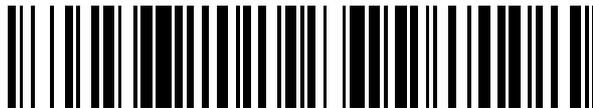


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 690**

21 Número de solicitud: 201430520

51 Int. Cl.:

A23B 7/144 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

08.04.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.11.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070170

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**FLORES MONREAL, Gema;
BLANCH MANZANO, Gracia Patricia y
RUIZ DEL CASTILLO, Maria Luisa**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE FENOLES CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN UVAS TINTAS QUE COMPRENDE UN TRATAMIENTO EXÓGENO CON UN ENANTIÓMERO DE JASMONATO DE METILO DILUIDO EN ETANOL**

57 Resumen:

Procedimiento para incrementar el contenido de fenoles con actividad biológica en uvas tintas que comprende un tratamiento exógeno con un enantiómero de jasmonato de metilo diluido en etanol. La presencia de compuestos polifenólicos en uvas hace que su consumo presente múltiples efectos beneficiosos para la salud. La presente invención plantea por primera vez un sencillo procedimiento post-cosecha, que comprende poner en contacto de forma exógena uvas tintas con un enantiómero de JM diluido en etanol. El procedimiento planteado consigue el incremento simultáneo y sustancial de más de un compuesto fenólico con actividad biológica saludable en uvas, que preferentemente son polifenoles y que más preferentemente son resveratrol y formas de quercetina, y constituye una alternativa a los procedimientos que utilizan fitohormonas como agentes de activación.

ES 2 550 690 A1

PROCEDIMIENTO PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE FENOLES CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN UVAS TINTAS QUE COMPRENDE UN TRATAMIENTO EXÓGENO CON UN ENANTIÓMERO DE JASMONATO DE METILO DILUÍDO EN ETANOL

5

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA TECNICA

10 La presente invención se engloba dentro de los sectores de la alimentación y de la salud, ya que específicamente se refiere a un procedimiento para incrementar el contenido de fenoles con actividad biológica saludable en uvas tintas previamente cosechadas, preferentemente polifenoles, y más preferentemente resveratrol y distintas formas de quercetina, y que comprende un tratamiento exógeno con un enantiómero de jasmonato de metilo diluido en
15 etanol.

ESTADO DE LA TÉCNICA

20 La presencia de compuestos bioactivos en las uvas hace que su consumo presente múltiples efectos beneficiosos para la salud. Así, son conocidos sus efectos antiinflamatorios, su capacidad para prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la diabetes, y singularmente, su efecto anticancerígeno.

25 De entre los compuestos bioactivos presentes en la uva, cabe destacar los polifenoles, empezando por el resveratrol, del que este fruto es considerado una de las principales fuentes y que se caracteriza por su actividad antitumoral. Otro polifenol presente en la uva en cantidades minoritarias es la quercetina, tanto libre como en sus diferentes formas, que posee también importantes propiedades biológicas.

30 Tales son los efectos beneficiosos para la salud de estos polifenoles bioactivos presentes en la uva que su extracto se comercializa desde hace años como suplemento alimenticio. De igual forma, existen también en el mercado suplementos nutricionales de resveratrol y quercetina, los cuales son suministrados de forma individual o combinados.

En el estado de la técnica se identifican documentos que se refieren a procedimientos para incrementar el contenido de polifenoles en tejidos vegetales o alimentos mediante el uso de agentes de activación.

5 Un agente de activación frecuentemente utilizado es el jasmonato de metilo (JM) que es una fitohormona que existe de forma endógena en las plantas superiores y que tiene múltiples funciones. Así por ejemplo, es posible encontrar documentos que se refieren al uso de JM en cultivos in vitro (US7666677; Nopo-Olazabal et al., *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 11744–11758); o al uso de JM combinado con otros compuestos como las ciclodextrinas
10 también en cultivos in vitro (WO2009106662A1).

