

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/161293 A1

(43) Fecha de publicación internacional
29 de diciembre de 2011 (29.12.2011)

PCT

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
A23L 1/308 (2006.01) *A61K 36/8965* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES2011/070442
- (22) **Fecha de presentación internacional:**
20 de junio de 2011 (20.06.2011)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**
P201030951 21 de junio de 2010 (21.06.2010) ES
- (71) **Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):** **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) **Inventores; e**
- (75) **Inventores/Solicitantes (para US solamente):** **GUILLÉN BEJARANO, Rafael** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, Guillermo** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **FUENTES ALVENTOSA, José María** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **JARAMILLO CARMONA, Sara** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **RODRÍGUEZ ARCOS, Rocío** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **JIMÉNEZ ARAUJO, Ana José** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN,**
- Juan** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre García Tejero, 4, E- 41012 Sevilla (ES).
- (74) **Mandatario:** **UNGRIA LÓPEZ, Javier;** Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible):** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))



WO 2011/161293 A1

(54) **Title:** PROCEDURE FOR THE OBTAINMENT OF FUNCTIONAL COMPOUNDS OF VEGETABLE ORIGIN

(54) **Título :** PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FUNCIONALES DE ORIGEN VEGETAL

(57) **Abstract:** Procedure for the obtainment of functional compounds of vegetable origin. The present invention relates to a new procedure for the obtainment of functional compounds of vegetable origin, such as phytochemicals, bioactive fibre. Furthermore, the present invention relates to the use of such functional compounds for functional foods, dietetic products or food supplements.

(57) **Resumen:** Procedimiento de obtención de compuestos funcionales de origen vegetal La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la obtención de compuestos funcionales de origen vegetal, tales como fitoquímicos, fibra bioactiva. Además, la presente invención se refiere al uso de esos compuestos funcionales para alimentos funcionales, productos dietéticos o complementos alimenticios.

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE COMPUESTOS FUNCIONALES DE ORIGEN VEGETAL

La presente invención pertenece al campo de la revalorización de subproductos
5 vegetales, mediante la obtención de compuestos funcionales. La presente
invención se refiere a un nuevo procedimiento para la obtención de
compuestos funcionales de origen vegetal, tales como fitoquímicos, fibra
bioactiva... Además la presente invención se refiere al uso de esos compuestos
10 funcionales para alimentos funcionales, productos dietéticos o complementos
alimenticios.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Estudios epidemiológicos han relacionado el consumo de frutas y verduras con
15 un descenso en la incidencia del cáncer y la mortalidad por enfermedad
cardiovascular (*Rimm et al, 1996, "Relation between intake and risk of coronary
heart disease in male health professionals", Ann. Intern. Med., 125, 384-389; y
Doll R, 1990, "An overview of the epidemiological evidence linking diet and
cancer", Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 49, 119-131*). Uno de los factores clave
20 con los que se ha asociado esto, es con el contenido en fitoquímicos (*Kris-
Etherton et al, 2002, "Bioactive compounds in foods: their role in the prevention
of cardiovascular disease and cancer, Am. J. Med., 113, 71S-88S; Scalbert et
al, 2002, "Absorption and metabolismo of polyphenols in the gut and the impact
on health", Biomed. Pharmacother., 56, 276-282; and Rankin et al, 1993, "The
25 modification of low density lipoprotein by the flavonoids myricetin and
gossypetin", Biochem. Pharmacol., 45, 67-75*).

Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas y en estas
cumplen una serie de funciones como, por ejemplo, protección contra la
30 incidencia de rayos ultravioleta, protección contra insectos y atrayentes de
animales para asegurar la polinización y la dispersión de semillas (*Harbone,
1982, "Introduction of ecological biochemistry", Academia Press, London, ISBN*

0-12-324680-6). Por estas razones los fitoquímicos se sintetizan preferentemente en los tejidos externos de las plantas. Estas partes externas son los principales residuos generados durante la manipulación y procesado de las frutas y verduras y se constituyen como una buena fuente para la extracción de fitoquímicos (Tomás-Barberán, 2004, "Agrifood residues as a source of phytochemicals", *Total Food Proc.*, 42-48, IFR, Norwich, UK, ISBN 0-7084-0644-5).

Por otra parte, dentro de los productos beneficiosos para la salud, derivados de productos vegetales, el mercado de las fibras alimentarias ha sido uno de los más favorecidos en los últimos años, asociándose su consumo a la prevención de diversas enfermedades tales como cáncer de colon, enfermedades coronarias, obesidad, diabetes y trastornos gastrointestinales (Anderson et al, 1994 "Health benefits and practical aspects of high-fibre diets", *Am. J. Clin. Nutr.*, 59, 1242S-1247S; and Rodríguez et al, 2006, "Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients", *Trends Food Sci. Technol.*, 17, 3-15).

