

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 723**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/105** (2006.01)

**A61K 36/53** (2006.01)

**A61K 36/63** (2006.01)

**B01D 11/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2016 PCT/GB2016/051014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16162703**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2016 E 16726925 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3280276**

54 Título: **Solventes de extracción eutéctica, métodos de extracción mediante eutectigénesis, que usa dichos solventes, y extractos derivados de dichos métodos de extracción**

30 Prioridad:

**10.04.2015 FR 1553092**

**08.12.2015 FR 1562033**

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

**24.03.2021**

73 Titular/es:

**NATUREX (50.0%)**

**250 Rue Pierre Bayle BP 81218**

**84911 Avignon, FR y**

**UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE**

**VAUCLUSE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LAVAUD, ALEXIS;**

**LAGUERRE, MICHAEL;**

**BIRTIC, SIMONA;**

**FABIANO TIXIER, ANNE SYLVIE;**

**ROLLER, MARC;**

**CHEMAT, FARID y**

**BILY, ANTOINE CHARLES**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 813 723 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

Solventes de extracción eutéctica, métodos de extracción mediante eutectigénesis, que usa dichos solventes, y extractos derivados de dichos métodos de extracción

**Campo de la invención**

- 5 De un modo general, la presente invención se refiere a:
- un solvente eutéctico para extraer material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico;
  - el uso de dicho solvente de extracción eutéctica para poner en práctica un método para extraer compuestos biológicos naturales;
  - un método para extraer compuestos biológicos naturales como compuestos fenólicos, que usa dicho solvente.
- 10 Más particularmente, la implementación de la invención es posible gracias a una mezcla proporcionada de betaína (trimetil glicina) o formas hidratadas de betaína, al menos un donante de enlaces de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en polioles y ácidos orgánicos y agua, como se define en la Reivindicación 1, que es útil para proporcionar la extracción mejorada de compuestos naturales del material biológico usado.

**Antecedentes de la invención**

- 15 La betaína es una forma trimetilada de glicina descubierta por primera vez en el jugo de remolacha azucarera. En virtud de su estructura y propiedades fisicoquímicas, esta molécula natural es de particular interés en los sectores cosméticos, productos farmacéuticos, alimentos y nutrición/salud. Se usa en particular por sus propiedades hidratantes, emolientes y humectantes para mantener el contenido de agua de un producto cosmético, así como para preservar un equilibrio óptimo de humedad de la piel. Este efecto beneficioso es el resultado de un posicionamiento particular en la interfaz de las células de la piel humana. Además, la betaína es un osmolito natural que protege las células humanas -al igual que las células- contra el estrés osmótico. Cuando se ingiere en la dieta o mediante suplementos nutracéuticos, esta molécula juega un papel protector hepático al permitir la suficiente metilación de ciertas enzimas hepáticas. Se han identificado también las condiciones asociadas con el metabolismo hepático de los lípidos como resultado de una ingesta insuficiente de betaína que puede dar lugar a la esteatosis (Craig, S. A. S., Betaine in human nutrition, Am. J. Clin. Nutr., 2004, 80, 539-549).

- Además de su papel fisiológico y tecnológico, la betaína es económica (~ 10 euros/kg), de origen biológico y no tóxica. Es un metabolito primario producido en cantidades considerables durante el procesamiento de la remolacha azucarera para la producción de sacarosa, que representa hasta el 30% de la melaza así obtenida. Dadas las cantidades industriales involucradas, quedan existencias de betaína que tienen poco o ningún valor de desarrollo. El descongelamiento de carreteras con jugo de remolacha rico en betaína obtenido después de extraer el azúcar es uno de un número de ejemplos de uso de este compuesto en sectores de muy bajo valor añadido. Por lo tanto, se buscan nuevas aplicaciones en nichos de mercado. La betaína tiene un valor indudable en la preparación de cocamidopropil betaína usada en la industria cosmética como un tensioactivo, pero este producto químico se deriva de la síntesis orgánica. En un contexto donde la artificialidad es cada vez más obsoleta, esta vía de desarrollo parece estar más comprometida que nunca. Por lo tanto, los cambios sociales, económicos y reglamentarios impulsados por el deseo de los consumidores de avanzar hacia opciones más naturales han impulsado el uso de sustancias naturales en procesos respetuosos con el medio ambiente con bajos aportes de energía (por ejemplo, baja temperatura).

- Un problema encontrado a menudo por la persona experta en la técnica es el de la alta sensibilidad al calor de las moléculas de interés, entre las cuales se encuentran los compuestos naturales que contienen núcleos aromáticos sustituidos por grupos hidroxilo (compuestos fenólicos, alcoholes, ácidos fenólicos y ésteres, flavonoides, taninos, estilbenos y terpenos fenólicos). También se sabe que la porción sacárida de saponinas y triterpenos, así como los sistemas conjugados asociados de terpenos y carotenoides se pueden isomerizar u oxidar más allá de 60-70 °C.

- Una característica esencial de la betaína es la combinación de un grupo amonio cuaternario con un ácido carboxílico, que son particularmente adecuados para la solubilización y para la extracción de sustancias polares o anfifílicas, en particular formando enlaces de hidrógeno y/o iónicos con el soluto a extraer. En una aproximación guiada por los principios de la química verde y de la eco-extracción, sería ventajoso poder usar betaína como principio activo y como fluido de extracción en una mezcla con otros constituyentes. Sin embargo, parece que no existe una aplicación de la betaína para la extracción de sustancias naturales de interés cosmético, farmacéutico o nutricional, como compuestos fenólicos, antioxidantes, saponinas, carotenoides, terpenos u otros, por la buena razón de que la betaína existe en forma sólida a temperatura ambiente y no es susceptible de extracción de ninguna sustancia natural debido a su estado físico.

- Sin embargo, el progreso reciente en la química muestra que un sólido se puede llevar al estado líquido cuando se formula de manera precisa en una mezcla con uno o más compuestos específicos en proporciones adecuadas. Esto se aplica en particular a los *solventes eutécticos profundos* que son mezclas de compuestos que tienen puntos de fusión mucho más bajos que los de sus constituyentes tomados de forma aislada. Toman su nombre del griego

“eutektos” que significa “fácilmente derretidos”, un término que se usó por primera vez por el médico inglés Guthrie en 1884. Estos solventes, descritos por Abbott y cols., en el documento EP 1 324 979, son generalmente líquidos a temperatura ambiente, mientras que los compuestos de los que se componen las mezclas son compuestos sólidos cuando se consideran por separado. Este fenómeno de disminución de los puntos de fusión por la formación de una mezcla eutéctica se atribuye al establecimiento de enlaces de hidrógeno intermoleculares, que tienen el efecto de aumentar el volumen del espacio entre las especies químicas, aumentando así su movilidad para que se vuelvan líquido.

En los últimos años se ha prestado particular atención al uso de sustancias naturales para su inclusión en la composición de estos solventes eutécticos, que luego se denominan *disolventes eutécticos profundos naturales* (NADES). Están compuestos de ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, polioles, colina y urea (Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verbene, M., Hollman, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.*, 2011, 156, 1701-1705). Estas sustancias naturales son constituyentes ideales para preparar mezclas eutécticas en virtud del hecho de que son abundantes en la biomasa, exhiben una gran diversidad estructural, son biodegradables, exhiben baja toxicidad, son comestibles en su mayor parte y son naturales. Se describen en particular en los documentos de la familia de WO 2011/55829.

Sin embargo, estos solventes eutécticos naturales tienen un cierto número de inconvenientes para el uso a escala industrial. Por ejemplo, la persona experta en la técnica sabe que el uso concomitante de azúcares y aminoácidos forma compuestos aromáticos y coloreados como resultado del bronceado no enzimático, y tales extractos no satisfacen las necesidades industriales de los mercados cosméticos, de productos farmacéuticos, alimentos y nutracéuticos. Aunque se pueden usar azúcares sin combinarse necesariamente con aminos, o *viceversa*, el material biológico es capaz de asociarse, por un lado, con azúcares y por otro lado, con aminos, lo que facilita el inicio de la reacción de bronceado no enzimático y, por lo tanto, previniendo el uso de los extractos así obtenidos para formular productos de consumo. Además, los constituyentes de las mezclas eutécticas naturales descritos en la familia de patentes WO 2011/55829 pueden no siempre ser adecuados desde el punto de vista regulatorio. Esto se aplica en particular a la colina y sus derivados que están prohibidos para su uso en cosméticos de acuerdo con el Reglamento Europeo N° 1223/2009. Sumado al hecho de que en el caso de mezclas eutécticas formadas a partir de azúcares, la estabilidad microbiana de los correspondientes extractos es generalmente insuficiente para prever su incorporación en productos de consumo comunes almacenados durante un periodo suficientemente largo para permitir el desarrollo de la flora de descomposición o de microorganismos patógenos.

Además, las mezclas eutécticas se forman típicamente solo para proporciones muy precisas de constituyentes definidos, lo que significa que no es suficiente mezclar tal o cual molécula, aunque sea natural, para obtener una disminución del punto de fusión de la mezcla y esperar que la mezcla sea estable desde el punto de vista de la cristalización (por estabilidad se entiende al menos una semana). También, estos solventes presentan el inconveniente de ser altamente viscosos a temperatura ambiente (generalmente por encima de 100 cP). Por ejemplo, la mezcla de cloruro de colina y urea (relación molar 1:2) tiene una viscosidad de casi 500 cP a 30 °C (Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V., Novel solvents properties of choline chloride/urea mixtures, *Chem. Commun.*, 2003, 7, 70-71), que no carece de problemas en términos de rendimientos de extracción y hace imposible su uso industrial como un solvente de extracción. En términos de interacciones moleculares, esta alta viscosidad se atribuye a la presencia de una red muy densa de enlaces de hidrógeno entre los constituyentes de las mezclas eutécticas, lo que reduce la movilidad de las especies libres presentes en estos solventes. Esta viscosidad también es atribuible al tamaño de los iones (si están presentes), al bajo volumen de espacio entre las moléculas, a los efectos electrostáticos y a las interacciones de Van der Waals. Todos estos factores combinados constituyen un impedimento para el uso de mezclas eutécticas con el fin de extraer sustancias de plantas (p.ej., vegetales), en tanto en cuanto las fuerzas de cizallamiento necesarias para poner en movimiento el fluido extractor y hacer que penetre en el material biológico del que se desea extraer la totalidad o parte de las sustancias, no serán suficientes para permitir una extracción óptima. Como corolario, la baja movilidad de las especies químicas en la mezcla eutéctica es problemática para disolver las sustancias a extraer, lo que da lugar a bajos rendimientos de extracción, altos costos de energía, tiempos de extracción prolongados y/o grandes cantidades de solventes.

Por lo tanto, parece que actualmente no hay una solución existente para extraer de un material biológico ingredientes o principios activos como compuestos fenólicos, antioxidantes, saponinas, carotenoides, terpenos u otros, usando solventes eutécticos fluidos y de baja viscosidad a base de betaína y en los que esta última también puede desempeñar un papel de ingrediente o principio activo (por ingrediente activo se entiende una sustancia que tiene una acción tecnológica, mientras que un principio activo se refiere a cualquier sustancia capaz de ejercer una acción cosmética, farmacológica o nutricional).

También existe una constante necesidad de alternativas de solventes de extracción natural para corroborar y encontrar una actividad potente para los extractos botánicos. Esto se debe a que los diferentes solventes pueden diferir en su capacidad de extracción, lo que da lugar a un potencial para obtener varios/diferentes beneficios para la salud dependiendo del solvente usado. Además, el uso de nuevos solventes de extracción, como los solventes eutécticos descritos en esta memoria, podría permitir el descubrimiento de nuevas actividades y aplicaciones para productos botánicos.

El papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las enfermedades humanas ha sido objeto de amplios estudios relacionados con la prevención de enfermedades. El estrés oxidativo, causado por un desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y la producción de oxidantes, incluyendo ROS, parece estar asociado con muchas enfermedades multifactoriales, especialmente cánceres, enfermedades cardiovasculares y trastornos inflamatorios. Los mecanismos por los cuales se desarrollan estas enfermedades implican generalmente la alteración oxidativa de moléculas fisiológicamente críticas, que incluyen proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, junto con una modulación tanto de la expresión génica como de la respuesta inflamatoria. La creciente evidencia sugiere que, además de las defensas antioxidantes del organismo, la ingesta de antioxidantes puede proteger a las moléculas biológicas importantes del daño oxidativo y, por lo tanto, reducir el riesgo de numerosas enfermedades crónicas relacionadas con ROS.

La exposición a la radiación solar ultravioleta (UV) es un factor causante del foto-daño y la carcinogénesis de la piel, y existe una necesidad urgente de mejorar las diferentes estrategias foto-protectoras moleculares (o sinérgicas con) la absorción de fotones (Watson y cols., 2014). Aunque las consecuencias espacio-temporales de la exposición a los UVR en la composición y arquitectura de la matriz dérmica extracelular (ECM) están bien caracterizadas, la patogénesis del foto-envejecimiento sigue estando mal definida. Existen varios marcadores y vías:

Las ROS están implicadas en el procesamiento del envejecimiento

La degradación de la matriz extracelular

La pérdida de la función de barrera de la piel

y así sucesivamente

Estudios recientes sugieren un papel foto-protector de la expresión génica cutánea orquestada por el factor de transcripción NRF2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear E2) y la proteína DJ-1. De hecho, la regulación a la baja de DJ-1 perjudica la translocación nuclear de Nrf2 (Liu y cols., 2014). La vía de DJ-1/NRF2 se activa claramente por células para combatir el daño inducido por el estrés oxidativo y esta vía actúa como un marcador celular de proteína del estrés oxidativo, lo que destaca el estrés oxidativo que ya está presente y que afecta a las células. Los extractos activos y botánicos son capaces de interferir con esta vía y, por lo tanto, el uso de extractos activos y botánicos puede ser capaz de actuar antes de la activación de esta vía para proteger frente al daño inducido por el estrés oxidativo.

Por lo tanto, tanto los antioxidantes como los inhibidores tópicos de la señalización celular perjudicial pueden ser eficaces para anular los efectos de la degradación específica de proteínas mediada por UV en la epidermis y en la dermis.

El documento WO 2015/044139 describe un proceso para la preparación de una composición de sabor. El proceso que comprende formar un solvente eutéctico profundo, preparar una mezcla de reacción que comprende el solvente eutéctico profundo y precursores del sabor y calentar la mezcla de reacción para formar compuestos aromáticos.

Yuntao Dai y cols., *Analytica Chimica Acta*, vol. 766, 2013, págs. 61 a 68 describen el uso de solventes eutécticos profundos naturales como medios potenciales para la tecnología verde.

Fabio Cardellini y cols., *RSC ADV.*, vol. 4, nº. 99 2014, págs. 55.990 a 56.002 describen la caracterización de nuevos solventes eutécticos profundos zwitteriónicos a partir de trimetil glicina y ácidos carboxílicos.

El documento WO 2012/145522 describe un solvente eutéctico profundo que comprende monohidrato de betaína y un componente seleccionado de urea o ácidos, como ácido malónico o ácido cítrico.

La enumeración o discusión de un documento aparentemente publicado anteriormente en esta especificación no se debe tomar necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o del conocimiento general común.

### Descripción de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de combinaciones precisas que comprenden betaína o una forma hidratada de betaína y agua con al menos un donante de enlaces de hidrógeno entre los ácidos orgánicos y/o polioles, para obtener una sinergia/mejora durante la etapa de extracción de compuestos de interés industrial, preferiblemente compuestos cosméticos, farmacéuticos o nutricionales y que pueden ser sensibles al calor, a partir de un material biológico de una planta (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariontario, y preferiblemente de plantas (p. ej., vegetales).

Para evitar dudas, como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "planta" significa un organismo vivo de la clase ejemplificada por árboles, arbustos, hierbas, pastos, helechos y musgos, que crecen típicamente en un sitio permanente, absorbiendo agua y sustancias inorgánicas a través de sus raíces y sintetizando nutrientes en sus hojas mediante la fotosíntesis usando el pigmento verde de la clorofila. Por ejemplo, el término plantas se puede referir a flores y vegetales (p. ej., vegetales).

Entre estos compuestos de interés se pueden mencionar en particular compuestos fenólicos que incluyen ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, estilbenos y alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, saborizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos, tensioactivos y terpenoides incluidas las saponinas.

5 Más particularmente, los compuestos de interés incluyen ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, saborizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos y terpenoides, incluidas las saponinas.

10 En un primer aspecto, la invención proporciona un solvente eutéctico para extraer material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico, en donde el solvente es una mezcla clara, estable y fluida que comprende:

(a) betaína o una forma hidratada de betaína;

(b) al menos un compuesto donante de enlaces de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en polioles y ácidos orgánicos; y

(c) agua;

15 en donde la relación molar de la betaína o de una forma hidratada de betaína con el al menos donante de enlaces de hidrógeno es de 1:1,5 a 1:3 y la proporción de agua en el solvente es de 15 a 30% en peso;

con la condición de que el solvente eutéctico de extracción no comprende ningún azúcar y/o sal de amina y/o anión exógeno.

