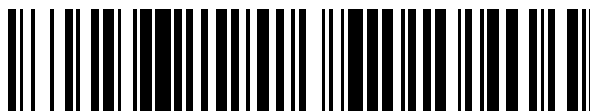


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 789**

51 Int. Cl.:

A24B 15/24 (2006.01)
A24B 15/30 (2006.01)
A24B 13/00 (2006.01)
C07C 35/02 (2006.01)
C07C 35/36 (2006.01)
C07C 35/21 (2006.01)
C07H 3/04 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2012 PCT/US2012/034961**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12148996**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012 E 12719203 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2701540**

54 Título: **Componentes y materiales derivados de tabaco**

30 Prioridad:

27.04.2011 US 201113095277

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.11.2019

73 Titular/es:

**R. J. REYNOLDS TOBACCO COMPANY (100.0%)
401 North Main Street
Winston-Salem, North Carolina 27101-3804, US**

72 Inventor/es:

**BYRD, CRYSTAL DAWN HEGE;
GERARDI, ANTHONY RICHARD y
DUBE, MICHAEL FRANCIS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 729 789 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

Componentes y materiales derivados de tabaco

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a productos hechos o derivados de tabaco, o que de otro modo incorporan tabaco, y se desean para consumo humano. Son de particular interés ingredientes o componentes obtenidos o derivados de plantas o porciones de plantas de la especie *Nicotiana*.

Antecedentes de la invención

10 Los artículos populares para fumar, tales como los cigarrillos, tienen una estructura en forma de varilla sustancialmente cilíndrica e incluyen una carga, rollo o columna de material fumable tal como tabaco triturado (por ejemplo, en forma de carga cortada) rodeada por una envoltura de papel, formando así una llamada "varilla de tabaco". Normalmente, un cigarrillo tiene un elemento de filtro cilíndrico alineado en una relación de extremo a extremo con la varilla de tabaco. Típicamente, un elemento de filtro comprende una estopa de acetato de celulosa plastificada circunscrita por un material de papel conocido como "papel de envolver". Ciertos cigarrillos incorporan un elemento de filtro que tiene múltiples segmentos, y uno de esos segmentos puede comprender partículas de carbón activado. Típicamente, el elemento de filtro se une a un extremo de la varilla de tabaco usando un material de envoltura circunscrito conocido como "papel de boquilla". También se ha vuelto deseable perforar el material de boquilla y el papel de envolver el filtro, para proporcionar la dilución del humo de la corriente principal aspirado con aire ambiente. Un fumador usa un cigarrillo encendiendo uno de sus extremos y quemando la varilla de tabaco. A continuación, el fumador recibe el humo de la corriente principal en su boca aspirando en el extremo opuesto (por ejemplo, el extremo del filtro) del cigarrillo.

25 El tabaco usado para la fabricación de cigarrillos se usa típicamente en forma mezclada. Por ejemplo, ciertas mezclas populares de tabaco, comúnmente denominadas "mezclas americanas", comprenden mezclas de tabaco curado con humo, tabaco burley y tabaco oriental y, en muchos casos, ciertos tabacos procesados, como el tabaco reconstituido y los tallos de tabaco procesados. La cantidad precisa de cada tipo de tabaco dentro de una mezcla de tabaco usada para la fabricación de una marca particular de cigarrillos varía de una marca a otra. Sin embargo, para muchas mezclas de tabaco, el tabaco curado con humo constituye una proporción relativamente grande de la mezcla, mientras que el tabaco oriental constituye una proporción relativamente pequeña de la mezcla. Véase, por ejemplo, Tobacco Encyclopedia, Voges (Ed.) p. 44-45 (1984), Browne, The Design of Cigarettes, 3rd Ed., p. 43 (1990) y Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (Eds.) p. 346 (1999).

30 El tabaco también se puede disfrutar en una forma llamada "sin humo". Los productos de tabaco sin humo particularmente populares se emplean insertando alguna forma de tabaco procesado o formulación que contiene tabaco en la boca del usuario. Varios tipos de productos de tabaco sin humo se exponen en las patentes de EE.UU. Nos. 1376586 de Schwartz; 3696917 de Levi; 4513756 de Pittman et al.; 4528993 de Sensabaugh, Jr. et al.; 4624269 de Story et al.; 4987907 de Townsend; 5092352 de Sprinkle, III et al.; y 5387416 de White et al.; 35 publicaciones se solicitan de patente de EE.UU. Nos. 2005/0244521 de Strickland et al. y 2009/0293889 de Kumar et al.; PCT WO 04/095959 de Arnarp et al.; PCT WO 05/063060 de Atchley et al.; PCT WO 05/004480 de Engstrom; PCT WO 05/016036 de Bjorkholm; y PCT WO 05/041699 de Quinter et al., véase, por ejemplo, los tipos de formulaciones de tabaco sin humo, ingredientes, y metodologías de proceso expuestos en las patentes de EE.UU. Nos. 6953040 de Atchley et al. y 7032601 de Atchley et al.

40 Un tipo de producto de tabaco sin humo se conoce como "tabaco en polvo". Se han fabricado tipos representativos de productos de tabaco en polvo húmedo, comúnmente conocidos como "snus", en Europa, particularmente en Suecia, por medio de compañías como Swedish Match AB, Fiedler & Lundgren AB, Gustavus AB, Skandinavisk Tobakskompagni A/S, y Rocker Production AB. Los productos de snus disponibles en los Estados Unidos han sido comercializados con los nombres comerciales Camel Snus Frost, Camel Snus Original y Camel Snus Spice por R.J. Reynolds Tobacco Company. Véase también, por ejemplo, Bryzgalov et al., 1N1800 Life Cycle Assessment, Comparative Life Cycle Assessments of General Loose and Portion Snus (2005). Además, ciertos estándares de calidad asociados con la fabricación de snus se han reunido en un denominado estándar GothiaTek. Los productos de tabaco sin humo representativos también se han comercializado con los nombres comerciales Oliver Twist por House of Oliver Twist A/S; Copenhagen, Skoal, SkoalDry, Rooster, Red Seal, Husky y Revel de US Smokeless Tobacco Co.; "taboka" de Philip Morris USA; Levi Garrett, Peachy, Taylor's Pride, Kodiak, Hawken Wintergreen, Grizzly, Dental, Kentucky King y Mammoth Cave de Conwood Company LLC; y Camel Orbs, Camel Sticks, y Camel Strips de R.J. Reynolds Tobacco Company.

55 A lo largo de los años, se han propuesto varios métodos de tratamiento y aditivos para alterar el carácter general o la naturaleza de los materiales de tabaco utilizados en los productos de tabaco. Por ejemplo, se han utilizado aditivos o procedimientos de tratamiento para alterar la química o las propiedades sensoriales del material del tabaco, o en el caso de los materiales de tabaco fumable, para alterar la química o las propiedades sensoriales del humo principal generado por los artículos para fumar que incluyen el material de tabaco. Los atributos sensoriales del humo del cigarrillo se pueden mejorar incorporando materiales saborizantes en varios componentes de un cigarrillo. Los

aditivos saborizantes ejemplares incluyen mentol y productos de las reacciones de Maillard, tales como pirazinas, aminoazúcares y compuestos de Amadori. Véase también, Leffingwell et al., Tobacco Flavoring for Smoking Products, R.J. Reynolds Tobacco Company (1972). En algunos casos, los procedimientos de tratamiento que implican el uso de calor pueden impartir al tabaco procesado un color o carácter visual deseado, propiedades sensoriales deseadas o una textura o naturaleza física deseada. Varios procedimientos para preparar composiciones sabrosas y aromáticas para uso en composiciones de tabaco se exponen en las patentes de EE.UU. Nos. 3424171 de Rooker; 3476118 de Luttich; 4150677 de Osborne, Jr. et al.; 4986286 de Roberts et al.; 5074319 de White et al.; 5099862 de White et al.; 5235992 de Sensabaugh, Jr.; 5301694 de Raymond et al.; 6298858 de Coleman, III et al.; 6325860 de Coleman, III et al.; 6428624 de Coleman, III et al.; 6440223 de Dube et al.; 6499489 de Coleman, III; y 6591841 de White et al.; publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2004/0173228 de Coleman, III y 2010/0037903 de Coleman, III et al.

Los atributos sensoriales del tabaco sin humo también se pueden mejorar mediante la incorporación de ciertos materiales saborizantes. Véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2002/0162562 de Williams; 2002/0162563 de Williams; 2003/0070687 de Atchley et al.; 2004/0020503 de Williams; 2005/0178398 de Breslin et al.; 2006/0191548 de Strickland et al.; 2007/0062549 de Holton, Jr. et al.; 2007/0186941 de Holton, Jr. et al.; 2007/0186942 de Strickland et al.; 2008/0029110 de Dube et al.; 2008/0029116 de Robinson et al.; 2008/0029117 de Mua et al.; 2008/0173317 de Robinson et al.; y 2008/0209586 de Neilsen et al.

La solicitud de patente KR20060054786 describe un método de extraer megastigmatrienonas de tabaco y la solicitud de patente CN101129216 se refiere a un extracto de tabaco que comprende una variedad de compuestos que incluyen neofitadieno, solanona, damascenona, megastigmatrienona y otros compuestos y enseña que este extracto se puede usar como aditivo de tabaco para cigarrillo bajo en alquitrán.

Existe una necesidad en la técnica de composiciones sabrosas apropiadas para adición a productos para fumar o productos de tabaco sin humo para introducir características deseadas. Sería deseable proporcionar un método para la extracción y aislamiento eficientes de tales composiciones.

25 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para extraer y aislar varios compuestos de plantas de la especie *Nicotiana*. El método de la invención es selectivo para ciertos compuestos que imparten características sabrosas y/o compuestos que se degradan para producir compuestos que imparten características sabrosas a artículos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. La invención también proporciona métodos para procesar estos compuestos y materiales de tabaco que incorporan estos compuestos.

De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para extraer y aislar compuestos de plantas de la especie *Nicotiana* según la reivindicación 1. En ciertas realizaciones, el método comprende recibir un material vegetal de la especie *Nicotiana*; poner en contacto el material vegetal con un disolvente durante un tiempo y en condiciones suficientes para extraer uno o más compuestos deseados del material vegetal en el disolvente; separar el disolvente que contiene el uno o más compuestos deseados del material vegetal extraído; y purificar el disolvente que contiene el uno o más compuestos deseados para proporcionar un aislado. El aislado obtenido de este modo comprende por lo menos alrededor de 75 por ciento en peso del uno o más compuestos deseados.

El uno o más compuestos deseados se seleccionan del grupo que consiste en solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β -damascenona, norsolanadiona, cis-abienol, α -cembratrienodiol, β -cembratrienodiol, luteína, productos de degradación de los mismos y mezclas de los mismos, en el que el aislado comprende uno o más productos de degradación de los mismos. La invención incluye aislados que contienen un solo compuesto y producto de degradación o cualquier grupo de dos o más compuestos y productos de degradación de la lista anterior.

