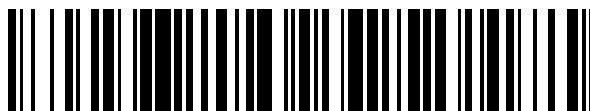


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 544**

51 Int. Cl.:

**A24B 15/24** (2006.01)

**B01D 11/02** (2006.01)

**A23L 27/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2011 PCT/GB2011/050455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11110843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 11710243 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2544560**

54 Título: **Métodos para extraer y aislar sustancias constitutivas del material celulósico**

30 Prioridad:

**09.03.2010 GB 201003887**

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

**06.04.2018**

73 Titular/es:

**BRITISH AMERICAN TOBACCO (INVESTMENTS)  
LIMITED (100.0%)  
Globe House, 1 Water Street  
London WC2R 3LA, GB**

72 Inventor/es:

**MURPHY, JAMES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 662 544 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**

Métodos para extraer y aislar sustancias constitutivas del material celulósico

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para extraer y aislar sustancias constitutivas del material celulósico, y las sustancias constitutivas que se aíslan utilizando el método. Más específicamente, la invención se refiere a un método que comprende la extracción supercrítica de material celulósico, tal como tabaco, seguida por la separación de al menos una de las sustancias constitutivas presentes en el medio de extracción por destilación.

10 Las sustancias constitutivas del material celulósico que se van a extraer y aislar tienen propiedades saborizantes y/o aromatizantes, ya que confieren sabor o aroma al material celulósico a partir del cual se aíslan, o al material celulósico al cual se añaden posteriormente.

Se pretende que las sustancias constitutivas aisladas se utilicen para potenciar las propiedades del sabor y/o aroma de los productos, y en particular, productos de tabaco combustibles y no combustibles o productos sustitutivos del tabaco o la nicotina.

**Antecedentes de la invención**

15 Los usuarios de los productos de tabaco combustibles y no combustibles pueden ser muy sensibles al gusto del producto que utilizan. Los procesos que intervienen en la producción de tales productos pueden dar como resultado la retirada de sustancias constitutivas del tabaco que contribuyen al gusto y/o aroma. Como resultado, puede resultar deseable potenciar el sabor el tabaco antes, durante o después del procesamiento.

20 Además de esto, puede resultar deseable crear productos que proporcionan al usuario una sensación de gusto o aroma asociada con el producto del tabaco pero que no contienen ellos mismos tabaco, por ejemplo, los productos sustitutivos de la nicotina o exentos de tabaco.

También puede resultar deseable crear productos que proporcionan al usuario una sensación de gusto o aroma particular, por ejemplo, un sabor y/u olor de mentol.

Estos objetivos se pueden lograr mediante el uso de agentes saborizantes y/o aromatizantes.

25 Los saborizantes son sustancias que son capaces de conferir una sensación en la boca del usuario. La sensación es percibida principalmente por los sentidos del gusto y el olfato, pero también puede ser detectada por los receptores táctiles y térmicos de la boca, que detectan sensaciones trigéminas tales como la astringencia, acritud y calor/frío.

30 La mayoría de las sustancias que producen sabores en la boca son polares, no volátiles e hidrosolubles. Las sustancias que confieren un aroma deben ser lo suficientemente volátiles para permitir la detección dentro de los receptores olfativos, ya sea a través de los conductos nasales u orales. La multitud de sabores que un usuario es capaz de detectar surge de las interacciones de los compuestos químicos con los receptores del gusto, trigéminos y del aroma.

35 A continuación, en la Tabla 1 se proporcionan algunos ejemplos de clases de compuestos aromáticos y saborizantes volátiles y no volátiles, sin embargo, se debe apreciar que los agentes químicos de una clase individual pueden dar lugar a muchos sabores diferentes, especialmente con concentraciones diferentes.

**Tabla 1**

<b>Clase de compuestos</b>	<b>Carácter sensorial</b>	<b>Ejemplo</b>
Aldehídos	Frutal	Hexanal, pentanal, acetaldehído, vanillina
Alcoholes	Dulce	Mentol, maltol
Ésteres	Amargo	Acetato de etilo, butirato de etilo
Cetonas	Caramelo	Diacetilo, ionona furanonas
Fenólicos	Medicinal, ahumado	Fenol(es), guaiacoles

Los agentes que tienen propiedades saborizantes y/o aromatizantes se pueden obtener de diversas fuentes. Muchas de estas fuentes son naturales, por ejemplo, materiales celulósicos tales como *Mentha arvensis* o *Mentha piperita*, a partir de los cuales se puede aislar un saborizante de tipo menta, *Zingiber officinale*, a partir del cual se puede aislar un saborizante de tipo jengibre, los brotes de *Ribes nigrum* (grosella), a partir de los cuales se puede aislar el saborizante solanona, *Trigonella foenum-graecum* (fenogreco), a partir del cual se puede aislar el saborizante dihidroactinidiolida, *Cichorium intybus*, a partir del cual se puede aislar un saborizante de tipo achicoria.

Otra fuente de saborizantes es el tabaco, del cual se sabe que contiene saborizantes tales como la pulegona; piperona, geranilacetona; 3-metilbutanal; bencenoetanol; tetradecanoato de metilo; aldehídos aromáticos tales como el benzaldehído y fenilacetaldéhido; alquilaldehídos tales como el nonanal, pentanal y hexanal; alquilbencenos tales como el safrol, *trans*-anetol, miristicina y metileugenol; cetonas tales como la ionona, solanona; alcoholes terpénicos tales como el linalool; y terpenos monocíclicos o terpénicos volátiles tales como el cembreno y dihidroactinidiolida.

Es deseable poder extraer sustancias constitutivas que pueden tener propiedades saborizantes y/o aromatizantes a partir del material celulósico.

Es posible extraer componentes del material celulósico utilizando disolventes. Por ejemplo, el documento CN 1166 753 divulga el uso de éter de petróleo y etanol absoluto, aplicados en condiciones de frío o calor para extraer componentes a partir del tabaco, para obtener de esta manera un «extracto de tabaco». Sin embargo, este método de extracción tiene la desventaja de requerir un paso de procesamiento para separar y retirar el disolvente del extracto, por ejemplo, un paso de filtración o destilación. La necesidad de un paso de procesamiento adicional para retirar el disolvente requiere tiempo y es costosa y puede también dar como resultado la retirada del «extracto» de sustancias constitutivas del material celulósico que tienen propiedades físicas similares al disolvente. Por ejemplo, puede que se retire con el disolvente un compuesto aromático o saborizante extraído que tenga un punto de ebullición similar al disolvente como resultado de la separación por destilación, la cual distingue entre los componentes en función del punto de ebullición. Esto puede dar como resultado la contaminación del disolvente con el compuesto aromático o saborizante extraído, y la pérdida del compuesto saborizante/aromatizante del extracto. También se sabe que se pueden extraer componentes solubles del material celulósico utilizando disolventes en estado supercrítico. Este proceso se conoce como extracción supercrítica o extracción con fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura o presión superior a su punto crítico termodinámico. Cuando un fluido está cerca de su punto crítico, pequeños cambios en la presión o temperatura dan como resultado grandes cambios en propiedades tales como la densidad.

El principio básico de la extracción con fluidos supercríticos es que se pone en contacto un material de alimentación con un fluido supercrítico, lo que da como resultado el reparto de las sustancias volátiles desde el material de alimentación hasta la fase supercrítica. Después de la disolución de cualquier material soluble, se retira el fluido supercrítico que contiene las sustancias disueltas y los componentes disueltos de la materia de alimentación se separan del fluido supercrítico.

La expresión «fluido supercrítico», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un medio a una temperatura y presión igual a su punto crítico o por encima de este, preferentemente por encima de su punto crítico. Según se aumentan la temperatura y la presión a lo largo de la línea de fase líquido/gas, la distinción entre los estados líquido y gaseoso desaparece gradualmente hasta un punto, el denominado «punto crítico», donde las fases líquida y gaseosa se convierten en una fase. Así pues, los fluidos supercríticos están caracterizados por propiedades físicas y térmicas que están entre las de un líquido y un gas puros. En consecuencia, la expresión «fluido supercrítico» engloba un medio que tiene dos fases cuando la presión y/o temperatura están cerca o por debajo del punto crítico y un medio con tan solo una fase cuando la presión y temperatura están en el punto crítico o por encima de este. Cerca y por encima del punto crítico las propiedades del medio cambian rápidamente con tan sólo ligeras variaciones de la presión y/o temperatura. Los fluidos supercríticos tienen un poder de solvatación similar al de los disolventes orgánicos líquidos, pero tienen una difusividad mucho más elevada, una viscosidad menor y una tensión superficial menor y, por lo tanto, penetran fácilmente en los sólidos porosos y fibrosos. Como consecuencia, el poder de solvatación de los fluidos supercríticos puede ajustarse cambiando la presión o temperatura.

El documento WO 01/65954 divulga un método que comprende el uso de un medio de extracción con un fluido supercrítico a una temperatura y presión elevadas, para tratar el tabaco con el fin de retirar las nitrosaminas.

El documento CN 1899142 divulga el uso de CO<sub>2</sub> supercrítico para retirar el contenido de nicotina de las hojas de tabaco.

La ventaja de la extracción súpercrítica respecto a otras técnicas de extracción es que el disolvente se puede retirar del extracto sin necesitar un paso de procesamiento adicional. El sistema puede volver a las condiciones atmosféricas (o no supercríticas) después de la extracción, y de esta manera se obtiene la evaporación del disolvente. Esto tiene la ventaja de que el disolvente en forma pura (es decir, sin estar contaminado por los componentes extraídos) se puede recoger y reciclar dentro del sistema, mientras que ninguna de las sustancias

constitutivas extraídas se pierde con el disolvente.

Sin embargo, la extracción súpercrítica no permite la retirada selectiva de los componentes individuales a partir del material de alimentación. Por lo tanto, si se desea retirar un(os) componente(s) particular(es) del material de alimentación, el componente deseado se debe aislar a partir del fluido súpercrítico y las sustancias restantes recircular al material de alimentación.

Por ejemplo, la extracción súpercrítica se puede llevar a cabo en condiciones suficientes para extraer esencialmente todos los solutos del material de alimentación celulósico. Después de la extracción tiene lugar un paso de aislamiento, donde los componentes constitutivos se separan del fluido súpercrítico. Se puede retirar un componente aislado, mientras que otros componentes se reciclan con el fluido súpercrítico a la materia de alimentación celulósica para reconstituir eficazmente de esta manera la materia de alimentación.

Se proporciona un ejemplo de este procedimiento en el documento EP 0 280 817, el cual divulga un proceso con el objetivo de proporcionar tabaco con niveles reducidos de nicotina mientras que los niveles de los otros componentes permanecen sustancialmente inalterados. El proceso del documento EP 0 280 817 conlleva atravesar el tabaco con un disolvente en el estado súpercrítico o estado líquido. A continuación, se pasa el disolvente a través de una trampa que contiene ácido donde se libera esencialmente de la nicotina. El disolvente, empobrecido en nicotina, pero todavía enriquecido con los otros componentes que se han repartido en la fase súpercrítica, se recicla al componente celulósico del tabaco.