20 Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "clara" puede significar que el solvente es transparente y no contiene partículas sólidas que son visibles a simple vista.

Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "estable" puede significar que la fase sólida, por ejemplo una fase cristal, no se forma dentro del solvente en una semana.

25 Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "fluido" puede significar que el solvente exhibe fluidez. Por ejemplo, puede exhibir fluidez a una temperatura de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 80 °C, como de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 60 °C, o de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 45 °C.

Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "exógeno" puede significar que los compuestos/componentes específicos ya no están presentes dentro del solvente eutéctico, es decir, no contribuyeron adicionalmente.

30 Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "azúcar" puede significar cualquier compuesto de azúcar conocido por los expertos en la técnica, que puede incluir azúcares como glucosa, fructosa y galactosa.

35 Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "sal de amina" puede significar que cualquier amina cargada positivamente se especifica con un contra-ión separado. Por ejemplo, el término "sal de amina" se puede referir a sales de amonio cuaternarias, como colina.

Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "anión" puede significar cualquier especie cargada negativamente. Por ejemplo, el término "anión" se puede referir a  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SO}_3\text{CF}_3^-$  o  $\text{COOCF}_3^-$ .

40 En una realización particular, la invención proporciona un solvente eutéctico para extraer material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico, en donde el solvente es una mezcla clara, estable y fluida que consiste esencialmente en:

(a) betaína o una forma hidratada de betaína;

(b) al menos un compuesto donante de enlaces de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en polioles y ácidos orgánicos; y

45 (c) agua;

en donde la relación molar de la betaína o de una forma hidratada de betaína con el al menos donante de enlaces de hidrógeno es de 1:1,5 a 1:3 y la proporción de agua en el solvente es de 15 a 30% en peso;

con la condición de que el solvente eutéctico de extracción no comprende ningún azúcar y/o sal de amina y/o anión exógeno.

Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término “consiste esencialmente en” significa que los solventes eutécticos de la invención no contienen sustancialmente otros componentes, particularmente ningún otro donante de enlaces de hidrógeno que se sepa que se usa en solventes eutécticos.

5 En una realización particular adicional, la invención proporciona un solvente eutéctico para extraer material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico, en donde el solvente es una mezcla clara, estable y fluida que consiste en:

(a) betaína o una forma hidratada de betaína;

(b) al menos un compuesto donante de enlaces de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en polioles y ácidos orgánicos; y

10 (c) agua;

En una realización adicional de la invención, el compuesto donante de enlaces de hidrógeno se puede seleccionar del grupo de polioles que consiste en: glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, etilén glicol, propilén glicol, ribitol, aldonitol, propanediol y pentilén glicol.

15 En una realización adicional de la invención, el compuesto donante de enlaces de hidrógeno se puede seleccionar del grupo de ácidos orgánicos que consiste en: ácido láctico, ácido málico, ácido maleico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido aconítico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido glucurónico, ácido neuramínico, ácido siálico, ácido shikímico, ácido fítico, ácido galacturónico, ácido idurónico, ácido hialurónico, ácido hidroxicítrico y derivados de lactonas.

En una realización de la invención, el donante de enlaces de hidrógeno no es ácido cítrico.

20 En la invención, la relación molar crítica de la betaína (o forma hidratada de betaína) con el al menos compuesto donante de enlaces de hidrógeno (polioles o ácidos orgánicos) es de 1:1,5 y 1:3 y es preferiblemente 1:2.

La proporción en peso de agua añadida a la mezcla para obtener el solvente de acuerdo con la invención es de 15 a 30% o de 20 a 30%.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un solvente eutéctico de extracción como se definió previamente para la extracción de compuestos biológicos naturales como compuestos fenólicos que incluyen ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, estilbenos y alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, saborizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos, tensioactivos y terpenoides que incluyen saponinas, a partir de un material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico, y preferiblemente a partir de material biológico de plantas (p. ej., vegetales).

30 En una realización adicional, la invención proporciona el uso de un solvente eutéctico de extracción como se definió previamente para la extracción de compuestos biológicos naturales como compuestos fenólicos que incluyen ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, saborizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos, tensioactivos y terpenoides que incluyen saponinas, a partir de un material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico, y preferiblemente a partir de material biológico de plantas (p. ej., vegetales).

35 En una realización del uso de la invención, el material biológico de plantas (p. ej., vegetales) se puede seleccionar del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero, Selaginella pulvinata, Tillandsia usnoides y hojas de olivo.

En una realización adicional del uso de la invención, el material biológico de plantas (p. ej., vegetales) se puede seleccionar del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero y hojas de olivo.

45 Sin desear estar limitado por la teoría, parece que la sinergia/mejora obtenida con el solvente de acuerdo con la invención deriva de un fenómeno físico-químico natural que se denominará en lo sucesivo como “*eutectigénesis*” y que corresponde con la formación de una mezcla eutéctica producida cuando se alcanzan las proporciones críticas de la mezcla correspondientes al punto eutéctico. El punto eutéctico es el punto en el diagrama de fase en la intersección de las dos curvas líquidas, lo que da la composición a la que la mezcla está a su temperatura mínima en fase líquida.

50 De una manera totalmente inesperada, se ha encontrado que la combinación de los tres compuestos – (a) betaína (o forma hidratada de betaína), (b) donante de enlaces de hidrógeno y (c) agua – en proporciones bien definidas, como de 1:1,5 a 1:3 o 1:2, hace posible extraer sustancias naturales de forma sinérgica/mejorada. La ausencia de uno de (a) a (c) da lugar a un colapso de la tasa de recuperación. Este descubrimiento es aún más significativo porque hasta ahora no existía ningún modelo teórico conocido, regla empírica o mecanismo de acción mediante el cual se dedujera

o predijera cualquier sinergia de extracción para mezclas eutécticas basadas en betaína. A lo sumo, se hace mención en la familia de documentos WO 2011/55829 en el sentido de que los solventes eutécticos profundos a menudo se forman a partir de dos compuestos presentes en una relación equimolar (1:1).

5 Los presentes inventores han demostrado de manera sorprendente e inesperada que este punto crítico se alcanza sistemáticamente para una relación molar de betaína (o forma hidratada de betaína):donante de enlaces de hidrógeno de 1:1,5 a 1:3, y preferiblemente 1:2. Por lo tanto, el punto crítico en el diagrama de fases corresponde a la composición crítica de la mezcla de extracción para la cual es óptima la eficacia de extracción para sustancias naturales, lo que parece que hasta ahora no se ha podido demostrar en ningún trabajo previo.

10 Además, el mecanismo de formación de mezclas eutécticas descrito por Abbott y cols., (familia de patentes de EE.UU. 7183433; Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., Tambyrajah, V., Novel solvents properties of chloride/urea mixtures, Chem. Commun., 2003, 7, 70-71) postula que la disminución del punto de fusión es la consecuencia del establecimiento de un enlace de hidrógeno entre un donante de enlaces de hidrógeno y el anión (ión cargado negativamente) de una sal de amina. Por lo tanto, es sorprendente encontrar en los resultados presentados a continuación que se obtiene una disminución del punto de fusión cuando no se aporta anión de manera exógena. Esto representa un avance en términos de conocimiento científico que aprovecha el carácter anfótero de la betaína. Mientras que muchos autores están demasiado centrados en las sales de amina, particularmente en las mezclas eutécticas naturales abarcadas por la presente invención incluyen sistemáticamente una amina sin aniones (aportada de manera exógena) ya que estas últimas no son necesarias para el mecanismo de eutectigénesis.

20 En términos de la composición de extracción, la invención describe la adición de una proporción en peso de agua exógena (es decir, contribuye y no está presente en la mezcla de betaína y del donante de enlaces de hidrógeno) comprendida entre 15 y 30% o 20 a 30% en las mezclas binarias de betaína:glicerol y betaína:ácido láctico, que tienen una relación molar crítica de betaína:donante de enlaces de hidrógeno de 1:1,5 a 1:3, y preferiblemente 1:2, para reducir la viscosidad a un nivel que es compatible con un uso industrial y con la designación de mezcla eutéctica. Específicamente, el experto en la técnica sabe que los enlaces de hidrógeno que permiten la formación de complejos supramoleculares característicos de solventes eutécticos se rompen por proporciones de agua en volumen superiores al 50% (Gutiérrez M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., del Monte, F. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures, Langmuir, 2009, 25, 5509-5515).

30 El método de extracción descrito de la presente invención con mezclas ternarias que contienen agua, betaína y un donante de enlaces de hidrógeno entre polioles y ácidos orgánicos como se define en esta memoria conserva la relación molar de eutectigénesis crítica de 1:1,5 a 1:3, y preferiblemente 1:2, entre betaína y el donante de enlaces de hidrógeno; una relación que es genérica para mezclas binarias (betaína:donante de enlaces de hidrógeno) y para mezclas ternarias (agua:betaína:donante de enlaces de hidrógeno) y proporciona una mejora espectacular en los contenidos activos dentro del extracto obtenido que usa el método de extracción de la invención. Por lo tanto, el método permite que el rendimiento de los activos se multiplique hasta 45 veces y mejore la riqueza de los perfiles cromatográficos que se obtienen en virtud de diferentes mezclas eutécticas que son líquidas a temperatura ambiente, como de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 80 °C, como de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 60 °C, o de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 45 °C, y a base de compuestos naturales de origen agrícola o biológico disponibles en cantidades industriales como betaína, polioles (como glicerol) y ácidos orgánicos (como ácido láctico) como sub-productos de la producción de azúcar, la química del petróleo y la biotecnología.

45 El método de extracción de la presente invención consiste en la maceración, percolación y/o infusión de un material biológico molido o sin moler sumergido en un solvente eutéctico, a una temperatura entre 20 y 60 °C, como de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 45 °C, a presión atmosférica o bajo presión, por ejemplo a una presión de aproximadamente 100 a 500 kPa, con agitación durante 1 a 5 horas, preferiblemente durante 2 horas. La fase de extracción no implica ninguna transformación química entre ninguno de los compuestos presentes en el solvente de extracción eutéctica que permanece totalmente inerte frente al material biológico y las sustancias naturales a extraer. Por ejemplo, ninguno de los compuestos presentes en el solvente de extracción eutéctica reacciona con el material biológico y las sustancias naturales que se extraerán de manera covalente; a las temperaturas de extracción descritas en esta invención (<60 °C), solo tienen lugar las interacciones no covalentes entre las sustancias naturales.

50 Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "molido" puede significar que el material biológico se ha sometido a fuerzas mecánicas para aplastar, pulverizar o reducir a polvo mediante fricción antes de ser macerado, percolado y/o infundido en el solvente de extracción eutéctica.

55 Como se usa en esta memoria, la persona experta entendería que el término "sin moler" puede significar que el material biológico no se ha sometido a fuerzas mecánicas antes de ser macerado, percolado y/o infundido en el solvente de extracción eutéctica.

El método de extracción de la presente invención mediante eutectigénesis descrito en esta memoria se desarrolló específicamente para obtener una estabilidad microbiana óptima sin la adición de conservantes exógenos ni al fluido de extracción ni a los extractos líquidos. Se descubrió que dichos extractos obtenidos después de la maceración,

- 5 percolación y/o infusión del material biológico en los solventes eutécticos y al finalizar las operaciones de filtración y acondicionamiento, por ejemplo, filtrar a través de una bolsa y/o filtro de placa, eran estables desde el punto de vista microbiológico, es decir, el extracto obtenido no comprendía una carga microbiológica que se consideraría peligrosa y/o tóxica para la salud humana a pesar de la carga microbiana del aporte de material biológico en la etapa de extracción inicial.
- 10 Por lo tanto, las mezclas y extractos eutécticos están libres de agentes conservantes que los expertos en la técnica saben que son capaces, en ciertos casos confirmados, de ejercer un efecto tóxico en seres humanos, particularmente en términos de disruptores endocrinos. La buena estabilidad microbiana de estos solventes proporciona un medio para mejorar indirectamente su seguridad, particularmente en vista del hecho de que parecería contradictorio usar un solvente eutéctico no tóxico solo para después proceder a añadir antimicrobianos potencialmente tóxicos.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para extraer compuestos biológicos naturales de acuerdo con la invención que comprende las siguientes etapas:
- a. sumergir, mientras se agita, un material biológico molido o sin moler en el solvente de extracción de acuerdo con la invención, luego
- 15 b. macerar o percolar o infundir la mezcla obtenida en la etapa a. a una temperatura entre 20 y 60 °C, luego
- c. filtrar el producto de extracción obtenido en b. obteniendo así un extracto líquido biológico natural derivado del material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico.
- El producto de extracción obtenido en b. se puede filtrar en la etapa c. usando cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica.
- 20 Por lo tanto, se describe en esta memoria un extracto líquido biológico natural que comprende material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico obtenido u obtenible mediante el método de extracción o uso previamente definido.
- El extracto líquido biológico natural se puede purificar adicionalmente antes de usarse o el extracto se puede usar sin ninguna purificación adicional. Los ejemplos de purificación que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, cromatografía, destilación y/o evaporación.
- 25 También se describe en esta memoria un extracto biológico natural y un solvente eutéctico como se define en esta memoria. Típicamente, el solvente eutéctico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50% en peso, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25% en peso.
- 30 Cuando el extracto líquido biológico natural se obtiene por el método de la invención, la etapa de filtración c. puede eliminar todo el solvente eutéctico presente. Alternativamente, la etapa de filtración puede dejar solvente residual presente dentro del producto de extracción.
- Por consiguiente, se describe en esta memoria un extracto líquido biológico natural que comprende un solvente eutéctico de acuerdo con la presente invención.
- 35 Típicamente, el solvente eutéctico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50% en peso, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25% en peso.
- Los compuestos biológicos naturales que se pueden extraer mediante el método de la invención pueden incluir ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, estilbenos y alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, saborizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos, tensioactivos y terpenoides que incluyen saponinas, a partir de material biológico de plantas y/o animal y/o procariótico.
- 40 Por ejemplo, los compuestos biológicos naturales que se pueden extraer mediante el método de la invención incluyen ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, saborizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos, terpenoides que incluyen saponinas, a partir de material biológico de plantas y/o animal y/o procariótico.
- 45 En una realización del método de la invención, el material biológico de plantas se puede seleccionar del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero, Selaginella pulvinata, Tillandsia usnoides y hojas de olivo.
- 50 Por ejemplo, el material biológico de plantas se puede seleccionar del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero y hojas de olivo.
- También se describe en esta memoria un extracto líquido biológico natural caracterizado porque el material biológico de plantas (p. ej., vegetales) del que se deriva se puede seleccionar del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de



caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero, Selaginella pulvinata, Tillandsia usnoides y hojas de olivo. Por ejemplo, el material biológico de plantas (p. ej., vegetales) se puede seleccionar de flor de cerezo, hinojo o rosa de Jericó.

5 El método de extracción de acuerdo con la invención es particularmente notable porque ejerce una acción sinérgica/mejorada en el proceso de extracción del material biológico. Además, el extracto líquido biológico natural obtenido al poner en práctica dicho método de extracción refuerza la actividad biológica y/o físico-química de los compuestos incluidos en dicho extracto. Por ejemplo, los resultados obtenidos con flor de cerezo muestran claramente la superioridad de los extractos obtenidos usando las mezclas eutécticas estudiadas (en comparación con más solventes convencionales como mezclas de hidroglicerina que se usan ampliamente en la industria cosmética y aromática) en un amplio rango de actividad biológica como foto-protección, síntesis de colágeno, acción anti-inflamatoria (vía del TNF $\alpha$ ) o inhibición de la liberación de metaloproteinasas de matriz tipo 1 (MMP-1) después de la estimulación por UV (protección contra al foto-envejecimiento).

10 Los resultados obtenidos con flores de azafrán, hinojo y rosa de Jericó demuestran la fuerte inhibición en la síntesis de melanina (efecto hipo-pigmentario) ejercida por los extractos eutécticos de flores de azafrán, hinojo y rosa de Jericó (alrededor de 55, 33 y 36%, respectivamente) en comparación con sus homólogos de hidroglicerina que carecen de actividad. Además, la inhibición del TNF $\alpha$  (respuesta anti-inflamatoria) para los extractos eutécticos de cola de caballo y las actividades antioxidantes de estos son muy superiores a las de los extractos de hidroglicerina de la misma planta. Esto también se aplica al romero, cuya extracción con solventes eutécticos basados en betaína induce una actividad antioxidante mayor en un factor de 2 que los extractos derivados de un proceso que emplea una mezcla agua:alcohol en peso (1:1). Además, los ejemplos muestran que la síntesis de colágeno en un modelo de fibroblastos y la foto-protección son mejores con extractos eutécticos de hojas de olivo en comparación con extractos de hidroglicerina de hojas de olivo.