En el estado de la técnica son numerosos los procedimientos de obtención de nutraceúticos y fitonutrientes a partir de productos vegetales y sus subproductos. Así, en el artículo de revisión: Zhao, 2007, "Nutraceuticals, Nutritional Therapy, Phytonutrients, and Phytotherapy for Improvement of Human Health: A Perspective on Plant Biotechnology Application", *Recent Patents on Biotechnol.*, incluye 297 citas bibliográficas de artículos y patentes publicados en los últimos años en relación a este tema. Dentro de los fitoquímicos, se ha prestado especial atención a la obtención de antioxidantes naturales a partir de alimentos vegetales y sus subproductos (Moure et al, 2001, "Natural antioxidants from residual resources", *Food Chem.*, 72, 145-171; and Peschel et al, 2006, "An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes", *Food Chem.*, 97, 137-150), y muchos de los procedimientos desarrollados se han centrado en la obtención de extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos, por la alta capacidad

antioxidante que éstos poseen. Véanse, por ejemplo, los documentos *WO 01/51482 A1*, *WO 03/042133 A1*, *US 6960360* o *Makris et al, 2007*, “*Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-ffod solid waste extracts*”, *J Food Comp. Anal.*, 20, 125-132.

5

Dentro de los vegetales, el espárrago debido a su riqueza en micronutrientes y fitoquímicos, junto a su bajo contenido calórico, es un producto de gran interés para un amplio sector de la población demandante de alimentos que, además de cubrir sus necesidades nutricionales y dietéticas, sean sanos y saludables, ya que contiene diversos compuestos bioactivos (flavonoides, saponinas y fibra bioactiva) que le confieren una potencial actividad biológica importante. Se han desarrollado distintos procesos para la obtención de extractos hidroalcohólicos a partir de tallos y raíces de espárrago, con fines terapéuticos. Así, en documentos, *WO 2006/032510 A1* y *EP 1640016 B1* se describe la obtención de extractos de espárrago, libres de saponinas, y su aplicación la preparación de medicamentos, tales como diuréticos; mientras que la patente *US 7247321*, propone el uso de fluido supercrítico para la obtención de extractos de espárrago, libres de saponinas, que pueden utilizarse como formulaciones de uso tópico para el tratamiento de melanogénesis.

15
20

Por otro lado, se ha descrito el uso de extractos de saponinas, obtenidos a partir de espárragos y sus subproductos, con aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y fitosanitaria. En las patentes *JP2129198 (A)*, *JP6033303 (B)* y *JP1905307 (C)* se describe la obtención de un extracto rico en saponinas, mediante la destilación hidroalcohólica de subproductos de espárrago, que puede ser utilizado como ingrediente funcional; y en la patente *JP3048694 (A)* se detalla la obtención de una saponina específica, a partir del extracto hidroalcohólico rico en saponinas, que posee actividad antifúngica. Por otro lado en la patente *CN101474350 (A)* también se describe un método para la obtención de saponinas de espárrago, basado en su extracción hidroalcohólica y proponen su uso como medicamento antitumoral.

25
30

En el estado de la técnica se han descrito fibras obtenidas a partir de distintas partes del espárrago con aplicación en la industria textil y papelera. Así, en *UK 19881/20*, se muestra un procedimiento para la separación de fibras de espárrago, que tras ser trituradas hasta alcanzar el tamaño de partícula
5 adecuado, pueden utilizarse para la fabricación de tejidos. Finalmente, en *DE19905944 A1*, se describe el uso de fibras de espárrago para el desarrollo de material de papel con características estructurales y aromáticas personalizadas.

10 El problema que subyace en la mayoría de los métodos descritos anteriormente, es que se requieren etapas previas de acondicionamiento de la muestra (subproductos de espárrago u otros vegetales) lo cual hace que el procedimiento se encarezca sustancialmente.

15 Además otro problema que presenta el Estado de la técnica es que en la mayoría de las ocasiones, es necesario el uso de disolventes orgánicos tales como metanol, etanol o acetona, para la extracción de los compuestos de interés. En el caso de la extracción acuosa, al utilizarse reactores abiertos, se pierden gran parte de los compuestos bioactivos, tales como los fenoles, por
20 procesos de oxidación. Como alternativa, otros procedimientos han desarrollado vías en las cuales se hace uso de fluidos supercríticos como se describe, por ejemplo en la patente US 7247321, pero la desventaja de este sistema es el alto coste del equipamiento y la necesidad de personal cualificado para aplicar dichas técnicas a nivel industrial.