En algunas realizaciones, el material vegetal de la especie *Nicotiana* está en una forma seleccionada del grupo que consiste en hoja entera, láminas, carga cortada, volumen expandido, tallos, tallos cortados en láminas, tallos hinchados cortados, tabaco reconstituido y partículas. En algunas realizaciones, el material vegetal de la especie *Nicotiana* se proporciona en forma verde o en forma curada.

En ciertas realizaciones, el disolvente es metanol. El uno o más compuestos deseados obtenidos de este modo se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en cis-abienol, α -cembratrienodiol, β -cembratrienodiol, ésteres de sacarosa y luteína. En ciertas realizaciones, el disolvente es vapor seco. El uno o más compuestos deseados obtenidos de este modo se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β -damascenona y norsolanadiona. Cuando el disolvente es vapor seco, la etapa de contacto puede comprender además recoger un destilado. En algunas realizaciones, el destilado puede comprender una capa acuosa y una capa aceitosa y el disolvente que contiene el uno o más compuestos deseados se puede seleccionar del grupo que consiste en la capa aceitosa, la capa acuosa y una corriente de residuos generada por el procedimiento de destilación.

En algunas realizaciones, la etapa de purificación comprende el uso de cromatografía de líquidos a escala preparativa. En ciertas realizaciones, la etapa de purificación comprende usar cromatografía flash. La etapa de purificación puede proporcionar un aislado con un nivel deseado del uno o más compuestos deseados, por ejemplo,

más de alrededor del 90% en peso o más de alrededor del 95% en peso del uno o más compuestos deseados. En ciertas realizaciones, el método comprende además añadir el aislado a una composición de tabaco adaptada para uso en un artículo para fumar o una composición de tabaco sin humo.

5 El aislado se trata adicionalmente para proporcionar uno o más productos de degradación del mismo, en el que el tratamiento comprende oxidación (es decir, tratamiento con H₂O₂ u otro reactivo oxidante) y/o tratamiento térmico. Como ejemplo, el aislado puede comprender luteína y el uno o más productos de degradación se pueden seleccionar del grupo que consiste en megastigmatrienona, beta-damascenona y mezclas de los mismos. Como otro ejemplo, el aislado puede comprender cis-abienol y el uno o más productos de degradación se puede seleccionar del grupo que consiste en esclareolida, esclareol, ambróxido y sus mezclas.

10 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para proporcionar un material de sabor derivado de una planta de la especie *Nicotiana* para su adición a una composición de tabaco, comprendiendo el método recibir un material vegetal de la especie *Nicotiana*; poner en contacto el material vegetal con un disolvente durante un tiempo y en condiciones suficientes para extraer el uno o más compuestos deseados del material vegetal en el disolvente; separar el disolvente que contiene uno o más compuestos deseados del material vegetal extraído; purificar el disolvente que contiene el uno o más compuestos para proporcionar un aislado que comprende por lo menos aproximadamente el 75% en peso del uno o más compuestos deseados, siendo seleccionado el uno o más compuestos deseados del grupo que consiste en solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β-damascenona, norsolanadiona, cis-abienol, α-cembratrienodiol, β-cembratrienodiol, luteína, en el que el aislado comprende uno o más productos de degradación de los mismos, y añadir el aislado a una composición de tabaco adaptada para uso en un artículo para fumar o una composición de tabaco sin humo.

Se pueden hacer varias modificaciones al método de proporcionar un material de sabor, como se indicó anteriormente para el método de extracción y aislamiento de compuestos. Por ejemplo, el material vegetal y el disolvente usado pueden variar, y se pueden usar varios métodos de tratamiento adicionales en combinaciones con el método de la invención.

25 El aislado se puede añadir a la composición de tabaco de varias maneras. Por ejemplo, el aislado se puede añadir a la forma de una formulación de envoltura o una formulación de revestimiento superior aplicada a la tira de tabaco o en la forma de un componente de un material de tabaco reconstituido. En ciertas realizaciones, la composición de tabaco comprende un material de tabaco adaptado para uso en un artículo para fumar. En tales realizaciones, la cantidad de material aislado en la composición de tabaco puede estar, por ejemplo, entre alrededor de 5 ppm y alrededor de 5 por ciento en peso, basado en el peso seco total del material de tabaco en el artículo para fumar. En ciertas realizaciones, la composición de tabaco comprende un material de tabaco adaptado para uso en un producto de tabaco sin humo. En tales realizaciones, la cantidad de material aislado en la composición de tabaco puede estar, por ejemplo, entre alrededor de 5 ppm y alrededor de 5 por ciento en peso, basado en el peso seco total del material de tabaco en el producto de tabaco sin humo.

35 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un aislado de una planta de la especie *Nicotiana* o componentes de la misma, en el que el aislado comprende por lo menos alrededor del 75 por ciento en peso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β-damascenona, norsolanadiona, cis-abienol, α-cembratrienodiol, β-cembratrienodiol, luteína, en el que el aislado comprende además uno o más productos de degradación de los mismos. En algunas realizaciones, el aislado comprende más de alrededor de 90% en peso o más de alrededor de 95% en peso de uno o más compuestos deseados. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de tabaco que comprenden el aislado para uso en artículos para fumar o composiciones de tabaco sin humo.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

45 La presente invención se describirá ahora más detalladamente de aquí en adelante. Sin embargo, esta invención se puede realizar de muchas formas diferentes y no se debe interpretar que está limitada a las realizaciones expuestas aquí; más bien, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta descripción sea exhaustiva y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a las personas expertas en la técnica. Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un, uno, una", y "el, la, lo" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La referencia a "porcentaje en peso seco" o "base de peso seco" se refiere al peso en base a los ingredientes secos (es decir, todos los ingredientes excepto el agua).

55 La selección de la planta de la especie *Nicotiana* puede variar; y en particular, los tipos de tabaco o tabacos pueden variar. Los tabacos que se pueden emplear incluyen tabacos curado con humo o Virginia (por ejemplo, K326), burley, curado al sol (por ejemplo, Indian Kurnool y orientales, que incluyen los tabacos Katerini, Prelip, Komotini, Xanthi y Yambol), Maryland, negro, negro curado al fuego, negro curado al aire (por ejemplo, tabacos Passanda, Cubano, Jatin y Bezuki), rubio curado al aire (por ejemplo, tabacos del norte de Wisconsin y Galpao), curado al aire de la India, Red Russian y Rustica, así como varios otros tabacos raros o especializados. Las descripciones de varios tipos de tabacos, prácticas de cultivo y prácticas de cosecha se exponen en Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (Eds.) (1999). Varios tipos representativos de plantas de la especie *Nicotiana* se exponen en Goodspeed, The Genus *Nicotiana*, (Chonica Botanica) (1954); patentes de EE.UU. Nos. 4660577 de

Sensabaugh, Jr. et al.; 5387416 de White et al. y 7025066 de Lawson et al.; publicaciones de solicitud de Patente de EE.UU. Nos. 2006/0037623 de Lawrence, Jr. y 2008/0245377 de Marshall et al. Las especies ejemplares de *Nicotiana* incluidas son *N. tabacum*, *N. rustica*, *N. alata*, *N. arentsii*, *N. excelsior*, *N. forgetiana*, *N. glauca*, *N. glutinosa*, *N. gossei*, *N. kawakamii*, *N. knightiana*, *N. langsdorffi*, *N. otophora*, *N. setchelli*, *N. sylvestris*, *N. tomentosa*, *N. tomentosiformis*, *N. undulata*, *N. x sanderae*, *N. africana*, *N. amplexicaulis*, *N. benavidesii*, *N. bonariensis*, *N. debneyi*, *N. longiflora*, *N. maritima*, *N. megalosiphon*, *N. occidentalis*, *N. paniculata*, *N. plambafinifolia*, *N. raimondii*, *N. rosulata*, *N. simulans*, *N. stocktonii*, *N. suaveolens*, *N. umbratica*, *N. velutina*, *N. wigandioides*, *N. acaulis*, *N. acuminata*, *N. attenuata*, *N. benthamiana*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. cordifolia*, *N. corymbosa*, *N. fragrans*, *N. goodspeedii*, *N. linearis*, *N. miersii*, *N. naudicaulis*, *N. obtusifolia*, *N. occidentalis* subsp. *Hersperis*, *N. pauciflora*, *N. petunioides*, *N. quadrivalvis*, *N. repanda*, *N. totundifolia*, *N. solanifolia* y *N. spgazzinii*.

La especie *Nicotiana* se puede derivar utilizando técnicas de modificación genética o hibridación (por ejemplo, las plantas de tabaco se pueden modificar genéticamente o hibridar para aumentar o disminuir la producción de componentes, características o atributos). Véase, por ejemplo, los tipos de modificaciones genéticas de plantas establecidas en las patentes de EE.UU. Nos. 5539093 de Fitzmaurice et al.; 5668295 de Wahab et al.; 5705624 de Fitzmaurice et al.; 5844119 de Weigl; 6730832 de Domínguez et al.; 7173170 de Liu et al.; 7208659 de Colliver et al. y 7230160 de Benning et al.; publicación de solicitud de Patente de EE.UU. No. 2006/0236434 de Conkling et al.; y PCT WO2008/103935 de Nielsen et al.

Para la preparación de productos de tabaco fumable y sin humo, es típico que las plantas cosechadas de la especie *Nicotiana* se sometan a un procedimiento de curado. Las descripciones de varios tipos de procedimientos de curado para varios tipos de tabacos se exponen en Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis et al. (Eds.) (1999). Las técnicas y condiciones ejemplares para curar tabaco curado con humo se exponen en Nestor et al., Beitrage Tabakforsch. Int., 20, 467-475 (2003) y la patente de EE.UU. No. 6895974 de Peele. Las técnicas y condiciones representativas para curar el tabaco al aire se exponen en Roton et al., Beitrage Tabakforsch. Int., 21, 305-320 (2005) y Staaf et al., Beitrage Tabakforsch. Int., 21, 321-330 (2005). Ciertos tipos de tabacos se pueden someter a tipos alternativos de procedimientos de curado, como el curado al fuego o el curado al sol. Preferentemente, los tabacos cosechados que se curan se envejecen a continuación.