Por otra parte, es posible encontrar documentos que se refieren a la aplicación precosecha de JM sobre la planta para incrementar el contenido en compuestos con actividad antioxidante. Por ejemplo, antocianinas y flavonoles que incluyen el O-glucosido de
15 quercetina en uvas (Ruiz-García y col., *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 1283–1290); o actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en zarzamora y frambuesas (Wang y col., *Food Chem.* 2008, 107, 1261-1269).

Por el contrario, otros documentos se refieren a la aplicación postcosecha de JM directamente sobre el fruto para incrementar, por ejemplo, quercetina en col (Khang y Liang, *Biochem & Pharmacol.* 1997, 54, 1013-1018); carotenos y clorofilas en manzanas y tomates (Pérez y col., *J. Plant Growth Regulat.* 1993, 12, 163-167; Saniewski y Czapski, *Experientia.* 1983, 39, 1373-1374); la capacidad antioxidante de frambuesas (Chanjirakul y col., *Postharvest Biol. Technol.* 2006, 40, 106-115); o para favorecer la biosíntesis de resveratrol
20 en uva (Vezzulli y col., *Am. J. Enol. Vitic.*, 2007, 58, 530-533.).

Sin embargo, la forma de JM que se utiliza mayoritariamente en los tratamientos de alimentos y tejidos vegetales referidos es la mezcla estereoisomérica de JM comercial, que contiene un 5% de (-)- y (+)-epiJM y un 95% de (-)- y (+)-JM.
30

En el conocimiento de los inventores son muy pocos los documentos que se refieren al uso de enantiómeros de JM en este tipo de tratamientos. Véase de la Peña Moreno y col. (*J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 11639–11644) que se refiere el tratamiento postcosecha de frambuesas con (+)-JM y de (-)-JM; y de la Peña Moreno y col. (*Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231, 829-834) que se refiere el uso de los mismos enantiómeros para la modificación
35 de compuestos volátiles en fresas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

5

Constituye un aspecto de la invención un procedimiento para incrementar simultáneamente el contenido de más de un compuesto fenólico con actividad biológica saludable en uvas tintas que comprende:

10 a) poner en contacto las uvas tintas previamente cosechadas con un enantiómero de Jasmonato de Metilo (JM) diluido en etanol.

Adicionalmente, el procedimiento anterior comprende las siguientes etapas:

15 b) someter al conjunto de la etapa (a) a una temperatura constante de entre 25 y 40 °C durante un período de tiempo de entre 20 y 30 horas; y posteriormente

c) aislar herméticamente al conjunto de la etapa (b) y mantenerlo a una temperatura de entre 4 y 10 °C durante un período de tiempo de entre 0 y 7 días.

20

Preferentemente, el enantiómero de JM se selecciona de entre (-)-JM y (+)-JM y los compuestos fenólicos con actividad biológica saludable son polifenoles, que más preferentemente son resveratrol y distintas formas de quercetina.

25 Descripción detallada de la invención

El problema técnico que resuelve la invención es conseguir una alternativa a los tratamientos post-cosecha con hormonas para conseguir el incremento de fenoles con actividad biológica saludable en uvas tintas. El procedimiento que se propone consigue que
30 simultáneamente se incremente más de uno de estos compuestos fenólicos en uvas tintas, de forma significativamente superior a lo que se consigue utilizando otros tratamientos con hormonas conocidos en el estado de la técnica.

Los inventores han descubierto que un tratamiento exógeno que comprende poner en
35 contacto uvas tintas ya cosechadas y un enantiómero de JM diluido en etanol; mantener a temperatura ambiente constante durante 24 horas; y dejar reposar durante 5 días a una

temperatura de 4° C (ver ejemplo 2), consigue aumentar la actividad de las enzimas implicadas en la bioformación simultánea de resveratrol y distintas formas de quercetina y, como consecuencia, conseguir una elevada acumulación de estos fenoles con actividad biológica saludable en el tejido de las uvas (ver ejemplo 4.3). El procedimiento propuesto referido exclusivamente a uvas tintas y los resultados obtenidos, se consideran novedosos y completamente inesperados ya que los escasos documentos presentes en el estado de la técnica que se refieren al tratamiento de otras frutas con enantiómeros de JM y con mezclas esteroisoméricas comerciales refieren resultados divergentes.