25

Por lo tanto es necesario el desarrollo de nuevos procedimientos que solventen todos los problemas anteriormente enunciados y que den una solución factible y respetuosa con el medioambiente.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un nuevo procedimiento de obtención de
5 compuestos funcionales de origen vegetal que mejora significativamente los
problemas anteriormente enunciados en los procedimientos ya descritos en el
Estado de la Técnica. Entre dichas ventajas destacan el uso de partes
residuales de los vegetales como el tallo de los turiones, no se requiere un
acondicionamiento ni ningún otro pre-tratamiento como el lavado, el secado o
10 la trituración inicial de estos residuos... Esto supone una gran ventaja con
respecto a otros procedimientos encontrados en la bibliografía, ya que en la
mayoría de los casos incluyen, al menos, una etapa de trituración de las
muestras. Los ensayos preliminares realizados antes de desarrollar el diseño
definitivo de experiencia pusieron de manifiesto que la trituración y agitación de
15 las muestras resultan desaconsejables, ya que durante estos procesos se
pierden algunos de los compuestos bioactivos presentes en los subproductos
de los vegetales, como por ejemplo el espárrago.

Por lo tanto un primer aspecto esencial de la presente invención se refiere a un
20 novedoso procedimiento para la obtención de compuestos funcionales de
origen vegetal que comprende las siguientes etapas:

- extracción en agua de un residuo fibroso y un extracto acuoso procedentes de
residuos de origen vegetal.
25
- separación del extracto acuoso del residuo fibroso procedentes de la etapa
anterior;
- secado del residuo fibroso;
- 30 - trituración y tamizado de la fibra seca obtenida de la etapa anterior; y

- fraccionamiento del extracto acuoso.

En la presente invención se entienden por residuos de origen vegetal a aquellas partes como las porciones finales del turión, peladuras y trozos de
5 turión rotos durante la manipulación industrial de dichos vegetales.

Según una realización preferida, los residuos de origen vegetal proceden del espárrago.

10 Según otra realización preferida, la extracción del residuo fibroso y del extracto acuoso se lleva a cabo en un reactor cerrado a una temperatura dentro del intervalo de 100 a 180°C (con o sin agitación) y en un intervalo de tiempo que va desde los 15 a los 300 minutos. Además dicha extracción puede realizarse en atmósfera libre de oxígeno.

15

En la presente invención un reactor cerrado puede ser desde una olla express hasta un autoclave industrial.

Según otra realización preferida, el residuo fibroso que queda tras la extracción
20 de los compuestos bioactivos solubles, se somete a una etapa de secado o liofilización, para obtener un producto seco que tras ser triturado, en molino de martillo, constituye la fibra bioactiva del vegetal a tratar. Esta fracción está formada por polisacáridos de pared celular y compuestos fenólicos, incluyendo lignina y ácidos hidroxicinámicos, pero además lleva asociados cantidades
25 menores de compuestos tales como flavonoides, saponinas y esteroides, que contribuyen a su potencial actividad biológica.

Por otro lado según otra realización preferida, el líquido obtenido tras el
tratamiento extractivo es un extracto acuoso funcional, rico en distintos
30 compuestos de interés, como azúcares, fenoles y saponinas, que se puede denominar extracto funcional completo.

A continuación y según otra realización preferida, comprende el fraccionamiento de dicho extracto acuoso, para obtener fracciones parcialmente purificadas y enriquecidas en compuestos bioactivos específicos. El extracto acuoso se inyecta en una columna rellena con una resina de adsorción polimérica o de intercambio iónico, en la que quedan retenidos los principales compuestos bioactivos (flavonoides y saponinas). Para la elución de los distintos compuestos, en primer lugar se utiliza agua (dos volúmenes de columna), separándose en esta fracción los azúcares solubles; a continuación se realiza una extracción secuencial de los compuestos fenólicos, mayoritariamente flavonoides, y las saponinas, utilizando respectivamente dos volúmenes de columna de disolución acuosa de etanol, al 10-50% y al 60-100%.

Estas dos fracciones constituyen los extractos funcionales parcialmente purificados y enriquecidos en flavonoides y saponinas. La recuperación de ambos grupos de compuestos tras su paso por la columna rellena con una resina de adsorción polimérica o de intercambio iónico es superior al 90% en ambos casos y su concentración en los extractos etanólicos 10-50% y 60-100% es 4 veces superior a la del extracto acuoso global para ambos tipos de compuestos. Estos extractos funcionales pueden utilizarse en suspensión o como extracto seco, tras ser liofilizados.

