obtenido después de hacer pasar la disolución de salmuera a través de la resina de intercambio aniónico de la columna (C). En la figura 17 se muestra un gráfico que ilustra la cantidad de cada glucósido limonoide desorbido de la resina de intercambio aniónico a medida que se aplican cantidades crecientes de salmuera a la resina.

Columna D (adsorbente de poliestireno-divinilbenceno):

45 En este experimento se muestra que el adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno es de utilidad en la retirada de la sal de cloruro de sodio de los compuestos de glucósidos limonoides que eluyen de la columna (C). Se observó que la sal pasaba a través del adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno de la columna (D) mientras que los glucósidos limonoides se retenían por el polímero.

50 La disolución de salmuera que contenía los compuestos de glucósidos limonoides desorbidos obtenidos de la columna (C) se aplica por la parte superior de la resina de poliestireno-divinilbenceno de la columna (D) y se permite percolar a través de la resina polimérica. Se observó que los glucósidos limonoides se adsorben sobre el adsorbente polimérico mientras que el cloruro de sodio en la disolución de salmuera no lo hace. Luego se lavó la columna (D) con cuatro volúmenes de lecho de agua para retirar la sal de cloruro de sodio.

55 Entonces se desorbieron los glucósidos limonoides de la resina polimérica de poliestireno-divinilbenceno con una disolución de eluyente que contenía etanol acuoso al 50%. En la figura 18 se muestra el cromatograma de HPLC de una fracción de eluato recogida después de la desorción de los glucósidos limonoides.

60 Uno de los resultados del proceso es que puede obtenerse una fracción concentrada de glucósido limonoide. Tal como se observa en los cromatogramas de HPLC apilados de la figura 19, que muestra la fracción original de extracto de cáscara de naranja (línea inferior en cada cromatograma) y la fracción concentrada de glucósido limonoide (línea superior en cada cromatograma), la concentración de los LG en el OPE original es de aproximadamente 1000 partes por millón en total y resulta difícil distinguir los picos individuales. Sin embargo, en la fracción concentrada resultante, la cantidad de LG comprende más del 80% de los componentes en el concentrado.

65 Dado que un OPE de 12 Brix contiene 1000 ppm de LG *in toto*, cada litro contiene 100 mg de LG puros. Por ende, el proceso puede producir un gramo de LG por litro de resina acrílica para cada ciclo del proceso.

El ejemplo anterior demuestra que pueden usarse diferentes resinas adsorbentes poliméricas para separar y purificar los compuestos bioactivos del extracto de cáscara de naranja sin una pérdida significativa de los compuestos objetivo.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la separación de compuestos bioactivos obtenidos de material vegetal, comprendiendo el proceso las etapas de:
- 5 (a) poner una pluralidad de compuestos bioactivos en contacto con un primer adsorbente polimérico en condiciones que permitan la adsorción de al menos un compuesto bioactivo sobre el primer adsorbente mientras que al menos un compuesto bioactivo no se adsorbe sobre el primer adsorbente,
- 10 (b) recoger una disolución que comprende al menos un compuesto bioactivo que no se ha adsorbido sobre el primer adsorbente, y
- (c) poner la disolución obtenida en la etapa (b) en contacto con un segundo adsorbente polimérico en condiciones que permitan la adsorción de al menos un compuesto bioactivo contenido en la disolución obtenida en la etapa (b)
- 15 sobre el segundo adsorbente;
- en el que el segundo adsorbente polimérico es un adsorbente polimérico de poliestireno-divinilbenceno, y caracterizado porque el primer adsorbente polimérico es un adsorbente polimérico acrílico.
- 20 2. Proceso según la reivindicación 1, en el que el primer adsorbente polimérico es un éster acrílico.
3. Proceso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el primer adsorbente polimérico es poli(metacrilato de metilo).
- 25 4. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer adsorbente polimérico y el segundo adsorbente polimérico están dispuestos cada uno en una columna.
5. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:
- 30 poner el al menos un compuesto bioactivo adsorbido sobre el primer adsorbente polimérico en contacto con un eluyente en condiciones que permitan la desorción del al menos un compuesto bioactivo del primer adsorbente; y
- eluir el al menos un compuesto bioactivo del primer adsorbente.
- 35 6. Proceso según la reivindicación 5, en el que el eluyente comprende alcohol y agua, y en el que la concentración de alcohol permanece sustancialmente constante durante la desorción del al menos un compuesto bioactivo del primer adsorbente polimérico.
7. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las etapas de:
- 40 poner el al menos un compuesto bioactivo adsorbido sobre el segundo adsorbente polimérico en contacto con un eluyente en condiciones que permitan la desorción del al menos un compuesto bioactivo del segundo adsorbente; y
- 45 eluir el al menos un compuesto bioactivo del segundo adsorbente.
8. Proceso según la reivindicación 7, en el que el eluyente comprende alcohol y agua, y en el que la concentración de alcohol permanece sustancialmente constante durante la desorción del al menos un compuesto bioactivo del segundo adsorbente polimérico.
- 50 9. Proceso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, que comprende la etapa de:
- poner el al menos un compuesto bioactivo eluido del segundo adsorbente polimérico en contacto con una resina en condiciones que permitan interacciones iónicas entre el al menos un compuesto bioactivo y la resina de tal manera que el al menos un compuesto bioactivo se adsorba sobre la resina.
- 55 10. Proceso según la reivindicación 9, en el que la resina de intercambio iónico está dispuesta en una columna.
11. Proceso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que comprende las etapas de:
- 60 poner el al menos un compuesto bioactivo adsorbido sobre la resina de intercambio iónico en contacto con una disolución que comprende un soluto en condiciones que permitan al soluto desplazar el al menos un compuesto bioactivo de la resina; y
- 65 eluir el al menos un compuesto bioactivo de la resina.
12. Proceso según la reivindicación 11, en el que el soluto es una sal.