10 Las principales ventajas del procedimiento de la invención se enumeran a continuación:

a) permite incrementar simultánea y considerablemente el contenido de más de un fenol con actividad biológica saludable, obteniendo una uva funcional más completa;

15 b) se trata de un procedimiento sencillo y económico puesto que no requiere ningún tipo de tecnología, ni personal cualificado para su manejo;

c) se lleva a cabo una vez cosechadas las uvas; y

20 d) el procedimiento es fácil de implementar por parte de cualquier industria.

Se sugiere que la actividad de los agentes de activación en cuanto al incremento de actividad de las enzimas implicadas en la bioformación de compuestos fenólicos con actividad biológica saludable, como son los polifenoles, y más concretamente el resveratrol y distintas formas de quercetina, es un proceso específico que se da entre cada agente de activación y el fruto o tejido vegetal sobre el cual se aplica.

Así por ejemplo, tal y como se recoge en el estado de la técnica, y como puede verse en la información resumida en la Tabla 1 sobre los incrementos de compuestos polifenólicos obtenidos mediante el tratamiento con la mezcla de esteroisómeros de JM comercial, cabría esperar que su aplicación en combinación con etanol sobre la uva tinta supusiese un incremento de la concentración de los compuestos que comprende la presente invención. Sin embargo, los inventores han descubierto (ver ejemplo 4.3) que no solo no produce cambios significativamente estadísticos en el contenido de polifenoles como el resveratrol, la quercetina-3-O-glucósido y la quercetina-3-O-rutinósido, sino que además produce una disminución significativa del contenido de la quercetina-3-O-galactósido.

Tabla 1. Resumen bibliográfico sobre el incremento de compuestos fenólicos obtenidos mediante el tratamiento de alimentos vegetales con la mezcla estereoisomérica comercial de JM.

| Cita | Compuesto | Alimento o tejido vegetal |
|--------------------------|---|---------------------------|
| Ruiz-García et al., 2012 | Antocianinas y flavonoles | Uvas |
| Wang et al., 2008 | Actividad antioxidante y compuestos fenólicos | Zarzamora y frambuesas |
| Vezzulli et al., 1997 | Resveratrol | Uva |
| Khang et al., 1992 | Quercetina | Col |
| Saniewski y Czapki, 1983 | Carotenos | Tomate |
| Pérez et al., 1993 | Clorofilas | Manzana |
| Chanjirakul et al., 1996 | Actividad antioxidante y compuestos fenólicos | Frambuesas |

- 5 En la misma línea, de la Peña Moreno y col. (*J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 11639–11644) obtuvieron incrementos de miricetina, quercetina y kaempferol en frambuesas utilizando el enantiómero (+)-JM, pero no apreciaron incrementos al utilizar el (-)-JM.

10 Se trata de datos divergentes a los que se presentan en este documento y que refuerzan el hecho de que los resultados obtenidos son totalmente inesperados al utilizar el procedimiento de la invención.

15 La invención se refiere a un procedimiento para incrementar simultáneamente el contenido de más de un compuesto fenólico con actividad biológica saludable en uvas tintas, que preferentemente son polifenoles y más preferentemente resveratrol y formas de quercetina, en adelante procedimiento de la invención, que comprende poner en contacto las uvas previamente cosechadas con un enantiómero de JM diluido en etanol.

20 Preferentemente, el enantiómero de JM diluido en etanol se introduce en un vial, y posteriormente se convierte en vapor que contacta con las uvas.

También preferentemente, las uvas y el enantiómero de JM se introducen en un recipiente que cuenta con un volumen tal que 2/3 del recipiente quedan ocupados por las uvas tintas y 1/3 queda libre para permitir la vaporización del JM.