En las presentaciones sólidas, los extractos parcialmente purificados contienen 11-15% flavonoides y al menos un 50% saponinas respectivamente, mientras que en el extracto acuoso completo la riqueza en peso es de al menos 0.45% de flavonoides y 1.15% saponinas.

Un segundo aspecto esencial de la presente invención se refiere a la fibra bioactiva, obtenible por el procedimiento anteriormente descrito, la cual está caracterizada porque comprende desde un 55 a un 65% en fibra alimentaria total, desde un 17 a un 21% de proteínas y desde un 3 a un 6% en azúcares solubles.

Además dicha fibra bioactiva, comprende desde 1 a 2 mg de flavonoides, desde 5 a 6 mg saponinas, desde 1,5 a 2,0 mg esteroides y desde 2,5 a 3,5 mg de hidroxicinamatos.

5

Por otro lado la presente invención también se refiere a un extracto acuoso, obtenible por el procedimiento anteriormente descrito, el cual está caracterizado porque comprende un 0,45% de flavonoides y un 1,15% de saponinas.

10

Por otra parte la presente invención se refiere a un producto funcional en forma de polvo, obtenible por el procedimiento anteriormente descrito que comprende desde un 11 a un 15% en flavonoides y que comprende desde un 80 a un 90% en saponinas.

15

Con la presente invención se consigue el aprovechamiento integral de los subproductos de los vegetales, mediante procedimientos simples y de fácil adaptación industrial. Los productos que se obtienen son:

20 - **Subproductos secos y liofilizados de los vegetales, en polvo.** Se mantienen prácticamente todos los componentes químicos presentes en los subproductos frescos, pero más concentrados.

25 - **Extracto funcional del vegetal.** Contiene la mayor parte de los compuestos solubles bioactivos. La riqueza en peso de este extracto global es de un 0,45% de flavonoides y un 1,15% de saponinas. Este producto, que se puede presentar en forma de solución, extracto seco, o incluso cualquier tipo de soporte sólido, una vez realizados los correspondientes ensayos de toxicidad y bioactividad, podrá utilizarse como ingrediente funcional en distintos productos
30 alimentarios. Pero además, podría tener aplicación en dietética y parafarmacia, en presentaciones similares a las numerosas cápsulas y preparados de plantas que existen actualmente en el mercado.

- **Extractos parcialmente purificados y enriquecidos.** Se obtienen extractos parcialmente purificados en flavonoides y saponinas que, una vez liofilizados, se pueden presentar en forma de polvo.

5

- **Fibra bioactiva.** Se puede utilizar, tanto seca como liofilizada, en la preparación de alimentos funcionales, tales como zumos, yogur, productos cárnicos, pescado, etc.

10 Por lo tanto un tercer aspecto esencial de la presente invención se refiere al uso de la fibra bioactiva, del extracto acuoso y del producto funcional para preparar alimentos enriquecidos, productos dietéticos o complementos alimenticios.

15 Además dichos productos se pueden usar como antifúngico y/o bactericida.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas
20 y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

25 **EJEMPLOS**

1) Optimización del proceso de obtención de compuestos funcionales de origen vegetal

30 El material de partida son los tallos de espárrago (porciones finales de los turiones que se desechan durante el procesado industrial), y no se requiere acondicionamiento ni ningún otro tratamiento previo (lavado, secado,

trituration) a la extracción de los componentes bioactivos. Esto supone una gran ventaja con respecto a otros procedimientos encontrados en la bibliografía, ya que en la mayoría de los casos incluyen, al menos, una etapa de trituración de las muestras.

5

Los ensayos preliminares realizados antes de desarrollar el diseño definitivo de experiencia pusieron de manifiesto que la trituración y agitación de las muestras resultan desaconsejables, ya que durante estos procesos se pierden algunos de los compuestos bioactivos presentes en los subproductos del

10

espárrago. Así, en las primeras experiencias realizadas en el laboratorio, en las que las extracciones se realizaron con agua y etanol, en un reactor abierto, con agitación continua, los flavonoides se perdieron prácticamente en su totalidad, sobre todo en el caso de utilizar agua como solvente; mientras que las saponinas mostraron ser mucho más estables al calentamiento y a la agitación.

15

En la tabla 1 se resumen las distintas condiciones ensayadas en las experiencias de laboratorio, en las que las cuatro variables estudiadas fueron temperatura (25 y 60°C), tiempo de extracción (1 y 90 minutos), escaldado o no de las muestras y solvente (agua y etanol).