El documento CN 1459256 divulga el uso de extracción con CO<sub>2</sub> súpercrítico para retirar elementos dañinos del tabaco. El CO<sub>2</sub> súpercrítico que contiene el extracto del tabaco desmenuzado se utiliza para alimentar separadores de rectificación que contienen materiales adsorbentes, tales como carbón vegetal activado, a presión y a una temperatura controlada, con el objetivo de retirar los componentes dañinos del tabaco. A continuación, el CO<sub>2</sub> súpercrítico se pone en contacto de nuevo con el tabaco desmenuzado y se reduce la temperatura y presión con el fin de llevar a cabo la transferencia de los componentes deseados de nuevo al material desmenuzado.

También existe constancia de medios para aislar componentes del fluido súpercrítico. Por ejemplo, el documento US 6 637 438 divulga el uso de cromatografía líquida a presión elevada (HPLC) para separar las fracciones obtenidas mediante la extracción con fluidos súpercríticos. Sin embargo, los métodos de separación tales como la cromatografía utilizan disolventes que son potencialmente tóxicos, no ecológicos y/o inflamables y que normalmente requieren que se retiren de los componentes después del aislamiento. Tales disolventes incluyen el benceno, ciclohexano, sulfóxido de dimetilo, acetonitrilo, ácido trifluoroacético, trietilamina y metanol.

Además, puede resultar muy difícil aislar eficazmente componentes constitutivos individuales a partir de un fluido súpercrítico. Este es especialmente el caso cuando el componente deseado está presente en el material de alimentación en cantidades muy pequeñas o cuando la propiedad del componente mediante la cual se aísla es muy similar a la de otros componentes presentes en el material de alimentación. Por ejemplo, las técnicas cromatográficas tales como el HPLC y la cromatografía de gases se basan en diferencias en la polaridad entre las muestras que se van a separar. La cromatografía por filtración en gel se basa en diferencias en el peso molecular. Por lo tanto, resulta muy difícil aislar componentes que tienen una polaridad o peso molecular similar utilizando estas técnicas.

Otro método conocido para separar una mezcla de líquidos miscible es la destilación. Compañías tales como VTA Verfahrenstechnische Anlagen GmbH & Co.KG (Niederwinkling, Alemania) tienen una experiencia significativa en el campo de la destilación. La destilación es el proceso de calentar un líquido hasta que entra en ebullición, capturar y enfriar los vapores calientes resultantes y recoger la muestra condensada resultante. Es posible separar mezclas en función de las diferencias en la volatilidad de los componentes en una mezcla líquida en ebullición utilizando la destilación. Los modelos idealizados de destilación están gobernados esencialmente por la ley de Raoult y la ley de Dalton.

La ley de Raoult asume que un componente contribuye a la presión de vapor total de la mezcla en proporción a su porcentaje en la mezcla y su presión de vapor cuando está puro.

La ley de Dalton afirma que la presión total ejercida por una mezcla gaseosa es igual a la suma de la presión parcial de cada componente individual en una mezcla gaseosa. Cuando se calienta una mezcla líquida, la presión de vapor de cada componente en la mezcla aumentará y esto provoca que la presión de vapor total aumente. Cuando la presión de vapor total alcanza la presión que rodea el líquido, se produce la ebullición y el líquido se vuelve gas en todo el volumen del líquido. Una mezcla con una composición concreta tiene un punto de ebullición a una presión concreta, cuando los componentes son mutuamente solubles.

En el punto de ebullición, todos los componentes volátiles de la mezcla entran en ebullición, pero el porcentaje de un componente individual en el vapor es mismo que su porcentaje de la presión de vapor total. Los componentes más ligeros tienen una presión parcial más elevada y, por lo tanto, están concentrados en el vapor, pero los componentes volátiles más pesados también tienen una presión parcial y necesariamente también se evaporan, aunque están

menos concentrados en el vapor.

Normalmente, la destilación se lleva a cabo utilizando una columna de fraccionamiento. La mezcla se calienta hasta que se evapora. El vapor asciende por la columna de fraccionamiento, donde se enfría gradualmente. Los diferentes componentes del vapor condensan a diferentes niveles en la columna de fraccionamiento, lo que permite que los componentes (ahora líquidos) de la mezcla original se separen.

Una desventaja de un procedimiento de destilación simple, donde se utiliza una única vaporización y condensación de fase, es que no separaría eficazmente una mezcla cuyos puntos de ebullición difieran en menos de 60-70 °C. Los ciclos de fraccionamiento repetidos, para intentar separar las mezclas con puntos de ebullición más similares, pueden ser caros y aún no alcanzan el objetivo de proporcionar un destilado puro de una de las sustancias en la mezcla, especialmente cuando los componentes tienen un punto de ebullición idéntico o muy similar.

Por ejemplo, el documento CN 1166 753 divulga el uso de procesos de destilación molecular multietapa para separar componentes del tabaco a partir de un extracto el cual se ha obtenido por exposición de trozos de tabaco machacados a éter de petróleo en condiciones de calor o frío.

Las dificultades para aislar eficazmente componentes constituyentes individuales a partir de un extracto obtenido mediante extracción supercrítica presentan un problema particular cuando se considera el aislamiento de componentes del tabaco que confieren un sabor o aroma al tabaco. Esto se debe a que muchos componentes de este tipo tienen una naturaleza similar, y tienen propiedades físicas similares, a los componentes del tabaco que se consideran indeseables.

Por ejemplo, puede ser deseable garantizar que los componentes aislados no están contaminados con nitrosaminas. Las nitrosaminas son una clase de compuestos químicos que se describieron por primera vez en la bibliografía química hace más de 100 años. Se sabe que el tabaco contiene ciertas nitrosaminas, que son conocidas como nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA, por sus siglas en inglés). Las TSNA están constituidas por cuatro compuestos químicos: *N*-nitrosornicotina (NNN); 4-metil-*N*-nitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK); *N*-nitrosoanatabina (NAT); y *N*-nitrosoanabasina (NAB). No se cree que las TSNA estén presentes en una cantidad significativa en las plantas de tabaco en desarrollo o el tabaco recién cortado (tabaco verde), pero se cree que se forman durante el curado y envejecimiento del tabaco.

Otro compuesto que puede resultar deseable retirar selectivamente de un extracto de tabaco es el benzo[a]pireno (BaP), un hidrocarburo policíclico que se detecta en el ambiente y en el humo de tabaco.

Puede resultar indeseable que las sustancias constitutivas del tabaco que se aíslan con el fin de utilizar sus características de sabor o aroma deseables estén contaminadas de manera significativa con benzo[a]pireno y/o TSNA. Es posible que ocurra tal contaminación al utilizar algunos métodos de aislamiento de compuestos, como resultado de la similitud de las propiedades físicas de estos compuestos con las de las sustancias constitutivas del tabaco que resulta deseable aislar.

También puede resultar indeseable que las sustancias constitutivas del material celulósico que se aíslan con el fin de utilizar sus características de sabor o aroma estén contaminadas de manera significativa con nicotina. Por ejemplo, puede resultar deseable utilizar sustancias constitutivas de este tipo en un producto exento de nicotina. Es posible que ocurra contaminación por nicotina al utilizar algunos métodos de aislamiento de compuestos, como resultado de la similitud de las propiedades físicas de la nicotina con las de las sustancias constitutivas del material de alimentación celulósico que resulta deseable aislar.

Por ejemplo, la nicotina tiene un peso molecular de 162.24 g y el saborizante safrol tiene un peso molecular de 162.2 g. Por lo tanto, no se podría utilizar un procedimiento de separación de filtración en gel estándar, que aísla compuestos a partir la mezcla en función de su peso molecular para obtener una muestra de safrol sustancialmente pura a partir de un fluido supercrítico que se ha puesto en contacto con un material de alimentación que también contenía nicotina.

La Tabla 2 a continuación detalla algunas de las propiedades físicas de los compuestos aromatizantes que se detectan normalmente en el tabaco. La Tabla 2 también proporciona detalles de algunas de las propiedades físicas de los componentes del tabaco que se pueden considerar indeseables.

Tabla 2

Nombre	Descripción del sabor/gusto	PEb (°C)	PFus (°C)	PM (g/mol)	Solubilidad (g/100 mL de agua)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )
NNN	-	153	47	177.2		
NNK	-		71-73	207.23		
NAT	-			189.21		
NAB	-			191.23		
B[a]P	-	495	179	252.31	Insoluble	1.24
Nicotina	Amargo	247	-79	162.26	Fácilmente soluble	1.01
Solanona	Humo de tabaco			194.31		
Benzaldehído	Almendras	178.1	-26	106.12	0.6	1.0415
Fenilacetaldéhid	De tipo miel/dulce/rosa/herbáceo	193	-10	120.15		
Nonanal	Fuertemente frutal/floral	195	-18	142.24	Insoluble	0.827
Cembreno	De tipo cera débil	150-152		272.47		
Linalool	Floral con un ligero carácter picante	198-199	<20	154.25	0.1589	0.86-0.87
Tetradecanoato de metilo	Céreo con un trasfondo de miel			242.4	0.866	
Cumarina	Vainilla	301	71	146.14		0.935
Pulegona	Menta, alcanfor	224		152.23	Insoluble	0.9346
Piperonal	Notas de hinojo	264	35-37	150.13		
<i>trans</i> -anetol	Anís/hinojo	234	20-21	148.2		0.998
Safrol		232-234	11	162.2		1.096
Metileugenol	Picante, leñoso, similar al clavo	256	-9	164.2		1.06
Miristicina	Nuez moscada	173	<25	192.2		1.1437

NNN: *N*-nitrosornicotina; NNK: 4-metil-*N*-nitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanona; NAT: *N*-nitrosoanatabina; NAB: *N*-nitrosoanabasina; B[a]P: benzo[a]pireno

PM: peso molecular; PEb: Punto de ebullición; PFus: Punto de fusión

La contaminación de una o más sustancias constitutivas deseadas con compuestos indeseables conlleva que se necesite procesar la muestra adicionalmente. Esto puede ser costoso y requerir tiempo.

5 El documento JP 9-10502 divulga un procedimiento para extraer un «componente objetivo», tal como la nicotina a partir de una materia prima sólida natural que conlleva poner en contacto la materia prima con un primer fluido a presión elevada. El fluido, y los componentes disueltos en él, se ponen en contacto con un absorbente. Los componentes solubles del absorbente se ponen en contacto a continuación con un segundo fluido a presión elevada, el cual se ha sometido a un gradiente de temperatura. El gradiente de temperatura garantiza que únicamente se disuelvan los componentes objetivo en el segundo fluido a presión elevada. El segundo fluido a presión elevada que contiene los componentes objetivos se introduce en un separador donde el(los) componente(s) objetivo se separa(n) reduciendo la solubilidad del componente objetivo en el segundo fluido a presión elevada.

10 El documento WO 2007/053096, que trata sobre el aislamiento y retirada de nitrosaminas del tabaco, divulga un método que requiere más de 10 pasos de procesamiento. El documento US5497792 divulga un proceso para extraer nicotina del tabaco utilizando un disolvente en estado supercrítico, la nicotina se puede retirar del disolvente de extracción mediante técnicas de condensación o destilación.

15 El documento US5252729 se refiere a un proceso para extraer compuestos a partir de material vegetal poniendo en contacto el material vegetal con un fluido supercrítico y recuperando la forma del compuesto del fluido supercrítico utilizando procedimientos de recuperación convencionales tales como evaporación, destilación, separación de fases, o cristalización o filtración. Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso simple que permita el aislamiento selectivo de componentes a partir del material de alimentación celulósico.