13. Proceso según la reivindicación 12, en el que la sal es cloruro de sodio.

5 14. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la pluralidad de compuestos bioactivos se obtienen de un fruto cítrico.

10 15. Proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la pluralidad de compuestos bioactivos comprenden un glicósido de flavanona y un glucósido limonoide, y en el que el glicósido de flavanona se adsorbe sobre el primer adsorbente polimérico y el glucósido limonoide se adsorbe sobre el segundo adsorbente polimérico para separar sustancialmente el glicósido de flavanona y el glucósido limonoide.

FIGURA 1

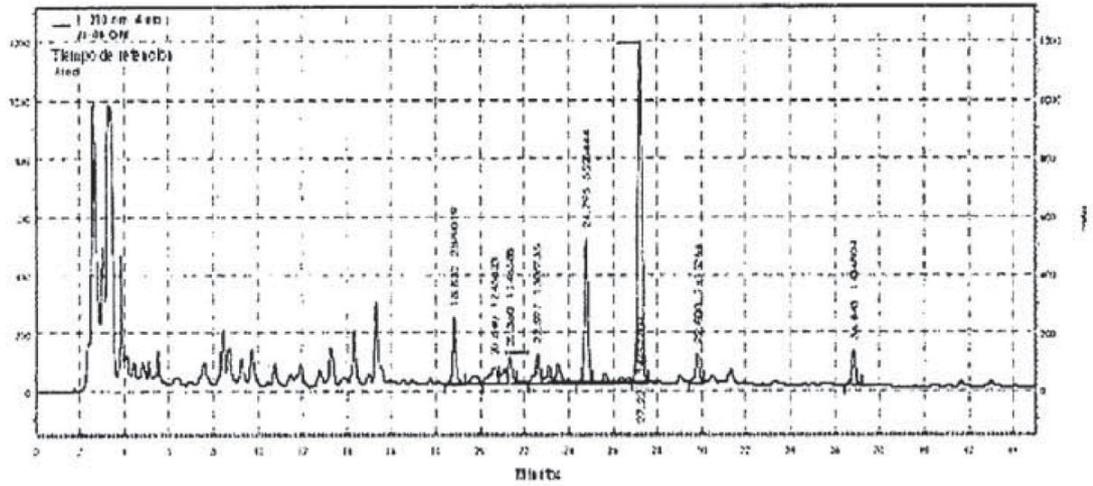


FIGURA 2

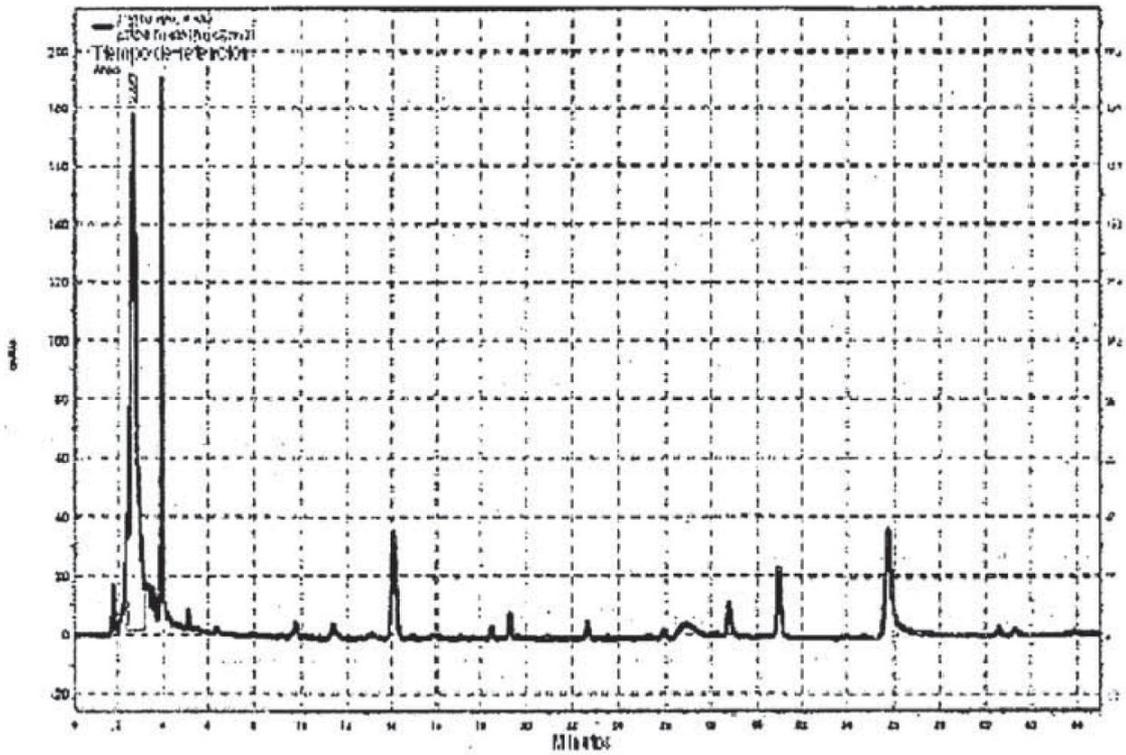


FIGURA 7

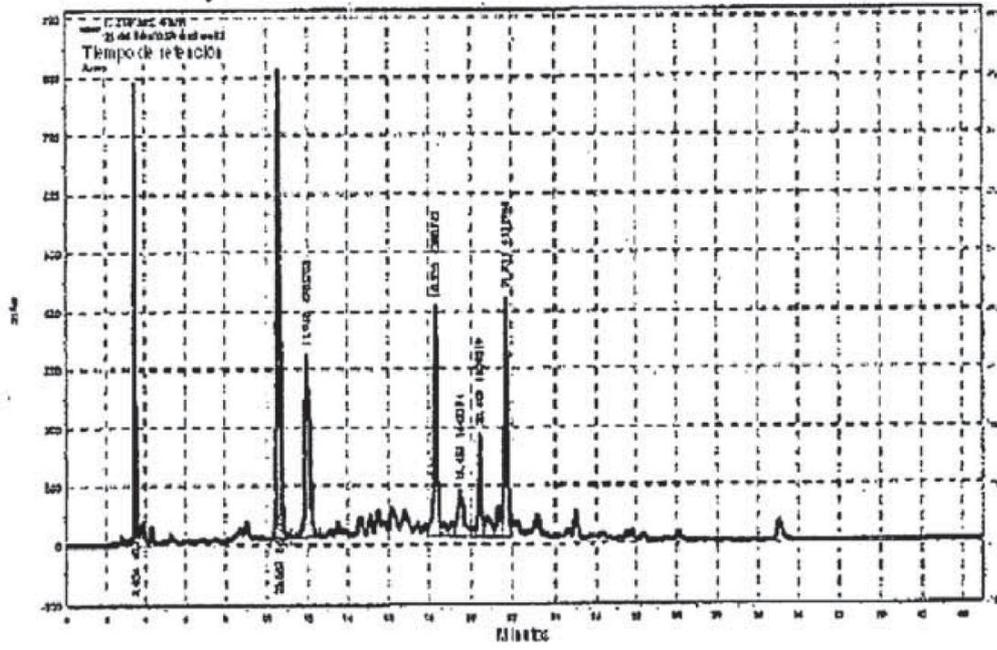