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Escaldado	Disolvente
1	60	90	SI	Agua
2	60	90	SI	Etanol
3	60	90	NO	Agua
4	60	90	NO	Etanol
5	60	1	SI	Agua
6	60	1	SI	Etanol
7	60	1	NO	Agua
8	60	1	NO	Etanol
9	25	90	SI	Agua
10	25	90	SI	Etanol
11	25	90	NO	Agua

12	25	90	NO	Etanol
13	25	1	SI	Agua
14	25	1	SI	Etanol
15	25	1	NO	Agua
16	25	1	NO	Etanol

Tabla 1. Tratamientos realizados con tallos de espárragos en reactor abierto de laboratorio

- 5 Las tablas 2 y 3 muestran la concentración y porcentajes de recuperación de flavonoides y saponinas en los distintos tratamientos ensayados. Los valores de referencia (283 mg/Kg flavonoides y 646 mg/Kg saponinas) para calcular dichos porcentajes se determinaron a partir de un extracto etanólico de los residuos de espárrago, en el que se cuantifican el total de flavonoides y saponinas presentes en el material de partida.
- 10

Tratamiento	mg flavonoides/ kg subproducto			% Recuperación
1	0,57	±	1,14	0,20
2	50,48	±	6,42	17,85
3	13,96	±	16,28	4,93
4	131,14	±	9,48	46,36
5	44,68	±	55,66	15,79
6	14,05	±	5,33	4,97
7	10,45	±	15,09	3,69
8	10,90	±	2,92	3,85
9	0,99	±	1,98	0,35
10	14,57	±	4,18	5,15
11	0,00			0,00
12	25,04	±	9,00	8,85
13	24,75	±	31,25	8,75
14	10,59	±	5,73	3,74
15	76,04	±	1,10	26,88

16	14,14	±	5,99	5,00
----	-------	---	------	------

Tabla 2. Concentración y porcentaje de recuperación de flavonoides en los diferentes tratamientos

- 5 La mayor concentración de flavonoides en los extractos fue de 131,14 mg/kg de subproductos, la cual se obtuvo con el tratamiento 4. Hay que indicar que, en general, se obtuvieron valores muy bajos y una alta variabilidad entre replicados del mismo tratamiento. La pérdida de flavonoides puede deberse, posiblemente, a procesos de oxidación enzimática, por acción de la peroxidasa, o química, debido a la aireación de la muestra en las distintas etapas de los
- 10 tratamientos (homogeneización, extracción y centrifugación).

La realización de análisis estadístico para los tratamientos con etanol (cuyos resultados fueron más homogéneos que los obtenidos con las extracciones acuosas) indica que de los tres factores, el tiempo, la temperatura y la

15 combinación de ambos influyeron positivamente en la extracción de flavonoides, mientras que el escaldado y la combinación del mismo con tiempo o temperatura produjeron efectos negativos.

20

Tratamiento	mg diosgenina/ kg subproducto			% Recuperación
1	244,78	±	0,99	37,95
2	198,33	±	23,88	30,75
3	352,54	±	39,24	54,66
4	204,71	±	23,68	31,74
5	273,49	±	18,91	42,40
6	401,07	±	28,40	62,18
7	282,50	±	29,06	43,80
8	307,29	±	40,55	47,64
9	173,96	±	34,68	26,97

10	346,74	±	45,69	53,76
11	282,96	±	31,30	43,87
12	406,26	±	23,07	62,99
13	179,72	±	16,86	27,86
14	354,05	±	27,76	54,89
15	335,01	±	24,62	51,94
16	443,26	±	51,63	68,72

Tabla 3. Concentración y porcentaje de recuperación de saponinas en los diferentes tratamientos.

5 En general, las saponinas son más estables al calentamiento y la agitación que los flavonoides. La mayor concentración y, por tanto, mayor porcentaje de recuperación se obtuvo con el tratamiento 16 (443,26 mg de diosgenina / kg de residuo; 68,72% de recuperación). También se superó el 60% de recuperación con el tratamiento 12 (62,99%) y 6 (62,18%). Los menores porcentajes de recuperación se obtuvieron con el tratamiento 9 (26,97%) y el tratamiento 13 (27,86%). De los resultados obtenidos parece deducirse que los tratamientos con etanol son más efectivos en la extracción (cinco de los ocho superan el 50% de recuperación) que los acuosos (sólo dos superan el 50%). En el caso de las extracciones acuosas, la temperatura y la combinación de la misma con el tiempo influyeron positivamente, mientras que el escaldado y la combinación del mismo con la temperatura produjeron efectos negativos. El factor tiempo no tuvo influencia significativa.