20 En particular, es un objeto de la invención proporcionar un proceso simple que permita el aislamiento de compuestos que tienen un punto de ebullición y/o presión de vapor similares.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un proceso que comprende menos de 5 pasos de procesamiento.

25 Es un objeto adicional de la invención proporcionar un proceso que sea relativamente ecológico en el sentido de que no requiera matrices de separación contaminantes.

Es también un objeto de la invención proporcionar un proceso que no requiera el uso de un disolvente de extracción potencialmente tóxico o inflamable con el fin de extraer los componentes solubles a partir del material celulósico; y que no requiera el uso de un disolvente con el fin de aislar las sustancias constitutivas a partir del extracto.

30 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método que tenga un grado elevado de gobernabilidad en lo que se refiere a instrumentos y/o maquinaria comercializados para llevar a cabo los pasos.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un proceso que sea relativamente barato.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un proceso que sea relativamente limpio, en el sentido de que la maquinaria que se utiliza en el proceso no requiera ciclos de limpieza excesivos para volver al estado de funcionamiento original.

### 35 **Compendio de la invención**

En consecuencia, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para extraer y aislar sustancias constitutivas a partir del material celulósico, comprendiendo el proceso:

- 40 (a) poner en contacto el material celulósico con un fluido supercrítico en condiciones que proporcionen un extracto;
- (b) retirar el material insoluble del extracto; y
- (c) fraccionar el extracto mediante destilación para proporcionar una o más sustancias constitutivas aisladas.

La frase «sustancias constitutivas del material celulósico» o «sustancias constitutivas procedentes del material celulósico», tal como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que se pueden solubilizar en el fluido supercrítico.

### 45 **Descripción detallada de la invención**

Los ejemplos de fluidos que se pueden utilizar desde un punto de vista práctico en aplicaciones súpercríticas son: dióxido de carbono, hexafluoruro de azufre, óxido nitroso, hidrocarburos halogenados que tienen hasta 4 átomos de carbono tales como CF<sub>4</sub>, CHF<sub>3</sub>, CClF<sub>3</sub>, CBrF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>-CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CHClF<sub>2</sub>, CCl<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, CHCl<sub>2</sub>F, CCl<sub>3</sub>F, CBrF<sub>3</sub>, CFCl=CF<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>-CF<sub>3</sub>, octafluorociclobutano e hidrocarburos que incluyen hasta 7 átomos de carbono tales como propano, butano, pentano, hexano, ciclohexano, tolueno, etanol, acetona, acetato de metilo, éter dietílico,

diclorometano y tetracloruro de carbono. Otros fluidos útiles incluyen N<sub>2</sub>O, SF<sub>6</sub> y argón.

En realizaciones preferidas, el fluido supercrítico no es un disolvente de extracción tóxico, inflamable o no ecológico. En consecuencia, en algunas realizaciones, el fluido supercrítico no es metanol o hexano. En realizaciones preferidas, el fluido supercrítico es dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

- 5 El material celulósico se puede obtener a partir de cualquier especie del reino Plantae, tales como árboles, flores, hierbas, arbustos, céspedes, vides, helechos, musgos y similares.

En ciertas realizaciones, el material celulósico se obtiene a partir de *Verbascum*, clavos, menta, té, eucalipto o manzanilla.

- 10 En realizaciones preferidas, el material celulósico se obtiene a partir de plantas vasculares y de la manera más preferida plantas vasculares que portan semillas tales como Pinophyta (coníferas), Cycadophyta (cicadas), Ginkophyta (ginkos), Gnetophyta (gnétidas) y Magnoliophyta. Las familias de materia vegetal que pertenecen a la división de Magnoliophyta incluyen Cannabaceae, que incluye el género *Humulus* (lúpulo), y Solanaceae, que también se denominan plantas solanáceas o de la familia de la patata. Dentro de la familia Solanaceae, *Nicotiana* es un género especialmente preferido, y un material celulósico específicamente preferido para su uso en la presente  
15 invención es la especie de *Nicotiana* denominada plantas de tabaco o simplemente tabaco.

El tabaco contiene más de 3000 compuestos que varían desde la matriz fibrosa, por ejemplo, compuestos poliméricos de peso molecular elevado tales como la celulosa, y una variedad de sustancias constitutivas de peso molecular intermedio que en su mayor parte no son volátiles, por ejemplo, hemicelulosa y lignina, y sustancias constitutivas de peso molecular bajo, incluidos compuestos de aroma y sabor.

- 20 Los ejemplos de los componentes del tabaco incluyen derivados de carotenoides, alcaloides, nitrosaminas, humectantes, metales, compuestos no poliméricos ejemplificados por la nicotina, nornicotina, anabasina, miosmina, antabina, glicerol, propilenglicol, trietilenglicol, amoníaco, níquel, plomo, cadmio, cromo, arsénico, selenio, mercurio, benzo[a]pireno, nitrato, triacetina, propionato de sodio, ácido sórbico y eugenol.

- 25 En realizaciones preferidas de la invención, las sustancias constitutivas del material celulósico extraídas y aisladas mediante un proceso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención tienen propiedades saborizantes y/o aromatizantes, ya que confieren sabor o aroma al material celulósico a partir del cual se aíslan, o al material celulósico al cual se añaden posteriormente.

- 30 En algunas realizaciones, las sustancias constitutivas pueden ser una o más de cumarina, pulegona, fenilacetaldéido, nonanal, cembreno, linalool, ionona, geranilacetona, 3-metilbutanal, pentanal, hexanal, bencenoetanol, tetradecanoato de metilo, benzaldehído, piperonal, *trans*-anetol, solanona, di-hidroactinidiolida, safrol, metileugenol, miristicina y adyuvantes o derivados de estos.

- 35 En realizaciones preferidas, las sustancias constitutivas del material celulósico extraídas y aisladas mediante un proceso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención están sustancialmente exentas de nicotina, una o más nitrosaminas y/o benzo[a]pireno. En la mayoría de las realizaciones preferidas, las sustancias constitutivas del material celulósico extraídas y aisladas mediante un proceso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención están sustancialmente exentas de nicotina.

En realizaciones preferidas, las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención están sustancialmente puras.

- 40 En ciertas realizaciones, las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención son entre un 80-100%; 90-100%; 95-100%; 98-100%; 99-100%; o un 99.5-100% puras. En algunas realizaciones, las sustancias constitutivas aisladas son entre un 75-95% puras; 75-90% puras; o un 85-90% puras.

El término «puro», tal como se utiliza en la presente, significa que la(s) sustancia(s) constitutiva(s) aislada(s) está(n) constituida(s) únicamente por la(s) sustancia(s) constitutiva(s) deseada(s) y no está(n) contaminada(s) por otra(s) sustancia(s) constitutiva(s) del material celulósico.

- 45 En realizaciones preferidas, el material celulósico utilizado en los métodos de acuerdo con el primer aspecto de la invención comprende o está constituido por material del tallo o la lámina de una planta. En realizaciones especialmente preferidas, el material celulósico comprende o está constituido por tallo del tabaco o lámina del tabaco. En las realizaciones más preferidas, el material celulósico utilizado comprende o está constituido por lámina del tabaco. Normalmente, la mayoría de los compuestos relacionados con el sabor se encuentran dentro de la porción de la lámina de la hoja de una planta y, por lo tanto, el uso de la lámina en los métodos de acuerdo con la presente invención mejora el rendimiento de los compuestos saborizantes/aromatizantes. Sin embargo, la lámina también contiene la mayoría de los azúcares y nicotina. Además de esto, la mayoría de las nitrosaminas y B[a]P se encuentran en la lámina de tabaco de Virginia curado con aire caliente, y en la lámina y tallo de tabaco Burley curado con aire. Por lo tanto, las sustancias constitutivas extraídas de la lámina es probable que estén contaminadas



con nicotina y/o una o más nitrosaminas y/o B[a]P.

El material celulósico se puede tratar opcionalmente de una o más maneras antes del paso de extracción supercrítica, tal como se menciona en la etapa (a) del primer aspecto de la presente invención, con el fin de obtener características de extracción óptimas. Por ejemplo, el material celulósico se puede pretratar con bases químicas tales como bicarbonato de amonio.

De manera alternativa, o además, el material celulósico se puede prehidratar antes de la extracción supercrítica. Esto se puede realizar, por ejemplo, tomando material celulósico con un contenido de humedad conocido (establecido mediante procedimientos de análisis estándar) y colocando un peso conocido en un receptáculo con una cantidad deseada de agua. El material celulósico y el agua se mezclan y el receptáculo se sella y se deja durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 4 °C para permitir la equilibración. Se puede establecer el contenido de humedad estudiando una muestra del material celulósico utilizando procedimientos de análisis estándar.

Preferentemente, el contenido de agua del material celulósico no debería exceder un nivel en el que se forma una suspensión acuosa densa que da como resultado la desintegración del material celulósico. Normalmente, antes de la extracción con un fluido supercrítico, el material celulósico, específicamente tabaco, tiene un contenido de humedad (agua) desde menos de aproximadamente un 10% en peso hasta aproximadamente un 50% en peso; preferentemente desde menos de aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 35% en peso; más preferentemente desde menos de aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 20% en peso; y aún más preferentemente desde menos de un 1, 2, 3, 4 o 5% hasta aproximadamente un 10% de contenido de humedad en peso.

El pretratamiento del material celulósico con, por ejemplo, agua, se puede utilizar para desplazar el equilibrio en los tipos de sustancias constitutivas del material celulósico que se extraen utilizando procesos de acuerdo con la presente invención. La hidratación del material de partida celulósico puede afectar al equilibrio de compuestos extraídos, como resultado de mezclar el agua con el fluido supercrítico. Esta mezcla da como resultado un cambio en la polaridad y/o pH del fluido supercrítico/disolvente de extracción acuoso en comparación con la polaridad y/o pH del fluido supercrítico cuando está presente una cantidad mínima de agua.

El pretratamiento del material celulósico mezclando, pulverizando o reduciendo su tamaño de otra manera (por ejemplo, para crear material cortado desmenuzado) puede conllevar mejoras en la capacidad de extracción, como resultado del aumento resultante en el área superficial del material celulósico que se expone al disolvente de extracción. Esto permite que el líquido de extracción utilizado durante el paso (a) de un proceso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención se ponga en un contacto íntimo con el material celulósico.

Se puede aplicar cualquier presión y temperatura durante la extracción súpercrítica siempre que el fluido esté en el punto crítico o por encima de este. Para el dióxido de carbono la temperatura puede ser de tan solo aproximadamente 30 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 31.1 °C. Convenientemente, la temperatura es de al menos aproximadamente 35 °C, preferentemente aproximadamente 40 °C y puede ser de al menos aproximadamente 100 °C. La temperatura puede estar comprendida entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 150 °C; más preferentemente entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 100 °C; aún más preferentemente entre aproximadamente 35 °C y aproximadamente 80 °C.

La presión aplicada durante la extracción puede ser cualquier presión igual o por encima de la presión crítica del fluido supercrítico empleado en el método. Para el dióxido de carbono, la presión puede ser de tan solo aproximadamente 7.0 MPa, preferentemente la presión es de al menos aproximadamente 7.38 o 7.382 MPa. Más preferentemente, la presión es de al menos aproximadamente 15 MPa; más preferentemente de al menos aproximadamente 25 MPa; y aún más preferentemente de al menos 30 MPa. La presión es preferentemente de aproximadamente 7.382 MPa a aproximadamente 100 MPa; más preferentemente de aproximadamente 15 MPa a aproximadamente 80 MPa; y de la manera más preferida de aproximadamente 20 MPa a aproximadamente 60 MPa.