FIGURA 8

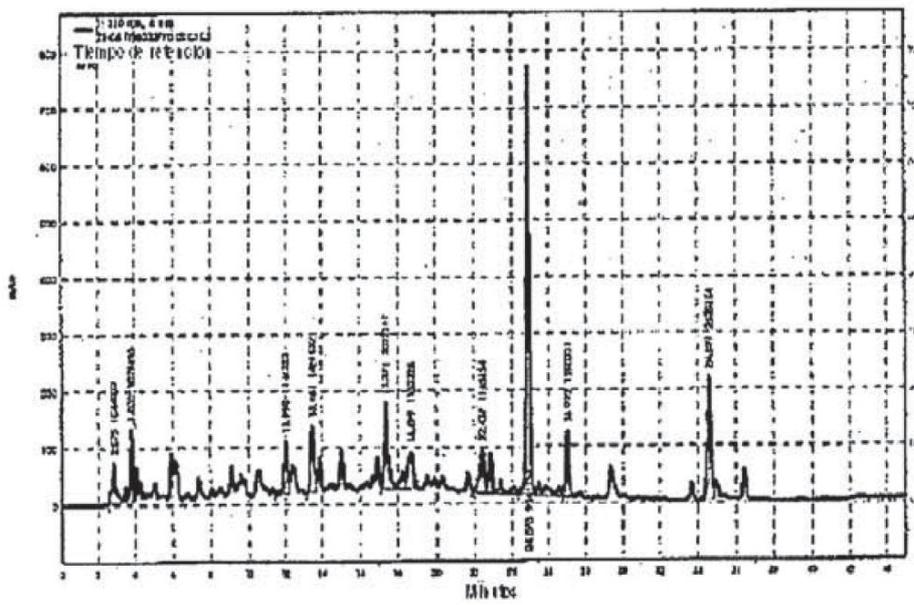


FIGURA 9

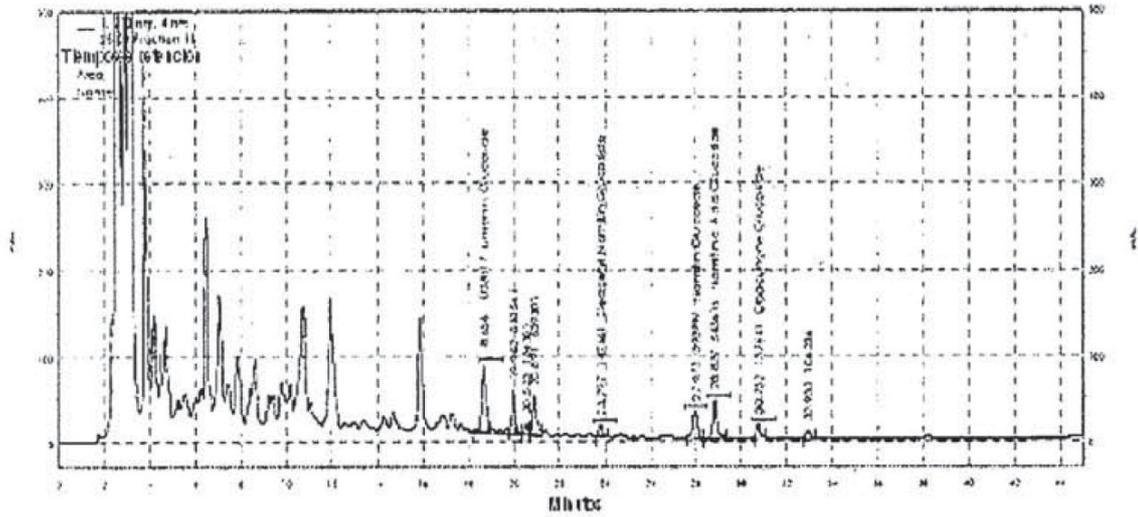


FIGURA 10

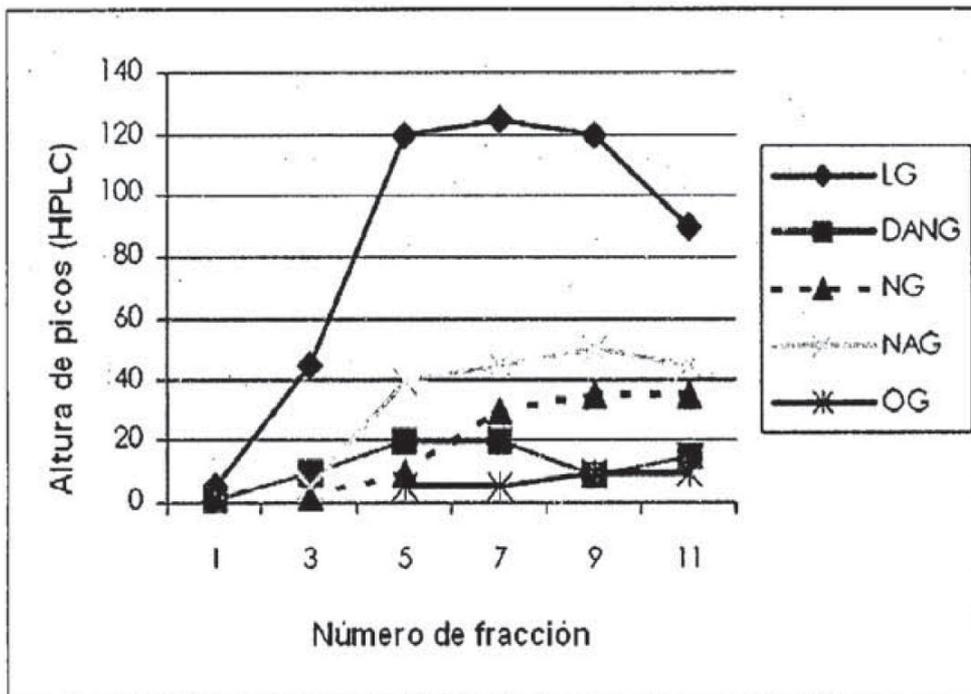


FIGURA 11

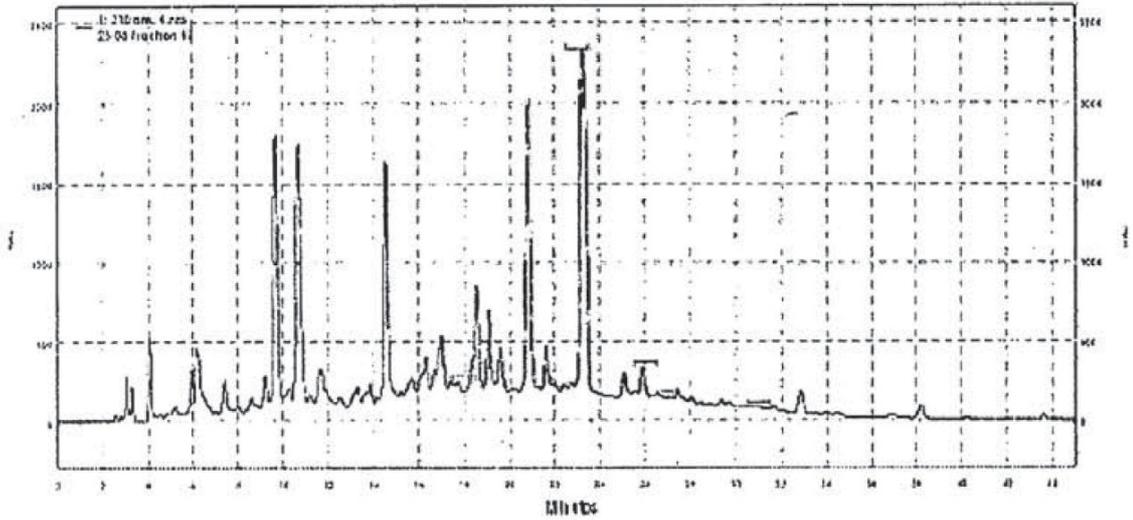