20 De estas primeras experiencias de extracción de flavonoides y saponinas con el reactor abierto de laboratorio podríamos concluir que:

-La agitación y la exposición al aire durante el tratamiento son factores que afectan negativamente a los flavonoides, mientras que las saponinas parecen ser mucho más estables.

-El etanol extrae mayor cantidad de ambos compuestos.

-Un mayor tiempo de extracción y temperatura produce efectos dispares según el solvente, fitoquímico y combinación de las variables estudiadas.

5

-El escaldado tiene, en general, un efecto negativo en la extracción de flavonoides y saponinas.

Además de los extractos ricos en flavonoides y saponinas, los tratamientos
10 anteriormente descritos también permiten obtener un residuo final, que hemos denominado fibra bioactiva, puesto que además de los constituyentes característicos de las fibras vegetales (polisacáridos y fenoles intraparietales), contiene cantidades significativas de fitoquímicos (flavonoides, saponinas y esteroides) que aumentan su potencial actividad biológica.

15

Las fibras obtenidas de los tratamientos en condiciones extremas, es decir, los
tratamientos 3 y 4 (60 °C, 90 minutos, sin escaldado y en agua o etanol
respectivamente), y 15 y 16 (temperatura ambiente, 1 minuto, sin escaldado y
en agua o etanol respectivamente), se secaron por dos métodos, liofilización y
20 secado en estufa de recirculación de aire. Se eligieron estas muestras porque eran en las que previsiblemente mayores diferencias se podrían encontrar. Se determinó el efecto que los distintos factores (temperatura, tiempo de extracción, disolvente y proceso de secado) tienen sobre las características de la fibra.

25

En las primeras experiencias realizadas en el laboratorio, en las que las
extracciones se realizaron con agua y etanol, en un reactor abierto, con
agitación continua, los flavonoides se perdieron prácticamente en su totalidad,
mientras que las saponinas mostraron ser mucho más estables al
30 calentamiento y a la agitación. A pesar de que se extrajeron mayores cantidades de flavonoides y saponinas con etanol, se eligió el agua como disolvente por las ventajas económicas y medioambientales que su uso

supone. Además, la mayor parte de flavonoides y saponinas que no se solubilizan en el extracto acuoso, se recuperan en la fracción de fibra, dándole un valor añadido a la misma.

- 5 2) Procedimiento de obtención de compuestos funcionales de origen vegetal a nivel industrial.

El presente ejemplo se refiere al tratamiento de 100 kg de subproductos de espárrago (porciones finales de los turiones) procedentes de la industria de envasado de espárrago verde. El contenido en flavonoides y saponinas de la muestra original es de 283 mg/Kg y 646 mg/Kg respectivamente. La muestra se extrae con 200 L de agua, introduciendo la mezcla en contenedores cerrados, que se colocan en un autoclave industrial (Steriflow, Madinox, Barcelona, España), en el que se lleva a cabo la extracción a 121°C, durante 2 horas. Posteriormente, se separan las dos fracciones resultantes del tratamiento: extracto acuoso funcional, conteniendo los fitoquímicos solubles y fibra bioactiva. Los rendimientos son de 200L de extracto acuoso y 100 Kg de fibra húmeda.

- 20 La concentración de flavonoides en el extracto acuoso es de 80 mg/L (56% recuperación) y la de saponinas de 199 mg/L (61% recuperación).

El residuo fibroso contiene también cantidades significativas de estos dos grupos de compuestos. El rendimiento de la fracción de fibra seca (en estufa, a 60°C, durante 16 horas) es del 5,5% con respecto a los subproductos originales; y su contenido en flavonoides y saponinas son 1,33 mg/g y 4,39 mg/g respectivamente, lo que representa un 23% (73 mg/Kg) de recuperación de flavonoides y un 18% (241 mg/Kg) de recuperación de saponinas con respecto a los subproductos originales.

- 30 Los compuestos bioactivos solubilizados en el extracto acuoso se fraccionan en una columna de PVC, rellena de una resina de intercambio iónico, en este caso XAD-16. Las dimensiones de la columna han sido 155cm alto x 10,7 cm

diámetro interno y el volumen de resina 14 L. La relación volumen de resina / volumen de extracto funcional ha quedado establecida en 100 mL resina/L extracto que contenga hasta 80 mg flavonoides y 200 mg saponinas. Siguiendo este diseño a escala piloto se pueden inyectar en la columna 100-200L de extracto acuoso que contenga hasta 1g de flavonoides y 30g de saponinas.