Cuando se utilizan dióxido de carbono como el fluido supercrítico, se prefiere especialmente una temperatura durante la extracción supercrítica de 40 °C y una presión de 30 MPa (300 bar).

En una realización especialmente preferida, la extracción supercrítica se realiza utilizando 70 kg de dióxido de carbono como el fluido supercrítico por kg de un material celulósico, a una temperatura durante la extracción supercrítica de exacta o aproximadamente 40 °C y una presión de exacta o aproximadamente 30 MPa.

Se ha observado que una temperatura de 40 °C y una presión de 30 MPa proporcionan un poder de solvatación óptimo para el tabaco, y de esta manera se garantiza que tantas y tanto de las sustancias volátiles en el material de alimentación de tabaco se retiren y repartan en la fase súpercrítica.

La duración de la puesta en contacto del material celulósico con el fluido supercrítico puede variar y, convenientemente, tiene una duración tal que permite la retirada de al menos un 20% en peso de los solutos del

material celulósico. La duración de la extracción está influenciada por el tipo de fluido supercrítico utilizado, el tipo de material celulósico utilizado, la forma del material celulósico, las condiciones de extracción utilizadas y el tipo de recipiente de extracción. Normalmente, el material celulósico está en contacto con el fluido supercrítico durante al menos 5 minutos; más preferentemente durante al menos 20 minutos; y de la manera más preferida durante al menos 60 minutos.

La limpieza de la maquinaria de extracción después de la extracción supercrítica de acuerdo con la invención se puede conseguir realizando uno o más «ciclos secos», pasando un disolvente supercrítico a través de la maquinaria en ausencia de cualquier material de alimentación celulósico. Las realizaciones de la presente invención que utilizan un fluido supercrítico de extracción atóxico o no inflamable/ecológico, tal como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), como en las realizaciones preferidas de la invención, facilitan el proceso de limpieza. Este es especialmente el caso cuando la maquinaria se utiliza para un único tipo de material de alimentación celulósico, tal como el tabaco.

Después de la extracción súpercrítica, el fluido supercrítico que comprende los solutos del material celulósico se separa del material celulósico, preferentemente en condiciones súpercríticas mantenidas. Esta separación genera un extracto, también denominado medio de extracción/solución de extracción, y un refinado, que es el material celulósico (insoluble) empobrecido. La separación del refinado y del extracto se puede realizar mediante cualquier método de separación adecuado, tal como filtración, decantación, sedimentación o tamizado.

Los solutos en el extracto se separan a continuación mediante destilación. Se ha observado que es posible utilizar la presente invención para conseguir una sensibilidad elevada en el proceso de destilación. Esto permite la separación de las sustancias constitutivas en el extracto que tienen puntos de ebullición muy similares, tales como diferencias del punto de ebullición de 5-10 °C o menos y, por lo tanto, permiten el aislamiento de los compuestos aromatizantes, a la vez que minimizan la contaminación debida a sustancias indeseables, tales como nitrosaminas, B[a]P y/o nicotina. Se consigue una sensibilidad de este tipo mediante la selección cuidadosa de los parámetros que participan en el proceso de destilación, y en particular, la(s) temperatura(s) y presión(ones) utilizada(s) durante la destilación, y la velocidad a la que se introduce el extracto en la cámara de destilación. Mediante el control cuidadoso de ciertos parámetros durante el proceso de destilación, se pueden aislar del disolvente de extracción incluso cantidades pequeñas de las sustancias constitutivas del material celulósico. Las sustancias constitutivas extraídas pueden estar en una forma sumamente concentrada y esto puede ser beneficioso, ya que puede que se necesite únicamente una cantidad muy pequeña de la sustancia constitutiva para proporcionar o mejorar el sabor o aroma del producto al cual se incorpora. Esto significa que el proceso es eficaz y rentable.

De acuerdo con la presente invención, la destilación se lleva a cabo a una presión rebajada (en comparación con la presión atmosférica). Esto se puede conseguir llevando a cabo el proceso de destilación al vacío. La destilación al vacío se basa en el principio de que la ebullición se produce cuando la presión de vapor de un líquido excede la presión ambiental. Por ejemplo, la nicotina entra en ebullición a 247 °C a presión atmosférica, pero a 124 °C a 0.022 atm (17 torr; 22.6 millibar (mbar)). Por lo tanto, el uso de una presión rebajada puede hacer que el proceso de destilación sea más eficaz y más rentable.

En ciertas realizaciones, el paso de destilación de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención es una destilación molecular. La expresión «destilación molecular» se refiere al uso de la destilación al vacío para proporcionar una(s) presión(ones) muy baja(s), tal como inferior(es) a 5, 2, 1 o 0.5 mbar.

Dependiendo de las condiciones de extracción supercrítica utilizadas, el extracto que resulta del paso de extracción supercrítica de acuerdo con los métodos de la presente invención puede ser rico en agua, y comprender aproximadamente un 80% de agua. En algunos casos, el extracto puede comprender un contenido de agua de hasta un 98%. En consecuencia, en algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, el primer paso de destilación puede conllevar la retirada del agua en exceso. Puede ser conveniente retirar el agua en exceso del extracto antes de llevar a cabo etapas adicionales de la destilación, ya que las sustancias constitutivas aisladas resultantes del extracto estarán entonces más concentradas. Además, no es posible condensar el agua a presiones muy bajas, tales como las que puede que se utilicen durante las últimas etapas del proceso de destilación, y la presencia de agua en exceso puede afectar a la capacidad de succión de cualquier bomba de vacío utilizada. Por lo tanto, la retirada del agua como parte de la destilación inicial puede mejorar la eficacia de las etapas de destilación posteriores. En consecuencia, en ciertas realizaciones, los extractos ricos en agua se calientan hasta 100-110 °C, opcionalmente a una presión rebajada, tal como 100-130 mbar. En realizaciones preferidas, se utiliza una temperatura de 100-110 °C y una presión de 100 mbar.

El proceso de destilación genera normalmente tres fracciones: una fracción «pesada» (conocida también como el «residuo»); una fracción «media» (también conocida como el «destilado»); y una fracción «ligera» (también conocida como la «muestra de la trampa fría»). El reparto de los elementos del extracto en las diversas fracciones se determina por la volatilidad: las ceras y similares normalmente se acumulan en el residuo; las sustancias más volátiles normalmente se acumulan en el destilado; mientras que las sustancias más volátiles de todas se acumulan en la trampa fría. En los casos en los que el extracto es rico en agua, el destilado puede ser rico en agua.

En realizaciones preferidas, el extracto se introduce en la cámara de destilación en condiciones continuadas de

- presión reducida, preferentemente creadas mediante el uso de un vacío, y calor. Al introducir el extracto en condiciones de este tipo, y a una velocidad adecuada, se forma una película delgada del extracto dentro de la cámara. Los componentes volátiles empiezan a evaporarse a partir de la película, y el sistema es lo suficientemente sensible para permitir la condensación de los componentes con una volatilidad diferente en ubicaciones determinadas (los denominados «dedos fríos») dentro del aparato, a partir de las cuales se pueden retirar y, por lo tanto, se separan de manera eficaz los componentes dentro del extracto. Al ajustar el vacío, temperatura, velocidad de introducción del extracto y, por lo tanto, la velocidad de flujo de la película delgada formada dentro de la cámara, se pueden controlar las proporciones relativas de las fracciones «ligera» y «pesada» que permanecen en el extracto.
- 5 La trampa fría se utiliza normalmente para recoger cualesquiera componentes supervolátiles que no condensan en los dedos fríos, sino que siguen siendo volátiles en las condiciones utilizadas. En algunas realizaciones, la trampa fría puede servir simplemente para proteger de los componentes más volátiles cualesquiera bombas de vacío que se estén utilizando.
- 10 En realizaciones preferidas, el extracto se introduce en la cámara de destilación lo suficientemente despacio para permitir la formación de una película delgada dentro de la cámara.
- 15 En realizaciones preferidas, el primer paso de destilación conlleva calentar el extracto hasta una temperatura de entre 100-110 °C, a una presión rebajada, tal como 90-130 mbar. Más preferentemente, se utiliza una temperatura de 100-110 °C y una presión de aproximadamente 100 mbar. Las muestras de la trampa fría y el destilado se retiran del sistema y los parámetros de destilación se pueden alterar entonces, con el fin de obtener fracciones adicionales.
- 20 En consecuencia, en ciertas realizaciones, el residuo resultante del primer paso de destilación se fracciona adicionalmente alterando la presión dentro del sistema hasta entre 1 y 5 mbar, más preferentemente 1 y 3 mbar, y de la manera más preferida se utiliza una presión de 2 mbar; con una temperatura inicial de entre 110 y 180 °C; más preferentemente entre 120-160 °C; aún más preferentemente entre 135 y 155 °C y de la manera más preferida una temperatura inicial de 150 °C; reduciendo hasta entre 110 y 150 °C y más preferentemente 140 °C.
- 25 Se pueden realizar uno o más ciclos de destilación adicionales, alterando adicionalmente la presión y/o temperatura del sistema para generar de esta manera fracciones adicionales. Por ejemplo, desde una temperatura inicial de entre 100 y 180 °C; más preferentemente entre 120-160 °C; aún más preferentemente entre 135 y 155 °C y de la manera más preferida 150 °C; la temperatura del sistema se puede reducir hasta entre 110 y 140 °C y de la manera más preferida 130 °C, a la vez que se mantiene una presión dentro del sistema de entre 1 y 5 mbar, más preferentemente y 3 mbar y de la manera más preferida una presión de 2 mbar.
- 30 Las fracciones obtenidas a partir del proceso de destilación se pueden concentrar para su uso como compuestos aromatizantes, por ejemplo, calentando para retirar el agua en exceso.
- Las cantidades de nicotina, B[a]P y TSNA en las fracciones se puede determinar utilizando procedimientos operativos estándar, tales como los resumidos en los Ejemplos 2 y 3 más adelante, con los que el experto en la técnica estará familiarizado.
- 35 El uso de la extracción supercrítica para extraer sustancias constitutivas del material celulósico, seguido por un fraccionamiento del extracto utilizando destilación de una manera que permite el aislamiento selectivo de uno o más componentes en el extracto, confiere varias ventajas respecto a otras técnicas para separar y aislar sustancias constitutivas del material celulósico.
- 40 En primer lugar, el proceso de acuerdo con la presente invención permite el aislamiento de compuestos con un punto de ebullición y presión de vapor similares. Esto significa que los compuestos en el material celulósico se pueden extraer y aislar con exactitud, para dar lugar a muestras que son sustancialmente puras.
- El proceso es simple a diferencia de técnicas de extracción/aislamiento conocidas, y comprende, en algunas realizaciones, menos de 5 pasos de procedimiento.
- 45 El presente proceso es relativamente ecológico ya que no requiere matrices de separación de contaminantes tales como sílices, alúminas o microesferas con el fin de separar sustancias constitutivas del material celulósico a partir del disolvente de extracción. La ausencia de matrices de separación también significa que el presente proceso es relativamente barato.
- Además, el paso de fraccionamiento del extracto con el fin de aislar sustancias constitutivas no requiere el uso de un disolvente. Esto evita los riesgos medioambientales y para la salud asociados con el uso de muchos disolventes.
- 50 También reduce el coste, ya que la retirada del disolvente de un sistema puede necesitar mucha energía y ser, por lo tanto, caro.
- Además, en realizaciones preferidas de acuerdo con el primer aspecto de la invención, el paso de extraer componentes solubles a partir del material celulósico no requiere el uso de un disolvente de extracción potencialmente tóxico, no ecológico o inflamable, tal como el metanol o hexano. Esto de nuevo evita los riesgos

medioambientales y para la salud asociados con el uso de tales disolventes y reduce el coste asociado con la retirada de tales disolventes del sistema.