15 Los presentes inventores han descubierto de manera sorprendente e inesperada que estas actividades biológicas y/o físico-químicas que se fortalecen mediante el uso de solventes eutécticos para fines extractivos estaban relativamente bien correlacionadas con los perfiles cromatográficos correspondientes. Específicamente, los perfiles obtenidos por extracción eutéctica son generalmente "inalcanzables" por solventes más convencionales. Los perfiles difieren no solo en términos cuantitativos, es decir, la cantidad específica de una determinada molécula dentro del extracto, sino aún más significativamente en términos cualitativos. Por ejemplo, aunque la mayoría de las moléculas extraíbles normalmente están presentes en los extractos eutécticos, estos últimos, sin embargo, contienen nuevas sustancias que están ausentes en los extractos de hidroglicerina. Por ejemplo, se han identificado cafeoil glucósido, ácido clorogénico y ácido dicafeoilquinico por primera vez en flor de cerezo debido al uso de solventes eutécticos, así como los isómeros de kaempferol-3-O-lactil-soforósido en la flor de azafrán. El descubrimiento de estos nuevos fitoactivos resalta las propiedades mejoradas (ya sean biológicas o físico-químicas) de los extractos eutécticos y abre nuevas vías para la utilización de extractos que exhiben actividades novedosas. Por ejemplo, el ácido dicafeoilquinico descubierto en los extractos eutécticos de flor de cerezo es un inhibidor selectivo y altamente eficaz del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) implicado en la etiología del síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA (Robinson y cols., Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase, Mol. Pharmacol. 1996, 50, 846-855).

20 Se describe en esta memoria el uso de un extracto líquido biológico natural como se define en esta memoria para la fabricación de una composición nutracéutica, un producto dietético o alimenticio para seres humanos o animales, un suplemento nutricional, una fragancia, una formulación farmacéutica, enológica o cosmética, destinado a ser administrado por vía oral, parenteral o para aplicación tópica, rectal, nasal, auricular, vaginal y/u ocular.

25 También se describe en esta memoria el uso de dicho extracto líquido biológico natural para la fabricación de una composición nutracéutica, un producto alimenticio o dietético para seres humanos o animales, un suplemento nutricional, una fragancia o saborizante, una formulación o composición farmacéutica, enológica o cosmética.

30 Por ejemplo, se describe en esta memoria, el uso de dicho extracto líquido biológico natural para la fabricación de una composición nutracéutica, un producto alimenticio o dietético, un suplemento nutricional, una composición farmacéutica o una formulación o composición cosmética.

35 También se describe en esta memoria el uso de un extracto líquido en una composición nutracéutica, un producto dietético o alimenticio para seres humanos o animales, un suplemento nutricional, una fragancia o aroma, formulación enológica o cosmética.

40 Se describe en esta memoria una composición farmacéutica que comprende un extracto líquido biológico natural como se define en esta memoria.

45 También se describe en esta memoria un extracto líquido como se define para su uso en una composición farmacéutica y además proporciona un extracto líquido o composición farmacéutica para su uso como agentes foto-protectores, anti-foto-envejecimiento, hipo-pigmentarios, de blanqueamiento, anti-envejecimiento, anti-oxidantes, anti-radicales, reductores de especies reactivas de oxígeno, reductores de productos finales de glicación avanzada, inhibidores de

metaloproteinasas, anti-inflamatorios, calmantes de la piel, activadores de la síntesis de colágeno, agentes hidratantes, restauradores de la función de barrera de la piel o potenciadores de la adhesión y cohesión celular.

5 Por ejemplo, el extracto líquido o la composición farmacéutica se puede usar como agentes foto-protectores, anti-foto-envejecimiento, hipo-pigmentarios, de blanqueamiento, anti-envejecimiento, anti-oxidante, anti-radicales, reductores de especies reactivas de oxígeno, inhibidores de metaloproteinasas, anti-inflamatorios, calmantes de la piel, activadores de la síntesis de colágeno, agentes hidratantes o restauradores de la función de barrera de la piel.

Como se describe en esta memoria, las composiciones o formulaciones están destinadas a administrarse por vía oral o por vía parenteral o mediante aplicación tópica, rectal, nasal, auricular, vaginal y/u ocular.

10 También se describe en esta memoria un extracto líquido biológico natural derivado de flor de cerezo como un agente foto-protector, protector de la función de barrera, anti-oxidante y anti-foto-envejecimiento. Por ejemplo, el extracto líquido biológico natural derivado de la flor de cerezo puede actuar como un agente foto-protector y anti-foto-envejecimiento.

15 Se describe en esta memoria un extracto líquido biológico natural derivado del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero, Selaginella pulvinata, Tillandsia usnoides y hojas de olivo como un agente foto-protector, protector de la función de barrera, anti-oxidante y anti-foto-envejecimiento.

20 Los datos presentados en esta memoria muestran que la formulación de extractos líquidos eutécticos en agua, por ejemplo, hacen posible obtener un alto nivel de actividad biológica y/o físico-química entre 0,001 y 10%, preferiblemente entre 0,01 y 1% (v). Un cierto número de extractos eutécticos reivindicados en la presente invención ejercen una actividad mayor que la de sus homólogos de hidroglicerina, incluso cuando estos últimos están diez veces más concentrados en la formulación líquida final.

25 Se probaron otras composiciones de fluidos de extracción que se muestran en la Tabla 4, que generalmente dieron lugar a la formación de una mezcla que cristaliza a temperatura ambiente y, ya esté fría o caliente, hace imposible, por lo tanto, cualquier extracción de cualquier material biológico. Además, las pruebas con ácido cítrico también muestran la dificultad de obtener mezclas eutécticas de extracción estables a partir de betaína. La Tabla 3 muestra la influencia de la composición de la mezcla binaria de betaína:ácido cítrico en la apariencia macroscópica del medio. Si bien una relación molar de 50:50 o 40:60 hace posible retrasar la formación de una fase cristalina después de una semana en comparación con la relación 20:80, se observa sin embargo que estas condiciones no son propicias para un desarrollo industrial.

30 También se puede ver en esta memoria en el Ejemplo 4 que una gran cantidad de mezclas eutécticas generalmente presentadas como potencialmente interesantes desde el punto de vista industrial y que a menudo incluyen azúcares, pero no solo azúcares, se vuelven amarillas, naranjas o marrones a 50 °C y polimerizan y se convierten en turbias o cristalizadas (Tabla 4). Una pequeña cantidad de mezclas permanecen líquidas y claras durante más de un mes a 4 °C, temperatura ambiente y 50 °C; las mezclas ternarias de betaína:glicerol:agua (2:3, molar más 25% en peso de agua) y de betaína:ácido láctico:agua (2:3, molar más 25% en peso de agua) forman parte de fluidos que, en ellos mismos, no tienen impacto en el color de las formulaciones destinadas a uso cosmético, farmacéutico o alimentario. En otras palabras, no se añadirá ninguna carga de color intrínseca al fluido de extracción a la coloración ya impartida por la extracción de sustancias colorantes a partir de un material biológico.

35 También se describe en esta memoria un extracto líquido biológico natural definido, caracterizado porque refuerza la actividad biológica y/o físico-química de los compuestos incluidos en dicho extracto.

45 En última instancia, los extractos líquidos obtenidos por la aplicación del método de extracción mediante eutectigénesis reivindicados en la presente invención tienen un mayor contenido de compuestos de interés en comparación con solventes más convencionales como agua o mezclas de hidroglicerina usadas comúnmente en la industria cosmética, nutracéutica o farmacéutica. Lo que es más, los solventes eutécticos y métodos de la presente invención también pueden funcionar tan bien o incluso mejor que las tecnologías de extracción intensificadas de última generación que usan agua subcrítica, por ejemplo.

50 Los extractos eutécticos obtenidos a partir de un gran número de materiales biológicos tienen una potencial aplicación como agentes foto-protectores, anti-foto-envejecimiento, hipo-pigmentarios, de blanqueamiento, anti-envejecimiento, antioxidantes y anti-radicales, reductores de especies reactivas de oxígeno, reductores de productos finales de glicación avanzada, inhibidores de metaloproteinasas, anti-inflamatorios, calmantes de la piel, activadores de la síntesis de colágeno, agentes hidratantes, restauradores de la función de barrera de la piel o potenciadores de la adhesión y cohesión celular.

55 Por ejemplo, los extractos obtenidos se pueden usar como agentes foto-protectores, anti-foto-envejecimiento, hipo-pigmentarios, de blanqueamiento, anti-envejecimiento, anti-oxidantes y anti-radicales, reductores de especies reactivas de oxígeno, inhibidores de metaloproteinasas, anti-inflamatorios, agentes calmantes de la piel, activadores de la síntesis de colágeno, agentes hidratantes o restauradores de la función de barrera de la piel.

En virtud de la capacidad de extracción de dichos solventes eutécticos, pueden emerger nuevas propiedades biológicas a partir de los materiales biológicos extraídos. Por ejemplo, los presentes inventores han encontrado que la actividad descubierta para el extracto eutéctico de flor de cerezo puede tener propiedades protectoras en términos de foto-envejecimiento y se podría usar como un agente cosmético, nutracéutico y/o alimentario. El experto en la materia sabe que la radiación de la luz en el intervalo de longitudes de onda entre 280 y 400 nm induce un bronceado de la epidermis humana. La radiación en el intervalo entre 280 y 320 nm (UV-B) causa eritema y quemazón de la piel lo que afecta de manera adversa el bronceado natural. Los rayos UV-A entre 320 y 400 nm causan deterioro de la piel que se manifiesta como una pérdida de elasticidad y aparición de un envejecimiento prematuro, en particular a través de la ruptura de la matriz extracelular. Por lo tanto, existe una gran demanda de medios para controlar estos efectos desagradables por razones estéticas y de salud. El extracto de flor de cerezo descrito en la presente invención es capaz de actuar (i) como un agente para controlar la reacción inflamatoria inducida por la radiación UV, (ii) como un inhibidor de la ruptura de la matriz extracelular después de la exposición a los rayos UV, y (iii) como un protector de la viabilidad de células expuestas a los rayos UV.

Además, como los solventes eutécticos son comestibles y no tóxicos, el extracto correspondiente se puede formular directamente en alimentos y bebidas (para seres humanos y animales), así como en productos cosméticos, nutracéuticos, cosméticos, enológicos, aromáticos (fragancias y saborizantes) y farmacéuticos en proporciones de incorporación en el producto acabado que varían de 0,001 a 20% o 0,01 a 20%, preferiblemente de 0,01 a 10% o 0,1 a 10% e idealmente de 0,05 a 5% o 1 a 5%. Los extractos líquidos enriquecidos con compuestos de interés en solución en una mezcla eutéctica también se pueden consumir directamente por vía oral o parenteral, o mediante aplicación tópica, rectal, nasal, auricular, vaginal y/u ocular.

La persona experta comprenderá que todas las referencias en esta memoria a aspectos particulares de la invención incluyen referencias a todas las realizaciones y combinaciones de una o más realizaciones de ese aspecto de la invención. Por lo tanto, todas las realizaciones de aspectos particulares de las invenciones se pueden combinar con una o más realizaciones de ese aspecto de la invención para constituir realizaciones adicionales sin apartarse de la enseñanza de la invención.

## Métodos experimentales

### 1. Preparación de solventes eutécticos

Los diferentes constituyentes de las mezclas eutécticas (glicerol, ácido láctico, ácido cítrico y betaína) se pesan en un matraz Erlenmeyer sin ningún orden en particular. Luego se añade agua del grifo, pero preferiblemente agua desmineralizada o destilada, a una concentración en peso que conservará la integridad físico-química y microbiana, entre el 1 y el 50%, preferiblemente entre el 15 y el 35%, e idealmente representará el 25% en peso de la mezcla. Las mezclas eutécticas elegidas en este documento son betaína:ácido cítrico (2:3, mol), betaína:glicerol (2:3, mol) y betaína:ácido láctico (2:3, mol), cada una conteniendo un 25% en peso en agua, aunque se debe apreciar que se podría usar otra combinación de betaína y donante de enlaces de hidrógeno como se define. La mezcla se calienta a 50 °C +/- 2 °C y se homogeneiza bajo agitación magnética. Una vez que el medio está completamente disuelto y derretido, se coloca a temperatura ambiente y luego se almacena en un recipiente hasta su uso.

### 2. Extracción sólido/líquido por maceración a 50 °C

Se muelen las diversas matrices de plantas previamente secas (p. ej., vegetales) (molinillo manual IKA), con la excepción del romero, luego se sumergen en un solvente convencional (agua, agua/glicerol, agua/ácido láctico, agua/ácido cítrico) o solvente eutéctico (véanse los Ejemplos). Se aplicó una relación del 5% de la matriz de plantas (p. ej., vegetales) (20 mM) para todas las extracciones. La mezcla se calentó a 50 °C durante 2 h bajo agitación magnética en un vaso de precipitados de vidrio de 100 ml. Se realiza una pasada, después de la cual se filtra el medio en caliente a través de un filtro de bolsa o un filtro de placa de 25 µm y luego nuevamente a través de un filtro de placa de 5-7 µm.

### 3. Intensificación de la extracción mediante agua subcrítica

Se muele la matriz de plantas previamente secas (p. ej., vegetales) (molinillo manual IKA), luego se sumerge en agua en un recipiente de reacción de vidrio de 150 ml. Se aplicó una relación del 5% de matriz de plantas (20 M) para las extracciones. Para homogeneizar la temperatura, el reactor se rodea con agua destilada (700 ml) y se coloca en una cavidad de microondas. La extracción se realiza mediante un reactor de microondas de alto rendimiento (1,2 kW, UltraClave, Milestone, Italia). Antes de comenzar la extracción, se elimina el oxígeno colocando el recipiente bajo vacío, luego se espacia el reactor y se satura el medio de reacción en nitrógeno a una presión inicial de 30 bares. La presión y temperatura nominales se alcanzan en virtud del flujo de nitrógeno y del calentamiento del microondas, respectivamente. La temperatura de extracción se ajusta a 125 °C y la presión inicial a 30 bares. Estos dos parámetros están controlados por sensores externos. Cuando la temperatura alcanza el valor nominal de 125 °C (dentro de los 15 minutos en nuestra experiencia), la extracción se realiza durante 30 minutos en una sola pasada. Una vez que se completa la extracción, el medio se filtra en caliente a través de un filtro de bolsa o un filtro de placa de 25 µm y luego nuevamente a través de un filtro de placa de 5-7 µm.

4. Cuantificación de compuestos de interés mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los extractos líquidos así obtenidos se analizan directamente mediante HPLC sin concentración ni secado preliminares.

4.1. Proporción de ácido rosmarínico en los extractos líquidos de romero

5 La cuantificación e identificación del ácido rosmarínico se realiza usando un estándar analítico (Extrasynthèse – referencia: 4957S) y trazando una curva de calibración. El aparato de HPLC Agilent 1100 está equipado con un detector de UV-Visible DAD o equivalente. Se usa un gradiente de elución a través de una mezcla de acetonitrilo de grado HPLC y agua de grado HPLC con una adición de ácido trifluoroacético (TFA) al 99%. Se usan las siguientes condiciones de cromatografía:

10 - columna C18 Zorbax Eclipse XDB, 1,8 µm, 4,6 mm x 50 mm o equivalente.

- Fase móvil:

Tiempo (min)	% acetonitrilo en TFA al 0,1%	% agua en TFA al 0,1%
0	15	85
2	15	85
2,5	18	82
2,7	100	0
3,5	100	0

- Flujo: 2 ml/minuto

- Detección: 328 nm

15 - Temperatura: 60 °C

- Volumen de inyección: 2 µl

- Presión: 210 bares ± 5 bares

Se observaron los siguientes tiempos de retención:

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Ácido rosmarínico	2,0
Luteolina 3-glucurónido	2,3

20 4.2. Proporción de oleuropeína en los extractos líquidos de hojas de olivo:

25 La cuantificación e identificación de oleuropeína se realizan usando un estándar analítico (Extrasynthèse – referencia: 0204) y trazando una curva de calibración. El aparato de HPLC Agilent 1100 está equipado con un detector de UV-Visible DAD o equivalente. Se usa un gradiente de elución a través de una mezcla de acetonitrilo de grado HPLC y agua de grado HPLC con una adición de ácido trifluoroacético (TFA) al 99%. Se usan las siguientes condiciones de cromatografía:

- columna C18 Zorbax Eclipse XDB, 1,8 µm, 4,6 mm x 50 mm o equivalente.

- Fase móvil:

Tiempo (min)	% acetonitrilo + TFA al 0,1%	% agua + TFA al 0,1%
0	20	80
2,6	20	80
2,7	100	0
3,5	100	0

- Flujo: 1,5 ml/minuto

- Detección: 230 nm

- Temperatura: 40 °C

- Volumen de inyección: 2 µl

5 - Presión: 210 bares ± 5 bares

Se observaron los siguientes tiempos de retención:

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
Oleuropeína	2,6

#### 5. Caracterización química de extractos líquidos mediante cromatografía líquida de alta resolución

10 Se aplicaron las condiciones cromatográficas a continuación con el fin de identificar y cuantificar los compuestos presentes en los diversos extractos producidos.

