

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 258**

21 Número de solicitud: 201500423

51 Int. Cl.:

C12F 3/06 (2006.01)

A61K 36/87 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.06.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.12.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
(100.0%)**

**Avda. de la Universidad s/n Edificio Rectorado y
Consejo Social
03202 Elche (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**MARTÍ BRUÑA, Nuria;
VALERO ROCHE, Manuel;
MARTÍNEZ FONT, Rafael;
BERENGUER MARTÍNEZ, María Del Remedio;
MICOL MOLINA, Vicente;
VEGARA GÓMEZ, Salud;
SÁNCHEZ-VALDEPEÑAS SÁNCHEZ, Vanessa;
SAURA LÓPEZ, Domingo y
BARRAJÓN CATALÁN, Enrique**

54 Título: **Extracción de compuestos biológicamente activos a partir de residuos de la industria de la vinificación**

57 Resumen:

Se describe como el tratamiento combinado de D.I.C. y la extracción del material modificado con esta tecnología con disolventes orgánicos, proporciona una mayor cantidad de fitoquímicos que con tecnologías convencionales. La aplicación de esta tecnología conjuntamente con la extracción con disolventes orgánicos, logra incrementar los rendimientos de extracción de compuestos biológicamente activos de los raspones de uva, un residuo de la industria de vinificación con muy pocas alternativas. De esta forma se logra valorizar un residuo de difícil gestión.

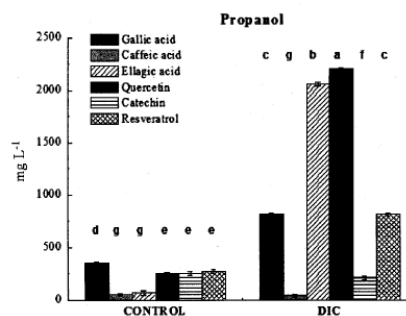


Figura 4

DESCRIPCIÓN**Extracción de compuestos biológicamente activos a partir de residuos de la industria de la vinificación.****Sector de la técnica**

5 La presente invención se enmarca en la industria de los extractos vegetales, específicamente en la transformación de desechos de materia prima vegetal. En particular se trata de la transformación de desechos enología con el fin de obtener pectina modificada de cítricos. Esta transformación conduce a una pectina modificada que exhibe determinadas actividades fisiológicas

10

Estado de la técnica

15 La presente invención concierne a la extracción de compuestos susceptibles de tener actividad biológica a partir de diversos materiales vegetales para su posterior utilización en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica. Este proceso de extracción se llevara a cabo mediante la utilización de la tecnología denominada Expansión Súbita Controlada (sus siglas en francés: Detente Instantanee Controlè, D.I.C.).

20 En la actualidad, dichos compuestos son extraídos convencionalmente mediante distintas técnicas como son la digestión[1-3], extracción con CO₂ supercrítico [4-7], extracción con agua supercrítica [8-9], extracción asistida por microondas [10-13] y extracción asistida por ultrasonidos [14-17].

25 Disolventes orgánicos como son etanol, metanol, acetato de etilo y acetona así como sus posibles combinaciones son utilizados para la obtención de los compuestos bioactivos de plantas mediante la extracción sólido-líquido. En la extracción sólido-líquido pueden influir muchos factores como la temperatura de extracción, el tiempo de extracción, la composición del disolvente y la relación disolvente/sólido. Por tanto, las desventajas de la extracción con disolventes son los largos tiempos de extracción, el alto consumo energético, la generación de grandes cantidades de productos tóxicos y como consecuencia de todo ello, un alto coste de obtención de los mismos.

30

35 Debido a la estructura natural de las plantas, presentan una alta resistencia a la penetración de disolventes siendo el proceso de difusión además complicado y muy

lento. Para mejorar la capacidad tecnológica e intensificar la extracción por disolventes, nos proponemos presentar un tratamiento termo-mecánico instantáneo controlado (D.I.C.), con el fin de asegurar la expansión de la estructura del material vegetal creando una estructura porosa y permitiendo mejorar considerablemente la extracción de los compuestos mediante la utilización de menor cantidad de disolventes orgánicos así como disminuir el tiempo de extracción.

La tecnología D.I.C. se desarrolló inicialmente por Allaf et al, alrededor de 1988 en la Universidad de La Rochelle. El tratamiento se inicia por lo general mediante la creación de vacío, seguida de la inyección de vapor de agua en el material manteniéndolo durante varios segundos y posteriormente una caída rápida de la presión de vacío. Se provoca así la vaporización del líquido sobrecalentado, la expansión y ruptura de las paredes celulares y refrigeración instantánea del material.

Debido a que la estructura natural de las plantas ofrece resistencia a la penetración de cualquier líquido, el proceso de extracción con disolventes es muy lento. Para mejorar la aptitud tecnológica e intensificar la extracción con disolvente, se someten los raspones secos a un tratamiento con la tecnología D.I.C. con el fin de asegurar la expansión de la estructura interna del material vegetal. El D.I.C. consta de un procesamiento termomecánico que somete el material a una transición abrupta desde un vapor a alta presión hasta un vacío instantáneo tal y como se puede ver en la figura 1 [18]. Esta expansión provoca que las estructuras porosas en el material tratado se dilaten [19-22]. Al dilatarse incrementan la penetrabilidad de los disolventes al interior de las estructuras que contienen los compuestos de interés, incrementando ventajosamente la capacidad de extracción.