5 El proceso es también relativamente limpio, ya que no requiere ciclos de limpieza excesivos para que la maquinaria de extracción y/o destilación recupere su estado de funcionamiento original. Esto es especialmente el caso cuando la maquinaria se utiliza únicamente para procesar material celulósico, y en particular, para procesar tabaco.

10 El proceso tiene un grado elevado de gobernabilidad en lo que se refiere a instrumentos y/o maquinaria comercializados para llevar a cabo los pasos. Por ejemplo, el equipo que está comercializado normalmente permite el control cuidadoso de las presiones y tiempos implicados en el procedimiento de extracción supercrítica; y las temperaturas, tiempos y presiones implicados en el procedimiento de destilación. Esto permite que el proceso se lleve a cabo en condiciones muy precisas. Esto también significa que las condiciones en las que se llevan a cabo la extracción y aislamiento se pueden variar en gran medida, con el fin de optimizar el aislamiento de los compuestos particulares.

15 Por lo tanto, el proceso de acuerdo con el primer aspecto de la invención permite el aislamiento de sustancias constitutivas a partir del material celulósico que están sustancialmente exentas de uno o más de: nitrosaminas, y en particular, una o más nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA); nicotina; y benzo[a]pireno (B[a]P), o que tienen niveles reducidos de uno o más de estos compuestos en comparación con el material celulósico a partir del cual se aislaron, o del material celulósico a partir del cual se aislaron cuando se concentra y/o procesa en un grado comparable.

20 En un aspecto adicional de la presente invención se proporcionan una o más sustancias constitutivas del material celulósico que se pueden obtener mediante un proceso de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En realizaciones preferidas, las sustancias constitutivas aisladas confieren un sabor o aroma al material celulósico a partir del cual se aíslan o al material celulósico al cual se añaden posteriormente.

25 En algunas realizaciones, las sustancias constitutivas pueden ser una o más de cumarina, pulegona, fenilacetaldehído, nonanal, cembreno, linalool, ionona, geranilacetona, 3-metilbutanal, pentanal, hexanal, bencenoetanol, tetradecanoato de metilo, benzaldehído, piperonal, *trans*-anetol, solanona, di-hidroactinidiolida, safrol, metileugenol, miristicina y adyuvantes o derivados de estos.

30 Las sustancias constitutivas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para potenciar el sabor del tabaco para su uso en productos de tipo tabaco. Como alternativa, tales sustancias constitutivas se podrían utilizar para crear productos exentos de tabaco, o como parte de estos, tales como productos sustitutivos del tabaco o la nicotina. Por ejemplo, se podrían incorporar sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención a pastillas para chupar o productos de inhalación tales como los utilizados por personas que están dejando de fumar.

35 Como alternativa, se podrían utilizar sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención para crear productos que proporcionan al usuario una sensación de gusto o aroma particular, por ejemplo, se podrían incorporar sustancias constitutivas aisladas a películas o tiras que se disuelven, pastillas para chupar, cápsulas, pulverizados nasales, pulverizados orales, aerosoles y chicles.

40 En realizaciones preferidas, las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención están sustancialmente exentas de una o más nitrosaminas, y en particular, nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA), nicotina y/o benzo[a]pireno (B[a]P), o que tienen niveles reducidos en comparación con el material celulósico a partir del cual se aislaron, o del material celulósico a partir del cual se aislaron cuando se concentran y/o procesan en un grado comparable.

En realizaciones preferidas, el contenido de nicotina de las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención es inferior a 25 mg/mL y más preferentemente inferior a 20, 19, 18, 17 o 16 mg/mL.

45 En realizaciones preferidas, el contenido total de TSNA en las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención es inferior a 8, 7, 6.9 o 6 µg/mL; más preferentemente inferior a 5, 4, 3, 2 o 1 µg/mL; y aún más preferentemente inferior a 0.5 o 0.1 µg/mL.

En realizaciones preferidas, el nivel de nitrosonornicotina (NNN) en las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención es inferior a 3.5 µg/mL; más preferentemente inferior a 3 µg/mL; y aún más preferentemente inferior a 2 µg/mL o por debajo del nivel de cuantificación.

50 En realizaciones preferidas, el nivel de 4-metil-*N*-nitrosamino-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) en las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención es inferior a 1.7 µg/mL; más preferentemente inferior a 1.6 µg/mL; y aún más preferentemente inferior a 1.5 µg/mL o por debajo del nivel de cuantificación.

En realizaciones preferidas, el nivel de *N*-nitrosoanatabina (NAT) en las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención es inferior a 2.4 µg/mL; más preferentemente inferior a 2 µg/mL; y aún más

preferentemente inferior a 1.8 µg/mL o por debajo del nivel de cuantificación.

En realizaciones preferidas, el nivel de *N*-nitrosoanabasina (NAB) en las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención es inferior a 0.14 µg/mL; y más preferentemente inferior a 0.1 µg/mL o por debajo del nivel de cuantificación.

5 En realizaciones preferidas, el nivel de benzo[a]pireno en las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención es inferior a 40 ng/g; preferentemente inferior a 30 ng/g; más preferentemente inferior a 25 o 20 ng/g, aún más preferentemente inferior a 10 o 5 ng/g, y de la manera más preferida inferior a 1, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 o 0.1 ng/g.

10 En ciertas realizaciones, las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención son entre un 80-100%, 90-100%, 95-100% o un 98-100% puras. En algunas realizaciones, las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con la presente invención son entre un 75-95%, 75-90% o un 85-90% puras.

15 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un aparato para extraer sustancias constitutivas a partir del material celulósico, que comprende un medio para poner en contacto material celulósico con un fluido supercrítico en condiciones suficientes para extraer uno o más solutos de la materia vegetal, para formar de esta manera un extracto y un refinado; un medio para separar el extracto del refinado; y un medio de destilación para separar una o más de las sustancias constitutivas del extracto.

En la técnica existe constancia de un aparato que permite la operación en condiciones en las que el disolvente de extracción está presente en estado supercrítico y, normalmente, comprende uno o más receptáculos resistentes a la presión y componentes de planta asociados.

20 En ciertas realizaciones, el aparato comprende un tanque de extracción, en el cual se introduce un fluido supercrítico, tal como dióxido de carbono supercrítico, a partir de un tanque de trabajo mediante una o más bombas. El dióxido de carbono se puede hacer pasar a través de un intercambiador de calor para que alcance la temperatura del proceso. A continuación, se pone el dióxido de carbono en contacto íntimo con la materia vegetal. Esto se puede llevar a cabo haciendo pasar el fluido supercrítico a través de uno o más receptáculos conectados en paralelo que contienen el material vegetal.

25 En la técnica existe constancia de medios para separar el extracto del refinado. En ciertas realizaciones, el medio de separación comprende un tanque de compensación o recipiente separador, el cual contiene una trampa para las sustancias constitutivas básicas, para de esta manera retirar las partículas y/o cierta materia suspendida o disuelta.

30 En la técnica existe constancia de medios de destilación y estos normalmente comprenden un matraz de destilación, una cabeza de destilación o una columna de fraccionamiento, un medio para controlar la temperatura, un condensador y uno o más recipientes receptores. La cabeza de destilación/columna de fraccionamiento conecta el condensador con el matraz de destilación. El medio para controlar la temperatura se coloca normalmente en la boca de la cabeza de destilación, con el fin de medir la temperatura del vapor del gas. El condensador es normalmente una columna con doble capa que tiene agua fría que fluye por la capa externa. Se pueden añadir perlas de ebullición al matraz de destilación para posibilitar una ebullición homogénea. El sistema puede comprender además un medio para desechar el(los) soluto(s) separado(s).

### Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de los pasos de un proceso de destilación típico.

40 La Figura 2 es un diagrama de flujo que describe el proceso de extracción y destilación para una realización de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención.

45 La Figura 3 es un diagrama de flujo de la secuencia de los eventos de destilación utilizados a continuación en el Ejemplo 1. Cabe señalar que se recogieron los materiales de las corrientes de desecho durante el inicio y fin de las unidades de destilación detalladas en el diagrama y durante los cambios en los parámetros (por ejemplo, temperatura y presión). Por lo tanto, se generó el desecho cuando las unidades se operaron en condiciones inestables.

### Ejemplo 1

#### (i) Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico

Se extrajeron a aproximadamente 5 kg de tabaco con CO<sub>2</sub> supercrítico. El tabaco cortado desmenuzado se extrajo utilizando una planta de extracción de CO<sub>2</sub>, en las condiciones expuestas en la Tabla 3:

**Tabla 3** Condiciones para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de tabaco cortado desmenuzado

Condiciones	Detalle
Disolvente de extracción:	CO <sub>2</sub> supercrítico a 30 MPa y 40 °C
Magnitud de flujo:	8 kg de CO <sub>2</sub> por hora
N.º de cargas*	16
Referencias de carga	CX249/090 - CX249/105
Materia prima por carga	308.9 g ± 1.5
kg de CO <sub>2</sub> por kg de tabaco	69.0 ± 1.5
Rendimiento del extracto	9.0% p/p ± 0.1% p/p
Cantidad total de tabaco extraída	4941.8 g
Cantidad total de extracto	443.2 g
Cantidad total de tabaco utilizado	4491.8 g
Rendimiento del extracto	8.97%
*Los extractos de todas las cargas excepto la carga 6 se combinaron y colocaron en un almacén frío para el almacenamiento intermedio para la destilación. El extracto de la carga 6 también se colocó en un almacén frío para su análisis.	

5 El rendimiento del extracto crudo a partir de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de 4941.8 g de tabaco cortado desmenuzado fue de 443.2 g (8.97%). Se envió una muestra de esto para su análisis y la cantidad restante (307.9 g) se fraccionó utilizando destilación.

#### (ii) Destilación

El extracto de tabaco (416.65 g) para destilar fue una suspensión rica en agua de sólidos céreos. Se estimó que el contenido en agua del extracto era de un 80%. El proceso de destilación fue tal como se expone a continuación.

- 10 1. La primera etapa de la destilación, incluida la retirada de agua, se llevó a cabo manejando el sistema a una presión de 130 mbar y 100 °C. Se obtuvo un residuo de 61.4 g con un destilado (Fracción 1) de 246 g, es decir, una división 20:80, tal como se esperaba a partir de la cantidad estimada de agua en el extracto de tabaco crudo.
- 15 2. El residuo de la etapa 1 anterior se fraccionó adicionalmente a una presión de 2 mbar y una temperatura inicial de 150 °C, reducida hasta 140 °C (para proporcionar la Fracción 2), durante la cual se produjo una cierta carbonización del residuo, y 130 °C (para proporcionar la Fracción 3).

La secuencia de los eventos de destilación y cómo se recogieron las muestras se muestra en la Figura 3. Hubo nueve muestras para su análisis. Además, hubo cuatro corrientes de desecho, las cuales se recogieron durante las fases de inicio o fin de la destilación, es decir, cuando las unidades de destilación no se operaron en condiciones estables.