Por lo menos una porción de la planta de la especie *Nicotiana* (por ejemplo, por lo menos una porción de la porción de tabaco) se puede emplear en una forma inmadura. Es decir, la planta, o por lo menos una porción de esa planta, se puede cosechar antes de llegar a una etapa que normalmente se considera madura o lista para la cosecha. Como tal, por ejemplo, el tabaco se puede cosechar cuando la planta de tabaco está a punto de un brote, está comenzando la formación de la hoja, está comenzando la floración, o similares. Por lo menos una porción de la planta de la especie *Nicotiana* (por ejemplo, por lo menos una porción de la porción de tabaco) se puede emplear en una forma lista para la cosecha. Es decir, la planta, o por lo menos una parte de esa planta, se puede cosechar cuando esa planta (o parte de la planta) alcanza un punto que tradicionalmente se considera madura, demasiado madura o lista para la cosecha. Como tal, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de recolección de tabaco empleadas convencionalmente por los agricultores, se pueden cosechar plantas de tabaco oriental, se pueden cosechar plantas de tabaco burley, o se pueden cosechar o cortar hojas de tabaco de Virginia por la posición del tallo principal.

Según la presente invención, un producto de tabaco incorpora tabaco que se combina con uno o más compuestos extraídos y/o aislados de una planta de la especie *Nicotiana* en forma verde o forma curada. Por lo menos una porción del producto de tabaco puede comprender compuestos retirados de la planta de *Nicotiana* (por ejemplo, por extracción, destilación u otros tipos de técnicas de procesado). En algunas realizaciones, por lo menos una porción del producto de tabaco puede estar compuesta de productos de degradación derivados de estos compuestos, tales como compuestos recogidos después de someter las plantas a una reacción química o después de someter compuestos o mezclas de los mismos aislados de plantas de *Nicotiana* a una reacción química (por ejemplo, condiciones de reacción ácido/base, condiciones de oxidación, tratamiento enzimático y/o tratamiento térmico).

La especie *Nicotiana* se puede seleccionar por el contenido de varios compuestos que están presentes en ella. Por ejemplo, las plantas se pueden seleccionar sobre la base de que esas plantas producen cantidades relativamente altas de uno o más de los compuestos que se desea aislar de ellas. En ciertas realizaciones, las plantas de la especie *Nicotiana* (por ejemplo, el tabaco Galpao común) se cultivan específicamente por su abundancia de compuestos de la superficie de la hoja. Las plantas de tabaco se pueden cultivar en invernaderos, cámaras de crecimiento, o al aire libre en campos, o cultivar hidropónicamente.

Se pueden emplear varias partes o porciones de la planta de la especie *Nicotiana*. Por ejemplo, virtualmente toda la planta (por ejemplo, la planta entera) se puede cosechar y emplear como tal. Alternativamente, varias partes o trozos de la planta se pueden cosechar o separar para su uso posterior después de la cosecha. Por ejemplo, las hojas, tallo, tallo principal y varias combinaciones de los mismos, se pueden aislar para un uso o tratamiento adicional. El material vegetal de la invención puede comprender de este modo una planta completa o cualquier porción de una planta de la especie *Nicotiana*.

El procesado después de la cosecha de la planta o parte de la misma puede variar. Después de la cosecha, la planta o porción de la misma se puede usar en forma verde (por ejemplo, la planta o porción de la misma se puede

usar sin ser sometida a ningún procedimiento de curado). Por ejemplo, la planta o parte de la misma se puede usar sin ser sometida a condiciones significativas de almacenamiento, manejo o procesado. En ciertas situaciones, es preferible que la planta o parte de la misma se use virtualmente inmediatamente después de la cosecha. Alternativamente, por ejemplo, una planta o porción de la misma en forma verde se puede refrigerar o congelar para su uso posterior, se puede liofilizar, someter a irradiación, amarillear, secar, curar (por ejemplo, usando técnicas de secado al aire o técnicas que emplean la aplicación de calor), calentar o cocer (por ejemplo, asar, freír o hervir), o someter de otro modo a almacenamiento o tratamiento para uso posterior. La planta cosechada o parte de la misma se puede procesar físicamente. La planta o parte de la misma se puede separar en partes o trozos individuales (por ejemplo, las hojas se pueden retirar de los tallos y/o los tallos y las hojas se pueden quitar del tallo principal). La planta o las partes o trozos individuales cosechados se pueden subdividir adicionalmente en partes o trozos (por ejemplo, las hojas se pueden rasgar, cortar, triturar, pulverizar, moler o moler en trozos o partes que se pueden caracterizar como trozos, gránulos, partículas o polvos finos de tipo de relleno). La planta, o partes de la misma, se pueden someter a fuerzas externas o presión (por ejemplo, al ser presionadas o sometidas a un tratamiento con rodillo). Cuando se llevan a cabo tales condiciones de procesado, la planta o porciones de la misma pueden tener un contenido de humedad que se aproxima a su contenido natural de humedad (por ejemplo, su contenido de humedad inmediatamente después de la cosecha), un contenido de humedad que se consigue añadiendo humedad a la planta o porción de la misma, o un contenido de humedad que es el resultado del secado de la planta o porción de la misma. Por ejemplo, los trozos de plantas en polvo, pulverizadas, trituradas o molidas pueden tener contenidos de humedad de menos de alrededor del 25 por ciento en peso, a menudo menos de alrededor del 20 por ciento en peso, y con frecuencia menos de alrededor del 15 por ciento en peso.

La planta de la especie *Nicotiana* o porciones de la misma se pueden someter a otros tipos de condiciones de procesado. Por ejemplo, los componentes se pueden separar unos de otros o de otro modo fraccionar en clases químicas o mezclas de compuestos individuales. Los procedimientos de separación típicos pueden incluir una o más etapas del procedimiento (por ejemplo, extracción con disolventes usando disolventes polares, disolventes orgánicos o fluidos supercríticos), cromatografía, destilación, filtración, recristalización y/o partición disolvente-disolvente. Los disolventes o vehículos de extracción y separación ejemplares incluyen agua, alcoholes (por ejemplo, metanol o etanol), hidrocarburos (por ejemplo, heptano y hexano), éter dietílico, cloruro de metileno y dióxido de carbono supercrítico. Las técnicas ejemplares útiles para extraer componentes de especies de *Nicotiana* se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 4144895 de Fiore; 4150677 de Osborne, Jr. et al.; 4267847 de Reid; 4289147 de Wildman et al.; 4351346 de Brummer et al.; 4359059 de Brummer et al.; 4506682 de Muller; 4589428 de Keritsis; 4605016 de Soga et al.; 4716911 de Poulouse et al.; 4727889 de Niven, Jr. et al.; 4887618 de Bernasek et al.; 4941484 de Clapp et al.; 4967771 de Fagg et al.; 4986286 de Roberts et al.; 5005593 de Fagg et al.; 5018540 de Grubbs et al.; 5060669 de White et al.; 5065775 de Fagg; 5074319 de White et al.; 5099862 de White et al.; 5121757 de White et al.; 5131414 de Fagg; 5131415 de Muñoz et al.; 5148819 de Fagg; 5197494 de Kramer; 5230354 de Smith et al.; 5234008 de Fagg; 5243999 de Smith; 5301694 de Raymond et al.; 5318050 de González-Parra et al.; 5343879 de Teague; 5360022 de Newton; 5435325 de Clapp et al.; 5445169 de Brinkley et al.; 6131584 de Lauterbach; 6298859 de Kierulff et al.; 6772767 de Mua et al.; y 7337782 de Thompson. Véase también, los tipos de técnicas de separación que se exponen en Brandt et al., LC-GC Europe, p. 2-5 (marzo, 2002) y Wellings, A Practical Handbook of Preparative HPLC (2006). Además, la planta o porciones de la misma se pueden someter a los tipos de tratamientos expuestos en Ishikawa et al., Chem. Pharm. Bull., 50, 501-507 (2002); Tienpont et al., Anal. Bioanal. Chem., 373, 46-55 (2002); Ochiai, Gerstel Solutions Worldwide, 6, 17-19 (2006); Coleman, III, et al., J. Sci. Food and Agric., 84, 1223-1228 (2004); Coleman, III et al., J. Sci. Food and Agric., 85, 2645-2654 (2005); Pawliszyn, ed., Applications of Solid Phase Microextraction, RSC Chromatography Monographs, (Royal Society of Chemistry, UK) (1999); Sahraoui et al., J. Chrom., 1210, 229-233 (2008); y 5301694 de Raymond et al.

En particular, en ciertas realizaciones, uno o más compuestos de interés se extraen de un material vegetal de la especie *Nicotiana* o una porción del mismo, poniendo en contacto la planta o una porción de la misma con un disolvente en condiciones (por ejemplo, presión y temperatura apropiadas) suficientes para extraer uno o más compuestos deseados del material vegetal. En algunas realizaciones, el disolvente es un disolvente orgánico, tal como metanol o hexanos. En otras realizaciones, el disolvente es vapor seco. El vapor seco (también denominado vapor anhidro) es un vapor que tiene un contenido mínimo de partículas de agua suspendidas (es decir, humedad). Por ejemplo, el vapor seco comprende típicamente menos de alrededor de 5% de partículas de agua en peso o menos de alrededor de 10% de partículas de agua en peso.

La temperatura y la presión a la que se realiza el procedimiento de extracción pueden variar. Sin embargo, en algunas realizaciones, la extracción apropiada se logra a temperatura y presión ambiente. Además, el periodo de tiempo que el disolvente está en contacto con el material de tabaco puede variar. Típicamente, el disolvente permanecerá en contacto con el material de tabaco durante aproximadamente dos horas, aunque se pueden usar periodos de tiempo más largos o más cortos sin apartarse de la invención.

Los compuestos de interés ejemplares que pueden estar presentes en el extracto obtenido según los métodos de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β -damascenona, norsolanadiona, cis-abienol, α -cembratrienodiol, β -cembratrienodiol, y/o luteína.

El procesado adicional del producto extraído se puede llevar a cabo de varias maneras. El método de procesado adicional puede depender de los compuestos presentes en el extracto y/o del tipo de disolvente usado en la

extracción.

Por ejemplo, cuando se usa un disolvente orgánico (por ejemplo, metanol o hexanos) para extraer uno o más compuestos del material de tabaco, el disolvente puesto en contacto con el material de tabaco simplemente se puede filtrar para retirar el material de tabaco en partículas y el filtrado se puede concentrar.

- 5 Cuando se usa vapor seco para extraer uno o más compuestos del material de tabaco, el vapor seco se condensa típicamente después de la etapa de contacto para dar un destilado de vapor. En ciertas realizaciones, este método de destilación se lleva a cabo en varias mezclas de materiales de tabaco curado. Por ejemplo, en una realización, se usa una mezcla de tabacos curado con humo, burley y oriental. Los métodos usados para la producción de aceites esenciales se pueden usar aquí para destilar compuestos de interés de plantas de tabaco o porciones de las mismas. Para ejemplos de procedimientos de destilación de vapor y condiciones que se pueden usar o modificar para usar para proporcionar compuestos de interés de plantas de tabaco o porciones de las mismas según la presente invención, véase por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5891501 de McKellip et al. El tipo de aparato usado para procesar el material de esta manera puede ser, por ejemplo, el tipo empleado tradicionalmente para el aislamiento de aceites de menta. En ciertas realizaciones, el destilado de vapor comprende una capa de agua condensada y una capa aceitosa que se pueden separar una de otra.