Columna analítica: C18 Atlantis T3 150 x 4,6 mm -5 µm o equivalente

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0,6 ml/min

Presión: 60-100 bares

15 Detección: dependiendo de los compuestos a cuantificar – 350 o 280 nm.

Volumen de inyección: 7 µl

Fase móvil:

A: Acetonitrilo:H<sub>2</sub>O (450/50 v:v) + ácido acético al 0,1%

B: H<sub>2</sub>O + ácido acético al 0,1%

Tiempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
5	5	95
15	5	95
20	70	30
30	80	20

20

#### 6. Prueba de estabilidad

25 Después de obtener las mezclas eutécticas, se monitorizaron sus comportamientos a lo largo del tiempo a tres temperaturas diferentes (4 °C, temperatura ambiente, 50 °C) con el fin de evaluar su impacto en una formulación, por ejemplo, para uso cosmético. Específicamente, en un contexto industrial, un extracto debe ser capaz de mantener su integridad de color durante un proceso industrial y durante el uso por parte de los consumidores.

#### 7. Prueba de eficacia físico-química como antioxidante

30 Se determina la capacidad de los extractos para atrapar peroxi-radicales usando el método de referencia publicado por Ou y cols. Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescent probe: First action 2012.23. Journal of AOAC International, 2013, 96, 1372-1376) en el Journal Oficial AOAC. Para información, la AOAC es la *Asociación de Químicos Oficiales de Agricultura* del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Todas las soluciones tampón de fosfato (pH 7,2) que contienen las concentraciones deseadas de antioxidantes (de 0 a 40 µM) se preparan de manera extemporánea. Se transfieren cincuenta mililitros de cada solución mediante una pipeta multicanal a una microplaca Fluotrac de 96 pocillos (Greiner). Luego cada pocillo se completa con 100 µl de solución tampón de fosfato, pH 7,2, que contiene 35 0,126 µM de sal disódica de fluoresceína. Para mejorar la repetitividad, la microplaca se calienta previamente a 37 °C bajo agitación orbital a 1.200 rpm en un agitador térmico con temperatura controlada (serie PHMT, Grant Instruments

Ltd, Shepreth, Inglaterra) durante 20 minutos. A continuación se añaden 50 µl de solución de AAPH en una solución tampón fosfato recién preparada usando una pipeta multicanal. Finalmente, cada pocillo contiene 200 µl de mezcla final compuesta de sal disódica de fluoresceína 0,063 M, 12,7 mM de AAPH y concentraciones crecientes de antioxidantes (de 0 a 10 µM) en solución de tampón fosfato. Se registra inmediatamente una caída en la fluorescencia a 515 nm ( $\lambda_{ex}$ : 490 nm). Las mediciones se toman a cada minuto durante 2 horas a  $37 \pm 0,1$  °C con 5 segundos de agitación antes de la medición usando un lector de microplacas. Los resultados se calculan luego de acuerdo con Ou y cols. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity using fluorescein as the fluorescent probe. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 4619-4626) en µmol de equivalente Trolox por g de extracto líquido (valor ORAC).

5

## 10 8. Pruebas de eficacia biológica

Todas las pruebas de eficacia se realizaron para concentraciones no citotóxicas de acuerdo con cada tipo celular usado.

### 8.1. Actividad anti-inflamatoria (inhibición de TNF $\alpha$ )

15 La prueba *in vitro* de actividad anti-inflamatoria se basa en la fuerte respuesta anti-inflamatoria que los queratinocitos son capaces de inducir después de la exposición al sol. Se usaron células HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados, Life-Technology, N<sup>o</sup>. P612451, Lote 09543), con un número de pases inferior a 50. Las células se cultivaron en el siguiente medio celular: DMEM con L-glutamina (Dulbecco's Minimum Essential Medium, PAN BIOTECH, Lote 97487) suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml; PAN BIOTECH, Lote 20145241) y con suero de ternera fetal inactivado al 10% (PAN BIOTECH, Lote P440011), pH 7,2.

20 Se estableció un control negativo usando una solución salina (HBSS, SIGMA) y un control positivo usando dexametasona a 10 µM.

25 Se colocaron  $1 \cdot 10^5$  células/ml (500 µl/pocillo) en placas de cultivo de 48 pocillos y se incubaron a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 5%) durante 24 horas. Al final de este periodo de incubación, las células se colocaron en cultivo con un medio libre de suero que contenía los extractos a probar durante 1 hora antes de la estimulación con luz UV. La irradiación se realizó usando un simulador Suntest CPS+ (Atlas Material Testing Technology BV, Moussey le Neuf, Francia) equipado con una lámpara de xenón (1.100 W). La irradiación se ajustó a 750 W/m<sup>2</sup> con una dosis de luz combinada del orden de 15 mJ/cm<sup>2</sup> durante 1 minuto. Las células se volvieron luego a cultivar durante 24 horas.

30 Al final de este periodo de incubación, se recuperó el sobrenadante del cultivo con el fin de medir el TNF-alfa liberado por las células. Se usó el kit de ELISA RAB068 Human TNF-alfa (SIGMA-ALDRICH) para este propósito. Las densidades ópticas (OD) de cada pocillo se midieron luego a 450 nm usando un lector de microplacas Infinite M200 Pro (TECAN). Los resultados obtenidos se compararon luego con el pocillo sin tratar con el fin de expresar la ganancia protectora en relación con el control positivo (en %)

$$\text{Ganancia protectora} = \frac{100 - 100 * (\text{OD media de pocillo prueba} - \text{OD media del control negativo})}{\text{OD media del control positivo} - \text{OD media del control negativo}}$$

### 8.2. Actividad de inhibición de la melanogénesis (efecto hipo-pigmentario)

35 El modelo biológico establecido para esta prueba fue el tipo celular NHEM-LP (para melanocitos humanos ligeramente pigmentados). Estas células se colocaron en cultivo a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% en un medio de M254 suplementado con HMGS-2 (sin PMA), insulina (5 µg/ml), penicilina (50 µg/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y gentamicina (25 µg/ml).

40 En primera instancia, se evaluaron concentraciones no citotóxicas de los extractos eutécticos bajo la prueba. Para este propósito, se probaron diferentes tiempos de incubación. Al completar estas sucesivas estimulaciones, se incubaron las células NHEM-LP con MTT (sal de tetrazolio), que se reduce a cristales de formazán azules por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Se midió la densidad óptica después de las disoluciones de los cristales de formazán por el DMSO usando un lector de microplacas (VERSAmix, Molecular Devices).

45 Los melanocitos se colocaron en cultivo en placas de 24 pocillos durante 24 horas. Se cambió el medio después de 24 horas y se reemplazó por medio que había sido (o no había sido) estimulado previamente. El control positivo consistió en una estimulación de las células por ácido lipoico (5 µg/ml) en presencia de L-tirosina (1 mM). También estaba presente un control (pocillo sin estimular) en la placa. Las células se incubaron después durante 10 días con dos tratamientos nuevos después de 3 y 7 días de incubación. Al final de la incubación, se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificó la síntesis de melanina en las capas celulares. Para este fin, se extrajo la melanina mediante lisis celular usando una solución de NaOH a 0,5 N. La densidad óptica se midió luego a 405 nm. La cuantificación se llevó a cabo usando una curva de calibrado previamente validada de acuerdo con un estándar (curva estándar a partir de 0,39 a 100 µg/ml).

50

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{Media del control estimulado} - \text{Condición de prueba}}{\text{Media del control estimulado} - \text{Media del control no estimulado}} \times 100$$

### 8.3. Efectos foto-protectores

Se usó la prueba *in vitro* para evaluar el efecto foto-protector para identificar compuestos o extractos que tienen propiedades foto-protectoras en términos de la viabilidad celular de las células expuestas a una dosis citotóxica de radiación solar.

5 Se usaron dos protocolos:

- Tratamiento previo de las células con el extracto bajo prueba antes de la exposición a la radiación solar,
- Tratamiento posterior de las células con el extracto después de la exposición a la radiación solar.

10 La citotoxicidad se midió 24 horas después de la exposición usando rojo neutro que es un colorante catiónico débil que penetra en las membranas celulares y se acumula en los lisosomas intracelulares. Esta prueba *in vitro* se llevó a cabo en una línea celular de queratinocitos HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados, Life-Technology, N<sup>o</sup>. P6110401, Lote 091006) con un número de pases inferior a 50. Las células se cultivaron en el siguiente medio:

DMEM con L-glutamina (Dulbecco's Minimun Essential Medium, PAN BIOTECH. Lote 5530513) suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml; PAN BIOTECH, Lote 9230112) y con suero de ternera fetal inactivado al 10%, (PAN BIOTECH, Lote P290907), pH 7,2.

15 Se estableció un control negativo usando una solución salina (HBSS, SIGMA) y un control positivo usando Trolox (SIGMA) a concentraciones de 10, 20 y 50 µg/ml.

20 Se colocaron 1.10<sup>5</sup> células/ml (500 µl/pocillo) en placas de cultivo de 48 pocillos y se incubaron a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 5%) durante 24 horas. En el protocolo de tratamiento previo, el medio de cultivo se reemplazó con 100 µl de solución salina que contenía el extracto a diferentes concentraciones, en contacto con las células durante 1 hora a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 5%). Al final de este periodo de incubación, se retiró la estimulación para ser reemplazada por 100 µl de HBSS. La irradiación se realizó usando un simulador Suntest CPS+ (Atlas Material Testing Technology BV, Moussey le Neuf, Francia) equipado con una lámpara de xenón (1.100 W). La irradiación se ajustó a 750 W/m<sup>2</sup> con una dosis de luz combinada del orden de 20 mJ/cm<sup>2</sup> durante 4 minutos. Las células se reemplazaron luego en cultivo durante 18-22 horas en el medio de cultivo acostumbrado. En el protocolo después del tratamiento, el medio de cultivo se reemplaza por 100 µl de solución salina HBSS. La irradiación se realizó luego usando un simulador Suntest CPS+ (Atlas Material Testing Technology BV, Moussey le Neuf, Francia) equipado con una lámpara de xenón (1.100 W). La irradiación se ajustó a 750 W/m<sup>2</sup> con una dosis de luz combinada del orden de 20 mJ/cm<sup>2</sup> durante 4 minutos. Luego se estimularon las células usando extractos con diferentes concentraciones no citotóxicas y se reemplazaron en cultivo durante 18-22 horas en el medio de cultivo acostumbrado.

30 En ambos protocolos, después de 18-22 horas de incubación, las células se lavaron y luego se colocaron en un medio que contenía 50 µg/ml de rojo neutro y se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 3 horas. Luego se retiró el medio para lavar las células y se eliminó el exceso de rojo neutro. Se añadió una solución decolorante (etanol al 50%, ácido acético al 1%, agua destilada 49%; 50 µl/pocillo) a las células. Las placas de 48 pocillos se agitaron luego durante 15-20 minutos a temperatura ambiente lejos de la luz. El grado de daño de la membrana celular (aumento en la liberación de rojo neutro) se midió a 540 nm usando un lector de microplacas Infinite M200 Pro (TECAN). Luego se midieron las densidades ópticas (OD) de cada pocillo. Los resultados obtenidos se compararon luego con el pocillo sin tratar (HBSS, 100% de viabilidad celular) con el fin de expresar la ganancia de protección en relación con el control positivo (en %):

Ganancia de protección (%) = % de viabilidad celular del pocillo de prueba - % de viabilidad celular del pocillo irradiado

### 8.4. Inhibición de la liberación de metaloproteinasas de matriz tipo 1 (efecto protector frente al foto-envejecimiento)

40 Las metaloproteinasas de matriz tipo 1 son colagenasas intersticiales implicadas en varios mecanismos fisiológicos de remodelamiento tisular. Son responsables, entre otras cosas, de romper la arquitectura y la organización del tejido cutáneo en respuesta a los rayos UV en el foto-envejecimiento.

45 La prueba *in vitro* anti-MMP-1 está basada en la capacidad de los queratinocitos de liberar MMP-1 después de la estimulación por luz UV. Se usaron las células HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados, Life-Technology, N<sup>o</sup>. P6110401, Lote 091006), con un número de pases inferior a 50, en el siguiente medio:

DMEM con L-glutamina (Dulbecco's Minimun Essential Medium, PAN BIOTECH. Lote 97487) suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (100 µg/ml; PAN BIOTECH, Lote 20145241) y con suero de ternera fetal inactivado al 10%, (PAN BIOTECH, Lote P440011), pH 7,2.

Se estableció un control negativo usando una solución salina (HBSS, SIGMA) y un control positivo usando ácido ascórbico (25 µM).

5 Se colocaron  $1.10^5$  células/ml (500 µl/pocillo) en placas de cultivo de 48 pocillos y se incubaron a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 5%) durante 24 horas. Al final de este periodo de incubación, las células se colocaron en cultivo con un medio libre de suero que contenía los extractos bajo prueba durante 1 hora precediendo a la estimulación con luz UV. La irradiación se realizó usando un simulador Suntest CPS+ (Atlas Material Testing Technology BV, Moussey le Neuf, Francia) equipado con una lámpara de xenón (1.100 W). La irradiación se ajustó a 750 W/m<sup>2</sup> con una dosis de luz combinada del orden de 15 mJ/cm<sup>2</sup> durante 1 minuto. Las células se volvieron a cultivar durante 24 horas.

10 Al final de este periodo de incubación, se recuperó el sobrenadante del cultivo con el fin de medir la MMP-1 liberada por las células. Para este propósito se usó un kit de ELISA RayBio Human MMP-1 (SIGMA-ALDRICH). Las densidades ópticas (DO) de cada pocillo se midieron luego a 450 nm usando un lector de placas Infinite M200 Pro (TECAN). Los resultados obtenidos se compararon luego con el pocillo sin tratar con el fin de expresar la ganancia de protección en % en relación con el control positivo:

$$\text{Ganancia de protección} = \frac{100 - 100^* (\text{OD media de pocillo prueba} - \text{OD media del control negativo})}{\text{OD media del control positivo} - \text{OD media del control negativo}}$$

#### 8.5. Activación de la síntesis de colágeno

15 El colágeno es una proteína estructural principal de la matriz extracelular, desempeñando un papel en el mantenimiento de la integridad de la piel, en particular, le da a la piel su longevidad y densidad y le confiere un aspecto saludable y juvenil. La prueba de medición de colágeno proporciona un medio para cuantificar el colágeno soluble en la matriz extracelular sintetizado dentro de las células de la piel tratadas con los extractos a evaluar. El colágeno se detectó a través de la prueba de Sircol (Biocolor, Reino Unido), usando así la capacidad de tinción y unión de Rojo Sirio sobre los residuos de hidroxiprolina.

20 Se colocaron en cultivo células de fibroblastos humanos primarios (Biopredic), con un número de pases inferior a 5, en el siguiente medio:

25 DMEM con L-glutamina (Dulbecco's Minimum Essential Medium, PAN BIOTECH. Lote 5842156) suplementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml; PAN BIOTECH, Lote 9870214) y con suero de ternera fetal inactivado al 10%, (PAN BIOTECH, Lote P342518), pH 7,2.

Se estableció un control negativo usando una solución salina (HBSS, SIGMA) y un control positivo usando ácido ascórbico (50 µg/ml).

30 Se colocaron  $1.10^5$  células/ml (1.000 µl/pocillo) en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 5%) durante 24 horas hasta alcanzar la confluencia. Al final de este periodo de incubación, las células se colocaron en cultivo con un medio libre de suero que contenía los extractos bajo prueba durante 72 horas a diferentes concentraciones. Luego se aplicó el protocolo de detección que usa el método de Sircol. De modo más preciso, se recoge el medio de cultivo para centrifugar con 100 µl de polietilén glicol en tampón TRIS-HCl (pH 7,6) y luego se incubó durante toda la noche entre 0 y 4 °C. Luego se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm durante 10 minutos con el fin de recuperar los sobrenadantes para la adición de 1 ml de reactivo colorante de Sircol. Después de la agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente, los tubos se volvieron a centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos. Después de la eliminación del sobrenadante se añadieron 750 µl de reactivo que contenía una mezcla de ácido acético/cloruro sódico/detergente. Después de volver a centrifugar, se eliminó el sobrenadante para la adición de 250 µl de un reactivo alcalino (hidróxido sódico a 0,5 M). Después de la agitación, se transfirieron 200 µl de cada pocillo a una microplaca de 96 pocillos con el fin de medir las absorbancias a 555 nm en un lector de microplacas Infinite M200 Pro (TECAN). Los resultados obtenidos se compararon luego con el pocillo sin tratar con el fin de expresar la ganancia de protección en relación con el control positivo (en %):

$$\text{Ganancia de colágeno (\%)} = \frac{(\text{OD media de pocillo prueba} - \text{OD media del control negativo}) - (\text{OD media del control positivo} - \text{OD media del control negativo})}{(\text{OD media del control positivo} - \text{OD media del control negativo})}$$

#### Figuras

45 La Figura 1 muestra los resultados obtenidos del Ejemplo 1 como se describe a continuación como un diagrama de fase binario entre el monohidrato de betaína y el ácido láctico (donante de enlaces de hidrógeno). Las proporciones de monohidrato de betaína y ácido láctico se dan en % de moles.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos del Ejemplo 2 como se describe a continuación como un diagrama de fase binario entre el monohidrato de betaína y el glicerol (donante de enlaces de hidrógeno). Las proporciones de monohidrato de betaína y glicerol se dan en % de moles.