**Tabla 4** Detalles de las muestras de la destilación

Fracción	Número	Muestra	Detalles
1	1613/01	Alimentación	Muestra del material de alimentación
	1613/01	Destilado	Destilado obtenido de la primera destilación
	1613/01	Residuo	Muestra restante después de la primera destilación
	1613/01	Trampa fría	Materiales volátiles recogidos en la trampa fría después de la primera destilación
2	1613/02	Destilado	Destilado obtenido a partir de la destilación del residuo 1613/01 en condiciones de 140 °C y 2 mbar
	1613/02	Residuo	Muestra restante después de la destilación
3	1613/03	Destilado	Destilado obtenido a partir de la destilación del residuo 1613/01 en condiciones de 130 °C y 2 mbar
	1613/03	Residuo	Muestra restante después de la destilación
	1613/03	Trampa fría	Materiales volátiles recogidos en la trampa fría de las pruebas 2 y 3

**Resultados**

El primer paso de destilación proporcionó 246.0 g de la Fracción 1 (destilado 1613/01; 79.9%).

- 5 El residuo de este paso, «Residuo 1613/01» (rendimiento = 61.4 g, 19.9%), se dividió y se utilizó para una destilación en dos condiciones diferentes: 1) la destilación de 10.7 g del Residuo 1613/01 a una presión de 2 mbar, inicialmente a 150 °C y que después se reduce hasta 140 °C, proporcionó 3.3 g de la Fracción 2 (destilado 1613/02; 30.8%); y 2) la destilación de 14.0 g del residuo de 1613/01 a una presión de 2 mbar y 130 °C, proporcionó 3.7 g de la Fracción 3 (destilado 1613/03; 26.4%).
- 10 Las cantidades de nicotina, benzo[a]pireno y TSNA en el material de alimentación de tabaco, el extracto crudo y las Fracciones de destilación 1-3 se determinó utilizando procedimientos estándar con los que estará familiarizado el experto en la técnica, tal como se detalla en los Ejemplos 2 y 3. Los resultados se proporcionan en la Tabla 5, a continuación, junto con la correspondiente información del rendimiento.

**Tabla 5** Rendimiento del analito y de la reacción de la destilación de extracto de tabaco

Detalles	Tabaco	Extracto crudo	Fracción		
			1	2	3
N.º aduanero	CR07/00025	-	-	-	-
Código	CRT B297	-	-	-	-
Código PSP	PA-07-1040	PA-07-1272	PA-08-0283	PA-08-0283	PA-08-0283
Material de partida (g)	-	4941.8	307.9	10.7	14.0
Rendimiento (g)	-	443.23 (9.0%)	-	-	-

ES 2 662 544 T3

Detalles	Tabaco	Extracto crudo	Fracción		
			1	2	3
Destilado (g)	-	-	246.0 (79.9%)	3.3 (30.8%)	3.7 (26.4%)
Residuo (g)	-	-	61.4 (19.9%)	7.3 (68.2%)	10.2 (72.9%)
Trampa fría (g)	-	-	0.6 (0.2%)	0.1 (1.0%)	0.1 (0.7%)
Nicotina (mg/mL)	23.1	42.40	15.45	54.00	63.50
Azúcar reductor (mg/mL)	100.0	12.0	-	-	-
Azúcar total (mg/mL)	109.0	18.0	-	-	-
NAB (µg/mL)	0.04	0.204	0.002	3.57	1.85
NAT (µg/mL)	0.58	2.98	0.026	53.4	29.0
NNK (µg/mL)	0.49	3.61	0.011	28.0	9.07
NNN (µg/mL)	0.83	6.22	0.042	82.3	41.8
Contenido total de TSNA (NAB+NAT+ NNK+NNN) (µg/mL)	1.94	13.014	0.081	167.27	81.72
B[a]P (ng/g)	41.2	0.40	<0.40	137.93	23.76
Agua NIR (siglas en inglés de cercano al IR) (%)	12.7	-	-	-	-
Humedad del horno (%)	13.3	-	-	-	-
<b>Límites de cuantificación (LOQ):</b> B[a]P=0.04 ng/g; TSNA: NAB=0.04 µg/g; NAT=0.08 µg/g; NNK=0.08 µg/g; NNN=0.08 µg/g					

Para comparar, el tabaco procesado (es decir, tabaco que se ha concentrado y procesado hasta un grado comparable al del tabaco utilizado en el presente Ejemplo, y que está listo para su incorporación a un producto de tabaco) tiene normalmente los siguientes niveles de nitrosaminas específicas del tabaco, de nicotina y B[a]P:

5 Nicotina (en función de la mezcla de tabaco): 24 mg/g

B[a]P: 0.8 ng/g

TSNA:

NAB: 140.55 ng/g (0.1405 µg/g)

NAT: 2473.78 ng/g (2.474 µg/g)

10 NNK: 1791.49 ng/g (1.791 µg/g)

NNN: 3539.25 ng/g (3.539 µg/g)



Contenido total de TSNA: 7945.07 ng/g (7.945 µg/mL)

Como se puede apreciar a partir de la Tabla 5, la Fracción 3 contiene significativamente menos B[a]P que el material de alimentación de tabaco.

5 Además de esto, los niveles de todas las TSNA en la Fracción 1 están por debajo del Límite de Cuantificación [LOQ, por sus siglas en inglés]. Además, el nivel de cada NAB, NAT, NNK, NNN, B[a]P y nicotina en la Fracción 1 es inferior a niveles comparables del material de partida de tabaco no procesado. Además, el nivel de cada NAB, NAT, NNK, NNN, B[a]P y nicotina en la Fracción 1 es inferior a niveles comparables en el tabaco procesado en un grado comparable.

10 Sin embargo, la Fracción 1 es un destilado acuoso. La cantidad de nicotina, TSNA (contenido total) y B[a]P en la Fracción 1, si se concentra (retirando el agua, por ejemplo, liofilizando) para proporcionar 3.5 g de destilado, es aproximadamente la siguiente:

Nicotina 1085.1 mg/mL

B[a]P: <28.11 ng/mL

Contenido total de TSNA: 5.69 µg/mL

15 En consecuencia, la Fracción 1 en forma concentrada contiene significativamente menos B[a]P que el material de partida de tabaco no procesado; y un contenido total de TSNA inferior al tabaco procesado en un grado comparable.

**Ejemplo 2:**

20 **Método para determinar niveles de b[a]P (hasta una concentración de 5 ng/g).** Resumiendo, se extrajo una muestra de prueba de 2 g en KOH metanólico y se limpió utilizando separaciones líquido/líquido. A continuación, la muestra se analiza mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) y se corrige respecto a la humedad, para obtener un resultado de ng/g en función del peso seco.

**Reactivos:****Solución de extracción**

25 60 g de KOH en aproximadamente 500 mL de metanol y 100 mL de agua. La mezcla se revuelve hasta que se enfría y se corrige cualquier gota en volumen mediante la adición de metanol.

**Solución de dimetilformamida (DMF)/H<sub>2</sub>O**

100 mL de H<sub>2</sub>O y aproximadamente 500 mL de DMF. La mezcla se agita bien y se permite que se enfríe. Una vez enfriada, se corrige cualquier gota en volumen mediante la adición de más DMF.

**Solución saturada de cloruro de sodio**

30 500 mL de H<sub>2</sub>O y suficiente cloruro de sodio para que no todo se disuelva. Agitar bien.

**Sílice desactivada al 10%**

Se introducen 200 g de sílice desactivada en una botella Schott de un 1 L con una tapa de PTFE sellada y se inserta un tapón de vidrio. Se introdujeron 20 mL de agua en la botella en alícuotas de 5 mL, haciendo rodar la botella entre adiciones. Se dejó que la botella se equilibrara durante al menos 2 horas.

**35 Solución de adición de patrón interno**

Se diluyen 10 mL de la solución madre de ISTD (siglas en inglés de *Internal Standard Spiking Solution*, Solución de adición de patrón interno) hasta 500 mL con ciclohexano (conc. = 10 ng/mL).

**Patrones de calibración**

40 Solución madre A (conc. de B[a]P = 500 ng/mL): 0.5 mL de B[a]P en ciclohexano con una concentración de 100 ng/µL diluidos hasta 100 mL con ciclohexano de grado HPLC.

Solución madre B (conc. de B[a]P = 50 ng/mL): 10 mL de la solución madre A diluidos hasta 100 mL con metanol HPLC.

Solución madre ISTD (conc. de B[a]P-D<sub>12</sub> = 500 ng/mL): 0.5 mL de B[a]P deuterado en ciclohexano con una concentración de 100 ng/µL diluidos hasta 100 mL con ciclohexano de grado HPLC.

Se añade ciclohexano de grado HPLC a la solución madre ISTD y la solución madre B, en las cantidades que se muestran en la siguiente tabla, hasta un volumen de 50 mL.

Cantidad (mL)				
Solución madre B	Solución madre ISTD	Dilución hasta /mL	Conc. de B[a]P ng/mL	Conc. de ISTD ng/mL
0.5	1	50	0.5	10
1	1	50	1	10
2	1	50	2	10
3	1	50	3	10
5	1	50	5	10
10	1	50	10	10

#### Preparación de las muestras

- 5 Para cada conjunto de extracciones se debe extraer una muestra de tabaco de referencia (2R4F; [www.2r4f.com](http://www.2r4f.com)) como muestra de control.

#### Extracción

- 10 Se añaden 2 g ( $\pm 0.01$  g) de muestra a 1 mL de la solución de adición de patrón interno. Añadir 60 mL de KOH metanólico y un tapón. Agitar y colocar en un baño de agua a 60 °C durante 2 horas, agitando ocasionalmente. Retirar y colocarlas en una campana extractora para que se enfríen.

#### Transferencia de B[a]P de metanol a ciclohexano

- 15 Colocar aproximadamente 5 mL de ciclohexano en un embudo de separación. Colocar un embudo con un lecho de lana de vidrio sobre la parte superior del embudo de separación, filtrar el extracto a través de la lámina de vidrio e introducirlo en el embudo de separación. Lavar el matraz cónico y el embudo con aproximadamente 100 mL de ciclohexano. Colocar un tapón en embudo de separación y agitarlo vigorosamente. Permitir que las dos fases se separen y separar por decantación la fase de metanol (fase inferior). Decantar la fase de ciclohexano. Devolver la fase de metanol al embudo de separación, añadir 100 mL más de ciclohexano y agitar vigorosamente. Permitir que las dos fases se separen. Desechar la fase de metanol y devolver la primera fase de ciclohexano al embudo.

#### Retirada del KOH del ciclohexano

- 20 Añadir aproximadamente 50 mL de agua al ciclohexano que está en el embudo de separación y agitar bien. Permitir que las dos fases se separen y desechar la fase acuosa inferior. Repetir tres veces. Se formará una emulsión durante la agitación y esta se puede desechar durante las separaciones. Una vez que hayan finalizado los lavados con agua, decantar la fase de ciclohexano restante en un tubo TurboVap, transferir el tubo a un TurboVap a 40 °C y reducir el extracto con aire hasta aproximadamente 50 mL.

#### 25 Transferencia de B[a]P de ciclohexano a DMF/H<sub>2</sub>O

Transferir 50 mL de ciclohexano a un embudo de separación, añadir un volumen igual de DMF/H<sub>2</sub>O al embudo y agitar vigorosamente. Permitir que las dos fases se separen. Decantar el DMF/H<sub>2</sub>O (fase inferior) en un matraz. Añadir 50 mL más de DMF/H<sub>2</sub>O al embudo de separación y agitar bien. Permitir que las dos fases se separen y separar por decantación el DMF/H<sub>2</sub>O (fase inferior). Desechar la fase superior de ciclohexano.