En el ejemplo que nos ocupa se han fraccionado 100 L de extracto acuoso, con un contenido de 8g flavonoides y 20g saponinas, los cuales quedan retenidos en la resina, y posteriormente son separados en base a su distinta polaridad. Las dos primeras etapas del fraccionamiento consisten en la inyección de la muestra y lavado con 25L agua (dos volúmenes de columna), midiendo cada 5L de elución la concentración de flavonoides y saponinas, y comprobando que éstos quedan retenidos en la columna en su totalidad. La tercera etapa consiste en la elución de flavonoides, utilizando para ello 25L (2 volúmenes de columna) de etanol: agua 40%; y, finalmente, las saponinas se eluyen con 25L (2 volúmenes de columna) de etanol: agua 96%.

La recuperación de flavonoides es del 99% (7,92g) en la fracción de etanol 40%, siendo su concentración cuatro veces superior (317mg/L) a la del extracto inicial (80mg/L).

Las saponinas se recuperan en un 98% (19,6g), en la fracción de etanol 96%, y su concentración también es cuatro veces superior (785mg/L) a la del extracto acuoso inicial (199mg/L).

Como ya se ha explicado anteriormente, estos extractos funcionales, parcialmente purificados y enriquecidos en flavonoides y/o saponinas pueden utilizarse en suspensión o en polvo, tras ser liofilizados. En este ejemplo, se obtienen 1,7 kg de un extracto liofilizado completo que contiene 0,45% flavonoides y 1,15% saponinas. Tras su fraccionamiento, el peso del extracto de flavonoides es de 72g y su riqueza del 11% en peso, mientras que el extracto de saponinas pesa 24,5g y su riqueza es del 80% en peso.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de compuestos funcionales de origen vegetal que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. extracción en agua de un residuo fibroso y un extracto acuoso procedentes de residuos de origen vegetal;
 - b. separación del extracto acuoso del residuo fibroso procedentes de la etapa a);
 - c. secado del residuo fibroso;
 - 10 d. trituración y tamizado de la fibra seca obtenida de la etapa c); y
 - e. fraccionamiento del extracto acuoso;
2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde los residuos de origen vegetal proceden del espárrago.
- 15 3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la extracción se lleva a cabo en un reactor cerrado.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde
20 la extracción se realiza a temperaturas en el intervalo de 100 a 180°C.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la extracción se realiza durante un intervalo de tiempo de 15 a 300 minutos.
- 25 6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la extracción se realiza durante 120 minutos.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la extracción se realiza en atmósfera libre de oxígeno con o sin agitación.

8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el secado del residuo fibroso se lleva a cabo en estufa, con circulación de aire, a una temperatura superior a 30°C.
- 5 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el secado del residuo se lleva a cabo mediante liofilización.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el residuo fibroso seco, se tritura y se tamiza, obteniendo una fibra bioactiva.
- 10 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el fraccionamiento del extracto acuoso se lleva a cabo en una columna rellena con una resina de adsorción o de intercambio iónico.
- 15 12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde en la etapa de fraccionamiento del extracto acuoso se lleva a cabo un lavado de la resina con agua para eluir los azúcares solubles.
- 20 13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde en el fraccionamiento del extracto acuoso se lleva a cabo la elución de un extracto fenólico con etanol 10-50%
- 25 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde en el fraccionamiento del extracto acuoso se lleva a cabo la elución de un extracto de saponinas con etanol 60-100%
15. El procedimiento según la reivindicación 1, donde se lleva a cabo un proceso de liofilización del extracto acuoso de la etapa b).
- 30 16. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, donde se lleva a cabo un proceso de liofilización del extracto fenólico y del el extracto de saponinas.

17. Fibra bioactiva, obtenible por el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende desde un 55 a un 65% en fibra alimentaria total, desde un 17 a un 21% de proteínas y desde un 3 a un 6% en azúcares solubles.

18. Fibra bioactiva, obtenible por el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque comprende desde 1 a 2 mg de flavonoides, desde 5 a 6 mg saponinas, desde 1,5 a 2,0 mg esteroides y desde 2,5 a 3,5 mg de hidroxicinamatos.

19. Un extracto acuoso, obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 11 a 14, caracterizado porque comprende al menos un 0,45% de flavonoides y un 1,15% de saponinas.

20. Un producto funcional en forma de polvo, obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, que comprende desde un 11 a un 15% en flavonoides.

21. Un producto funcional en forma de polvo, obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16 que comprende 80-90% saponinas.