La Figura 3 muestra los resultados obtenidos del Ejemplo 3 como se describe a continuación como un diagrama de fase binario entre el monohidrato de betaína y el ácido cítrico (donante de enlaces de hidrógeno). Las proporciones de monohidrato de betaína y ácido cítrico se dan en % de moles.

5 La Figura 4 muestra los resultados obtenidos a partir del Ejemplo 5 como se describe a continuación, como muestra el rendimiento de recuperación del ácido rosmarínico dependiendo del fluido de extracción compuesto de agua y/o betaína y/o ácido láctico.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos a partir del Ejemplo 6 como se describe a continuación, como muestra el rendimiento de recuperación del ácido rosmarínico dependiendo del fluido de extracción compuesto de agua y/o betaína y/o glicerol.

10 La Figura 6 muestra el perfil cromatográfico (LC/UV, 230 nm) obtenido a partir de los extractos líquidos de romero obtenidos en el Ejemplo 7 como se describe a continuación, donde 1 es un compuesto no identificado, 2 es ácido rosmarínico, 3 es luteolina-3-*O*-glucorónido, 4 es el isómero luteolina-3'-(4<sup>o</sup>-acetilglucorónido), 5 es rosmanol, 6 es carnosol y 7 es carnosato de metilo. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usó el solvente eutéctico para la extracción y el trazo gris es el resultado obtenido cuando se usó agua:glicerol para la extracción.

15 La Figura 7 muestra las capacidades antioxidantes de los extractos líquidos de romero obtenidos en el Ejemplo 7 como se describe a continuación, expresados como valor ORAC ( $\mu\text{mol}$  de eq Trolox /g de muestra) para la *Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno*.

La Figura 8 muestra el rendimiento de recuperación de oleuropeína de las hojas de olivo dependiendo del fluido de extracción compuesto de agua y/o betaína y/o glicerol como se describe en el Ejemplo 8 a continuación.

20 La Figura 9 el rendimiento de recuperación de oleuropeína de las hojas de olivo usando agua subcrítica como se describe en el Ejemplo 10.

25 La Figura 10 muestra los perfiles cromatográficos (LC/UV, 280 nm) de los extractos líquidos de hojas de olivo obtenidos en el Ejemplo 11 usando betaína:glicerol:agua o hidroglicerina como el solvente de extracción. 1 es hidroxitirosol, 2 es Luteolina-7-*O*-glucósido, 3 no está identificado, 4 es Luteolina-glucósido, 5 es Oleuropeína y 6 es el isómero de Oleuropeína. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usó el solvente eutéctico para la extracción y el trazo gris es el resultado cuando se usó agua:glicerol para la extracción.

Las Figuras 11A y 11B muestran la ganancia de colágeno (A) y la ganancia de protección (B) lograda por las células después de la incubación celular con extractos líquidos de hojas de olivo obtenidos en el Ejemplo 11 usando diferentes solventes de extracción. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t.

30 La Figura 12 muestra los perfiles cromatográficos (LC/UV, 350 nm) de los extractos líquidos de flor de cerezo obtenidos en el Ejemplo 12 usando betaína:glicerol:agua, betaína:ácido láctico:agua o hidroglicerina como el solvente de extracción. 1 es Cafeoil glucósido, 2 es Ácido clorogénico, 3 es Cumaroil glucósido, 4 es Rutina, 5 es Kaempferol rutinósido, 6 es ácido dicafeoil quínico, 7 no está identificado, 8 es Isoramnetina, 9 es el Flavonoide C17H14O7 y 10 es el Flavonoide C18H16O8. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usaron los solventes eutécticos para la extracción y el trazo gris es el resultado cuando se usó agua:glicerol para la extracción.

35 Las Figuras 13A, 13B, 13C y 13D muestran la foto-protección después de la irradiación UV (A), la inhibición de la liberación de metaloproteinasas de matriz tipo 1 (MMP-1) (B), la actividad anti-inflamatoria frente a  $\text{TNF}\alpha$  (C), la síntesis de colágeno (D) después de la exposición celular a extractos líquidos de flor de cerezo en base a los extractos líquidos de flor de cerezo obtenidos en el Ejemplo 12. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t.

40 Las Figuras 14A, 14B, 14C y 14D muestran la foto-protección después de la irradiación UV a través de la síntesis de la proteína de unión estrecha ZO-1 (A), la síntesis de loricrina (B), y la actividad antioxidante previa al reclutamiento celular de la vía DJ-1/NRF2 (C y D) después de la exposición del explante de piel humana a extractos líquidos de flor de cerezo en base a los extractos líquidos de flor de cerezo obtenidos en el Ejemplo 12. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t.

45 La Figura 15 muestra los perfiles cromatográficos (LC/UV, 280 nm) de los extractos líquidos de cola de caballo obtenidos en el Ejemplo 13 usando betaína:ácido láctico:agua o hidroglicerina como el solvente de extracción. 1 es un fenólico no identificado, 2 es un alcaloide no identificado, 3 es Kaempferol dihexósido ramnósido, 4 es ácido cafeoil tartárico, 5 es el isómero del ácido cafeoil tartárico, 6 es ácido faseólico, 7 es Gosupitrina, 8 es Protogenkwuanin-4'-*O*-glucósido, 9 es ácido cumárico, 10 es un derivado de ácido ferúlico, 11 no está identificado, 12 no está identificado y 13 es Kaempferol trihexósido ramnósido. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usaron los solventes eutécticos para la extracción y el trazo gris es el resultado cuando se usó agua:glicerol para la extracción.

50 La Figura 16 muestra la actividad anti-inflamatoria de extractos de cola de caballo obtenidos en el Ejemplo 13 usando diferentes solventes de extracción mostrando la inhibición de la liberación de TNF-alfa después de la exposición a luz UV de queratinocitos HaCaT.

La Figura 17 muestra las capacidades antioxidantes de los extractos líquidos de cola de caballo obtenidos en el Ejemplo 13 usando diferentes solventes de extracción, expresados como valor ORAC ( $\mu\text{mol}$  de eq Trolox /g de muestra) para la *Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno*.

5 La Figura 18 muestra los perfiles cromatográficos (LC/UV, 280 nm) de los extractos líquidos de hinojo (roca de San Pedro) obtenidos en el Ejemplo 14 usando betaína:glicerol:agua o hidroglicerina como solvente de extracción. 1 es ácido 3-cafeoilquinico, 2 es ácido 5-cafeoilquinico, 3 es ácido 4-cafeoilquinico, 4 es ácido 1-cafeoilquinico, 5 es ácido 5-p-cumaroilquinico, 6 es ácido 5-feruloilquinico, 7 es Rutina, 8 es Quercetin-3-O-glucósido, 9 el isómero del ácido dicafeoilquinico y 10 es una Flavona no identificada. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usaron los solventes eutécticos para la extracción y el trazo gris es el resultado cuando se usó agua:glicerol para la extracción.

10 La Figura 19 muestra la inhibición de la síntesis de melanina después de la exposición a extractos líquidos de hinojo obtenidos en el Ejemplo 14 usando diferentes solventes de extracción sobre melanocitos de piel humana ligeramente pigmentada (estimulados en presencia de L-tirosina 1 mM).

15 La Figura 20 muestra los perfiles cromatográficos (LC/UV, 350 nm) de los extractos líquidos de plátano obtenidos en el Ejemplo 15 usando betaína:glicerol:agua o hidroglicerina como solvente de extracción. 1 es cistanósido, 2 es hidroxiverbascósido, 3 es dihidroxiverbascósido, 4 es el isómero del hidroxiverbascósido, 5 es feniletanoid glucósido, 6 es verbascósido, 7 es isoverbascósido, 8 es diglucurónido de luteolina, 9 es glucurónido de luteolina y 10 es Scutellareína. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usaron los solventes eutécticos para la extracción y el trazo gris es el resultado cuando se usó agua:glicerol para la extracción.

20 La Figura 21 muestra los perfiles cromatográficos (LC/UV, 350 nm) de los extractos líquidos de flores de azafrán obtenidos en el Ejemplo 16 usando betaína:ácido láctico:agua o hidroglicerina como solvente de extracción. 1 es Kaempferol-3-O-soforósido-7-O-glucósido, 2 es Kaempferol-3-O-soforósido, 3 es Kaempferol-3-O-lactil-soforósido, 4 es el isómero de Kaempferol-3-O-lactil-soforósido y 5 es Kaempferol glicosil-gliceril ramnosilo. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usaron los solventes eutécticos para la extracción y el trazo gris es el resultado cuando se usa agua:glicerol para la extracción.

25 La Figura 22 muestra la inhibición de la síntesis de melanina (A) y de la liberación de metaloproteinasas de matriz tipo 1 (MMP-1) (B) por extractos líquidos de flores de azafrán obtenidos en el Ejemplo 16 usando diferentes solventes de extracción (a continuación de la exposición a la luz UV de las células). \*\*\* $p < 0,001$ , prueba t.

30 La Figura 23 muestra los perfiles cromatográficos (LC/UV, 280 nm) de los extractos líquidos de rosa de Jericó obtenidos en el Ejemplo 17 usando betaína:glicerol:agua, betaína:ácido láctico:agua o hidroglicerina como solvente de extracción. 1 no está identificado, 2 es ácido protocatecuico, 3 es Piceína, 4 no está identificado, 5 es Taxifolina, 6 es Taxifolina metil éter, 7 Silibina y 8 Isosilibina. El trazo negro son los resultados obtenidos cuando se usaron los solventes eutécticos para la extracción y el trazo gris es el resultado cuando se usa agua:glicerol para la extracción.

35 La Figura 24 muestra la inhibición de la síntesis de melanina después de la exposición a extractos líquidos de rosa de Jericó obtenidos en el Ejemplo 17 usando diferentes solventes de extracción sobre melanocitos de piel humana ligeramente pigmentados (estimulados en presencia de L-tirosina 1 mM). \*\*\*\* $p < 0,001$ , prueba t.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos son meramente ejemplos ilustrativos de los procesos de la invención descritos en esta memoria. Todo el equipamiento, reactivos y solventes usados eran equipamiento estándar de laboratorio, p. ej., artículos de vidrio, aparato de calentamiento y aparato de HPLC.

40 Se debe tener en cuenta que estos ejemplos muestran una sinergia de extracción para una relación de betaína:donante de enlaces de hidrógeno de 2:3. Sin embargo, cuando los valores obtenidos se redondean a enteros, la relación 2:3 se convierte en 1:2.

Ejemplo 1. Criticidad de la relación molar de la mezcla binaria de betaína:ácido láctico

Tabla 1. Aspecto visual de las mezclas binarias de betaína:ácido láctico dependiendo de la relación molar

Betaína (%)	Ácido láctico (%)	Claridad
70	30	Formación inmediata de un precipitado
60	40	Formación inmediata de un precipitado
50	50	Formación de cristales después de una semana
40	60	Líquida y clara
30	70	Líquida y clara
20	80	Formación de cristales después de un día

5 Cuando se varían las proporciones molares de betaína y ácido láctico, se observa un estrecho intervalo de composición entre 40:60 y 30:70, respectivamente, para el que la mezcla es clara. Por debajo y por encima de este umbral, la mezcla presenta características de medios inestables con formación de cristales inmediatamente después de la mezcla (relaciones molares de betaína:ácido láctico de 70:30, 60:40 y 50:50) o después del almacenamiento de una semana a temperatura ambiente (relación 20:80). Es interesante observar que este intervalo de composición corresponde exactamente a la aparición de una disminución máxima del punto de fusión en el diagrama de fase de la mezcla (Figura 1). Esta disminución máxima (o punto eutéctico) se debe al complejo fenómeno de la eutectigénesis de la que, para nuestro conocimiento, nunca se ha aclarado el mecanismo de acción para las mezclas de betaína y donantes de enlaces de hidrógeno. Sin embargo, se puede avanzar en la hipótesis de que los ensamblajes supramoleculares formados por el establecimiento de enlaces de hidrógeno y/o iónicos entre la betaína y el ácido láctico son conducentes a un reordenamiento de la red molecular al aumentar el volumen del espacio vacío. La Figura 1 muestra claramente que la eutectigénesis se da para una relación de betaína:ácido láctico alrededor de 33:66, lo que implica que una molécula de betaína interacciona de forma no covalente con dos moléculas de ácido láctico. Por lo tanto, se entenderá que una relación que se desvía de este equilibrio da lugar a la desestabilización de la mezcla y a un aumento considerable en el punto de fusión. Por lo tanto, para fines de extracción, es necesario usar mezclas molares precisamente entre 50:50% y 30:70%, preferiblemente entre 40:60 y 30:70% de betaína y ácido láctico, respectivamente. Estas relaciones molares tienen puntos de fusión entre temperatura ambiente y -40 °C y son preferiblemente líquidas y claras a temperatura ambiente y a 50 °C, que es un requisito previo para su uso como fluido de extracción.

20 Ejemplo 2. Criticidad de relación molar de la mezcla binaria betaína:glicerol

Tabla 2. Aspecto visual de las mezclas binarias de betaína:glicerol dependiendo de la relación molar

Betaína (%)	Glicerol (%)	Apariencia visual
70	30	Formación inmediata de precipitado después de la cristalización
60	40	Formación inmediata de precipitado después de la cristalización
50	50	Formación inmediata de precipitado después de la cristalización
40	60	Líquida y clara
30	70	Líquida y clara
20	80	Líquida y clara

25 La observación macroscópica de las mezclas de betaína:glicerol con diferentes relaciones molares muestra que se necesita un mínimo de 60% de glicerol para obtener una mezcla clara que se pueda usar en la extracción sólido/líquido (Tabla 2). Las relaciones molares de betaína:glicerol de 70:30, 60:40 y 50:50 dan lugar todas a la formación inmediata de partículas sólidas visibles a simple vista que desestabilizan el medio y después se cristalizan rápidamente. Estos resultados también se confirman mediante el diagrama de fase de esta mezcla que indica un punto eutéctico para una relación de betaína:glicerol de 40:60 respectivamente (Figura 2). La criticidad de la eutectigénesis para formar una mezcla clara no es fortuita y probablemente ocurre como resultado, como en el Ejemplo 1, de ensamblajes supramoleculares característicos de mezclas eutécticas que solo se pueden formar en proporciones cuantitativas precisas entre las especies moleculares involucradas. En el ejemplo dado en esta memoria, una molécula de monohidrato de betaína interacciona con dos moléculas de glicerol, como se muestra en la Figura 2. Finalmente, la adición de glicerol al 60% hace posible reducir el punto de fusión de la betaína y obtener una mezcla eutéctica líquida hasta -40 °C.

35 Ejemplo 3. Ausencia de criticidad de la relación molar de la mezcla binaria betaína:ácido cítrico

Tabla 3. Apariencia visual de las mezclas binarias de betaína:ácido cítrico dependiendo de la relación molar

Betaína (%)	Ácido cítrico (%)	Claridad
70	30	Formación de cristales después de una semana
60	40	Formación de cristales después de una semana
50	50	Formación de cristales después de una semana
40	60	Formación de cristales después de una semana
30	70	Formación de cristales después de una semana
20	80	Formación inmediata de cristales

A diferencia de las mezclas descritas en los ejemplos 1 y 2, las mezclas binarias de betaína:ácido cítrico no presentan criticidad con respecto a la relación molar y la apariencia macroscópica. Como se puede ver en la Tabla 3, prácticamente todos los intervalos de composición de la mezcla dan lugar a la cristalización de medios inestables después de una semana. Su uso para fines de extracción sistemáticamente dio lugar a la formación de masa, ya sea de la mezcla sola o de la mezcla con el material biológico, o incluso con el extracto líquido después de la filtración. No obstante, la Figura 3 muestra que se obtiene una disminución del punto de fusión a lo largo de un amplio intervalo de composición en comparación con los constituyentes puros tomados de forma aislada. En virtud de este hecho, satisfacen uno de los criterios esenciales de las mezclas eutécticas. Este ejemplo no solo ilustra la dificultad de obtener mezclas eutécticas estables a partir de betaína, sino que también establece que no todos los solventes eutécticos son adecuados para la extracción sólido/líquido al contrario de lo que se sugiere a menudo en la literatura.

Ejemplo 4. Prueba para obtener varias mezclas eutécticas y estudio de estabilidad a 50 °C.

Las pruebas de estabilidad, particularmente a 50 °C, hicieron posible resaltar la inestabilidad y el deterioro de ciertas mezclas eutécticas, por ejemplo, aquellas que comprenden al menos un azúcar entre glucosa, fructosa, sacarosa y sus mezclas.

Tabla 4. Monitorización de la estabilidad de mezclas eutécticas que incluyen al menos un azúcar.