#### 30 Transferencia de B[a]P de DMF/H<sub>2</sub>O a ciclohexano

Lavar el embudo de separación varias veces con ciclohexano para retirar cualquier residuo. Transferir el extracto combinado de DMF/H<sub>2</sub>O al embudo de separación. Añadir un volumen igual de ciclohexano y 50 mL de una solución saturada de cloruro de sodio. Agitar bien. Permitir que las dos fases se separen; se formará una fase de sal entre las dos fases, desechar la fase de DMF/H<sub>2</sub>O (inferior). En un embudo de vidrio colocar holgadamente un lecho de lana

## ES 2 662 544 T3

de vidrio y verter aproximadamente 2-3 cm de sulfato de sodio anhidro granular en el embudo. Colocar el embudo en un tubo TurboVap, filtrar la fase de ciclohexano a través del sulfato de sodio e introducirlo en el tubo TurboVap. En un TurboVap a 40 °C reducir la muestra con aire hasta aproximadamente 10 mL.

### Limpieza en la columna de sílice

- 5 Pesar 5 g ( $\pm 0.05$  g) de sílice desactivada al 10% y añadir aproximadamente 10 mL de ciclohexano: se formará una suspensión espesa. Transferir esta a una columna de vidrio; lavar el vaso de precipitado e introducir los lavados en la columna hasta que se haya sacado toda la sílice. Añadir sulfato de sodio granular de manera que tenga una anchura de 2 cm. Colocar un tubo TurboVap debajo de la columna. Verter los 10 ml de la muestra en la columna y permitir que el ciclohexano se filtre a través de la columna y se introduzca en el tubo TurboVap. Lavar el tubo
- 10 TurboVap original con aproximadamente 50 mL de ciclohexano y transferir cuidadosamente esto a la columna, asegurándose de que no se perturba la sílice. Lentamente añadir 100 mL más de ciclohexano para diluir el B[a]P de la columna.

### Parámetros de GCMS

#### Inyector:

Lavados de la muestra:	2
Bombas de la muestra:	2
Volumen de inyección:	2 $\mu$ L
Tamaño de la jeringuilla:	10 $\mu$ L
Lavados con el disolvente A después de iny:	5
Lavados con el disolvente B después de iny:	5
Retraso por la viscosidad:	0 segundos
Velocidad del émbolo	Rápida
Permanencia preinyección:	0.00 minutos
Permanencia posinyección:	0.00 minutos

#### Columna:

Columna:	HP5-MSI 30 m x 0.25 mm x 0.25 $\mu$ m
Modo:	Flujo constante
Flujo inicial:	1 mL/min
Presión inicial nominal:	8.52 psi
Velocidad promedio:	37 cm/s

## ES 2 662 544 T3

### Entrada:

Modo:	Sin división pulsado
Temperatura:	250 °C
Presión:	8.51 psi
Presión del pulso:	25.0 psi
Tiempo del pulso:	2.00 min
Flujo de purga:	50.0 mL/min
Tiempo de purga:	2.00 min
Flujo total:	54.2 mL/min
Ahorro de gas:	Activo
Flujo de ahorro:	20.0 mL/min
Tiempo de ahorro:	2.00 min
Tipo de gas:	Helio

### Horno:

Temp. inicial:	60 °C		
Tiempo inicial:	2.00		
Rampas:			
n.º	Velocidad	Temp. final	Tiempo final
1	30.0	250 °C	15.0 min
2	40.0	310 °C	10.0 min
2	0.0 (apagado)		
Temperatura post:	0 °C		
Tiempo post:	0.00 min		
Tiempo de operación:	34.67 min		

Línea de transferencia MSD:

Retraso del disolvente /min. :	14.0 min	
Iones SIM:	Ion	Tiempo de permanencia /ms
	252	150
	250	150
	264	150
	264	150
Resolución:	Baja	
Cuad MS:	150 °C	
Fuente MS:	230 °C	
MS apagado /min. :	23.0 min	
Info MS:	Línea de transferencia MSD: Temp. inicial: 280 °C Tiempo inicial: 0.00 min	

**Análisis**

5 Se puede crear una curva de calibración representando gráficamente la relación de las respuestas de las áreas de respuesta de B[a]P deuterado respecto a B[a]P frente a la concentración de B[a]P en los patrones y calcular la pendiente y la ordenada en el origen.

**Cálculo del instrumento**

$$\frac{\text{(Relación de respuestas - Ordenada en el origen)}}{\text{Pendiente}} \times \text{Conc. patrón interno ng/mL} = \text{B[a]P ng/mL}$$

**Conversión de ng/mL a ng/g en función del peso húmedo**

$$\frac{\text{Volumen de la muestra final (mL)} \times \text{B[a]P (ng/mL)}}{\text{Peso de la muestra húmeda (g)}} = \text{B[a]P ng/g en función del peso húmedo}$$

10

**Conversión de ng/g de muestra húmeda a ng/g de muestra seca**

$$\text{B[a]P ng/g muestra húmeda} \times \frac{100}{(100 - \text{humedad } \%)} = \text{B[a]P ng/g en función del peso seco}$$

**Ejemplo 3: Determinación de niveles de las TSNA**

15 La determinación cuantitativa de TSNA en el tabaco se puede llevar a cabo utilizando cromatografía líquida-tándem de espectrometría de masas (LC-MS/MS).

En resumen, se pesan aproximadamente 0.5 g de tabaco molido en un tubo de centrifuga y se añaden 100 µL de

una mezcla que contiene cuatro patrones internos diferentes.

- 5 Estos patrones internos son los equivalentes deuterados (NAB-d<sub>4</sub>, NAT-d<sub>4</sub>, NNK-d<sub>4</sub> y NNN-d<sub>4</sub>) de las 4 TSNA que se están cuantificando (NAB, NAT, NNK y NNN). La muestra se extrae posteriormente añadiendo 20 mL de metanol. A continuación, se sonicó la suspensión durante 30 min y se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm. A partir del sobrenadante, se transfieren aproximadamente 1.4 mL a un vial del automuestreador para que su análisis mediante LC-MS/MS. El sistema se calibra con un conjunto de patrones de TSNA estandarizados internamente. Los niveles debidos a la adición de los patrones internos en los patrones de calibraciones de TSNA son comparables a los niveles debidos a la adición de los patrones internos en las muestras.

**Soluciones madre de patrón interno**

marca	[NAB-d <sub>4</sub> ]	[NAT-d <sub>4</sub> ]	[NNK-d <sub>4</sub> ]	[NNN-d <sub>4</sub> ]	cantidad pesada (mg)	volumen final de metanol (mL)
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)		
IS-NAB-SMADRE_200	200	0	0	0	10	50
IS-NAT-SMADRE_200	0	200	0	0	10	50
IS-NNK-SMADRE_200	0	0	200	0	10	50
IS-NNN-SMADRE_200	0	0	0	200	10	50

10

Las soluciones madre de patrón interno se utilizan para preparar soluciones madre de patrón interno intermedias:

**Soluciones madre de patrón interno intermedias**

marca	[NAB-d <sub>4</sub> ] (µg/ml)	[NAT-d <sub>4</sub> ] (µg/ml)	[NNK-d <sub>4</sub> ] (µg/ml)	[NNN-d <sub>4</sub> ] (µg/ml)	Volumen tomado (mL)	De la solución	metanol añadido (mL)
IS-NAB-SMADRE_10	10	0	0	0	1	IS-NAB-SMADRE_200	19
IS-NAT-SMADRE_10	0	10	0	0	1	IS-NAT-SMADRE_200	19
IS-NNK-SMADRE_10	0	0	10	0	1	IS-NNK-SMADRE_200	19
IS-NNN-SMADRE_10	0	0	0	10	1	IS-NNN-SMADRE_200	19

15

Estas soluciones madre de patrón interno intermedias se utilizan para preparar soluciones madre de patrón interno de trabajo:

**Soluciones madre de patrón interno de trabajo**

Marca	[NAB-d4] (µg/ml)	[NAT-d4] (µg/ml)	[NNK-d4] (µg/ml)	[NNN-d4] (µg/ml)	volumen tomado (mL)	tomado de la solución (marca)	metanol añadido (mL)	volumen final (mL)
	10	0	0	0	2	IS-NAB- SMADRE_10	0	2
	3.3	6.7	0	0	4	IS-NAT- SMADRE_10	0	6
	2	4	4	0	4	IS-NNK- SMADRE_10	0	10
IS_2	1	2	2	2	4	IS-NNN- SMADRE_10	6	20
IS_0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	1	IS_2	19	20

Los patrones de trabajo se preparan por dilución de las soluciones madre de patrones:

5

**Preparación de las soluciones de patrones de trabajo**

Marca	[NAB] (ng/ml)	[NAT] (ng/ml)	[NNK] (ng/ml)	[NNN] (ng/ml)	volumen tomado (µL)	de la solución (marca)	metanol añadido (µL)	volumen final (µL)
STD_100	50	100	100	100	200	STD- SMADRE_1	1800	2000
STD_50	25	50	50	50	100	STD- SMADRE_1	1900	2000
STD_10	5	10	10	10	200	STD_100	1800	2000
STD_5	2.5	5	5	5	200	STD_50	1800	2000
STD_1	0.5	1	1	1	200	STD_10	1800	2000
STD_0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	200	STD_1	1800	2000
STD_0.05	0.025	0.05	0.05	0.05	100	STD_1	1900	2000
STD_0.01	0.005	0.01	0.01	0.01	200	STD_0.1	1800	2000

Los QC y patrones estandarizados internamente se preparan añadiendo solución de patrón interno (IS\_0.1) a las soluciones de patrones de trabajo y un patrón de solución madre QC:

## ES 2 662 544 T3

### Preparación de las soluciones QC y patrones estandarizados internamente

Marca	[NAB] (ng/mL)	[NAT] (ng/mL)	[NNK] (ng/mL)	[NNN] (ng/mL)	volumen tomado (µL)	De la solución (marca)	IS_0.1 añadido (µL)	volumen final (µL)
STD- IS_100	45	90	90	90	900	STD_100	100	1000
STD- IS_50	22.5	45	45	45	900	STD_50	100	1000
STD- IS_10	4.5	9	9	9	900	STD_10	100	1000
STD- IS_5	2.25	4.5	4.5	4.5	900	STD_5	100	1000
STD- IS_1	0.45	0.9	0.9	0.9	900	STD_1	100	1000
STD- IS_0.1	0.045	0.09	0.09	0.09	900	STD_0.1	100	1000
STD- IS_0.05	0.0225	0.045	0.045	0.045	900	STD_0.05	100	1000
STD- IS_0.01	0.0045	0.009	0.009	0.009	900	STD_0.01	100	1000
QC	4.5	18	18	18	900	STD-QC	100	1000

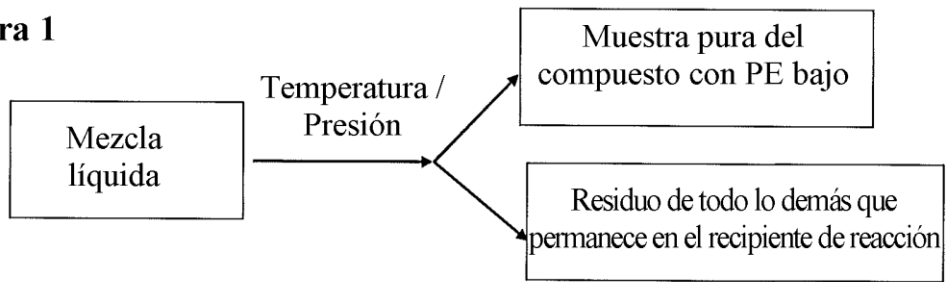
Por lo tanto, las concentraciones de NAB-d<sub>4</sub>, NAT-d<sub>4</sub>, NNK-d<sub>4</sub> y NNN-d<sub>4</sub> son, respectivamente, 5, 10, 10, 10 ng/mL en todas las soluciones QC y patrones estandarizados internamente.