25 Bibliografía

1. Passos, C.P., et al., *Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail*. Food Chemistry, 2009. 115(1): p. 48-53.
2. Muñoz, O., M. Sepúlveda, and M. Schwartz, *Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from chilean wine*. Food Chemistry, 2004. 87(4): p. 487-490.
3. Costoya, N., et al., *Enzyme-aided extraction of polyphenols from grape pomace*. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2010. 9(4): p. 696-705.

4. Castro-Vargas, H.I., et al., *Extraction of phenolic fraction from guava seeds (Psidium guajava L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents*. The Journal of Supercritical Fluids, 2010. 51(3): p. 319-324.
5. Herrero, M., et al., *Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications*. Journal of Chromatography A, 2010. 1217(16): p. 2495-2511.
6. Pereira, C.G. and M.A.A. Meireles, *Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives*. Food and Bioprocess Technology, 2010. 3(3): p. 340-372.
7. Santos, D.T. and M.A.A. Meireles, *Extraction of volatile oils by supercritical fluid extraction: Patent survey*. Recent Patents on Engineering, 2011. 5(1): p. 17-22.
8. Ju, Z. and L.R. Howard, *Subcritical Water and Sulfured Water Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Dried Red Grape Skin*. Journal of Food Science, 2005. 70(4): p. S270-S276.
9. Teo, C.C., et al., *Pressurized hot water extraction (PHWE)*. Journal of Chromatography A, 2010. 1217(16): p. 2484-2494.
10. Liazid, A., et al., *Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins*. Food Chemistry, 2011. 124(3): p. 1238-1243.
11. Sutivisedsak, N., et al., *Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Food Research International, 2010. 43(2): p. 516-519.
12. Farhat, A., et al., *Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism*. Food Chemistry, 2011. 125(1): p. 255-261.
13. He, Z. and W. Xia, *Microwave-assisted extraction of phenolics from Canarium album L. and identification of the main phenolic compound*. Natural Product Research, 2011. 25(2): p. 85-92.
14. Ghafoor, K., et al., *Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (Vitis vinifera) Seeds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. 57(11): p. 4988-4994.
15. Carcel, J.A., et al. *Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves*. in *Physics Procedia*. 2009. Santiago.
16. Novak, I., et al., *Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance*

liquid chromatography with electrochemical detection. Analytica Chimica Acta, 2008. 630(2): p. 107-115.

17. Dobiáš, P., et al., Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. Central European Journal of Chemistry, 2010. 8(1): p. 87-95.
18. Amor, B., Allaf, K., 2009. Impact of texturing using instant pressure drop treatment prior to solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Food Chemistry 115(3), 820-825.
19. Amor, B. B., Lamy, C., Andre, P., Allaf, K., 2008. Effect of instant controlled pressure drop treatments on the oligosaccharides extractability and microstructure of *Tephrosia purpurea* seeds. Journal of Chromatography A 1213(2), 118-124.
20. Kamal, I. M., Sobolik, V., Kristiawan, M., Mounir, S. M., Allaf, K., 2008. Structure expansion of green coffee beans using instantaneous controlled pressure drop process. Innovative Food Science & Emerging Technologies 9(4), 534-541.
21. Kristiawan, M., Sobolik, V., Klíma, L., Allaf, K., 2011. Effect of expansion by instantaneous controlled pressure drop on dielectric properties of fruits and vegetables. Journal of Food Engineering 102(4), 361-368.
22. Louka, N., Allaf, K., 2004. Expansion ratio and color improvement of dried vegetables texturized by a new process "Controlled Sudden Decompression to the vacuum": Application to potatoes, carrots and onions. Food Engineering 65(2), 233-243.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención describe un método de producción de extractos enriquecidos en polifenoles de uva (antocianos y estilbenos) a partir de los raspones de uva, procedente de los residuos de vinificación. Este método de producción ventajosamente logra incrementos en los rendimientos de extracción de compuestos biológicos presentes en la uva cuando posteriormente se aplica un proceso de extracción contracorriente con diferentes disolventes orgánicos.

Además la presente invención describe el proceso de obtención de extractos a partir de subproductos de la industria de vinificación, utilizando como pretratamiento la tecnología D.I.C., previo a los procesos de extracción de disolventes de los compuestos

de interés. Este pretratamiento ventajosamente logra un incremento apreciable en los rendimientos de extracción de esos compuestos.

El proceso de tratamiento con D.I.C. consiste en colocar el material a tratar a un una cámara estanca capaz de soportar altas presiones y alto vacío; cámara de
5 tratamiento. En esta cámara se puede modular la presión a la que se somete el material mediante una válvula neumática que permite la entrada de vapor a alta presión procedente de una caldera de vapor. La presión puede mantenerse durante tiempos variables que van desde fracciones de segundo hasta horas. Una segunda válvula neumática permite aliviar esta presión abriéndola hacia una cámara en la que se ha
10 hecho vacío. El efecto combinado de una alta presión de vapor en la cámara de tratamiento junto con el vacío instantáneo y controlado posterior, logra un efecto de esponjamiento, de incremento del volumen del material tratado. Con esto se logra que los canales y caminos por los que los disolventes de extracción transcurren, incrementen su diámetro un mayor volumen de estos lleguen hasta los rincones mas recónditos,
15 logrando de esta forma que se incremente de forma ventajosa los rendimientos de extracción.

Se realiza la separación de grano de uva y raspón mediante una despalladora-trituradora (COINME Import-Export, S.L., Berantevilla, Álava) con una capacidad de
20 500 kg h-1. Posteriormente los raspones fueron congelados a -18 ° C. El grano de uva triturado se destina a la fermentación vínica.