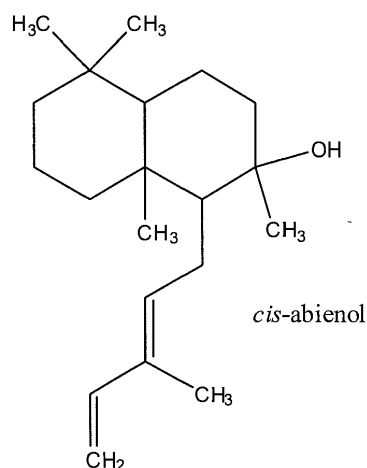
La capa aceitosa obtenida de este modo del material de tabaco comprende típicamente uno o más compuestos de interés (por ejemplo, neofitadieno, solanona, isómeros de megastigmatrienona, β -damascenona y norsolanadiona). En ciertas realizaciones, la capa aceitosa es ventajosamente rica en compuestos de sabor, que incluyen uno o más de los compuestos de interés señalados anteriormente, y está esencialmente libre de alcaloides. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la capa aceitosa contiene menos de alrededor del 15% en peso, menos de alrededor del 10% en peso, menos de alrededor del 5% en peso, menos de alrededor del 2% en peso, menos de alrededor del 1% en peso, o menos de alrededor del 0,5% en peso de alcaloides. Los porcentajes de otros compuestos presentes en la capa aceitosa pueden variar, dependiendo, por ejemplo, del tipo de tabaco sometido a destilación por los métodos proporcionados aquí.

25 El agua residual resultante del procedimiento de destilación puede, en ciertas realizaciones, comprender también compuestos de interés (por ejemplo, que incluyen, pero no están limitados a, aquellos compuestos de interés que se observa que están presentes en la capa aceitosa). Se cree que estos compuestos están presentes tanto en la capa aceitosa como en el agua porque el procedimiento de destilación puede proporcionar ciertos compuestos con notable solubilidad en agua. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los compuestos de interés se aíslan del agua residual producida por el procedimiento de destilación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los compuestos de sabor y/o la nicotina están presentes en el agua residual. Se observa que el porcentaje de varios compuestos volátiles y semivolátiles en las aguas residuales varía en función del tiempo. De este modo, se pueden recoger varias fracciones del agua residual por separado para proporcionar disoluciones que contienen porcentajes más altos de ciertos compuestos. Por consiguiente, la invención proporciona la extracción de los compuestos deseados por destilación, en la que los compuestos deseados se proporcionan en la capa aceitosa del destilado, la capa acuosa del destilado y/o en el agua residual producida durante el procedimiento de destilación.

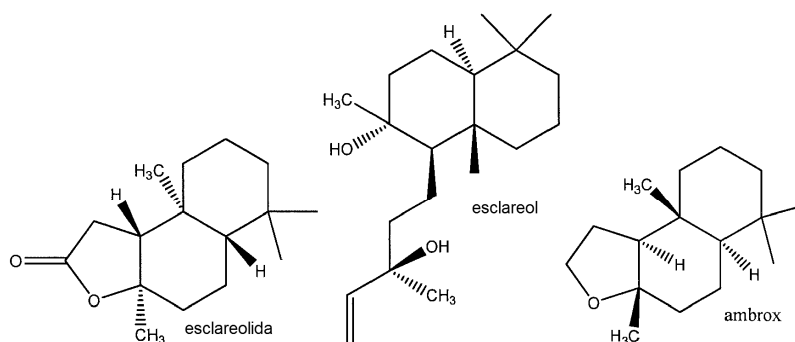
Se pueden aislar varios compuestos o mezclas de compuestos de la planta *Nicotiana* o porciones de la misma mediante los métodos proporcionados aquí. Tal como se usa aquí, un "componente aislado" o "aislado de plantas" es un compuesto o mezcla compleja de compuestos separados de una planta de la especie *Nicotiana* o una porción de la misma. El componente aislado puede ser un compuesto único, una mezcla homóloga de compuestos similares (por ejemplo, isómeros de un compuesto de sabor) o una mezcla heteróloga de compuestos diferentes (por ejemplo, una mezcla compleja de varios compuestos de diferentes tipos, preferentemente con atributos sensoriales deseables). El material de tabaco que se ha sometido a los métodos de extracción descritos en el presente documento se puede procesar adicionalmente, por ejemplo, para extraer uno o más compuestos adicionales del mismo. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2008/0254149 de Havkin-Frenkel.

Según la presente invención, una variedad de compuestos que tienen características distintivas de sabor y aroma se pueden extraer y/o aislar de plantas de la especie *Nicotiana*. Algunos de estos compuestos se pueden considerar volátiles en condiciones ambientales normales de temperatura, humedad y presión del aire. Los compuestos preferidos exhiben atributos sensoriales positivos a concentraciones relativamente bajas. Los ejemplos de los tipos de compuestos que pueden estar presentes en plantas de *Nicotiana* y se pueden extraer y aislar mediante los métodos descritos aquí incluyen solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β -damascenona, norsolanadiona, cis-abienol, α -cembratrienodiol, β -cembratrienodiol, y/o luteína.

El cis-abienol, cuya estructura se muestra a continuación, es un importante labdanoide en la hoja verde de los tabacos. Por ejemplo, el cis-abienol se encuentra comúnmente en los tabacos orientales.

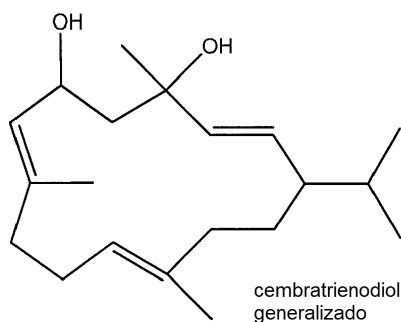


- 5 Durante el curado al aire y al sol de tabacos orientales verdes, la concentración de *cis*-abienol típicamente disminuye significativamente a medida que se forman numerosos productos de degradación de labdanoides. Los productos de degradación de labdanoides son estructuralmente similares al *cis*-abienol, e incluyen, por ejemplo, esclareolida, esclareol y ambróxido, cuyas estructuras se muestran a continuación. Se sabe que estos productos de degradación imparten características de cedro a los productos de tabaco que contienen tabacos orientales.



- 10 El *cis*-abienol aislado puede encontrar varias aplicaciones en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. En algunas realizaciones, el *cis*-abienol aislado se degrada por varios medios y los productos de degradación se pueden usar en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el *cis*-abienol aislado y/o sus productos de degradación encuentran uso como materiales de sabor natural derivados del tabaco (por ejemplo, material de sabor sustituto del turco) o sustitutos del tabaco oriental. En algunas realizaciones, los productos de *cis*-abienol y/o degradación se usan para aplicaciones terapéuticas o nutriceúticas. Por ejemplo, los compuestos labdanoides han mostrado actividad anticancerígena. Véase, por ejemplo, Jung et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8: 3295-98 (1998).
- 15 En algunas realizaciones, el *cis*-abienol se usa como un sustrato en la preparación de otros compuestos. Por ejemplo, se ha usado como un sustrato en la síntesis de weidendioles, que son inhibidores de la proteína de transferencia de éster de colesterol que pueden reducir el riesgo de aterosclerosis. Véase, por ejemplo, Barrero et al., Tetrahedron 54: 5635-5650 (1998).

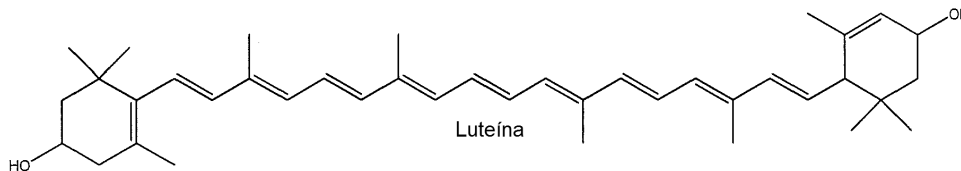
- 20 Los cembratrienodios (por ejemplo, α -2,7,11-cembratrieno-4,6-diol y β -2,7,11-cembratrieno-4,6-diol), cuya estructura se muestra a continuación, se encuentran en altas cantidades en la hoja y flor de *Nicotiana tabacum*. La biodegradación de estos compuestos durante el curado de las hojas de tabaco da como resultado la formación de una gama de compuestos de sabor. Los cembratrienodios tienen una estructura como se muestra a continuación.



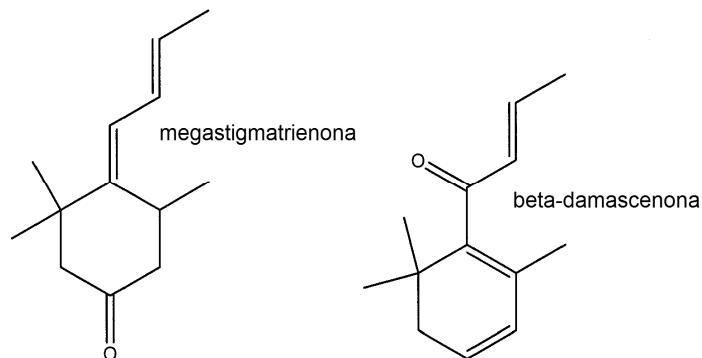
Los cembratrienodios aislados pueden encontrar varias aplicaciones en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. En algunas realizaciones, los cembratrienodios aislados se degradan por varios medios y los productos de degradación se usan en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los cembratrienodios aislados y/o los productos de degradación de los mismos pueden encontrar uso como materiales de sabor natural derivados del tabaco. En algunas realizaciones, los cembratrienodios y/o los productos de degradación se usan para aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, se ha encontrado que los cembratrienodios proporcionan beneficios potenciales para la salud en el tratamiento del cáncer y ciertas enfermedades neurodegenerativas. Véase, por ejemplo, Saito et al., *Agric. Biol. Chem.* 51 (3): 941-43 (1987) y la patente de EE.UU. No. 4701570 de Mizusaki et al. Los cembratrienodios y sus derivados también pueden ser útiles como fármacos para prevenir fumar y/o para tratar la adicción a la nicotina. Véase, por ejemplo, El Sayed et al., *Expert Opin. Invest. Drugs* 16 (6): 877-87 (2007).

Los ésteres de sacarosa son compuestos glicolípidos, caracterizados por ácidos carboxílicos de bajo peso molecular unidos a grupos hidróxido de la porción de glucosa de la sacarosa. Se considera que los ésteres de sacarosa son algunos de los aromas sensoriales y aromáticos más importantes responsables del sabor del tabaco oriental. Véase, por ejemplo, Leffingwell et al., *Rec. Adv. Tob. Sci.* 14: 169-218 (1998).