El procedimiento de la invención se optimiza cuando inmediatamente tras poner en contacto las uvas previamente cosechadas y el enantiómero de JM diluido en etanol se llevan a cabo las siguientes etapas:

5 b) se somete al conjunto anterior a una temperatura constante de entre 25 y 40 °C durante un período de tiempo de entre 20 y 30 horas; y posteriormente

 c) se aísla dicho conjunto herméticamente y se mantiene a una temperatura de entre 4 y 10 °C durante un período de tiempo de entre 0 y 7 días.

10
En la presente invención por “fenoles o compuestos fenólicos con actividad saludable” se entiende compuestos orgánicos cuya estructura molecular contiene al menos un grupo fenol y que poseen algún tipo de actividad biológica beneficiosa para el organismo. Compuestos fenólicos con actividad saludable que se incluyen en el ámbito de la invención son
15 preferentemente polifenoles como flavonoles, antocianinas y taninos, y más preferentemente resveratrol y formas de quercetina.

Por “resveratrol” se entiende el 3, 5, 4-trihidroxi-trans-estilbeno, un tipo de compuesto polifenólico producido de forma natural por algunas plantas.

20
Por “formas de quercetina” se entiende formas del compuesto 2-(3, 4)-dihidroxifenil)-3, 5, 7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona, que es un flavonol que se encuentra en altas concentraciones tanto en frutas como en verduras. Aunque la quercetina puede estar presente en forma libre, sus formas más frecuentes son unidas a una molécula de un carbohidrato, concretamente
25 como O-glucósido, O-galactósido y O-rutinósido. De este modo, ejemplos de formas de quercetina que se incluyen dentro del ámbito del procedimiento de la invención, preferentemente se eligen de entre quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactósido y quercetina-3-O-rutinósido.

30 Por “agente de activación” se entiende aquel compuesto que cuando interactúa con un fruto o tejido vegetal activa o promueve la síntesis de otros compuestos existentes en dicho material. En el ámbito de la presente invención los agentes de activación son fitohormonas existentes en todas las plantas superiores, que intervienen en el crecimiento, senescencia y mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos.

Ejemplos de uvas tintas, a título ilustrativo y no limitativo, que se incluyen en el ámbito del procedimiento de la invención son Bobal, Cabernet Franc, Cariñena, Garnacha tinta, Merlot, Tempranillo y Malbec.

5 El JM posee dos centros quirales en los carbonos 3 y 7 de la molécula. Esto implica que pueden existir cuatro configuraciones estereoisoméricas diferentes, es decir como dos parejas de enantiómeros distintos. Estas configuraciones se denominan (-)- y (+)-JM ((3R, 7R)- y (3S, 7S)-isómeros, respectivamente) y (-)- y (+)-epijasmonato de metilo (epiJM, (3R, 7R)- y (3R, 7S)-isómeros, respectivamente). Al igual que ocurre con todos los compuestos
10 quirales, el carácter disimétrico de determinados receptores biológicos implica que la estereoquímica del JM sea el factor principal de la relación entre la estructura de la molécula y su actividad biológica.

El aislamiento de los enantiómeros que se utilizan en el procedimiento de la invención se
15 realiza, por ejemplo, partiendo de una mezcla estereoisomérica de JM comercial, mediante HPLC preparativa utilizando una columna quiral empaquetada con β -ciclodextrina permetilada como fase estacionaria (ver ejemplo 1). Como el experto en el estado de la técnica sabrá es posible utilizar cualquier otra técnica que permita obtener dichos enantiómeros como por ejemplo, síntesis enantioselectiva.

20 Un ejemplo de enantiómero de JM que se utiliza en el procedimiento de la invención procede de una mezcla estereoisomérica de JM comercial, que comprende un 5% de (-)- y (+)-epiJM y 95% de (-)- y (+)-JM y que se aísla mediante HPLC preparativa utilizando una columna quiral empaquetada con β -ciclodextrina permetilada como fase estacionaria.

25 La relación preferente de enantiómero de JM diluido en 1 ml de etanol por cada gramo de uva tinta que se utiliza en el procedimiento de la invención es de entre 0.005 y 0.1 μ l.