El raspón es deshidratado mediante secado en horno durante 48 h a 40° C. Con esto el peso inicial de los raspones se reduce al 50%. Después se muelen en un molino Pulverisette 14 (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemania) con variador de velocidad hasta obtener un polvo fino. El polvo de raspón seco se coloca en la cámara de
25 tratamiento del D.I.C. (5 en figura 1) sometiéndolo a vapor de alta presión (300 kPa, 50 s) mediante la abertura de la válvula neumática (3 en figura 1). Previamente, la cámara de vacío se somete a un vacío de unos 5 kPa (4 en figura 1). El tratamiento de alta presión es seguido por la rápida expansión del vapor de la cámara de tratamiento hacia la cámara de vacío, abriendo de forma controlada la segunda válvula neumática (3 en
30 figura1) y cerrando la primera. Después del tratamiento, polvo del raspón se recupera quedando preparado para la extracción con solventes.

El método habitual de extracción de polifenoles, implica la maceración en disolventes de bajo punto de ebullición, que contengan una pequeña concentración de ácido mineral. El poder extractante de los disolventes, está muy influenciado por la acidez.

El objetivo de la extracción mediante disolventes descrito en esta invención, es la cuantificación y selección de los disolventes que presenten un mayor poder extractivo de compuestos fenólicos. Para ello se procede a macerar en disolución con diferentes disolventes, raspones deshidratados en estufa mediante aire forzado y triturados, y sometidos a un tratamiento instantáneo de alta y baja presión (D.I.C.) según el procedimiento descrito anteriormente.

Posteriormente el disolvente es separado del extracto y de la torta de extracción agotada, mediante un filtro de bandas (8 en figura 1). Finalmente es secado mediante un nebulizador (10 en figura 1) de tamaño piloto (Spray Dryer B-290, Buchi, Alemania). Los disolventes son recuperados mediante un sistema de rectificación (12 en figura 1), permitiendo su reutilización.

Los rendimientos de extracción para el control y las muestras tratadas con D.I.C. se muestran en las figuras 2, 3 y 4. La comparación de los resultados del control y tratados con D.I.C. muestra que existe un efecto positivo y significativo en la concentración de los compuestos extraídos de las muestras pretratadas con D.I.C. Independientemente del disolvente utilizado en el proceso de extracción, se produjo un gran aumento en la concentración de la mayoría de los compuestos ensayados, excepto para el ácido cafeico y catequina en el extracto de propanol-agua. Los mayores incrementos se observaron en ácido gálico, quercetina, ácido elágico y resveratrol. El tratamiento con D.I.C. de raspones aumentó el contenido de ácido gálico, entre 468 y 1394 mg L⁻¹, quercetina, entre 1453 y 1951 mg L⁻¹, ácido elágico, entre 982 y 1991 mg L⁻¹, y el resveratrol, entre 486 y 685 mg L⁻¹, dependiendo del disolvente usado.

Los rendimientos de extracción para cinco de los compuestos analizados en las muestras tratadas con D.I.C. variaba considerable y significativamente ($P < 0,001$) en función del disolvente utilizado en el proceso. Como se muestra en las Figuras 2, 3 y 4, la mayor eficacia de extracción de ácido gálico ($1608,3 \pm 7,6$ mg L⁻¹) se obtuvo con etanol, seguido de acetato de etilo ($862 \pm 20,8$ mg L⁻¹) y, finalmente, propanol ($814 \pm 12,2$ mg L⁻¹). Aunque con menores cantidades la extracción de ácido cafeico tiene una secuencia similar con respecto a la eficacia de los disolventes utilizados. En el caso de ácido

elágico y resveratrol, las concentraciones más altas de estos compuestos se obtuvieron con propanol, seguido de etanol y, finalmente, acetato de etilo. Debemos destacar, sin embargo, que no se observaron diferencias significativas de la utilización de acetato de etilo y etanol como disolventes para la extracción de ácido elágico. La eficacia de los disolventes utilizados para la extracción de catequina fue acetato de etilo > etanol > propanol.

Por otro lado, los disolventes que mayores concentraciones de quercetina lograron obtener de las muestras tratadas fueron acetato de etilo y propanol, con rendimientos de $2236 \pm 102,9$ y $2201,7 \pm 12,6$ mg L⁻¹, respectivamente. El rendimiento medio de la extracción con etanol fue también alta ($2056,7 \pm 10,4$ mg L⁻¹) con diferencias significativas ($P < 0,05$). Además, esta secuencia sobre la eficacia de los disolventes es la única que coincide con la observada en las muestras de control. Para los compuestos restantes ensayados, la eficacia de los disolventes fue diferente en las muestras tratadas y control.

La industria de los diferentes subproductos del vino y mosto siguen siendo una fuente adecuada y barata de compuestos polifenólicos de alta calidad que tienen muchos efectos favorables en la salud humana como antioxidantes. En general, los resultados obtenidos mediante la presente invención indican que el tratamiento D.I.C. tiene un gran impacto en el rendimiento de extracción de los seis compuestos fenólicos del raspón.

Principalmente, el tratamiento D.I.C. aumentó la disponibilidad del ácido gálico, quercetina, ácido elágico y resveratrol en un 50% (v / v) en tratamientos con etanol acuoso, acetato de etilo o propanol. Los cambios en la microestructura de las partículas de polvo fácilmente podría explicar por qué la extracción es mucho mejor después del tratamiento con D.I.C. Los disolventes más polares (etanol y propanol) fueron eficaces para extraer los ácidos fenólicos (ácidos gálico, cafeico y elágico) y estilbenos (resveratrol), mientras que un disolvente moderadamente polar (acetato de etilo) fue más eficaz con los flavonoides [(+)-catequina y la quercetina].