La luteína, cuya estructura se muestra a continuación, es un pigmento carotenoide importante en el tabaco.



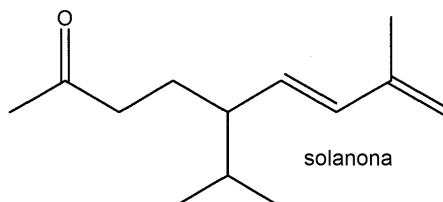
Se sabe que la luteína se descompone durante el curado al aire del tabaco verde para producir varias iononas y derivados de las mismas. Dos tipos importantes de derivados de la luteína son megastigmatrienona y beta-damascenona. Estos compuestos afectan a las características del aroma del tabaco curado. Además de ser productos de degradación de luteína, la megastigmatrienona y beta-damascenona, cuyas estructuras se muestran a continuación, también se pueden extraer por separado y aislar del tabaco según los métodos proporcionados aquí.



La luteína aislada puede encontrar varias aplicaciones en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. En algunas realizaciones, la luteína aislada se degrada por varios medios y los productos de degradación producidos a partir de ellos se pueden usar en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la luteína aislada y/o los productos de degradación de la misma pueden encontrar uso como derivados del tabaco, materiales de sabor natural, colorantes o antioxidantes. La luteína también es útil como un compuesto nutricional y/o terapéutico. Véase por ejemplo, Granado et al., *Br. J. Nutr.* 90 (3): 487-502 (2003); Sies et

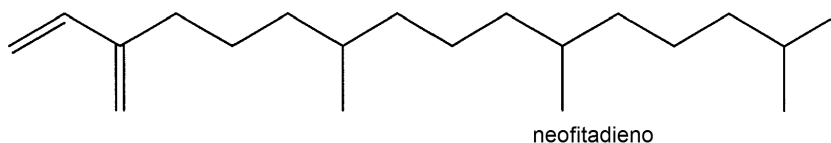
al., *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 73 (2): 95-100 (2003); y Krinsky et al., *Annu. Rev. Nutr.* 23 (2): 171-201 (2003).

La solanona es un compuesto que es un útil saborizante y potenciador del sabor del tabaco. Se señala específicamente que está presente en el aroma del tabaco burley. Véase, por ejemplo, Domle et al., *Helv. Chim. Acta*, 55 (6): 1866-1882 (1972). Aunque comúnmente se produce por medios sintéticos (véase, por ejemplo, Johnson et al., *J. Org. Chem.* 30 (9): 2918-2921 (1965) y patentes de EE.UU. 4433695 de Hall et al. y 4547594 de Light et al. la solanona está presente en el tabaco y se puede aislar según los métodos proporcionados aquí, y su estructura se muestra a continuación.



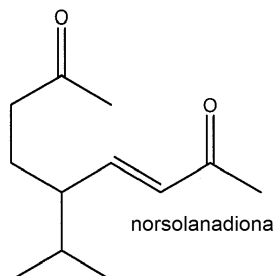
La solanona aislada puede encontrar varias aplicaciones en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. En algunas realizaciones, la solanona aislada se puede degradar por varios medios y los productos de degradación se pueden usar en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la solanona aislada y/o los productos de degradación de la misma pueden encontrar uso como materiales de sabor natural derivados del tabaco.

Se informa que el neofitadieno, cuya estructura se muestra a continuación, mejora el sabor del tabaco porque puede actuar como portador del sabor atrapando sustancias volátiles en el aerosol del humo de tabaco. Véase, por ejemplo, J.C. Leffingwell, *Leaf chemistry: basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types. Tobacco: Production, Chemistry and Technology*, 265-284 (1999).



El neofitadieno aislado puede encontrar varias aplicaciones en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. En algunas realizaciones, el neofitadieno aislado se puede degradar por varios medios y los productos de degradación se pueden usar en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el neofitadieno aislado y/o sus productos de degradación pueden encontrar uso como materiales de sabor natural derivados del tabaco.

La norsolanadiona, cuya estructura se muestra a continuación, es otro compuesto que se sabe que es útil como saborizante de tabaco y para aumentar o mejorar el aroma y el sabor del tabaco para fumar. Al igual que la solanona, este compuesto se sintetiza comúnmente, en lugar de aislarse. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 4517385 de Light et al.



La norsolanadiona aislada puede encontrar varias aplicaciones en productos para fumar y/o productos de tabaco sin humo. En algunas realizaciones, la norsolanadiona aislada se puede degradar por varios medios y los productos de degradación se pueden usar en productos de tabaco. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la norsolanadiona aislada y/o sus productos de degradación pueden encontrar uso como materiales de sabor natural derivados del tabaco.

Después de la extracción de compuestos de interés de tabaco, es deseable según la presente invención aislar y purificar adicionalmente ciertos compuestos. Debido a que los procedimientos de extracción descritos aquí conducen típicamente a mezclas complejas de compuestos, se deben tratar adicionalmente para proporcionar mezclas

deseadas de compuestos y/o compuestos individuales aislados (por ejemplo, para dar aislados que comprenden por lo menos alrededor del 75% en peso del compuesto o compuestos).

5 Los medios por los cuales se proporcionan tales mezclas y/o compuestos individuales aislados pueden variar. Se pueden usar extracciones adicionales con disolventes (por ejemplo, extracción con disolventes usando disolventes polares, disolventes orgánicos o fluidos supercríticos), cromatografía, destilación, filtración, recristalización y/o partición disolvente-disolvente para aislar y/o purificar los compuestos deseados de los extractos.

10 En algunas realizaciones, se usan múltiples métodos para aislar y/o purificar los compuestos deseados. Por ejemplo, la extracción con disolvente se puede combinar con uno o más métodos cromatográficos. La muestra obtenida mediante extracción se puede disolver en un disolvente e inyectar directamente en el sistema de cromatografía flash o se puede tratar de alguna manera antes de la inyección. En otro ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra se trata primero para retirar uno o más compuestos que se sabe que se eluyen en condiciones similares a las del compuesto o los compuestos a aislar por cromatografía flash. En una realización particular, un extracto obtenido por extracción con metanol de un material de tabaco se procesa para retirar quercetin-3-rutinósido ("rutina"). Por ejemplo, la rutina se puede retirar del extracto añadiendo agua, metanol y cloruro de metileno al extracto y extrayendo la rutina a la capa de metanol/agua. La capa de cloruro de metileno se puede concentrar y procesar adicionalmente (por ejemplo, mediante cromatografía) para aislar y/o purificar el (los) compuesto (s) deseado (s) contenido (s) en ella. En otras realizaciones, el extracto se puede disolver y someter directamente a separación cromatográfica.

20 En algunas realizaciones, se usa la cromatografía de líquidos preparativa para aislar y/o purificar ciertos compuestos de interés de un extracto de tabaco. En algunas realizaciones, un compuesto o compuestos de interés se aíslan usando cromatografía de líquidos preparativa basado en los tiempos de elución de los estándares. Se encuentran disponibles varios sistemas de LC preparativa comerciales automatizados, de fabricantes como Waters, Agilent Technologies y Bio-Rad. Los parámetros específicos del sistema de LC preparativa usado se pueden variar por una persona experta en la técnica para lograr el nivel de resolución deseado. Por ejemplo, el disolvente puede ser cualquier disolvente o mezcla de disolventes suficiente para disolver el (los) compuesto (s) de interés. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua, metanol, etanol, acetato de etilo, éter dietílico, cloruro de metileno, cloroformo, éter de petróleo y/o hexanos. El sistema se puede usar con un sistema isocrático o de gradiente de disolvente (es decir, variando la relación de dos o más disolventes en función del tiempo). En algunas realizaciones, el sistema disolvente se puede elegir de modo que proporcione la mejor resolución entre el compuesto de interés y otros compuestos presentes en la mezcla. El caudal del sistema se puede variar, por ejemplo, de alrededor de 10 ml/min a alrededor de 100 ml/min (por ejemplo, alrededor de 36 ml/min).

35 En algunas realizaciones, se usa cromatografía flash para aislar y/o purificar ciertos compuestos de interés a partir de un extracto de tabaco. Los sistemas de cromatografía flash son conocidos en la técnica y los sistemas ejemplares se discuten, por ejemplo, en Still et al., J. Org. Chem. 42: 2923-2925 (1978) y la patente de EE.UU. 4591442 de Andrews. Se encuentran disponibles varios sistemas de cromatografía flash comercial automatizados, de fabricantes como Biotage, Teledyne Isco, Grace Davison Discovery Sciences y Buchi. La cromatografía flash puede ser deseable para proporcionar cantidades razonablemente grandes de compuesto, ya que las columnas típicamente tienen tamaños de partículas relativamente grandes (por ejemplo, aproximadamente 30-40 μm) y pueden acomodar una mayor cantidad de muestra (y una muestra más concentrada), permitiendo aislar más del (de los) compuesto (s) de interés por inyección.

45 Los parámetros específicos del sistema de cromatografía flash usado se pueden variar por una persona experta en la técnica para conseguir el nivel de resolución deseado. Por ejemplo, el disolvente puede ser cualquier disolvente o mezcla de disolventes suficiente para disolver el (los) compuesto (s) de interés. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua, metanol, etanol, acetato de etilo, éter dietílico, cloruro de metileno, cloroformo, éter de petróleo y/o hexanos. El sistema se puede usar con un sistema isocrático o de gradiente de disolvente (es decir, variando la relación de dos o más disolventes en función del tiempo). En algunas realizaciones, el sistema disolvente se puede elegir para proporcionar la mejor resolución entre el compuesto de interés y otros compuestos presentes en la mezcla. El caudal del sistema puede variar, por ejemplo, de alrededor de 20 a alrededor de 200 ml/min (por ejemplo, alrededor de 150 ml/min).

50 La cromatografía flash puede proporcionar o no el (los) compuesto (s) de interés a un nivel de pureza suficiente. En ciertas realizaciones, las fracciones correspondientes al (a los) compuesto (s) de interés se pueden recoger, combinar y concentrar para dar un aislado que comprende el (los) compuesto (s) de interés a un nivel suficiente de pureza (es decir, en el que el (los) compuesto (s) de interés están presentes en un porcentaje en peso suficiente del aislado). Por ejemplo, el aislado de la presente invención puede comprender el (los) compuesto (s) de interés en una cantidad mayor de alrededor del 75% en peso, mayor de alrededor del 80% en peso, mayor de alrededor del 85% en peso, mayor de alrededor del 90% en peso, mayor de alrededor del 95% en peso, mayor de alrededor del 98% en peso, o mayor de alrededor del 99% en peso. En algunas realizaciones, las fracciones obtenidas de cromatografía flash se pueden resolver adicionalmente usando cromatografía de líquidos preparativa.