30 En una realización particular, la relación de enantiómero de JM diluido en 1 ml de etanol por cada gramo de uva tinta es de 0.025 μ l.

Preferentemente, el enantiómero de JM se selecciona de entre (-)-JM y (+)-JM.

35 El enantiómero que se utiliza en el procedimiento de la invención comprende un alto grado de pureza, que preferentemente es superior al 95%. Sin embargo, en el ámbito de la invención también se incluyen enantiómeros con grados inferiores de pureza.

En otra realización particular, la temperatura que se utiliza en la etapa (b) del procedimiento de la invención es 25°C y el período de tiempo son 24 horas.

5 Alternativamente se retira el vial en el que se introduce el enantiómero de JM diluido en etanol antes de iniciar la etapa (c) del procedimiento de la invención.

En otra realización particular, la etapa (c) del procedimiento de la invención se lleva a cabo durante 5 días y a una temperatura de 4°C.

10 En otra realización particular, el procedimiento de la invención que comprende utilizar un enantiómero que es (-)-JM y uvas tintas de la variedad Red Globe, consigue un incremento de resveratrol superior al 125 %; de quercetina-3-O-glucósido superior al 350 %; de quercetina-3-O-galactósido superior al 130 %; y de quercetina-3-O-rutinósido superior al 125 %; refiriéndose los porcentajes al contenido de la muestra sin tratar.

15 En otra realización particular, el procedimiento de la invención que comprende utilizar un enantiómero que es (+)-JM y uvas tintas de la variedad Red Globe, consigue un incremento de quercetina-3-O-glucósido superior al 75 %; y de quercetina-3-O-rutinósido superior al 80 %, refiriéndose los porcentajes al contenido de la muestra sin tratar.

20 A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

30 Ejemplo 1. Aislamiento de enantiómeros de JM

Los enantiómeros puros de JM: (-)- y (+)- de JM, fueron separados y aislados a partir del compuesto comercial formado por la mezcla estereoisomérica, (Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemania) según el procedimiento descrito en Flores y col. (*Food Chem.*, 2013, 141, 2982-35 2987) que se basa en técnicas de HPLC a escala preparativa y que permiten resolver cromatográficamente los cuatro estereoisómeros de JM hasta línea base.

Se utilizó una columna de 30 m de longitud y 20 mm de diámetro interno, empaquetada con un espesor de 5 μm de β -ciclodextrina permetilada, la cual fue utilizada como fase estacionaria quiral. Se partió de una disolución de 50 mg de JM comercial en 10 ml de etanol y se introdujeron 1500 μl de esta disolución en el cromatógrafo. Se recogió un volumen de 23.4 ml y 31.2 ml de las fracciones de (-)-JM y (+)-JM respectivamente en el disolvente de elución MeOH/H₂O y en viales independientes. Las cantidades aisladas de cada uno de ellos fueron 3.56 mg respectivamente.

Las fracciones anteriores se sometieron a extracción en fase sólida (SPE) en fase inversa, utilizando C18 como material de empaquetamiento y eluyendo con 2 ml de etanol. El exceso de etanol fue evaporado a vacío en un rotavapor hasta un volumen final de 1 ml. De esta forma se aislaron los cuatro estereoisómeros de JM disueltos en etanol. En concreto, se recogieron 3.56 mg de (-)- y (+)-JM, respectivamente y 0.18 mg de (-)- y (+)-epiJM. La pureza con la que se aislaron fue 96.1%, 98.6%, 91.6% y 99.9% para (-)-JM, (-)-epiJM, (+)-epiJM y (+)-JM, respectivamente.

Ejemplo 2. Tratamiento de uvas tintas cosechadas utilizando el procedimiento de la invención

160 g de uvas tintas de la variedad Red Globe se colocaron en un recipiente de vidrio de 1 L de capacidad, en cuyo interior se introdujo un vial abierto de 1 ml de capacidad. El recipiente cuenta con un volumen tal que 2/3 del recipiente quedan ocupados por las uvas tintas y 1/3 queda libre para permitir la vaporización del JM. Se realizaron cuatro tratamientos diferentes: el primero introduciendo 0.025 μl del enantiómero (-)-JM diluido en 1 ml de etanol en el vial; el segundo introduciendo 0.025 μl del enantiómero (+)-JM diluido en 1 ml de etanol en el vial; el tercero introduciendo 0.050 μl de la mezcla estereoisomérica comercial en el vial, diluido en 1 ml de etanol; el cuarto sin vial de JM a modo de control.