Ejemplos

En todos los ejemplos se utilizaron en la determinación los siguientes métodos de análisis.

La determinación de diversos compuestos fenólicos se llevó a cabo por HPLC, utilizando un método basado en el descrito previamente por Dalluge *et al.* (1998). Cada compuesto se cuantificó por comparación con una curva de calibración obtenida con las compuestos purificados correspondientes a concentraciones de 500, 250 y 125 mg L⁻¹.

5 Se utilizó un sistema de Merck-Hitachi LaChrom equipado con una bomba cuaternaria D-7100, D-7455 con un detector de barrido de diodos y horno para columnas L-7650. Utilizamos una columna analítica RP-18 LiChrospher® 100 (250 x 4 mm, 5 micras de tamaño de partícula) de Merck, protegida por una pre-columna del mismo material. La separación se realiza a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹ con una fase móvil

10 compuesta de (A) H₂O + 0,05% TFA (Trifluoroacético) y (B) 60:40 MeOH (Metanol)-ACN (Acetonitrilo) + 0,05% de TFA. Para la analítica veinticinco µl de cada muestra se inyectaron en el sistema cromatográfico. El mutigradiante aplicado para la fase móvil fue como sigue: 0-5 min, desde 10% B a 15% B; 5-40 min, desde 15% B a 35% B; 40-55 min, desde 35% B a 10% de B. La columna se equilibró con las condiciones iniciales

15 durante 20 min después de cada análisis. Se utilizó la detección por barrido de diodos, estableciéndose la temperatura del horno a 35°C.

A continuación pasamos a describir los ejemplos que pretenden ser ilustrativos de la tecnología descrita en esta patente pero no limitativos de la misma.

20

EJEMPLO 1. Racimos de uva de variedad Monastrell fueron sometidos a una separación de raspón mediante una despalilladora-trituradora (COINME Import-Export, S.L., Berantevilla, Álava) y congelándose el raspón a -18 ° C. Posteriormente se realiza una deshidratación mediante secado en horno a vacío. Muestras de aproximadamente

25 3,1 kg cada una se secaron durante 48 h a 40 ° C. El peso inicial de los tallos se redujo al 50%, por lo que 1,55 Kg de raspones secos de uva se muelen en un molino Pulverisette 14 (FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Alemania) hasta obtener un polvo fino. Reuniendo el material de varias moliendas, 2 Kg de polvo de raspón que son sometidos a tratamiento en el D.I.C.; inyectando vapor de alta presión durante 50 s (300

30 kPa, 50 s) seguido por la rápida expansión a vacío (5 kPa, 30 s). Después del tratamiento, el polvo de raspón se recuperó, listo para extracción por solventes. En este ejemplo el disolvente utilizado fue el etanol del 96% / H₂O, al 50%.

Se utilizaron 5 g de este polvo de raspón tratado, al que se añadieron 100 mL de disolvente y se comparó el resultado con un polvo de raspón sin tratar. Se mantuvo la

extracción durante 24 horas a una temperatura controlada de 30° C. Los resultados se presentan en la siguiente tabla 1 y en la figura 2.

Tabla 1

CONTROL	g/Tm raspón seco		Incremento de rendimiento (%)
	Media	Desviación estándar	
Gálico	0,428	0,018	
Cafeico	0,405	0,014	
Elágico	1,617	0,030	
Quercetina	0,291	0,026	
Catequina	1,053	0,050	
Resveratrol	0,020	0,017	
Total	3,815	0,156	
DIC	Media	Desviación estándar	
Gálico	3,217	0,015	651,6
Cafeico	0,659	0,040	62,8
Elágico	3,579	0,034	121,3
Quercetina	4,113	0,021	1.311,9
Catequina	1,447	0,026	37,4
Resveratrol	1,393	0,090	6.866,7
Total	14,409	0,227	(Incremento promedio) 1.508,6

- 5 En ella podemos ver claramente como la utilización de un pretratamiento con D.I.C. logra un incremento de un 1.508,6 % de rendimiento promedio en la extracción de compuestos bioactivos, es decir incrementa casi 5 veces los rendimientos de extracción.
- 10 EJEMPLO 2. Al igual que en el ejemplo anterior, racimos de uva de variedad Monastrell fueron sometidos a una separación de raspón mediante una despalilladora-trituradora (COINME Import-Export, S.L., Berantevilla, Álava), congelándose el raspón a -18 ° C. Posteriormente se realiza una deshidratación mediante secado en horno a vacío. Muestras de aproximadamente 3,0 kg cada una se secaron durante 48 h a 40 ° C.
- 15 El peso inicial de los tallos se redujo al 50%, por lo que 1,50 Kg de raspones secos de uva se muelen en un molino Pulverisette 14 (FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Alemania) hasta obtener un polvo fino. Reuniendo el material de varias moliendas, 2 Kg de polvo de raspón son sometidos a tratamiento en el D.I.C.; inyectando vapor de alta presión durante 50 s (300 kPa, 50 s) seguido por la rápida expansión a vacío (5 kPa, 30
- 20 s). Después del tratamiento, el polvo de raspón se recuperó, listo para extracción con disolventes. En este ejemplo el disolvente utilizado fue el acetato de etilo. Se usaron 100 mL de disolvente por ensayo.

Se utilizaron 5 g de este polvo de raspón tratado y se comparó el resultado con un polvo de raspón sin tratar. El tiempo de extracción fue de 24 horas a una temperatura controlada de 30° C. Los resultados se presentan en la siguiente tabla 2 y en la figura 3.