60 En algunas realizaciones, los compuestos aislados o mezclas de los mismos se pueden someter a condiciones para hacer que esos compuestos experimenten transformación química. Por ejemplo, el material de tabaco obtenido de

plantas de la especie *Nicotiana* o parte de las mismas se puede tratar para provocar la transformación química o mezclar con otros ingredientes. En algunas realizaciones, los extractos obtenidos a partir de ellos, o el (los) compuesto (s) aislado (s) (aislados) se pueden tratar para provocar la transformación química o mezclar con otros ingredientes. Las transformaciones químicas o la modificación del material del tabaco, el extracto o el compuesto aislado puede provocar cambios en ciertas propiedades químicas y físicas del material del tabaco, el extracto o el compuesto (s) aislado (por ejemplo, los atributos sensoriales del mismo). Los procedimientos de modificación química ejemplares se pueden llevar a cabo por reacción ácido/base, hidrólisis, oxidación, calentamiento y/o tratamientos enzimáticos; y como tales, los compuestos pueden sufrir varias reacciones de degradación.

El material, extracto o aislado de tabaco se trata para proporcionar productos de degradación (por ejemplo, la luteína se puede tratar para proporcionar varios compuestos de sabor, que incluyen megastigmatrienonas y/o β -damascenona; el cis-abienol se puede tratar para proporcionar esclareolida, esclareol y/o ambróxido). Los productos de degradación son cualquier compuesto que se produzca a partir de los compuestos extraídos y/o aislados según la presente invención. Los productos de degradación se pueden formar naturalmente a partir de tales compuestos o se pueden producir mediante un procedimiento de degradación acelerada (por ejemplo, mediante la adición de calor y/o productos químicos para acelerar la descomposición de los compuestos). Estos compuestos se pueden degradar, por ejemplo, mediante oxidación (por ejemplo, mediante tratamiento con H_2O_2 u otros agentes oxidantes) y/o reacciones de hidrólisis.

Los tipos ejemplares de ingredientes adicionales que se pueden mezclar con el material de tabaco, extractos o aislados según la presente invención incluyen uno o más saborizantes, cargas, aglomerantes, ajustadores de pH, agentes tampón, colorantes, auxiliares de desintegración, antioxidantes, humectantes y conservantes.

Los extractos y aislados de la presente invención son útiles como componentes añadidos a composiciones de tabaco, particularmente composiciones de tabaco incorporadas en artículos para fumar o productos de tabaco sin humo. La adición de los extractos o aislados a una composición de tabaco puede mejorar la composición del tabaco de varias maneras, dependiendo de la naturaleza del extracto o aislado y del tipo de composición de tabaco. Los extractos y aislados ejemplares pueden servir para proporcionar sabor y/o aroma a un producto de tabaco (por ejemplo, una composición que altera las características sensoriales de las composiciones de tabaco o el humo derivado de ellas). Los extractos y aislados de la invención también se pueden usar como componentes de productos de tabaco que no contienen ningún otro material de tabaco en ellos. En otras palabras, el extracto o aislado de la invención se podría usar como única fuente de tabaco en el producto de tabaco de la invención, por ejemplo, incorporando el extracto o aislado dentro de una composición oral de tabaco sin humo, tal como un producto adaptado para disolverse o fundirse en la cavidad oral.

La forma del extracto o aislado obtenido según la presente invención puede variar. Típicamente, el aislado está en forma sólida, líquida o semisólida o gel. El aislado se puede usar en forma concreta, absoluta o pura. Las formas sólidas del aislado incluyen formas secadas por pulverización y liofilizadas. Las formas líquidas del aislado incluyen el aislado contenido en vehículos acuosos o de disolvente orgánico.

El extracto o aislado se puede emplear como un componente de una composición de tabaco en una variedad de formas. El extracto o aislado se puede emplear como un componente de tabacos procesados. En un aspecto, el extracto o aislado se puede emplear dentro de una formulación de envoltura para su aplicación a la tira de tabaco (por ejemplo, usando los tipos de maneras y métodos expuestos en la patente de EE.UU. No. 4819668 de Shelar), o dentro de una formulación de revestimiento superior.

Alternativamente, el extracto o aislado se puede emplear como ingrediente de un material de tabaco reconstituido (por ejemplo, usando los tipos de procedimientos de reconstitución de tabaco generalmente expuestos en las patentes de EE.UU. Nos. 5143097 de Sohn; 5159942 de Brinkley et al.; 5598868 de Jakob; 5715844 de Young; 5724998 de Gellatly; y 6216706 de Kumar). El extracto o aislado también se puede incorporar a un filtro de cigarrillo (por ejemplo, en el tapón del filtro, la envoltura del tapón o el papel de filtro) o incorporar en el papel de envoltura del cigarrillo, preferentemente en la superficie interior, durante el procedimiento de fabricación del cigarrillo.

El extracto o aislado derivado de *Nicotiana* se puede incorporar en artículos para fumar. Las mezclas representativas de tabaco, componentes que no son de tabaco y cigarrillos representativos fabricados a partir de ellas, se exponen en las patentes de EE.UU. Nos. 4836224 de Lawson et al.; 4924888 de Perfetti et al.; 5056537 de Brown et al.; 5220930 de Gentry; y 5360023 de Blakley et al.; solicitud de patente de EE.UU. 2002/0000235 de Shafer et al.; y PCT WO 02/37990. Esos materiales de tabaco también se pueden emplear para la fabricación de esos tipos de cigarrillos que se describen en las patentes de EE.UU. Nos. 4793365 de Sensabaugh; 4917128 de Clearman et al.; 4947974 de Brooks et al.; 4961438 de Korte; 4920990 de Lawrence et al.; 5033483 de Clearman et al.; 5074321 de Gentry et al.; 5105835 de Drewett et al.; 5178167 de Riggs et al.; 5183062 de Clearman et al.; 5211684 de Shannon et al.; 5247949 de Deevi et al.; 5551451 de Puggs et al.; 5285798 de Banerjee et al.; 5593792 de Farrier et al.; 5595577 de Bensalem et al.; 5816263 de Counts et al.; 5819751 de Barnes et al.; 6095153 de Beven et al.; 6311694 de Nichols et al.; y 6367481 de Nichols, et al.; publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2008/0092912 de Robinson et al.; y PCT WO 97/48294 y PCT WO 98/16125. Véase, también, esos tipos de cigarrillos comercializados descritos en Chemical and Biological Studies on New Cigarette Prototypes that Heat Instead of Burn Tobacco, R.J. Reynolds Tobacco Company Monograph (1988) e Inhalation Toxicology, 12: 5, pág. 1-58 (2000).

El extracto o aislado descrito aquí se puede incorporar en productos de tabaco sin humo, tales como tabaco en polvo húmedo suelto, tabaco en polvo seco suelto, tabaco de mascar, trozos de tabaco peletizado (por ejemplo, que tiene las formas de píldoras, comprimidos, esferas, monedas, bolas, obloides o granos, tiras, trozos, varillas, cilindros o barritas de tabaco extruido o conformado, aglomerados finamente divididos o molidos de trozos en polvo y componentes, trozos del tipo de copo, trozos de tabaco procesado moldeado, trozos de goma que contiene tabaco, rollos de películas del tipo de cinta, películas o tiras fácilmente solubles en agua o dispersables en agua (por ejemplo, publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2006/0198873 de Chan et al.), o materiales del tipo de cápsula que poseen una envoltura exterior (por ejemplo una envoltura exterior dura o plegable que puede ser transparente, incolora, translúcida o de naturaleza muy coloreada) y una región interior que posee tabaco o sabor de tabaco (por ejemplo un fluido newtoniano o un fluido tixotrópico que incorpora tabaco de alguna forma). Varios tipos de productos de tabaco sin humo se exponen en las patentes de EE.UU. Nos. 1376586 de Schwartz; 3696917 de Levi; 4513756 de Pittman et al.; 4528993 de Sensabaugh, Jr. et al.; 4624269 de Story et al.; 4987907 de Townsend; 5092352 de Sprinkle, III et al.; y 5387416 de White et al.; publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2005/0244521 de Strickland et al. y 2008/0196730 de Engstrom et al.; PCT WO 04/095959 de Arnarp et al.; PCT WO 05/063060 de Atchley et al.; PCT WO 05/016036 de Bjorkholm; y PCT WO 05/041699 de Quinter et al., Véase también, los tipos de formulaciones de tabaco sin humo, ingredientes, y metodologías de procesamiento establecidas en las patentes de EE.UU. Nos. 6953040 de Atchley et al. y 7032601 de Atchley et al.; publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2002/0162562 de Williams; 2002/0162563 de Williams; 2003/0070687 de Atchley et al.; 2004/0020503 de Williams, 2005/0178398 de Breslin et al.; 2006/0191548 de Strickland et al.; 2007/0062549 de Holton, Jr. et al.; 2007/0186941 de Holton, Jr. et al.; 2007/0186942 de Strickland et al.; 2008/0029110 de Dube et al.; 2008/0029116 de Robinson et al.; 2008/0029117 de Mua et al.; 2008/0173317 de Robinson et al.; y 2008/0209586 de Neilsen et al.

La cantidad de extracto o aislado añadido a una composición de tabaco, o incorporado de otro modo dentro de una composición de tabaco o producto de tabaco, puede depender de la función deseada de ese extracto o aislado, de la composición química de ese extracto o aislado y del tipo de composición de tabaco a la que se añade el extracto o aislado. La cantidad añadida a una composición de tabaco puede variar, pero típicamente variará de alrededor de 5 ppm y alrededor de 5 por ciento en peso en base al peso seco total de la composición de tabaco a la que se añade el extracto o el aislado. La cantidad añadida puede variar, dependiendo, por ejemplo, del objetivo a conseguir por la adición de tal compuesto o mezclas de compuestos (por ejemplo, la mejora de sabor) y de las características específicas del compuesto o mezcla de compuestos a añadir.

Experimental

Los aspectos de la presente invención se ilustran más completamente mediante los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención y no se debe interpretar que limitan la misma.

Ejemplo 1

35 Extracción y aislamiento de ésteres de sacarosa, luteína, cembratrienodiolos y cis-abienol

Extracción

40 *Nicotiana tabacum* de tabaco Galpao se cosecha, se corta en trozos y se extrae con metanol. Las hojas se retiran y el extracto de metanol se concentra a aproximadamente 77% en peso de sólidos. El extracto en metanol concentrado se separa en dos capas, que comprenden una capa superior del tipo de alquitrán (que es soluble en metanol) y una capa acuosa inferior (que es soluble en agua). La capa superior del tipo de alquitrán se separa y se encuentra que contiene analitos de interés de la superficie de la hoja tales como ésteres de sacarosa, cembratrienodiolos y cis-abienol. Estos analitos de interés se pueden separar y recoger mediante cromatografía de líquidos y/o cromatografía flash.