Mezclas eutécticas (relación molar)	Apariencia visual en la formación	Apariencia visual después de 1 semana a 50 °C	Apariencia visual después de 2 semanas a 50 °C
Sacarosa/glicina/agua (1:1:6); (1:1:10)	-	/	/
Fructosa/glicina/agua (1:1:4); (2:1:10)	-	/	/
Fructosa/cloruro de colina/agua (1:1:4)	+	-	-
Fructosa/ácido cítrico/agua (1:1:6)	+	---	
Fructosa/ácido láctico/agua (1:1:6)	+	--	---
Sacarosa/cloruro de colina/agua (1:1:10)	-	/	/

+: estable, sin color; - : inestable, cristalización; -- : inestable, color amarillo/naranja; --- : inestable, color marrón

Ejemplo 5. Influencia de la eutectigénesis en la capacidad de la mezcla ternaria betaína:ácido láctico:agua de extraer ácido rosmarínico del romero

Los resultados presentados en este ejemplo muestran claramente la sinergia obtenida después de la formación de la mezcla eutéctica (Figura 4). En particular, la tasa de recuperación de ácido rosmarínico extraído a partir del romero en condiciones de maceración a 50 °C durante 2 horas en un paso es máxima para la mezcla eutéctica ternaria betaína:ácido láctico:agua (2:3, mol; 25% en peso de agua). La relación molar entre la betaína y ácido láctico es equivalente en esta memoria a aquella para la que se formó una eutéctica en el ejemplo 1. La adición de un 25% de agua a la mezcla hace posible mantener los complejos supramoleculares responsables de la sinergia, al tiempo que reduce considerablemente la viscosidad de la mezcla para facilitar el método de extracción. Además, las extracciones control con agua y con mezclas binarias de agua:betaína y de agua:ácido láctico (realizadas en las mismas condiciones y con la misma concentración en peso de betaína o ácido láctico) muestran que la sinergia solo se obtiene cuando se coloca el romero en presencia de la mezcla eutéctica. Esto último proporciona una mejora espectacular en el rendimiento de extracción de ácido rosmarínico de alrededor de 47, 31 y 2,5 veces con respecto al agua y a mezclas de agua:betaína y agua:ácido láctico, respectivamente.

Ejemplo 6. Influencia de la eutectigénesis en la capacidad de la mezcla ternaria betaína:glicerol:agua para extraer ácido rosmarínico del romero

El Ejemplo 6 muestra la sinergia obtenida con la mezcla eutéctica ternaria de betaína y glicerol (a una relación molar de 2:3) con 25% en peso de agua en el rendimiento de ácido rosmarínico extraído del romero en condiciones de maceración a 50 °C durante 2 horas (Figura 5). La relación molar entre betaína y glicerol es equivalente a aquella para la que se formó un eutéctico en el ejemplo 2. La adición de un 25% de agua a la mezcla permite mantener los complejos supramoleculares responsables de la sinergia mientras se reduce considerablemente la viscosidad de la mezcla para facilitar el método de extracción. Además, las extracciones control con agua y con mezclas binarias de agua:betaína y agua:glicerol (realizadas en las mismas condiciones y con la misma concentración en peso de betaína o glicerol)

muestran que la sinergia solo se obtiene cuando el romero se coloca en presencia de la mezcla eutéctica. Este último proporciona una mejora espectacular en el rendimiento de extracción del ácido rosmarínico de aproximadamente 22 veces en relación con el agua y 15 veces en relación con mezclas de agua:betaína y de agua:glicerol, respectivamente.

5 Ejemplo 7. Comparación de los perfiles químicos y de la actividad antioxidante de extractos de romero obtenidos usando una mezcla ternaria de betaína:ácido láctico:agua o una mezcla de hidroglicerina como solvente de extracción.

10 Como se muestra en la Figura 6, el perfil del extracto de romero obtenido con la mezcla eutéctica de betaína:ácido láctico:agua es mucho más rica en diterpenos (141 vs. 8 µg/ml), compuestos fenólicos (850 vs. 232 µg/ml) y ácido rosmarínico (340 vs. 3 µg/ml) que el de los extractos de hidroglicerina. Por consiguiente, los extractos eutécticos enriquecidos con los compuestos de interés, en particular con antioxidantes polifenólicos, exhiben una actividad antioxidante considerablemente mayor que los extractos de hidroglicerina (Figura 7). Esta actividad se determinó usando una prueba de referencia para medir la capacidad antioxidante (es decir, la *Capacidad de Absorbancia del Radicales de Oxígeno* o el método ORAC).

15 Se observó, entre otras cosas, la presencia de una alta concentración de ácido rosmarínico en el extracto eutéctico de romero en cuestión (betaína:ácido láctico:agua). Esta molécula presenta la característica estructural particular de tener dos núcleos de catecol (*orto*-difenoles) que tienen una estructura molecular óptima en términos de actividad antioxidante, ya que promueven el establecimiento de un enlace de hidrógeno intramolecular entre los hidroxilos fenólicos. También se ha demostrado en la Tabla 5 que era posible el desarrollo a escala industrial de este método para obtener extractos eutécticos y, además, produjo resultados comparables a los observados con el método a escala de laboratorio, que es un criterio importante en términos de la reproducibilidad del método reivindicado en la presente invención.

Tabla 5

Lote	Ác. rosmarínico (µg/ml)	Diterpenos totales (µg/ml)	Fenólicos (µg/ml)
Agua:glicerol (50:50; p:p)	2,7	8,1	232,1
Betaína:ác. láctico (40:60; mol:mol) + agua (25% en p) (escala de laboratorio)	399,8	141,3	849,8
Betaína:ác. láctico (40:60; mol:mol) + agua (25% en p) (escala industrial)	327,8	156,6	784,2

Además, los diversos resultados muestran el potencial de los extractos eutécticos de romero para aplicaciones cosméticas, alimentarias (humanas y animales), farmacéuticas o nutraceuticas, como agentes antioxidantes.

25 Ejemplo 8. Influencia de la eutectigénesis en la capacidad de la mezcla ternaria de betaína:glicerol:agua para extraer oleuropeína a partir de hojas de olivo.

30 Los resultados presentados en este ejemplo muestran la sinergia obtenida después de la formación de la mezcla eutéctica entre betaína y glicerol (para una relación molar de 2:3) con un 25% en peso de agua (Figura 8). La relación molar de betaína:glicerol es equivalente a aquella para la que se formó un eutéctico en el ejemplo 2. La adición de un 25% de agua a la mezcla hace posible mantener los complejos supramoleculares responsables de la sinergia mientras reduce considerablemente la viscosidad de la mezcla para facilitar el método de extracción. Además, las extracciones control con mezclas binarias de agua:betaína (65:35, en peso) y de agua:glicerol (60:40, en peso), aunque se realizan en las mismas condiciones y en las mismas concentraciones en peso, muestran que la sinergia solo se obtiene cuando se colocan las hojas de olivo en presencia de la mezcla eutéctica. Esto último proporciona una mejora espectacular en la recuperación de oleuropeína (entre 2,8 y 9 veces) en relación con mezclas de agua:betaína y agua:glicerol, y con agua, respectivamente.

35 Ejemplo 9. Influencia de la eutectigénesis en la capacidad de la mezcla ternaria de betaína:glicerol:agua para mejorar la eficacia de extracción.

40 Se realizaron los siguientes experimentos de extracción con diversos glicoles. El término "glicol" en este ejemplo se refiere al uso de pentilén glicol, propanediol (Zemea®) y propilén glicol. En las siguientes extracciones se usaron varias especies de plantas, que incluyen hojas de romero, hojas de olivo, partes aéreas de *Selaginella pulvinata* y partes aéreas de *Tillandsia usnoides*.

Tabla 6: Hojas de olivo

Lote	Oleuropeína (µg/ml)
Agua:propilén glicol (55:45 (2 mol); p:p)	2.000
Betaína:propilén glicol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	3.100
Agua:propanediol (55:45 (2 mol); p:p)	1.000
Betaína:propanediol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	2.800
Agua:glicerol (50:50; p/p)	447,7

Tabla 7. Hojas de romero

Lote	Ácido rosmarínico (µg/ml)
Agua:propilén glicol (55:45 (2 mol); p:p)	520
Betaína:propilén glicol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	650
Agua:propanediol (55:45 (2 mol); p:p)	450
Betaína:propanediol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	840
Agua:pentilén glicol (50:50 (2 mol); p:p)	89
Betaína:pentilén glicol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	590
Agua:glicerol (50:50;p:p)	2,7

5

Tabla 8. Partes aéreas de Selaginella pulvinata

Lote	Amentoflavona (µg/ml)
Betaína:propilén glicol (1:2; mol:mol) + agua (20% en peso)	93,7
Betaína:propanediol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	74,3
Betaína:pentilén glicol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	169,0
Agua:glicerol (50:50; p/p)	4,4

Tabla 9. Partes aéreas de Tillandsia usnoides

Lote	Fenólicos totales (µg/ml)
Betaína:propanediol (1:2; mol:mol) + agua (20% en peso)	349,6
Betaína:pentilén glicol (1:2; mol:mol) + agua (20% en p.)	406,3
Agua:glicerol (50:50; p/p)	324,0

10 Ejemplo 10. Comparación de agua subcrítica y mezclas eutécticas para la extracción de oleuropeína a partir de hojas de olivo

15 Se comparó el método de extracción mediante eutectigénesis con una tecnología de extracción de última generación, como el agua subcrítica, que consiste en una fase acuosa sobrecalentada a 125 °C y que se mantiene líquida aplicando una presión de 30 a 45 bares. La Figura 9 muestra que las mezclas eutécticas ternarias compuestas de betaína y ácido láctico o glicerol (2:3 mol) con un 25% en peso de agua producen más oleuropeína a partir de una matriz de planta (p. ej., vegetales) como hojas de olivo que el agua subcrítica. Este resultado es interesante porque la

oleuropeína, como la mayoría de los compuestos fenólicos, es sensible al calor y, por lo tanto, está sometida a termoxidación. Además, a partir del punto de vista de la eco-extracción y la química verde, es ventajoso reducir tanto la temperatura como la presión del proceso con el fin de ahorrar energía y poner en práctica procesos respetuosos con el medio ambiente.

- 5 Ejemplo 11. Comparación de los perfiles químicos y la actividad biológica de los extractos de hoja de olivo obtenidos usando una mezcla ternaria de betaína:glicerol:agua o una mezcla de hidroglicerina como solvente de extracción.

Los perfiles cromatográficos que se muestran en la Figura 10 indican las mayores concentraciones activas de plantas (p. ej., vegetales) de los extractos eutécticos (betaína:glicerol:agua) en comparación con los extractos de hidroglicerina. Este resultado es particularmente sorprendente para la oleuropeína. A escala de laboratorio, la adición de betaína en una mezcla de agua:glicerol hace posible, en virtud del fenómeno de eutectigénesis mostrado en el Ejemplo 2, triplicar (o cuadruplicar) la concentración de oleuropeína. Cuando el proceso de extracción mediante eutectigénesis se transfiere a escala industrial (como se muestra en la Tabla 10), este aumento alcanza incluso un factor de 5,4. De forma similar, el contenido total de compuestos fenólicos es 2,6 y 3,4 veces mayor para los extractos eutécticos de hojas de olivo obtenidos respectivamente en el laboratorio y a escala industrial que para los extractos líquidos convencionales que usan una mezcla de agua:glicerol (50:50; p:p).

Tabla 10

Lote	Oleuropeína (µg/ml)	Fenólicos totales (µg/ml)
Agua:glicerol (50:50; p:p)	447,7	894,8
Betaína:glicerol (40:60; mol:mol) + agua (25% en p) (escala de laboratorio)	1.721,6	2.367,1
Betaína:glicerol (40:60; mol:mol) + agua (25% en p) (escala industrial)	2.303,3	3.017,2

Estos resultados se pueden tomar como explicativos del espectacular aumento en la síntesis de colágeno en los fibroblastos de piel humana (Figura 11A) y la foto-protección en las células HaCat (Figura 11B) después de la incubación de extractos eutécticos de hojas de olivo en concentraciones que van del 0,01 al 0,1%. Por ejemplo, una formulación acuosa de extracto eutéctico al 0,1% es 18 veces más activa en términos de síntesis de colágeno que la misma formulación que usa un extracto de hidroglicerina. Por lo tanto, esta eficacia mejorada permite reducir las concentraciones de extractos eutécticos requeridas, lo que presenta una cierta cantidad de ventajas. Específicamente, cuando se usa una formulación diez veces menos concentrada de extractos eutécticos (0,01%), su eficacia biológica en relación con la ganancia de colágeno en la matriz extracelular es equivalente y, a menudo, incluso mayor que los extractos de hidroglicerina que son diez veces más concentrados. Además, en términos de fotoprotección preventiva (tratamiento de células con extractos antes de la irradiación UVA) que se muestra en la Figura 11B, se ve un aumento de un factor de 4,7 en la actividad biológica, que es considerable.

Estos datos ilustran el potencial de los extractos eutécticos como agentes foto-protectores, filtros de UV, agentes anti-envejecimiento e hidratantes (el colágeno tiene la propiedad de retener agua y también realiza una función de barrera para la piel). También, dada la conocida actividad antioxidante de la oleuropeína (Laguerre y cols., Characterization of olive leaf phenolics by ESI-MS and evaluation of their antioxidant capacities by CAT assay. J. Am. Oil Chem. Soc. 2009, 86, 1215-1225), los perfiles cromatográficos presentados en la Figura 10 apuntan la posibilidad de usar estos extractos mejorados como antioxidantes en varias formulaciones.

- 35 Ejemplo 12. Comparación de los perfiles químicos y la actividad biológica de extractos de flor de cerezo obtenidos usando mezclas ternarias de betaína:glicerol:agua y betaína:ácido láctico:agua o una mezcla de hidroglicerina como solventes de extracción.

Los resultados presentados en este ejemplo ilustran perfectamente el hecho de que el uso de los solventes eutécticos reivindicados en la presente invención para extraer sustancias de plantas (p. ej., vegetales) hace posible obtener extractos "inalcanzables" mediante solventes convencionales del tipo agua:glicerol. Esto se aplica especialmente al perfil cromatográfico que se muestra en la Figura 12 y los datos mostrados en la Tabla 11 entre una extracción con una mezcla eutéctica y una mezcla de hidroglicerina. Los extractos son totalmente diferentes. La extracción mediante eutectigénesis hace posible en este caso generar un nuevo extracto de flor de cerezo que incluye numerosos compuestos (en comparación con extractos convencionales) como ácido clorogénico identificado mediante espectrometría de masas o un glucósido del ácido cumarínico, rutina, ácido dicafeoilquínico o isoramnetina. En términos cuantitativos, se registró un aumento dramático en el contenido de polifenoles para los solventes eutécticos betaína:glicerol:agua y betaína:ácido láctico:agua en comparación con los extractos de hidroglicerina (4,3 y 13,7 veces más concentrado, respectivamente).

Tabla 11

Lote	Cafeoil glucósido (µg/ml)	Fenólicos totales (µg/ml)
Agua:glicerol (50:50)	nd	45,58
Betaína:ácido láctico (40:60; mol:mol) + agua (25% en p)	332,68	625,55
Betaína:glicerol (40:60; mol:mol) + agua (25% en p)	63,94	196,99

Con respecto a la actividad biológica, los extractos eutécticos muestran una vez más una espectacular superioridad en términos de foto-protección, inhibición de la metaloproteinasa de matriz tipo 1 (MMP-1), actividad anti-inflamatoria y síntesis de colágeno. En esta memoria solo se presentan los resultados de los extractos obtenidos de una mezcla de betaína:glicerol:agua, aunque se registraron datos similares para la mezcla de betaína:ácido láctico:agua. Como se muestra en la Figura 13A, los extractos eutécticos son mucho más activos que los extractos de hidroglicerina como agentes foto-protectores; incluso se puede decir que los últimos extractos carecen de toda eficacia. También se puede llegar a una conclusión similar sobre la base de los resultados obtenidos para la inhibición de las metaloproteinasas de matriz extracelular tipo 1 (MMP-1) involucradas en el foto-envejecimiento (Figura 13B), para la inhibición del TNF $\alpha$  que marca una importante vía de inflamación (Figura 13C) y también para la síntesis de colágeno soluble en la matriz extracelular (Figura 13D). Además, basándose en un modelo de explante de piel humana inducido por luz UV, el extracto eutéctico de flor de cerezo es capaz de aumentar la proteína de unión estrecha ZO-1 (Zona oculta) y de la síntesis de loricrina implicada en la función de barrera de la piel, adhesión y cohesión celular que da lugar a la hidratación de la piel (Figura 14A y 14B) pero también tiene una actividad antioxidante ya que las células de la piel no necesitan reclutar la vía DJ-1/NRF2 para luchar contra el daño de los rayos UV (Figura 14C y 14D). Para cada una de estas actividades, se obtuvieron ganancias muy significativas usando los solventes y los métodos de extracción reivindicados en la presente invención.

Estos resultados abren el camino a nuevas aplicaciones para estos extractos como agentes anti-inflamatorios, calmantes, anti-envejecimiento, foto-protectores y antioxidantes, filtros UV, agentes hidratantes o agentes anti-foto-envejecimiento.