Tabla 2

CONTROL	g/Tm raspón seco		Incremento de rendimiento (%)
	Media	Desviación estándar	
Gálico	0,753	0,031	
Cafeico	0,024	0,008	
Elágico	0,865	0,036	
Quercetina	1,562	0,088	
Catequina	0,262	0,034	
Resveratrol	0,131	0,029	
Total	3,597	0,225	
DIC	Media	Desviación estándar	
Gálico	1,724	0,042	128,8
Cafeico	0,364	0,026	1416,7
Elágico	3,413	0,150	294,8
Quercetina	4,472	0,206	186,3
Catequina	2,450	0,132	835,1
Resveratrol	1,103	0,067	740,1
Total	13,527	0,623	(Incremento promedio) 600,3

5

Al igual que en el ejemplo anterior podemos ver claramente como la utilización de un pretratamiento con D.I.C. logra un incremento promedio de un 660,3 % de rendimiento en la extracción de compuestos bioactivos, es decir incrementa casi 5 veces los rendimientos de extracción.

10

EJEMPLO 3. Racimos de uva de variedad Monastrell fueron sometidos a una separación de raspón mediante una despalladora-trituradora (COINME Import-Export, S.L., Berantevilla, Álava) y congelándose el raspón a -18 ° C. Posteriormente se realiza una deshidratación mediante secado en horno a vacío. Muestras de aproximadamente 3,1 kg cada una se secaron durante 48 h a 40 ° C. El peso inicial de los tallos se redujo al 50%, por lo que 1,55 Kg de raspones secos de uva se muelen en un molino Pulverisette 14 (FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Alemania) hasta obtener un polvo fino. Reuniendo el material de varias moliendas, 2 Kg de polvo de raspón que son sometidos a tratamiento en el D.I.C.; inyectando vapor de alta presión durante 50 s (300 kPa, 50 s) seguido por la rápida expansión a vacío (5 kPa, 30 s). Después del tratamiento, el polvo de raspón se recuperó, listo para extracción por solventes. En este ejemplo el disolvente utilizado fue el propanol puro, 100 mL.

15

20

Se utilizaron 5 g de este polvo de raspón tratado y se comparó el resultado con un polvo de raspón sin tratar. Al igual que en los ejemplos anteriores, el tiempo de extracción fue de 24 horas a una temperatura controlada de 30° C. Los resultados se presentan en la siguiente tabla 3 y en la figura 4.

5

Tabla 3

CONTROL	g/Tm raspón seco		Incremento de rendimiento (%)
	Media	Desviación estándar	
Gálico	0,693	0,029	
Cafeico	0,105	0,015	
Elágico	0,134	0,029	
Quercetina	0,500	0,035	
Catequina	0,500	0,053	
Resveratrol	0,540	0,020	
Total	2,472	0,181	
DIC	Media	Desviación estándar	
Gálico	1,628	0,024	134,8
Cafeico	0,084	0,005	-19,7
Elágico	4,117	0,059	2972,1
Quercetina	4,403	0,025	780,7
Catequina	0,421	0,011	-15,9
Resveratrol	1,619	0,032	199,9
Total	12,272	0,157	(Incremento promedio) 675,3

En ella podemos ver claramente como la utilización de un pretratamiento con D.I.C. logra un incremento de un 675,3 % de rendimiento promedio en la extracción de compuestos bioactivos, aunque en el caso del ácido caféico y la catequina el rendimiento de extracción disminuyó.

Breve descripción de las figuras

15 **Figura 1.-** Diagrama del proceso de producción con el sistema D.I.C. integrado. Las leyendas numeradas en la figura se corresponden con la siguiente identificación: 1- corresponde a la caldera generadora de vapor a alta presión para el equipo D.I.C.; 2, corresponde al actuador neumático que abre y cierra las válvulas (3) de apertura y cierre para la admisión del vapor de agua presurizado en la cámara de tratamiento del D.I.C. (4) y la liberación de esa presión; 5, que corresponde a la cámara de expansión del D.I.C., hacia donde se libera la presión de la cámara de tratamiento (4); 6, que corresponde con la bomba de vacío; 7 que corresponde con el reactor de tratamiento y extracción con disolventes a contracorriente; 8. Que corresponde con un filtro de bandas

20

para el prensado de la masa tratada en la extracción; 9, que corresponde con la bomba de alimentación del extracto con un 30% del disolvente inicial hacia el secador por nebulización (10); 11, que corresponde con un depósito pulmón, previo al rectificador de disolvente (11), y 13 que corresponde con el depósito de disolvente purificado.

5

Figura 2. Comparación del rendimiento de los diferentes compuestos extraídos con etanol con tratamiento con D.I.C. y sin tratamiento.

Figura 3. Comparación del rendimiento de los diferentes compuestos extraídos con acetato de etilo con tratamiento con D.I.C. y sin tratamiento.

10

Figura 4. Comparación del rendimiento de los diferentes compuestos extraídos con propanol con tratamiento con D.I.C. y sin tratamiento.

Reivindicaciones

1.- Procedimiento para la obtención de extracto enriquecido de polifenoles de uva
5 **caracterizado por:**

- Utilizar subproductos derivados de la producción de vino, como hollejos o raspón.
- Tratamiento con un equipo de expansión súbita controlada (D.I.C.) de los subproductos anteriores previamente secados y molidos.
- 10 • Adición de uno de los siguientes disolventes agua-etanol en relación 1:1 (p/v), propanol o acetato de etilo.
- Tratamiento de extracción con estos disolventes.
- Aislamiento de la parte líquida de la sólida mediante filtración o centrifugación.
- Evaporación del líquido al vacío hasta la completa eliminación del disolvente,
15 ajuste de los grados Brix hasta 11° con agua destilada y secado mediante secado por nebulización. Obteniéndose el extracto.