Cada recipiente de vidrio abierto se colocó en el interior de un horno con la temperatura termostaticada a 25°C, la cual se mantuvo durante 24 h dejando actuar el vapor de JM sobre las uvas. Pasado este tiempo, se retiró el vial de enantiómero de JM del recipiente, se cerró herméticamente y se almacenó a 4°C durante 5 días.

Una vez transcurrido el período las uvas fueron liofilizadas.

35

Ejemplo 3. Extracción de resveratrol y quercetina en uvas tintas tratadas y sin tratar

Muestras de las uvas liofilizadas según el ejemplo 2, se extrajeron con una mezcla de MeOH/H₂O en proporción 80/20 a temperatura ambiente utilizando una batidora durante 5 min. Para la extracción se utilizó un volumen de 20 ml de disolvente por gramo de muestra. Para asegurar la extracción completa de resveratrol y de las formas de quercetina, el procedimiento se repitió dos veces. Los dos extractos obtenidos se juntaron, evaporando el disolvente a vacío utilizando un rotavapor. El extracto final seco se disolvió en MeOH para su análisis por cromatografía de líquidos.

10

Ejemplo 4. Determinación y cuantificación de compuestos bioactivos**4.1. Resveratrol y formas de quercetina en uvas tintas tratadas y sin tratar**

El extracto según el ejemplo 3 se filtró utilizando un filtro de 0.22 µm de tamaño de poro. Posteriormente se inyectó en HPLC utilizando una jeringa de 100 µl. El equipo utilizado fue un LC Waters modelo 996, provisto de un inyector automático y detector de *diode array* (DAD). La separación se llevó a cabo en fase inversa utilizando una columna de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de espesor de fase (C18, ACE, Madrid, España). Como fase móvil se empleó una mezcla de H₂O con 1% de ácido fórmico (disolvente A) y AcCN (disolvente B). El flujo aplicado fue 1 ml/min durante todo el análisis.

20

El programa utilizado comenzó con una composición isocrática de 5:95 de A:B durante los 10 min de análisis para pasar a 10:90 a lo largo de 15 min, a 15:85 en los siguientes 10 min para terminar finalmente en 25:75 durante los siguientes 20 min. Las condiciones finales se mantuvieron durante 10 min. Posteriormente, se volvió a la proporción inicial de 5:95 la cual se mantuvo durante 15 min para garantizar la limpieza y estabilidad entre análisis cromatográficos. Se registró la señal a 304 y 348 nm para detectar resveratrol y los tres compuestos derivados de quercetina, respectivamente. Para realizar la identificación se preparó una recta de calibrado con diluciones modelo comprendidas entre 0.00006 mg/l y 0.25 mg/l. En todos los casos se compararon los tiempos de retención con aquéllos proporcionados por los patrones en las mismas condiciones experimentales. Una excepción fue la quercetina-O-rutinósido, la cual tuvo que ser identificada por espectrometría de masas (MS), tal y como se describe a continuación, debido a la falta de disponibilidad del patrón comercial.

30

35

La cuantificación de los cuatro compuestos se llevó a cabo interpolando en la recta de calibrado realizada para cada compuesto. Cada inyección se realizó en triplicado.