Métodos de aislamiento

45 La cromatografía de líquidos a escala preparativa se usa comúnmente para separar y recoger compuestos de interés en una mezcla compleja (por ejemplo, usando un sistema de LC preparativa de Waters que comprende un inyector automático Waters 2707, un detector DAD de Waters, un módulo de gradiente cuaternario Waters 2545 y un colector de fracciones Waters III y equipado con una columna Waters μ Bondapak CI 8 19x300 mm y colector de fracciones).

50 Los métodos de separación se desarrollan típicamente en una columna de cromatografía de líquidos a escala analítica (por ejemplo, usando un sistema de LC Waters 2695 equipado con una columna de partículas de 10 μ m Waters μ Bondapak C18 3.9x300 mm) y se escalan hasta un sistema de cromatografía de líquidos a escala preparativa. La cromatografía flash (por ejemplo, que usa un sistema automatizado de purificación flash Teledyne Isco CombiFlash con 275 g de columna C18 Gold) también se puede usar para aislar compuestos de interés. Esta técnica se puede usar sola o en tándem con cromatografía preparativa para aislar y recoger varios compuestos.

Aislamiento de ésteres de sacarosa (no parte de la invención)

Los ésteres de sacarosa se aíslan de la capa del tipo de alquitrán mediante cromatografía de líquidos a escala preparativa. La mezcla del tipo de alquitrán se disuelve en metanol (aproximadamente 20 mg/ml) y se inyecta (1 ml) en el sistema de LC preparativa de Waters citado anteriormente, usado a un caudal de 36 ml/min, análisis isocrático con metanol:agua 75:25, y un detector DAD Waters a 214 nm. Las fracciones correspondientes al tiempo de retención conocido de los estándares de éster de sacarosa (recogidos entre alrededor de 1.0 y alrededor de 5.6 minutos) se recogen y combinan. Se observa que otro pico importante se eluye con los ésteres de sacarosa a alrededor de 1.6 minutos. El análisis de HR-LC-MS de estas fracciones muestra que este pico corresponde a quercetin-3-rutinósido o rutina. La concentración de rutina en la mezcla del tipo de alquitrán determinada por el análisis de HR-LC-MS es de alrededor de 800 µg/g.

Para generar un extracto libre de rutinósido, se realiza una extracción líquido-líquido en la capa del tipo de alquitrán antes de la LC preparativa. La capa del tipo de alquitrán (alrededor de 2 g) se disuelve en metanol (30 ml). Esta mezcla se añade a un embudo de decantación con agua destilada desionizada (80 ml) y cloruro de metileno (40 ml). La mezcla se agita, la capa acuosa (que se muestra que contiene la rutina) se desecha, y la capa de cloruro de metileno se retira y se concentra. El material resultante (reconstituido en metanol) se analiza por HR-LC-MS, que mostró la presencia de ésteres de sacarosa pero no el rutinósido. El material libre de rutinósido se inyecta a continuación en el sistema de LC preparativa para aislar los ésteres de sacarosa.

Las fracciones correspondientes al tiempo de retención conocido de los estándares de éster de sacarosa se recogen y se combinan. Las fracciones combinadas se concentran para retirar el metanol y se añade cloruro de metileno a la capa de agua restante en una proporción de 1:1. Los tubos se agitan, se centrifugan y la capa acuosa se desecha. La capa de cloruro de metileno se concentra y se disuelve en alcohol isopropílico para el análisis de HR-LC-MS. Se determina que la capa del tipo de alquitrán del extracto de tabaco y metanol contiene aproximadamente 1000 µg/g de una gama de ésteres de sacarosa. Este extracto exhibe una distribución cualitativa similar de ésteres de sacarosa a la que está presente en otros tipos de tabaco oriental y curado.

Aislamiento de luteína

La luteína se aísla mediante LC preparativa a partir de la capa del tipo de alquitrán, que se trata primero para retirar el rutinósido, como se describe anteriormente. La mezcla libre de rutinósido se inyecta en el sistema de LC preparativa (10 ml de volumen de inyección) que comprende una columna de partículas de 7 µm Symmetry Prep C18 de 19 x 300 mm a temperatura ambiente, usada a un caudal de 26 ml/min, un sistema de disolvente de metanol y agua, con una relación inicial de 75:25, relación a los 10 minutos de 75:25, relación a los 15 minutos de 100:0 y relación a los 25 minutos de 75:25: agua, y un detector DAD de Waters a 443 nm. El colector de fracciones está configurado para recoger fracciones de 40 segundos durante toda la medida, con un tiempo total de análisis de 30 minutos. La luteína se eluye a aproximadamente 18.7 minutos en estas condiciones (como se correlaciona con un estándar de luteína inyectado previamente en el sistema de LC preparativa).

La luteína también se aísla de la capa del tipo de alquitrán mediante cromatografía flash. Una muestra de la capa del tipo de alquitrán, que se trata primero para retirar el rutinósido, como se describe anteriormente, se inyecta (15 ml de volumen de inyección) en el sistema de cromatografía flash. El sistema de cromatografía flash se usa a un caudal de 150 ml/min con un gradiente de disolvente (metanol y agua) con una relación inicial de 75:25, relación a los 5 minutos de 75:25, relación a los 7 minutos de 100:0, y relación a los 15 minutos de 75:25, y un detector puesto a 443 nm. Las fracciones que dan lugar a una señal a 443 nm después de la elución de cis-abienol se recogieron en el sistema de cromatografía flash, se combinaron y se concentraron (por ejemplo, usando una unidad de rotavapor Buchi puesta a 50°C y un vacío de 337 mBar). Las fracciones concentradas combinadas se disuelven y se inyectan en el sistema de LC preparativa (10 ml de volumen de inyección) que comprende una columna de partículas de 7 µm Symmetry Prep C18 19 x 300 mm a temperatura ambiente, usada a un caudal de 26 ml/min, un sistema de disolvente de metanol y agua, con una relación inicial de 75:25, relación a los 3 minutos de 75:25, relación a los 5 minutos de 100:0 y relación a los 12 minutos de 75:25: agua, y un detector DAD de Waters a 443 nm. El colector de fracciones está configurado para recoger fracciones de 20 segundos durante toda la medida, con un tiempo total de análisis de 15 minutos. La luteína se eluye a los 9 minutos.

Las fracciones que contienen luteína que se han aislado mediante LC preparativa y/o cromatografía flash se combinan y se concentran para retirar el metanol (por ejemplo, usando una unidad de rotavapor Buchi puesta a 50°C y un vacío de 337 mBar). El material resultante es una forma semisólida de luteína.

Aislamiento de cembratrienodios

Los cembratrienodios se aíslan de la capa del tipo de alquitrán mediante cromatografía de líquidos a escala preparativa. Una muestra de la capa del tipo de alquitrán descrita anteriormente se inyecta (1 ml de volumen de inyección) en el sistema de cromatografía flash. El sistema de cromatografía flash se usa a un caudal de 36 ml/min con un sistema de disolvente isocrático (75:25 metanol:agua) y un detector puesto a 214 nm. Las fracciones que dan lugar a una señal a 214 nm se recogieron en el sistema de cromatografía flash. El colector de fracciones está configurado para recoger fracciones de 20 segundos durante toda la medida, con un tiempo total de análisis de 10

minutos. Usando el tiempo de retención de los estándares de β -cembra trienodiol y α -cembra trienodiol, se recogieron las fracciones correspondientes a cada uno de estos compuestos y se combinaron por separado. En este sistema, el β -cembra trienodiol se eluye a los 9.0 minutos y el α -cembra trienodiol se eluye a los 6.9 minutos.

5 Las fracciones aisladas se concentran por separado para retirar el metanol de las fracciones, dejando disoluciones acuosas. Se añade cloruro de metileno a cada fracción aislada, las fracciones se agitan para aislar el compuesto deseado en la capa de cloruro de metileno y las fracciones se centrifugan. La capa acuosa se desecha y las capas de cloruro de metileno restantes se analizan por GC/MS (por ejemplo, usando un sistema Agilent 6890/5973 de Agilent). La GC/MS se realiza añadiendo DMF con patrón interno (400 ppm de tert-butil-hidroquinona) y BSTFA con 1% de TMCS a viales que contienen las fracciones aisladas. Los viales se mantienen a 76°C durante 30 minutos y se enfrían a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las disoluciones resultantes se analizan por GC/MS, y la identificación de picos se realiza comparando los espectros de los cembra trienodios sililados con los espectros de estándares conocidos.

15 El espectro de masas confirma que las fracciones combinadas son los α - y β -cembra trienodios, y los datos indican que ambas fracciones de cembra trienodiol son aproximadamente del 99% de pureza basado en el recuento del área total. La fracción de β -cembra trienodiol contiene una pequeña cantidad de compuestos del tipo de azúcar y ácido hexadecanoico y la fracción de α -cembra trienodiol contiene pequeñas cantidades de compuestos del tipo de azúcar y un compuesto del tipo de fitol. Se determina que la capa del tipo de alquitrán del extracto de tabaco y metanol contiene aproximadamente 80 mg/g de β -cembra trienodiol y aproximadamente 30 mg/g de α -cembra trienodiol.

Aislamiento de cis-abienol

20 El cis-abienol se aísla de la capa del tipo de alquitrán mediante cromatografía de líquidos a escala preparativa. Una muestra de la capa del tipo de alquitrán se trata primero para retirar el rutinósido, como se describe anteriormente. La mezcla libre de rutinósido se inyecta en el sistema de LC preparativa (10 ml de volumen de inyección) que comprende una columna de partículas de 10 μ m Symmetry Prep C18 de 19 x 300 mm a temperatura ambiente, usada a un caudal de 36 ml/min, un sistema de disolvente isocrático de metanol y agua, con una relación de 75:25, y un detector DAD de Waters a 214 nm. El colector de fracciones está configurado para recoger fracciones de 20 segundos durante toda la medida (de 12 ml cada una), con un tiempo total de análisis de 20 minutos. El cis-abienol se eluye en aproximadamente 17.0 minutos en estas condiciones.

30 Inicialmente, las fracciones aisladas con un pico de absorción significativo a 214 nm son desconocidas. De este modo, las fracciones combinadas se analizan por GC/MS, que no es concluyente. La fracción aislada se infunde en el Thermo TSQ Quantum Ultra MS/MS usando una sonda de ionización química a presión atmosférica para la ionización de la muestra. Esta técnica indica que el peso molecular del compuesto en la fracción aislada es 29 amu. La fracción aislada se analiza adicionalmente mediante espectroscopia UV/Vis (por ejemplo, usando un espectrofotómetro de UV/Vis Hewlett Packard 8453), que muestra una absorción máxima a 238 nm. La confirmación adicional de la identidad de esta fracción aislada se basa en los datos de HPLC-ESI-MS, peso molecular, RMN y UV/Vis dados para el cis-abienol en un artículo de Ding et al., *Chromatographia* 66: 529-532 (2007), que se incorpora aquí como referencia.