2- Procedimiento según la reivindicación 1, **caraterizado porque** el subproducto derivado puede proceder de la industria de producción de mosto de uva.

20

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el alcohol monohidroxílico utilizado es un alcohol de bajo peso molecular.

25

4.- Preparación a base de Extracto de uva obtenido mediante el procedimiento descrito en la reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por** tener una composición en el rango siguiente: Gálico 3,217, Cafeico 0,659, Elágico 3,579, Quercetina 4,113, Catequina 1,447 y Resveratrol 1,393 ppm, color entre rojo y morado, un porcentaje mínimo de polifenoles entre el 14 y el 15 %.

30

5.- Preparación a base de Extracto de uva obtenido mediante el procedimiento descrito en la reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por** tener una composición en el rango siguiente: Gálico 1,724, Cafeico 0,364, Elágico 3,413, Quercetina 4,472, Catequina 2,450, y Resveratrol 1,103 ppm, color entre rojo y morado, y un porcentaje mínimo de polifenoles entre el 13 y el 14 %.

6.- Preparación a base de Extracto de uva obtenido mediante el procedimiento descrito en la reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por** tener una composición en el rango siguiente: Gálico 1,628, Cafeico 0,084, Elágico 4,117, Quercetina 4,403, Catequina 0,421, y Resveratrol 1,619 ppm, , color entre rojo y morado, un porcentaje mínimo de polifenoles entre el 12 y el 13 %.

7.- Preparación a base del extracto obtenido según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por** ser usada en la elaboración de un producto útil y eficaz para el tratamiento contra los cánceres de mama, colon y páncreas, y melanomas.