Ejemplo 13. Comparación de los perfiles químicos y la actividad biológica y físico-química de extractos de cola de caballo obtenidos usando una mezcla ternaria de betaína:ácido láctico:agua o una mezcla de hidroglicerina como solvente de extracción

Al igual que la flor de cerezo, el ejemplo de la cola de caballo ilustra el hecho de que la extracción mediante eutéctigénesis proporciona un medio para obtener nuevos extractos. La Figura 15 compara dos trazados cromatográficos de los cuales se puede decir, como mínimo, que no se superponen entre sí. Entre otras diferencias, se puede mencionar que el dihexosido ramnósido de kaempferol, la gospitrina, el protogenkwanin-4'-O-glucósido y el ácido faseólico están presentes en concentraciones más altas en el extracto eutéctico (betaína:ácido láctico:agua) en comparación con el extracto de hidroglicerina. La Tabla 12 también demuestra las diferencias en el contenido fenólico de los extractos obtenidos.

Tabla 12

Lote	Fenólicos totales (µg/ml)
Agua:glicerol (50:50; p:p)	395,1
Betaína: ácido láctico (40:60; mol:mol) + agua (25% en p.)	387,4

Sin embargo, es difícil llegar a una conclusión sobre la superioridad de tal y tal extracto únicamente sobre la base de perfiles tan diferenciados como estos. Por esta razón, se llevaron a cabo pruebas de actividad biológica sobre la acción inhibidora de sustancias naturales extraídas de la cola de caballo en la cascada pro-inflamatoria que da lugar a la producción de TNF $\alpha$  (Figura 16). Para una concentración equivalente en peso (0,01%), es claramente evidente que el extracto eutéctico de cola de caballo es más activo que el derivado de una simple mezcla de agua:glicerol. También se encuentra una respuesta a la dosis, que es ventajosa para ajustar la formulación dependiendo del nivel de eficacia biológica buscado. En general, la actividad aumenta en un factor de 5 cuando la concentración se incrementa por un factor de 10. También se llevó a cabo un análisis comparativo de la actividad antioxidante entre los extractos. La Figura 17 muestra un factor de 1,6 de mayor eficacia en la reducción de peroxi-radicales derivados de un iniciador azo para el extracto eutéctico de cola de caballo en comparación con el extracto de hidroglicerina.



Por lo tanto, los extractos eutécticos de cola de caballo parecen prometedores para aplicaciones como agentes anti-inflamatorios y antioxidantes en gran número de campos (principalmente farmacéutico, nutracéutico y cosmético). Con respecto al campo de la cosmética, estos extractos se pueden usar como agentes calmantes (a través de sus propiedades anti-TNF $\alpha$ ) y como agentes antioxidantes y anti-envejecimiento (a través de sus propiedades reductoras de radicales libres).

Ejemplo 14. Comparación de los perfiles químicos y la actividad biológica de extractos de hinojo (roca de San Pedro) obtenidos usando una mezcla ternaria de betaína:glicerol:agua o una mezcla de hidroglicerina como solvente de extracción

A primera vista, de todos los perfiles cromatográficos presentados en esta memoria, los perfiles para el hinojo son los menos diferenciados entre el abordaje extractivo mediante eutéctigénesis y el empleo de solventes convencionales como agua y glicerol (50:50; p:p). En términos de compuestos fenólicos, los dos extractos son equivalentes en general con concentraciones de 195 y 181  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente para los extractos de hidroglicerina y eutécticos (Figura 18). La Tabla 13 también demuestra las diferencias en los compuestos fenólicos totales obtenidos.

Tabla 13

Lote	Fenólicos totales ( $\mu\text{g/ml}$ )
Agua:glicerol (50:50; p:p)	195,07
Betaína: glicerol (40:60; mol:mol) + agua (25% en p.)	181,2

El extracto eutéctico contiene menos ácidos 1-cafeoilquínico y 5-cumaroilquínico, pero más ácido dicafeoilquínico y 5-feruloilquínico que el extracto con agua y glicerol. Sin embargo, para otros compuestos, como el ácido 5-cafeoilquínico, los dos extractos presentan concentraciones sustancialmente similares. Debido a que estas diferentes moléculas tienen núcleos fenólicos que difieren en número (uno o dos ciclos por molécula) y en estructura (ferúlica vs. cumárica vs. cafeica), las variaciones en los perfiles, incluso de naturaleza aparentemente modesta, pueden generar diferencias muy marcadas en la actividad biológica y/o físico-química. Esto se puede ver en la Figura 19, donde una formulación acuosa de un extracto eutéctico de hinojo al 0,1% muestra una inhibición de la síntesis de melanina en los melanocitos epidérmicos humanos (ligeramente pigmentados) de un 33%, mientras que el extracto de hidroglicerina carece de toda actividad.

Este es un resultado importante en la medida en que la arbutina, que es el agente hipo-pigmentario natural más ampliamente usado en cosmética, libera un compuesto tóxico (hidroquinona) (ref.). Esto es un contexto favorable para el desarrollo de nuevos agentes de blanqueamiento que sean tanto naturales como libres de arbutina. En este sentido, los resultados presentados en este ejemplo demuestran completamente el potencial de los extractos eutécticos de hinojo reivindicados en esta invención para aplicaciones en el blanqueamiento de la piel. Además, en virtud de la capacidad de respuesta establecida de los núcleos de catecol de ésteres quínicos de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, cumárico, etc.) presentes en los extractos eutécticos, estos últimos están indicados para aplicaciones en la industria cosmética, nutracéutica, farmacéutica o alimentaria como antioxidantes.

Ejemplo 15. Comparación de los perfiles químicos de extractos de plátano obtenidos usando una mezcla ternaria de betaína:glicerol:agua o una mezcla de hidroglicerina como solvente de extracción

El Ejemplo 15 demuestra el hecho de que la extracción que usa una mezcla eutéctica de betaína:glicerol:agua produce un perfil cromatográfico más rico en general en verbascósidos totales en comparación con el del extracto de hidroglicerina (Figura 20). La concentración total de verbascósidos aumenta de 197 a 397  $\mu\text{g/ml}$  (que es el doble) añadiendo betaína a la mezcla de agua-glicerol (como se muestra en la Tabla 14). En este caso, el compuesto 6 – verbascósido- es un antioxidante muy poderoso (Laguerre y *cols.*, 2009) que contiene dos núcleos de catecol – como el ácido rosmarínico presentado en los Ejemplos 6 y 7.

Tabla 14

Lote	Verbascósidos totales ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fenólicos totales ( $\mu\text{g/ml}$ )
Agua:glicerol (50:50; p:p)	197,1	211,2
Betaína:glicerol (40:60; mol:mol) + agua (25% en p) (escala de laboratorio)	397	486,4
Betaína:glicerol (40:60; mol:mol) + agua (25% en p) (escala industrial)	646,7	842,1

De manera más precisa, es un éster heterosídico de ácido cafeico e hidroxitirosol implicado en una gran cantidad de actividades biológicas y/o físico-químicas. Además, de manera espectacular, la adaptación del método de extracción a escala industrial hace posible aumentar el contenido total de verbascósidos en más de tres veces y el de los compuestos fenólicos en casi el doble. Además, una comparación de los compuestos fenólicos totales entre el extracto eutéctico de plátano obtenido a escala de laboratorio y el extracto de hidroglicerina muestra una diferencia de un factor de 2,3 a favor del extracto eutéctico.

Ejemplo 16. Comparación de los perfiles químicos de extractos de flor de azafrán obtenidos usando una mezcla ternaria de betaína:ácido láctico:agua o una mezcla de hidroglicerina como solvente de extracción

Los perfiles cromatográficos mostrados en la Figura 21 difieren principalmente en términos de la presencia de glicosil-gliceril ramnósido de kaempferol y de dos isómeros de kaempferol-3-O-lactil sofrósido (como se muestra en la Tabla 15).

Tabla 15

Lote	Crocinas (µg/ml)	Flavonoides totales (µg/ml)
Agua:glicerol (50:50; p:p)	14,43	2.349
Betaína:ácido láctico (40:60; mol:mol) + agua (25% en p) (escala de laboratorio)	6,35	2.414

Estos constituyentes activos de las flores de azafrán se pudieron identificar mediante cromatografía líquida-ionización por electro-*espray* con espectrometría de masas en tándem (LC-ESI/MS). Están prácticamente ausentes en los perfiles obtenidos a partir del extracto de hidroglicerina, lo que podría explicar los resultados dados en la Figura 22 que muestran una mayor eficacia del extracto eutéctico en la inhibición de la síntesis de melanina y en la liberación de metaloproteinasas en la matriz extracelular, aunque en una forma más modesta en este último caso. Si se supone que la fracción flavonoide es la única implicada en el determinismo bioquímico de estas dos actividades, entonces se puede sugerir que la presencia de kaempferol glicosil-gliceril ramnósido y de formas isoméricas de kaempferol-3-O-lactil sofrósido es de primordial importancia para obtener extractos dotados de una mayor actividad biológica en relación con los extractos convencionales del tipo de hidroglicerina. Estos resultados también demuestran el potencial de los extractos eutécticos de flores de azafrán como agentes hipo-pigmentarios, foto-protectores y anti-envejecimiento. Además, dada la naturaleza química de las moléculas de las que están compuestas (flavonoides), estos extractos eutécticos son un buen augurio para actividades estabilizadoras de radicales libres más potentes que las de los extractos convencionales y, por lo tanto, su uso como antioxidantes.

Ejemplo 17. Comparación de los perfiles químicos de los extractos de rosa de Jericó obtenidos usando mezclas ternarias de betaína:glicerol:agua y betaína:ácido láctico:agua o una mezcla de hidroglicerina como solventes de extracción

Los extractos obtenidos de una extracción mediante eutectigénesis (ya sea betaína:glicerol:agua o betaína:ácido láctico:agua) presentan perfiles totalmente diferentes de los observados por cromatografía y derivados de una extracción de agua y glicerina (Figura 23). Estos datos demuestran el carácter diferenciador inducido por el uso de solventes eutécticos profundos como el reivindicado en la presente invención en comparación con un método más convencional. En este caso, el extracto eutéctico que se muestra en la Figura 23 contiene mucha más taxifolina (y su éter metílico), ácido protocatecuico, flavonolignan como silibina e isosilibina (como se muestra Tabla 16). Es interesante notar que la concentración total de compuestos fenólicos es respectivamente 2 y 3 veces mayor para los extractos derivados del uso de mezclas de betaína:ácido láctico:agua y de betaína:glicerol:agua que para el uso de una mezcla de agua:glicerol.

Tabla 16

Lote	Taxifolina (µg/ml)	Fenólicos (µg/ml)
Agua:glicerol (50:50; p:p)	14,4	28,03
Betaína:glicerol (40:60; mol:mol) + agua (25% en p)	25,8	83,9
Betaína:ácido láctico (40:60; mol:mol) + agua (25% en p)	28,3	53,8

En términos de actividad biológica, el extracto eutéctico cuyo perfil cromatográfico se muestra en la Figura 23 (betaína:glicerol:agua) inhibe la síntesis de melanina en casi un 36%, mientras que el extracto de hidroglicerina carece de toda actividad (Figura 24). Este es un resultado lógico dado el perfil, ya que se sabe que la taxifolina inhibe la

melanogénesis celular (An y cols., Flavonoids, taxifolin and luteolin attenuate cellular melanogenesis despite increasing tyrosine protein levels, *Phytother. Res.* 2008, 22, 1200-1207), como efectivamente de hecho que la arbutina se usa ampliamente en cosméticos como agente hipo-pigmentario. En este punto, se debe señalar que la arbutina no es activa de manera satisfactoria ya que libera hidroquinona, cuya presencia está prohibida (particularmente en cosméticos por encima de 1ppm). Este tipo de actividad en ausencia de arbutina demuestra por tanto el gran potencial del extracto eutéctico de rosa de Jericó para el sector cosmético en la gama de agentes hipo-pigmentarios, pero también como agentes antioxidantes y anti-envejecimiento dado que el ácido protocatecuico y la taxifolina son eficaces reductores de radicales libres, cada uno de los cuales tiene un núcleo de catecol del que se ha explicado anteriormente el mecanismo de acción para controlar el estrés oxidativo. Finalmente, el Ejemplo 17 demuestra el hecho de que los solventes eutécticos son perfectamente adecuados para la extracción de compuestos bio- o quimio-activos de plantas de resurrección.

**REIVINDICACIONES**

1. Un solvente de extracción eutéctica para extraer material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico, en donde el solvente es una mezcla clara, estable y fluida que comprende:
- (a) betaína (trimetil glicina) o una forma hidratada de betaína;
- 5 (b) al menos un compuesto donante de enlaces de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en polioles y ácidos orgánicos; y
- (c) agua;
- en donde la relación molar de betaína o una forma hidratada de betaína a al menos un donante de enlaces de hidrógeno es de 1:1,5 a 1:3 y la proporción de agua en el solvente es de 15 a 30% en peso;
- 10 con la condición de que el solvente eutéctico de extracción no contiene ningún azúcar y/o sal de amina y/o anión exógenos.
2. Un solvente de extracción eutéctico de acuerdo con la Reivindicación 1 en donde los polioles se seleccionan del grupo que consiste en glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, etilén glicol, propilén glicol, ribitol, aldonitol, propanediol y pentilén glicol.
- 15 3. Un solvente de extracción eutéctico de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, en donde los ácidos orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en ácido láctico, ácido málico, ácido maleico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido aconítico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido glucurónico, ácido neuramínico, ácido siálico, ácido shikímico, ácido fítico, ácido galacturónico, ácido idurónico, ácido hialurónico, ácido hidroxicítrico y derivados de lactona.
- 20 4. Un método para extraer compuestos biológicos naturales como compuestos fenólicos que incluyen ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, estilbenos y alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, saborizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos, tensioactivos y terpenoides, que incluyen saponinas, a partir de material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico y, preferiblemente, material biológico de plantas (p. ej., vegetales), en donde el método comprende las siguientes etapas:
- 25 a. sumergir, mientras se agita, un material biológico molido o sin moler en un solvente como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3; luego
- b. macerar o percolar o infundir la mezcla obtenida en la etapa a. a una temperatura entre 20 y 60 °C; luego
- 30 c. filtrar el producto de extracción obtenido en b. obteniendo así un extracto líquido biológico natural derivado de material de plantas (p.ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico.
5. Un método de acuerdo con la Reivindicación 4, en donde el material biológico de plantas se selecciona del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero, Selaginella pulvinata, Tillandsia usnoides y hojas de olivo.
- 35 6. Uso del solvente de extracción eutéctico como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 para extraer compuestos biológicos naturales tales como compuestos fenólicos que incluyen ácidos y ésteres fenólicos, flavonoides, secoiridoides, estilbenos y alcoholes fenólicos, así como antioxidantes, carotenoides, alcaloides, lípidos, fenilpropanoides, aromatizantes y modificadores del sabor, fragancias, biocidas, antimicrobianos, proteínas, enzimas, colorantes, pigmentos, tensioactivos y terpenoides, que incluyen saponinas, a partir de material biológico de plantas (p. ej., vegetales) y/o animal y/o procariótico y, preferiblemente de material biológico de plantas (p. ej., vegetales).
- 40 7. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 6, en donde el material biológico de plantas se selecciona del grupo que consiste en flor de cerezo, cola de caballo, plátano, flores de azafrán, hinojo, rosa de Jericó, romero, Selaginella pulvinata, Tillandsia usnoides y hojas de olivo.