40 El cis-abienol se aísla alternativamente de la capa del tipo de alquitrán mediante cromatografía flash. Una muestra de la capa del tipo de alquitrán, que se trata primero para retirar rutinósido, como se describe anteriormente, se inyecta (15 ml de volumen de inyección) en el sistema de cromatografía flash. El sistema de cromatografía flash se usa a un caudal de 150 ml/min con un gradiente de disolvente (metanol y agua) con una relación inicial de 75:25, relación a los 5 minutos de 75:25, relación a los 7 minutos de 100:0 y relación a los 15 minutos de 75:25, y un detector puesto a 214 nm. Las fracciones que dan lugar a una señal a 214 nm se recogen en el sistema de cromatografía flash, se combinan y se concentran (por ejemplo, usando una unidad de rotavapor Buchi puesta a 50°C y un vacío de 337 mBar). Las fracciones combinadas, concentradas se disuelven y se inyectan en el sistema de LC preparativa (10 ml de volumen de inyección) que comprende una columna de partículas de 7 μ m Symmetry Prep C18 de 19 x 300 mm de a temperatura ambiente, usada a un caudal de 26 ml/min, un sistema disolvente de metanol y agua, con una relación inicial de 75:25, relación a los 10 minutos de 75:25, relación a los 15 minutos de 100:0 y relación a los 20 minutos de 75:25, y un detector DAD de Waters a 214 nm. El colector de fracciones está configurado para recoger fracciones de 20 segundos durante toda la medida (12 ml de volumen de cada una), con un tiempo total de análisis de 30 minutos. El cis-abienol se eluye a los 17.8 minutos.

55 Las fracciones de cis-abienol recogidas de la LC preparativa y/o el método de cromatografía flash se concentran para proporcionar una forma semisólida de cis-abienol. El aislamiento y la recogida de alto volumen de cis-abienol se realizan típicamente en el sistema de cromatografía flash, lo que permite una mayor eficiencia, ya que se pueden inyectar muestras más concentradas. En algunos casos, las fracciones de la cromatografía flash se deben resolver adicionalmente usando HPLC preparativa; sin embargo, la cromatografía flash proporciona típicamente una resolución suficiente de cis-abienol sin la necesidad de HPLC preparativa de las fracciones.

Ejemplo 2

Extracción y aislamiento de ésteres de sacarosa, luteína, cembratrienodiolos y cis-abienol

Una mezcla de tabaco curado con humo, burley y oriental se somete a una destilación de vapor seco. Específicamente, una mezcla de tiras de tabacos curados con humo, burley y oriental se coloca en una cisterna de 18,1 m³ (640 pies³) equipada con capacidad de destilación de vapor. El vapor anhidro se pasa a través de la cisterna y se condensa, produciendo aproximadamente 15,1 litros (4 galones) por minuto de destilado de vapor. El destilado se procesa empleando equipos empleados tradicionalmente para el aislamiento de aceites de menta. Unos pocos minutos después de comenzar el procedimiento de destilación de vapor, comienza a aparecer un brillo de aceite en la superficie del destilado recogido. A medida que avanza el tiempo, el brillo se convierte en una capa de aceite definida que descansa sobre el agua condensada. Este aceite esencial de color marrón rojizo se retira suavemente del agua. El aceite esencial se disuelve en cloruro de metileno y se analiza por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC / MS, por ejemplo, GC Agilent 6890 equipado con MSD Agilent 5973). Los datos indican que el aceite esencial comprende, como compuestos principales volátiles y semivolátiles, solanona, neofitadieno, ácido palmítico y ácido oleico. Otros componentes del aceite esencial son los isómeros de megastigmatrienona, derivados de ionol, β -damascenona y norsolanadiona.

Además, se captura el agua destilada que primero pasó a través del equipo de aislamiento de aceite esencial y subsecuentemente se desechó a la cloaca (es decir, la corriente de "residuos"). Las muestras de la corriente de "residuos" recogidas durante la destilación en función del tiempo se disuelven en cloruro de metileno y se analizan por GC/MS. Los cromatogramas resultantes indican que la corriente de "residuos" contiene un número notable de compuestos volátiles y semivolátiles que incluyen algunos de los compuestos encontrados en el aceite esencial (por ejemplo, neofitadieno, nicotina, alcohol furfurílico y biperidina).

La corriente de "residuos" se separa en componentes acuosos y orgánicos para facilitar el procesado/separación aguas abajo del aceite esencial en mezclas menos complejas o componentes individuales. Específicamente, el agua "residual" del procedimiento de destilación de vapor se añade a la sílice contenida dentro de un cilindro de vidrio fritado. El agua se retira suavemente de la sílice usando un aspirador de agua al vacío. El hexano se filtra a través de la columna, seguido de MTBE, seguido de metanol. Los disolventes orgánicos se retiran mediante evaporación rotatoria y los materiales resultantes se reconstituyen en cloruro de metileno. Las muestras de cloruro de metileno se analizan por GC/MS. El componente principal del extracto de hexano es neofitadieno.

Ejemplo 3

Extracción y aislamiento de ésteres de sacarosa y cembratrienodiolos

Una hoja de tabaco se sumerge en cloruro de metileno a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 segundos. La disolución de cloruro de metileno resultante se concentra y el extracto se limpia usando un método descrito en Ashraf-Khorassani et al., Beitrage Tabkforsch. Int. 23: 32-45 (2008), que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

El extracto limpio se purifica con HPLC de fase normal con detección de UV a 214 nm, usando una columna de sílice con ciano ligado (25 cm x 10 mm, $d_p = 5 \mu\text{m}$) y una fase móvil de etanol/isooctano/agua en una relación de 15:85:0.1. Se identifican los picos para ésteres de sacarosa, α -cembrenodiol y β -cembrenodiol; las fracciones correspondientes a cada pico se recogen individualmente. Las identidades de las fracciones correspondientes a cada pico se confirman mediante GC-FID (MS), DB5, 15 m x 0.25 mm (derivados de TMS) con una temperatura inicial del horno de 80°C (mantenida durante 2 minutos), que se incrementó a 10°C/min hasta 140°C, se incrementó a 5°C/min hasta 300°C y se mantuvo a 300°C durante 10 minutos.

Muchas modificaciones y otras realizaciones de la invención se le ocurrirán a una persona experta en la técnica a la que pertenece la presente invención que tiene el beneficio de las enseñanzas presentadas en la descripción anterior. Por lo tanto, se debe entender que la invención no se va a limitar a las realizaciones específicas descritas y que se pretende que las modificaciones y otras realizaciones estén incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean aquí términos específicos, se usan solo en un sentido genérico y descriptivo y no con propósitos de limitación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para extraer y aislar compuestos de plantas de la especie *Nicotiana* útiles como material de sabor, que comprende:
- 5 recibir un material vegetal de la especie *Nicotiana*;
- poner en contacto el material vegetal con un disolvente durante un tiempo y en condiciones suficientes para extraer uno o más compuestos deseados del material vegetal en el disolvente;
- separar el disolvente que contiene el uno o más compuestos deseados del material vegetal extraído;
- 10 purificar el disolvente que contiene el uno o más compuestos deseados para proporcionar un aislado que comprende por lo menos alrededor del 75 por ciento en peso del uno o más compuestos deseados, siendo seleccionado el uno o más compuestos deseados del grupo que consiste en solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β -damascenona, norsolanadiona, cis-abienol, α -cembratrienodiol, β -cembratrienodiol, luteína, productos de degradación de los mismos y mezclas de los mismos; y
- tratar el aislado para proporcionar uno o más productos de degradación de los mismos.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el material vegetal de la especie *Nicotiana* está en una forma seleccionada del grupo que consiste en hoja entera, láminas, carga cortada, volumen expandido, tallos, tallos cortados en láminas, tallos hinchados cortados, tabaco reconstituido, y partículas.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el disolvente es metanol.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el uno o más compuestos deseados se seleccionan del grupo
- 20 que consiste en cis-abienol, α -cembratrienodiol, β -cembratrienodiol y luteína.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el disolvente es vapor seco.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el uno o más compuestos deseados se seleccionan del grupo que consiste en solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β -damascenona y norsolanadiona.
7. El método de la reivindicación 5, en el que la etapa de contacto comprende además recoger un destilado,
- 25 opcionalmente, en el que el destilado comprende una capa acuosa y una capa aceitosa.
8. El método de la reivindicación 7, en el que el disolvente que contiene uno o más compuestos deseados se selecciona del grupo que consiste en la capa aceitosa, la capa acuosa y una corriente de residuos generada en el procedimiento de destilación.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de purificación comprende usar cromatografía de
- 30 líquidos a escala preparativa o cromatografía flash.
10. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de purificación proporciona un aislado que comprende más de alrededor de 90% en peso del uno o más compuestos deseados, preferentemente más de alrededor de 95% en peso del uno o más compuestos deseados.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el tratamiento del aislado para proporcionar uno o más productos
- 35 de degradación del mismo se selecciona de oxidación, tratamiento térmico, y una combinación de los mismos,
- en el que el aislado comprende luteína y en el que el uno o más productos de degradación se seleccionan del grupo que consiste en megastigmatrienona, beta-damascenona, y mezclas de los mismos; o
- en el que el aislado comprende cis-abienol y en el que el uno o más productos de degradación se seleccionan del grupo que consiste en esclareolida, esclareol, ambróxido, y mezclas de los mismos.
- 40 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además añadir el aislado a una composición de tabaco adaptada para uso en un artículo para fumar o una composición de tabaco sin humo.
13. Un aislado de una planta de la especie *Nicotiana* o componentes de la misma, en el que el aislado
- 45 comprende por lo menos alrededor del 75 por ciento en peso de uno o más compuestos deseados seleccionados del grupo que consiste en solanona, neofitadieno, megastigmatrienona, β -damascenona, norsolanadiona, cis-abienol, α -cembratrienodiol, β -cembratrienodiol, luteína y productos de degradación de los mismos;
- en el que el aislado comprende uno o más productos de degradación de los mismos
14. El aislado de la reivindicación 13, en el que el aislado comprende más de alrededor del 90% en peso del uno o más compuestos deseados,

preferentemente más de alrededor del 95% en peso del uno o más compuestos deseados,

y/o en el que el aislado comprende uno o más productos de degradación de luteína, seleccionados del grupo que consiste en megastigmatrienona, beta-damascenona y mezclas de los mismos; o el aislado comprende uno o más productos de degradación de cis-abienol, seleccionados del grupo que consiste en esclareolida, esclareol, ambróxido y mezclas de los mismos.

5

15. Una composición de tabaco para uso en un artículo para fumar o una composición de tabaco sin humo que comprende el aislado de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14.