**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para extraer y aislar sustancias constitutivas a partir del material celulósico, comprendiendo el proceso:
  - (a) poner en contacto el material celulósico con un fluido supercrítico en condiciones que proporcionen un extracto;
  - (b) retirar el material insoluble del extracto; y
  - (c) fraccionar el extracto mediante destilación a una presión rebajada para proporcionar una o más sustancias constitutivas aisladas.
2. Un proceso tal como se reivindica en la reivindicación 1, donde el fluido supercrítico utilizado en el paso (a) es dióxido de carbono.
3. Un proceso tal como se reivindica en la reivindicación 2, donde la temperatura durante el paso (a) es de aproximadamente 40 °C y la presión durante el paso (a) es aproximadamente 30 MPa.
4. Un proceso tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el proceso comprende además un paso de retirada de agua tras el paso (b).
5. Un proceso tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el paso (c) conlleva un primer paso de destilación que se lleva a cabo a una temperatura de entre 80 y 150 °C, más preferentemente 90-120 °C y de la manera más preferida entre 100 y 110 °C.
6. Un proceso tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el paso (c) conlleva un primer paso de destilación que se lleva a cabo a una presión de 90-130 mbar, más preferentemente 100-110 mbar y de la manera más preferida a una presión de 100 mbar.
7. Un proceso tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el paso (c) conlleva uno o más pasos de destilación adicionales.
8. Un proceso tal como se reivindica en cualquier reivindicación 7, donde se lleva a cabo un primer paso de destilación adicional a una presión de entre 1 y 5 mbar, más preferentemente 1 y 3 mbar y de la manera más preferida 2 mbar, y/o una temperatura inicial de entre 110 y 180 °C, más preferentemente 120-160 °C y de la manera más preferida entre 135 y 155 °C, donde se reduce hasta entre 100 y 150 °C y más preferentemente 140 °C.
9. Un proceso tal como se reivindica en la reivindicación 7 o reivindicación 8, donde se lleva a cabo un segundo paso de destilación adicional a una presión de entre 1 y 5 mbar, más preferentemente 1 y 3 mbar y de la manera más preferida 2 mbar, y/o una temperatura inicial de entre 110 y 180 °C, más preferentemente 120-160 °C y de la manera más preferida entre 135 y 155 °C, donde se reduce hasta entre 110 y 140 °C y más preferentemente 130 °C.
10. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el material celulósico se obtiene a partir de *Verbascum*, clavos, menta, té, eucalipto, o manzanilla o tabaco.
11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, donde el material celulósico es lámina de tabaco.
12. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde las sustancias constitutivas aisladas de acuerdo con el proceso son sustancialmente puras, o tienen un nivel reducido de uno o más de nicotina, una o más nitrosaminas, o benzo[a]pireno en comparación con el material celulósico partir del cual se aislaron las sustancias constitutivas, o a partir del material celulósico a partir del cual se aislaron cuando se concentra y/o procesa en un grado comparable.
13. Un proceso tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde las sustancias constitutivas extraídas están sustancialmente exentas de nicotina, una o más nitrosaminas y/o benzo[a]pireno.
14. Un proceso tal como se reivindica en la reivindicación 13, donde las sustancias constitutivas aisladas tienen niveles de nitrosaminas inferiores a 0.1 µg/mL, y/o niveles de nicotina inferiores a 25 mg/mL, y/o niveles de benzo[a]pireno inferiores a 2 ng/g.
15. Un proceso tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las sustancias constitutivas aisladas son una o más de cumarina, pulegona, piperonal, *trans*-anetol, safrol, metileugenol o miristicina.
16. Un aparato para extraer sustancias constitutivas a partir del material celulósico, que comprende un medio para poner en contacto material celulósico con un fluido supercrítico en condiciones suficientes para extraer uno o más solutos del material celulósico, para formar de esta manera un extracto y un refinado; un medio para separar el extracto del refinado; y un medio de destilación para separar uno o más solutos del extracto a presión rebajada.

**Figura 1**



**Figura 2**

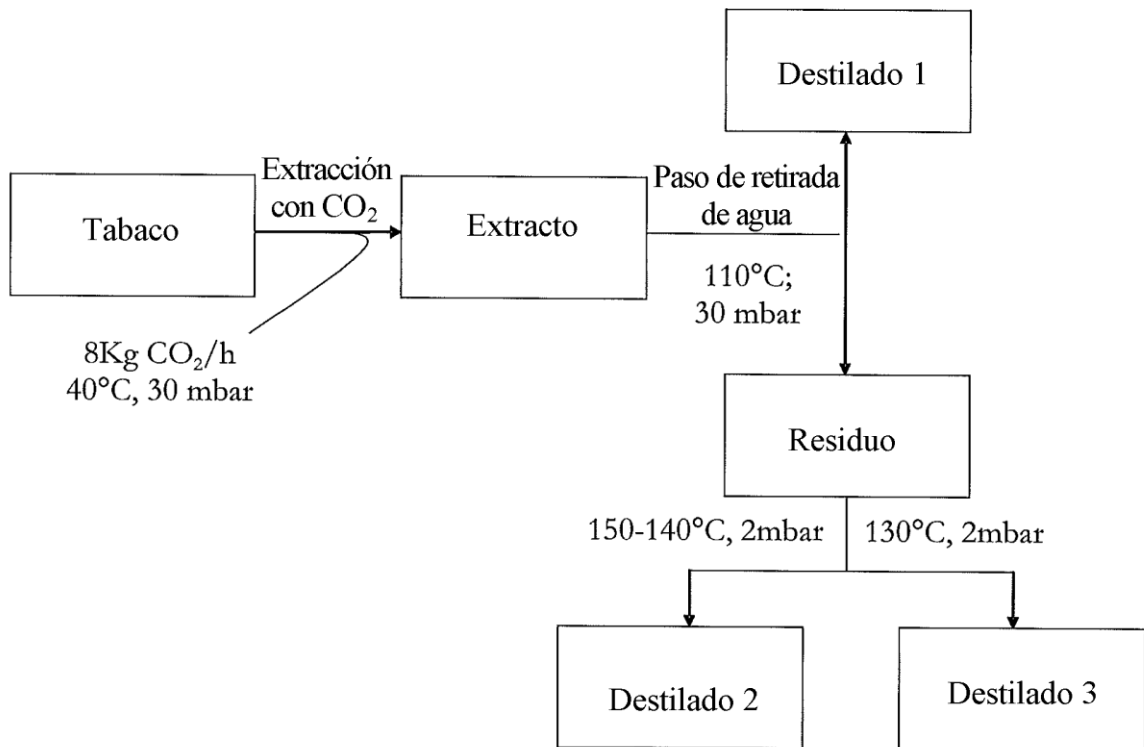
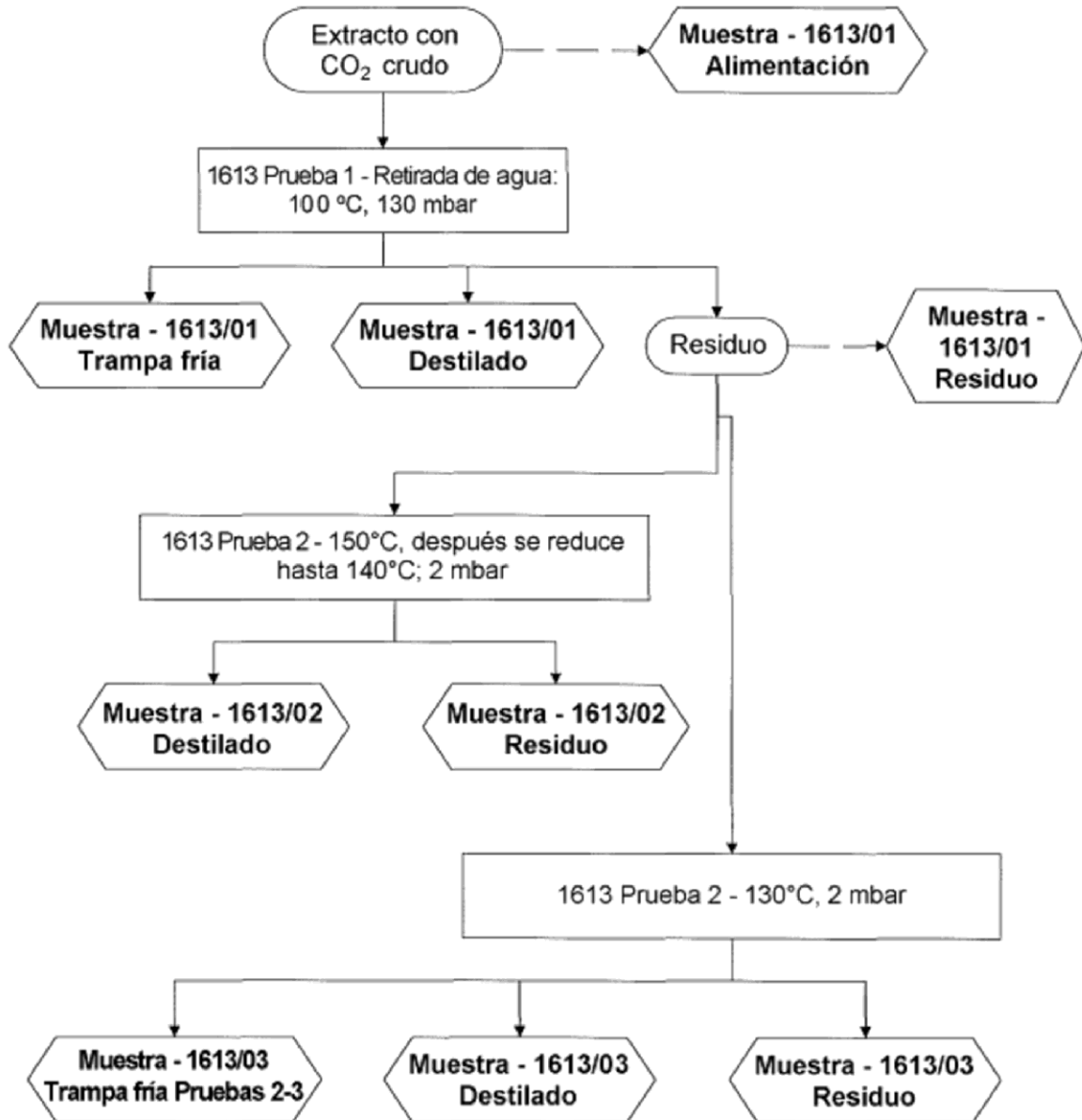


Figura 3



**Notas y leyenda:**

Material de alimentación

Proceso de destilación molecular

Material recogido para análisis