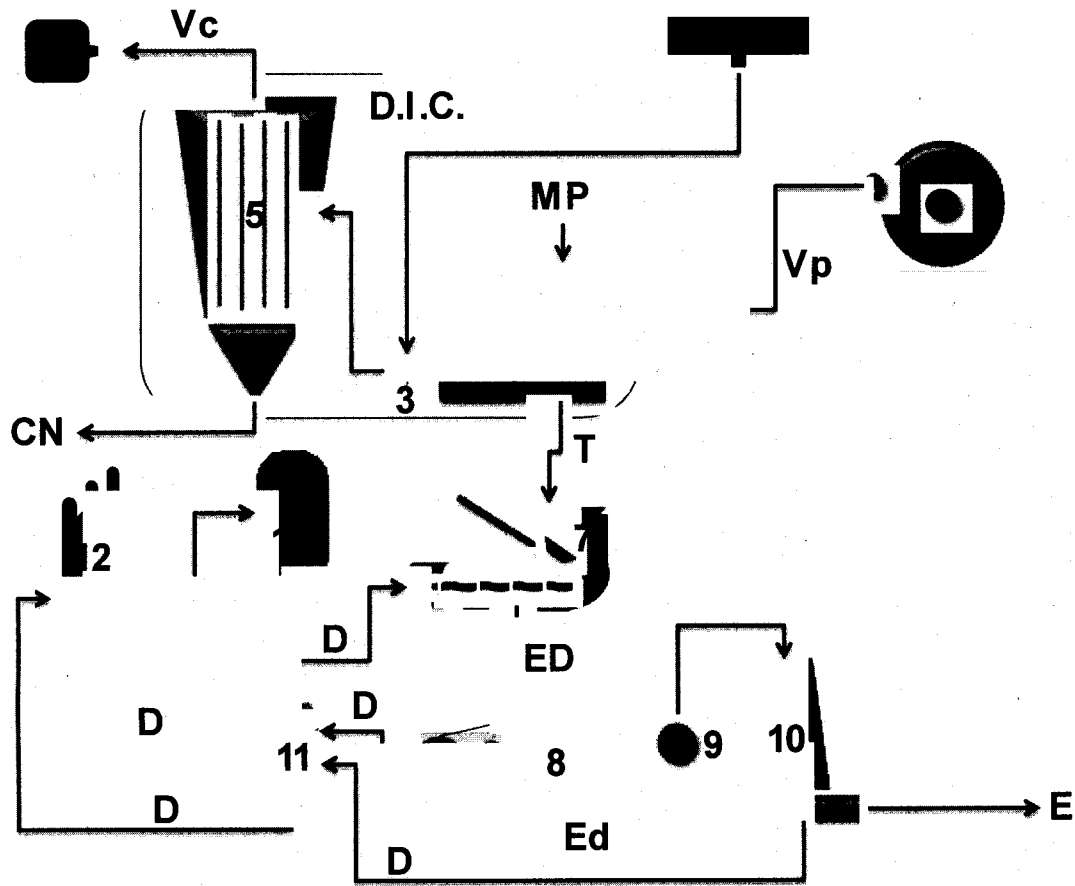


Figura 1

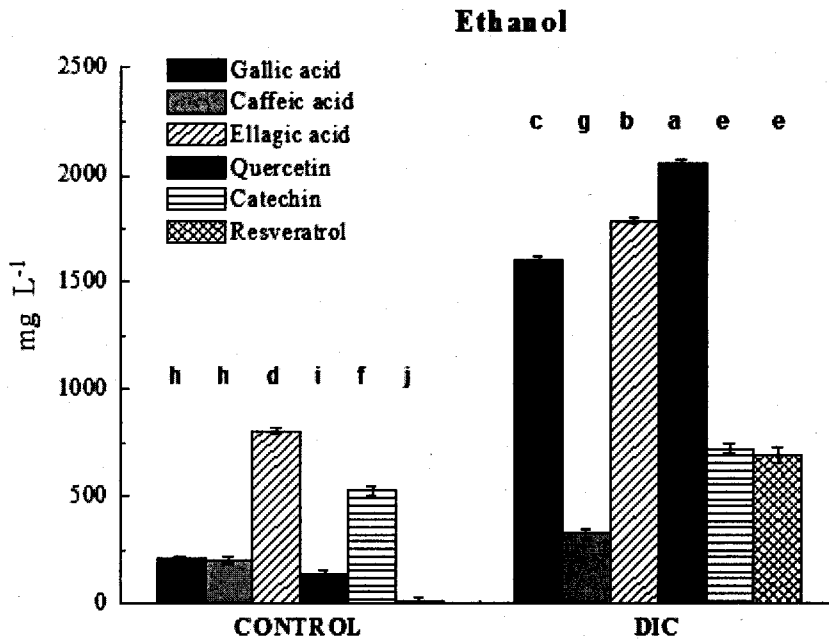


Figura 2

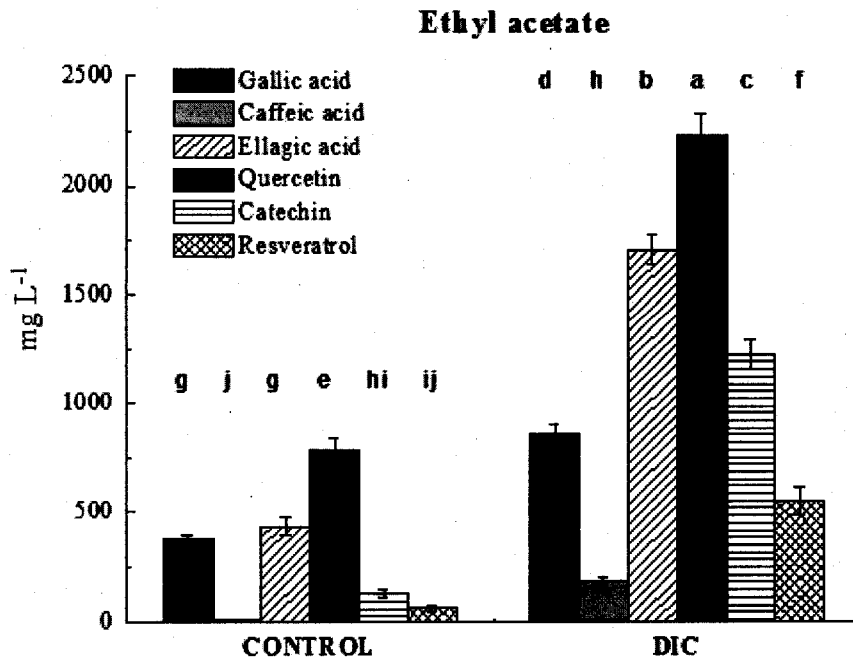


Figura 3

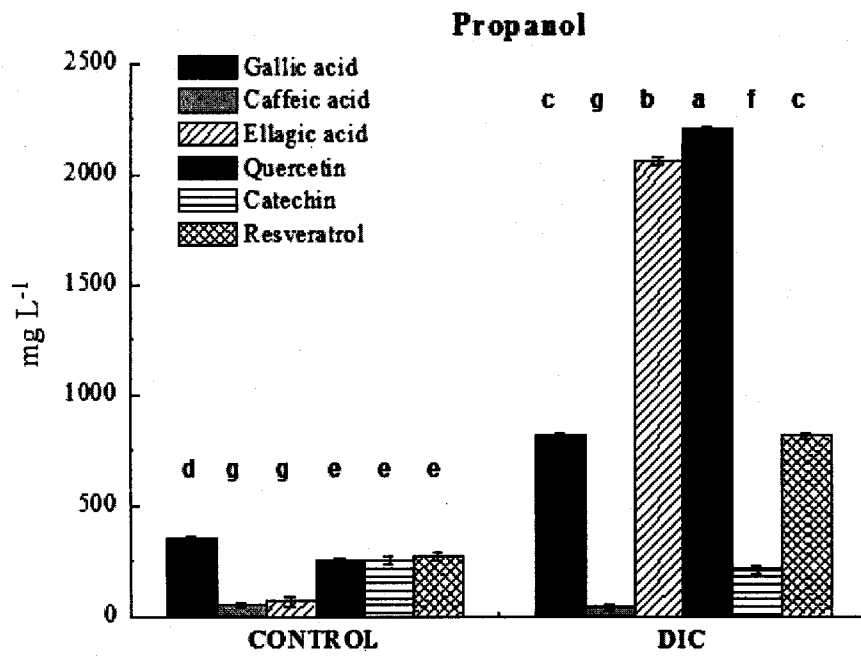


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201500423
②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12F3/06** (2006.01)
A61K36/87 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2004089891 A1 (KEMIJSKI INST et al.) 21.10.2004, reivindicaciones.	1-6
Y	MKAOUAR S. et al. Instant controlled pressure drop texturing for intensifying ethanol solvent extraction of olive (<i>Olea europaea</i>) leaf polyphenols. Separation and Purification Technology. 20.03.2015. Vol. 145. Páginas 139-146.	1-6
Y	WO 2006113700 A1 (UNITEL TECHNOLOGIES INC et al.) 26.10.2006, . reivindicaciones.	1-6
Y	ELAYDI K., et al. INTENSIFICATION OF THE SOLVENT EXTRACTION OF RHUS 2 TRIPARTITUM BIOACTIVE MOLECULES USING INSTANT 3 CONTROLLED PRESSURE DROP (DIC). British Journal of Applied Science and Technology. 12.02.2014. VOL. 4. Nº 11, páginas 1576-1793.	1-6
A	KAMAL I. et al. Optimization of Instant Controlled Pressure Drop Dic-Assisted-Solvent Extraction of Total Phenols of Green Coffee Beans. Journal of Food Studies. 01.06.2013. Vol. 2. Nº 1, páginas 42-61.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.11.2015