4.2. Quercetina-O-rutinósido en uvas tintas tratadas y sin tratar

- 5 El extracto según el ejemplo 3 se filtró con un filtro de 0.22 μm de tamaño de poro y se introdujo en el cromatógrafo de líquidos. El equipo utilizado fue un LC Agilent modelo 1100 equipado con dos detectores, un DAD y un MS con interfase de electrospray.
- 10 La separación se llevó a cabo en fase inversa utilizando una columna de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno y 5 μm de espesor de fase (C18, ACE, Madrid, España). Como fase móvil se utilizó una mezcla de H_2O con 1% de ácido fórmico (disolvente A) y AcCN (disolvente B). El flujo aplicado fue de 1 ml/min durante todo el análisis. El programa de elución utilizado fue el mismo que se indica en el ejemplo 3. Los espectros de
- 15 masas se registraron tanto en positivo como en negativo aplicando un gradiente de voltaje desde 200 m/z hasta 3000 m/z. La presión del nebulizador fue fijada en 55 psi.

4.3. Concentración de fenoles en uvas tintas tratadas y sin tratar

- 20 Los valores obtenidos y los resultados del tratamiento estadístico de análisis de varianzas mediante ANOVA considerando como diferencias significativas aquellas determinadas por el test de Student, se recogen en la tabla 2.

25 Tabla 2. Concentración de compuestos fenólicos con actividad biológica saludable presentes en el extracto de uva tratadas según el procedimiento de la invención (μg de compuesto fenólico / g uva)

| Muestras | Resveratrol | quercetina-3-O-glucósido | quercetina-3-O-galactósido | quercetina-3-O-rutinósido |
|---|----------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Uvas sin tratar (control) | 27.4 \pm 0.9 | 398.9 \pm 0.7 | 58.9 \pm 0.5 | 23.3 \pm 0.6 |
| Uvas tratadas con la mezcla esteroisomérica de JM comercial | 22.3 \pm 0.8 | 387.7 \pm 0.5 | 21.5 \pm 0.9 | 17.6 \pm 0.3 |
| Uvas tratadas con (-)-JM | 38.9 \pm 1.0 | 807.6 \pm 1.0 | 136.4 \pm 0.8 | 43.6 \pm 0.7 |
| Uvas tratadas con (+)-JM | 21.5 \pm 0.6 | 692.7 \pm 0.7 | 58.9 \pm 0.6 | 51.7 \pm 0.8 |

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para incrementar simultáneamente el contenido de más de un compuesto fenólico con actividad biológica saludable en uvas tintas que comprende:

5 a) poner en contacto las uvas tintas previamente cosechadas con un enantiómero de Jasmonato de Metilo (JM) diluido en etanol.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde el enantiómero de JM diluido en etanol se introduce en un vial y posteriormente se vaporiza y contacta con las uvas.

15 3.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde las uvas tintas y el enantiómero de JM diluido en etanol se introducen en un recipiente que cuenta con un volumen tal que 2/3 del recipiente quedan ocupados por las uvas tintas y 1/3 queda libre para permitir la vaporización del JM.

4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, que adicionalmente comprende las siguientes etapas:

20 b) someter al conjunto de la etapa (a) a una temperatura constante de entre 25 y 40 °C durante un período de tiempo de entre 20 y 30 horas; y

c) aislar herméticamente al conjunto de la etapa (b) y mantenerlo a una temperatura de entre 4 y 10 °C durante un período de tiempo de entre 0 y 7 días.

25 5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el enantiómero de JM se utiliza en una relación de entre 0.005 y 0.1 µl diluido en 1 ml de etanol por cada gramo de uva.

30 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el enantiómero de JM se utiliza en una relación de 0.025 µl diluido en 1 ml de etanol por cada gramo de uva.

7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el enantiómero de JM se selecciona de entre (-)-JM y (+)-JM.

35

- 8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el enantiómero de JM comprende un grado de pureza superior al 95%.
- 5 9.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la etapa (b) tiene lugar a una temperatura de 25°C durante un período de tiempo de 24 horas.
- 10.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde se retira el vial previamente a la etapa (c).
- 10 11.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la etapa (c) se lleva a a una temperatura de 4°C durante 5 días.
- 12.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde los compuestos fenólicos son polifenoles.
- 15 13.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los polifenoles son resveratrol y formas de quercetina.
- 20 14.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde las formas de quercetina son quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactósido y quercetina-3-O-rutinósido.