22. Uso de la fibra bioactiva de cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 18 para preparar alimentos enriquecidos, productos dietéticos o complementos alimenticios.

23. Uso del extracto acuoso de la reivindicación 19 para preparar alimentos enriquecidos, productos dietéticos o complementos alimenticios.

24. Uso del producto funcional de las reivindicaciones 20 ó 21 para preparar alimentos enriquecidos, productos dietéticos o complementos alimenticios.

25. Uso del extracto acuoso de la reivindicación 19, como antifúngico y/o bactericida.
- 5 26. Uso del producto funcional de las reivindicaciones 20 ó 21, como antifúngico y/o bactericida.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, X-FULL, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4147779 A (NAITO et al.) 03.04.1979, column 1, line 45-column, 2, line 6; column 2, line 37-column 3, line 35	1-12, 15, 19, 22-24
Y	CN 101559157 A (UNIV EAST CHINA NORMAL) 21.10.2009, (abstract) [on line] [retrieved on 20.07.2011] Retrieved from EPO EPODOC Database	1-12, 15, 19, 22-26
Y	JP 3048694 A (DOWA MINING CO LTD) 01.03.1991, (abstract) [on line] [retrieved on 20.07.2011] Retrieved from EPO WPI Database	25, 26
A	US 4770880 A (SASAKI et al.) 13.09.1988, column 1, lines 6-10, lines 50-59; column 6, lines 11-56	1, 2, 4, 8, 17, 18, 22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
26 September 2011 (26.09.2011)

Date of mailing of the international search report
(10/11/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

A. Sukhwani

Telephone No. 91 3495473

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070442

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 147833 A (WINCENTY MATZKA) 10.10.1921, page 1, column 2	1, 2, 4, 8, 17, 18, 22
A	JP 10113148 A (NIPPON RUIBOSUTEII HONSHA KK) 06.05.1998, (abstract) [on line] [retrieved the 20.07.2011] Retrieved from EPO EPODOC Database	1, 2, 4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070442

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US4147779 A	03.04.1979	GB2006596 AB JP54059343 A HK9684 A	10.05.1979 12.05.1979 10.02.1984
----- CN101559157 A	----- 21.10.2009	----- NONE	-----
----- JP3048694 A	----- 01.03.1991	----- NONE	-----
----- US4770880 A	----- 13.09.1988	----- JP61040764 A	----- 27.02.1986
----- GB147833 A	----- 10.10.1921	----- NONE	-----
----- JP10113148 A	----- 06.05.1998	----- NONE	-----
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070442

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L1/308 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61K36/8965 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070442

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A23L, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, X-FULL, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	US 4147779 A (NAITO et al.) 03.04.1979, columna 1, línea 45-columna, 2, línea 6; columna 2, línea 37-columna 3, línea 35	1-12, 15, 19, 22-24
Y	CN 101559157 A (UNIV EAST CHINA NORMAL) 21.10.2009, (resumen) [en línea] [recuperado el 20.07.2011] Recuperado de EPO EPODOC Database	1-12, 15, 19, 22-26
Y	JP 3048694 A (DOWA MINING CO LTD) 01.03.1991, (resumen) [en línea] [recuperado el 20.07.2011] Recuperado de EPO WPI Database	25, 26
A	US 4770880 A (SASAKI et al.) 13.09.1988, columna 1, líneas 6-10, líneas 50-59; columna 6, líneas 11-56	1, 2, 4, 8, 17, 18, 22

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
26 septiembre 2011 (26.09.2011)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10 de noviembre de 2011 (10/11/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
A. Sukhwani

Nº de teléfono 91 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070442

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	GB 147833 A (WINCENTY MATZKA) 10.10.1921, página 1, columna 2	1,2,4,8, 17,18,22
A	JP 10113148 A (NIPPON RUIBOSUTEII HONSHA KK) 06.05.1998, (resumen) [en línea] [recuperado el 20.07.2011] Recuperado de EPO EPODOC Database	1, 2, 4-6

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070442

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US4147779 A	03.04.1979	GB2006596 AB JP54059343 A HK9684 A	10.05.1979 12.05.1979 10.02.1984
----- CN101559157 A	----- 21.10.2009	----- NINGUNO	-----
----- JP3048694 A	----- 01.03.1991	----- NINGUNO	-----
----- US4770880 A	----- 13.09.1988	----- JP61040764 A	----- 27.02.1986
----- GB147833 A	----- 10.10.1921	----- NINGUNO	-----
----- JP10113148 A	----- 06.05.1998	----- NINGUNO	-----
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

A23L1/308 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61K36/8965 (2006.01)