FIGURA 12

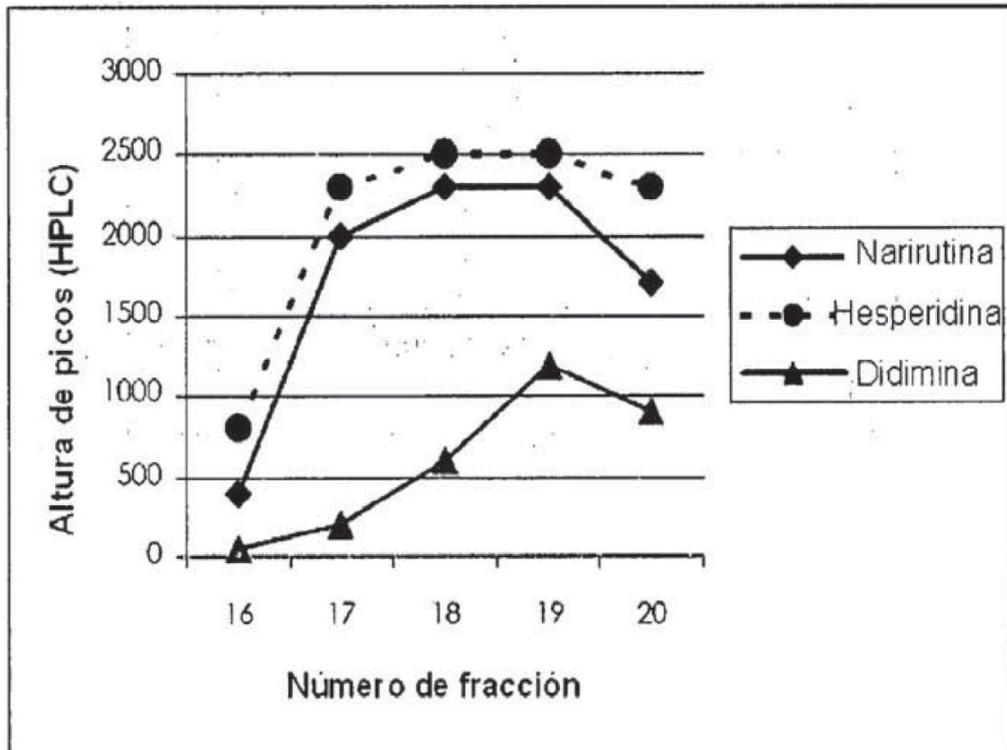


FIGURA 15

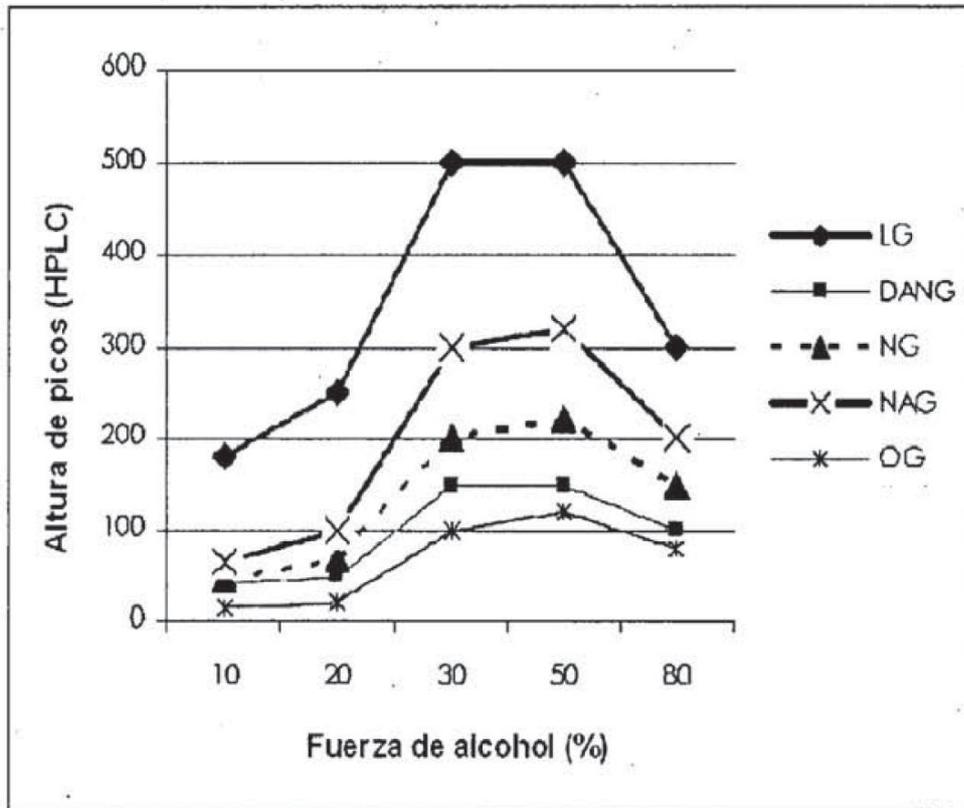


FIGURA 16

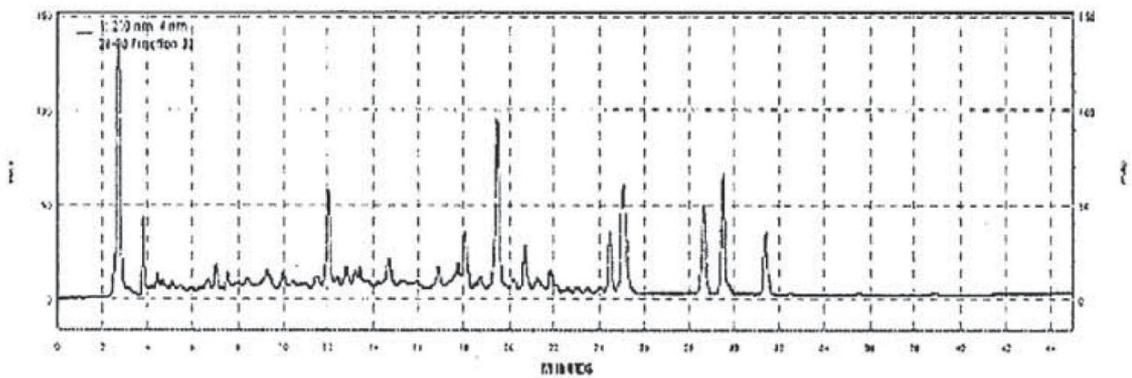


FIGURA 17