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12F, A61K, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS. MEDLINE, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.11.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-6	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2004089891 A1 (KEMIJSKI INST et al.)	21.10.2004
D02	MKAOUAR S. et al. Instant controlled pressure drop texturing for intensifying ethanol solvent extraction of olive (<i>Olea europaea</i>) leaf polyphenols. Separation and Purification Technology. 20.03.2015. Vol. 145. Páginas 139-146.	20.03.2015
D03	WO 2006113700 A1 (UNITEL TECHNOLOGIES INC et al.)	26.10.2006
D04	ELAYDI K., et al. INTENSIFICATION OF THE SOLVENT EXTRACTION OF RHUS 2 TRIPARTITUM BIOACTIVE MOLECULES USING INSTANT 3 CONTROLLED PRESSURE DROP (DIC). British Journal of Applied Science and Technology. 12.02.2014. VOL. 4. Nº 11, páginas 1576-1793.	12.02.2014
D05	KAMAL I. et al. Optimization of Instant Controlled Pressure Drop Dic-Assisted-Solvent Extraction of Total Phenols of Green Coffee Beans. Journal of Food Studies. 01.06.2013. Vol. 2. Nº 1, páginas 42-61.	01.06.2013

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de diversos materiales vegetales para su posterior utilización en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica, en concreto a un método de producción de extractos enriquecidos en polifenoles de uva, a partir de los raspones de uva procedentes de los residuos de vinificación. Este proceso se lleva a cabo mediante la combinación de una Expansión Súbita Controlada (DIC) seguida de UNA extracción con disolventes orgánicos.

Las reivindicaciones 1-3 caracterizan el procedimiento por un pre-tratamiento mediante la expansión súbita controlada (DIC) seguido de una extracción con combinaciones de disolventes orgánicos: agua-alcohol, agua-propanol, o agua-acetato de etilo en relación 1:1 (p/v).

Las reivindicaciones 4-6 caracterizan distintos extractos de uva obtenidos mediante el procedimiento de la reivindicación 1. D01 divulga un procedimiento para aislar compuestos antioxidantes a partir de material de desecho de plantas que comprende una extracción con disolventes orgánicos polares, preferiblemente con agua, o una mezcla agua-etanol, a una temperatura de entre 10-50°C.

Principalmente se usan residuos de fruta triturada, especialmente de uvas, grosellas, de donde aislar sustancias que tienen propiedades antioxidantes y propiedades funcionales y sensoriales favorables, como polifenoles y antocianos.

D02 divulga un procedimiento de extracción de polifenoles a partir de hojas de olivo mediante la combinación de DIC seguido de extracción con etanol. En el mismo documento se divulgan los parámetros óptimos para maximizar la obtención de los compuestos fenólicos hasta un 312% (ver págs. 143, 145).

D03 se refiere a un procedimiento para preparar un producto concentrado de polifenoles, que comprende las etapas de: extracción de los polifenoles a partir de material de uva con una mezcla que consiste esencialmente en agua y etanol; y una eliminación del disolvente del extracto líquido para formar un concentrado líquido de polifenoles.

D04 se refiere a la aplicación de la técnica DIC como pre-tratamiento para intensificar la capacidad extractiva de una mezcla de disolventes para la obtención de fenoles a partir de *Rhus tripartitum*, y la optimización de los parámetros de operación (página 1576, punto 2.4).

D05 divulga un procedimiento combinado de DIC y extracción con solvente para maximizar la extracción de polifenoles a partir de granos de café, mostrando tanto los parámetros de DIC como la mejor combinación de solventes para llevar a cabo la extracción (ver págs. 51, 56).

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan un procedimiento de obtención de extracto de polifenoles a partir de uvas con las mismas características que el que aparece en las reivindicaciones 1-3, ni tampoco divulga un extracto como el de las reivindicaciones 4-6, por lo que tales reivindicaciones cumplirían con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la invención, la diferencia entre este documento y el objeto de la presente solicitud sería la utilización de DIC como pre-tratamiento a la extracción con la mezcla de solventes orgánicos. El efecto técnico producto de esta diferencia sería el incremento del rendimiento de la extracción de polifenoles. Por tanto, el problema técnico que plantearía la invención sería la provisión de un procedimiento para maximizar la extracción de polifenoles a partir de residuos de uva. Los documentos D02, D04 y D05 divulgan el uso de DIC como pre-tratamiento a la utilización de solventes para maximizar la obtención de polifenoles a partir de distintos materiales vegetales, consiguiendo una altísima eficacia en la extracción final en comparación con el simple uso de mezclas agua-alcohol. Así pues, el experto en la materia, conocedor de los buenos resultados obtenidos con esta técnica en la extracción de antioxidantes, se sentiría inclinado a aplicar la DIC como pre-tratamiento a la extracción con solventes a la hora de elaborar un procedimiento para tratar los residuos de la uva con el fin de extraer polifenoles y que mejorase los resultados frente a la extracción simple con solventes orgánicos, teniendo altas probabilidades de éxito. Por tanto, las reivindicaciones 1-6 carecerían de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.