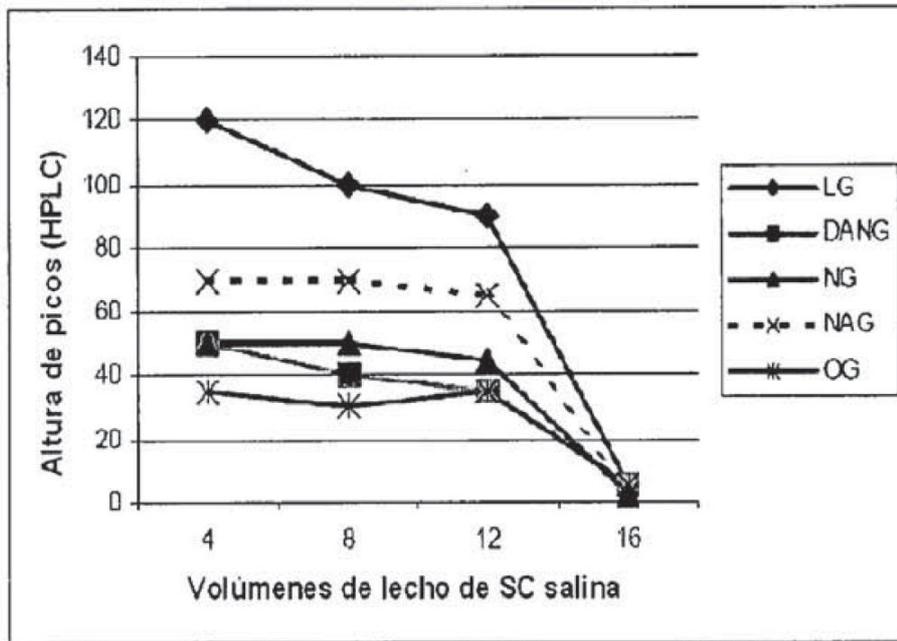


FIGURA 18

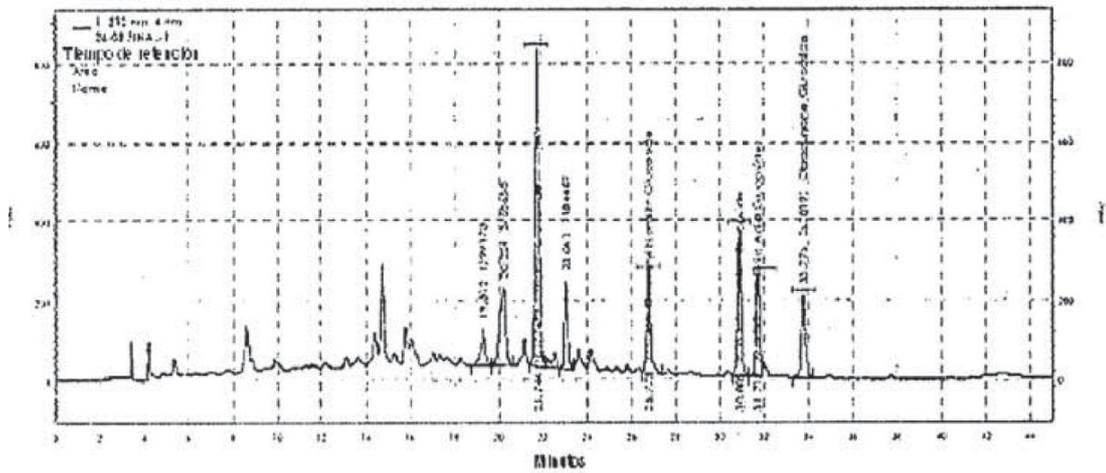


FIGURA 19

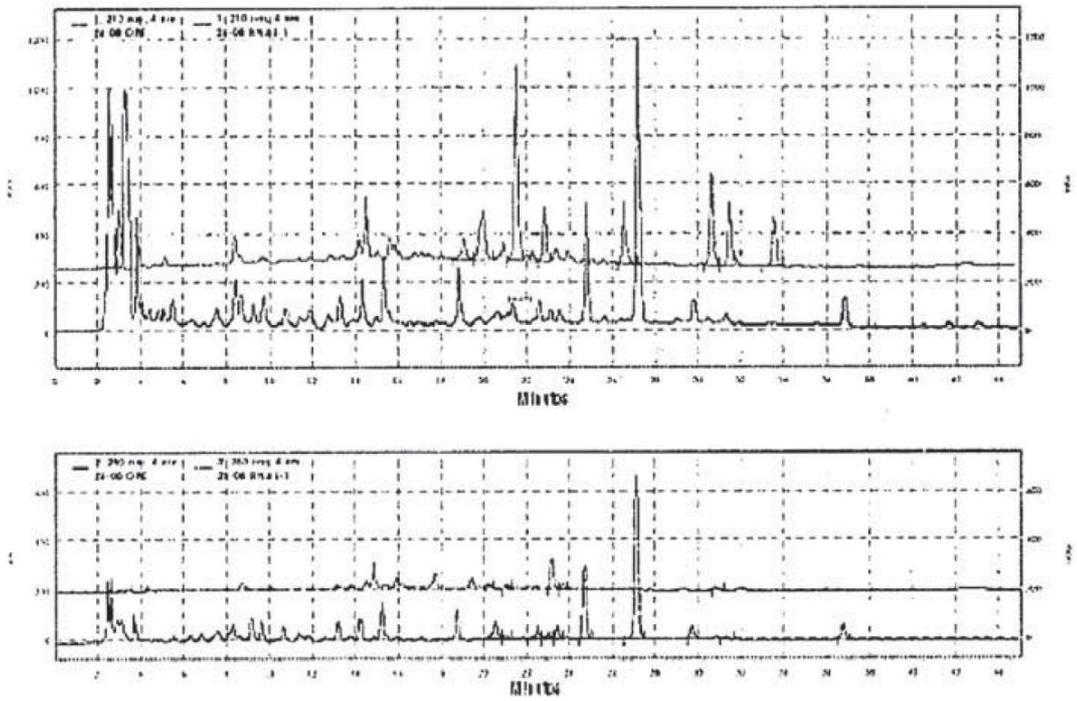


FIGURA 20

Procesamiento de la cáscara de naranja