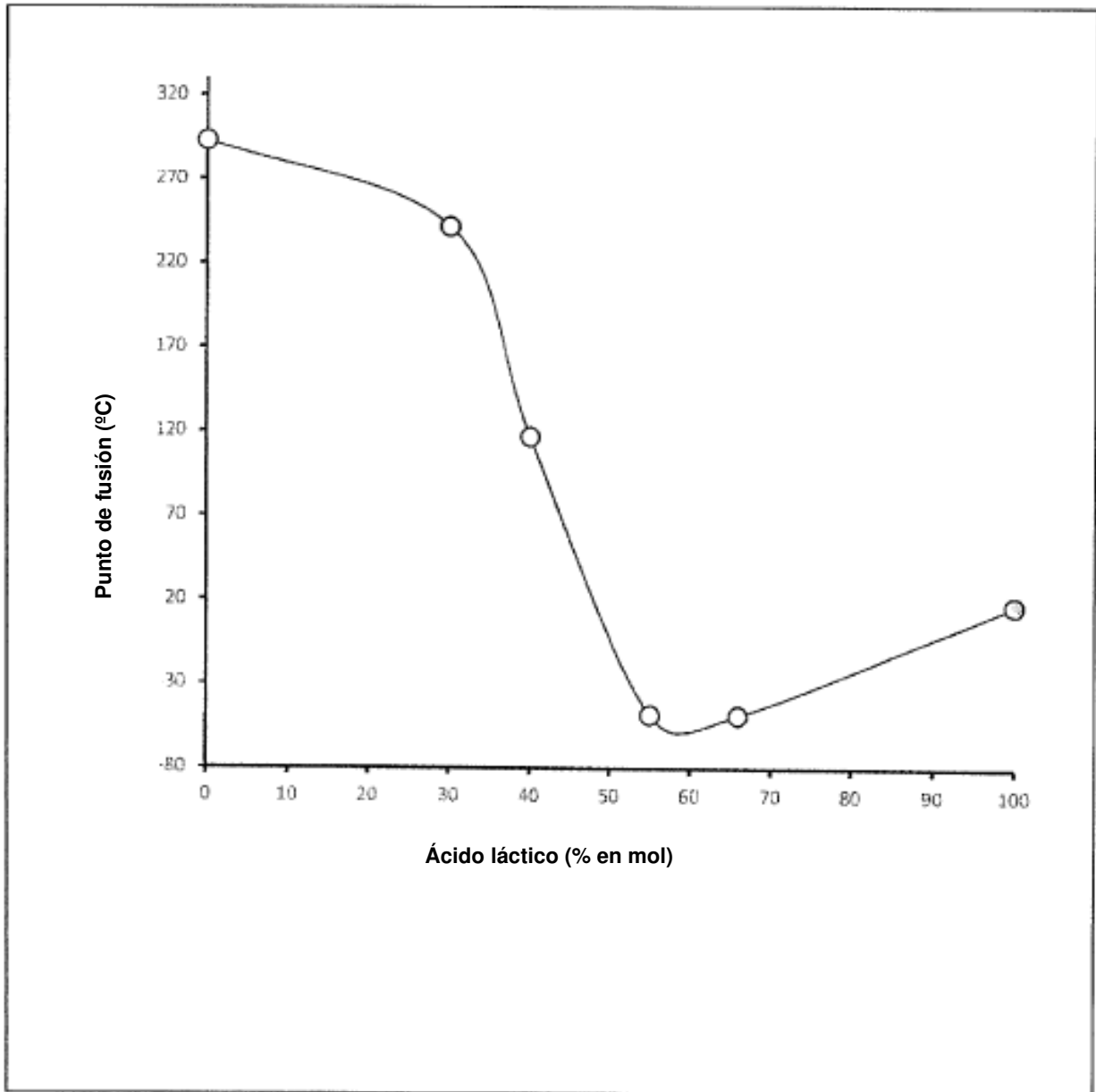


Figura 1

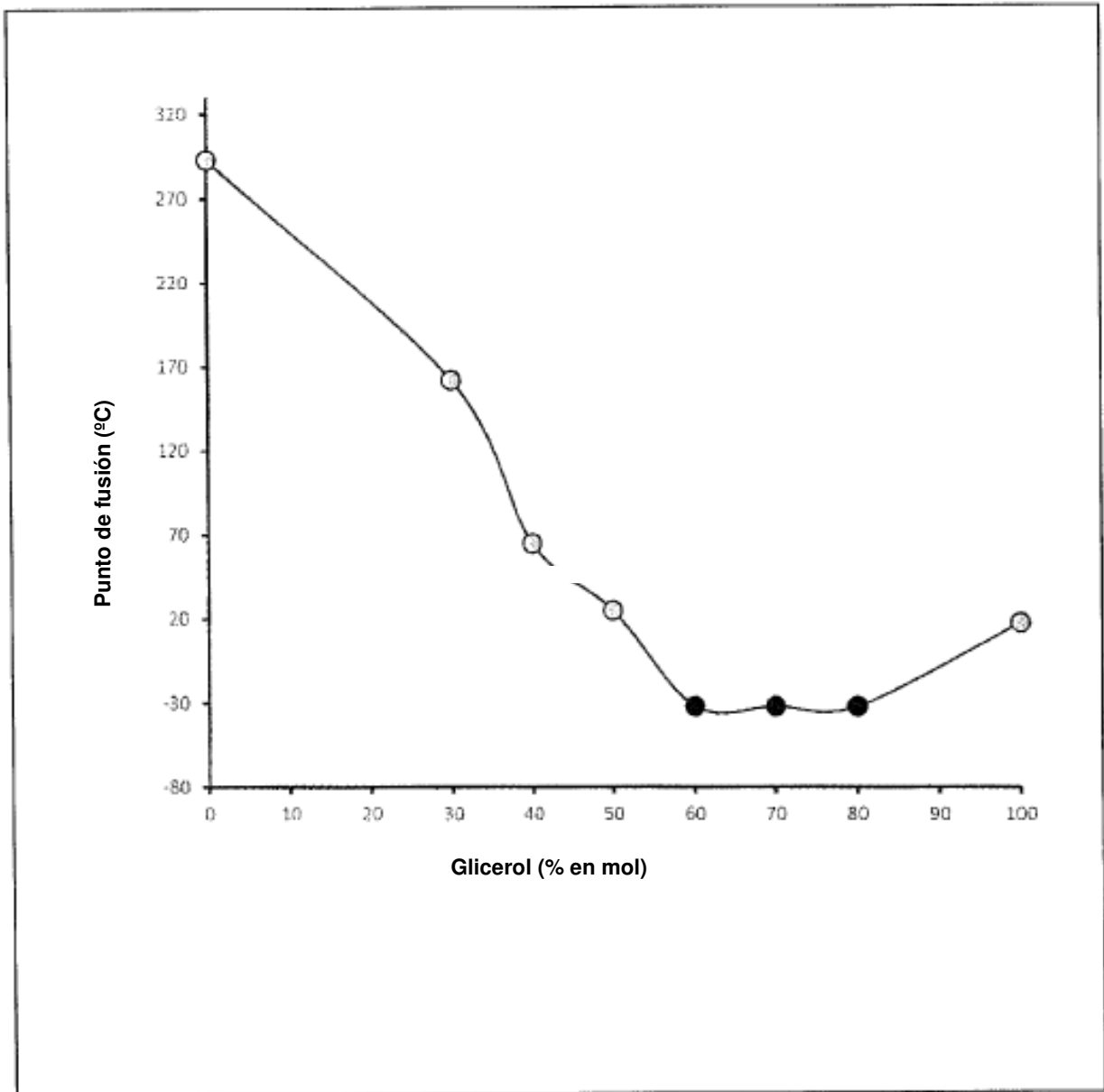


Figura 2

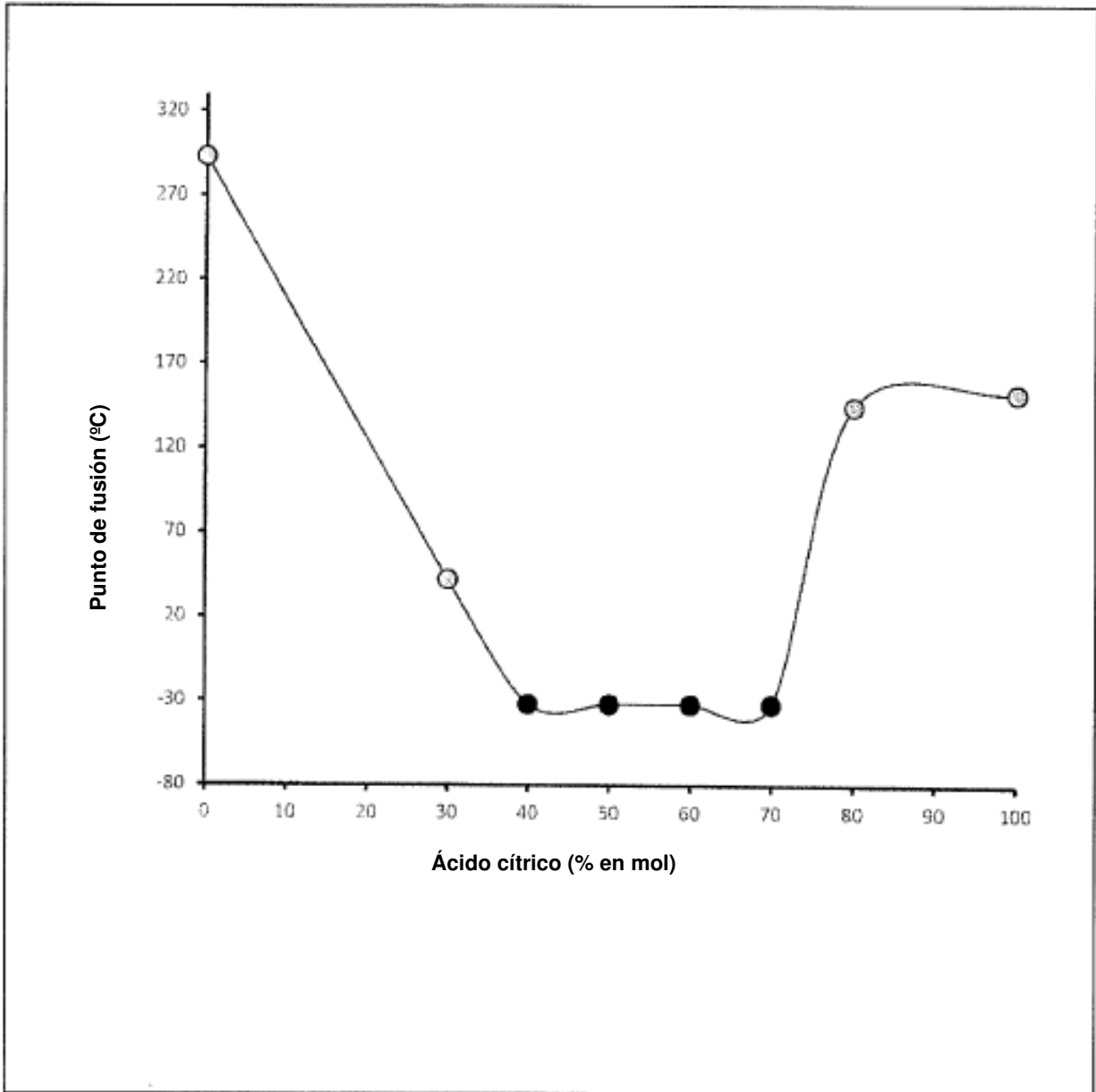


Figura 3

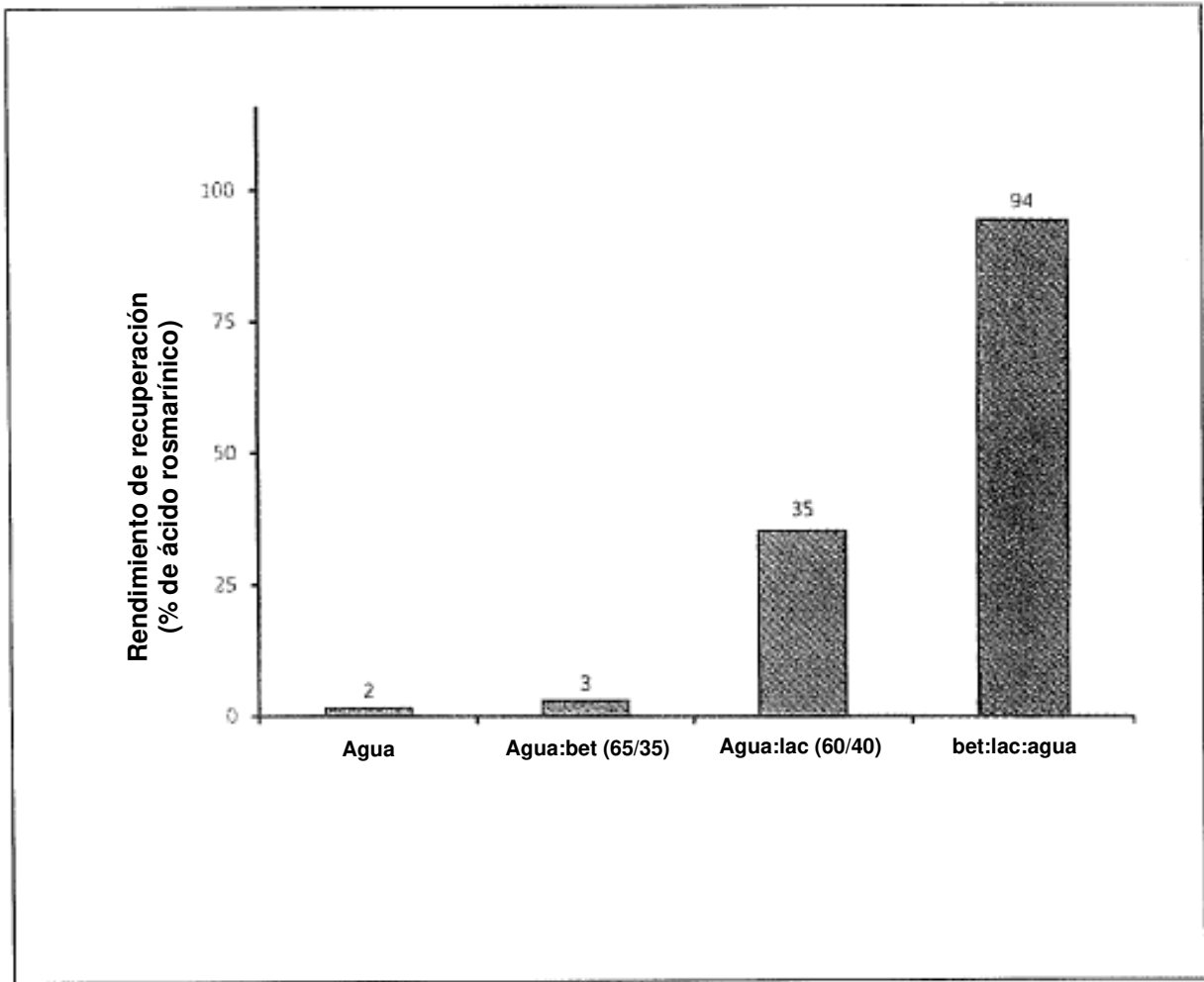


Figura 4



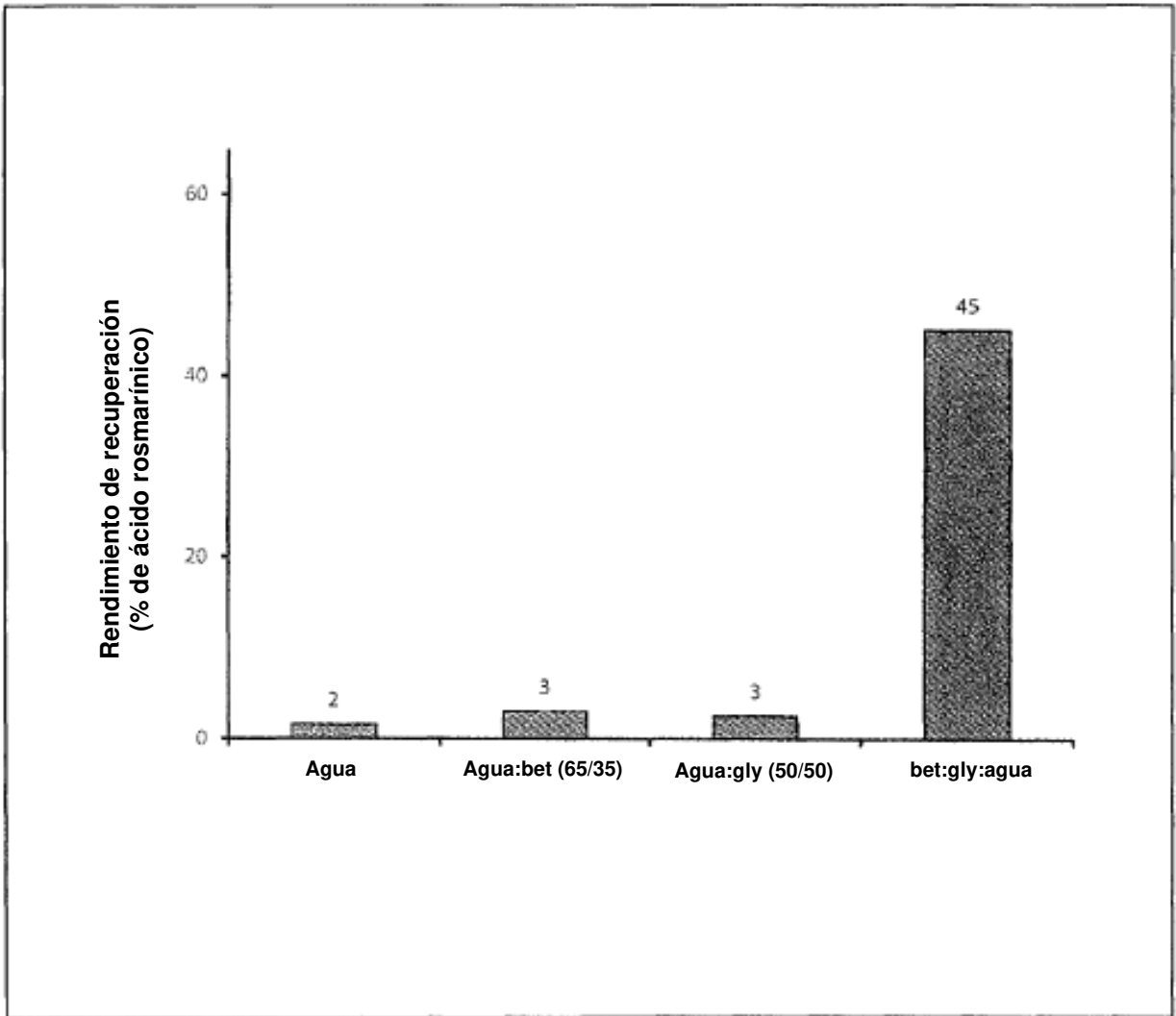
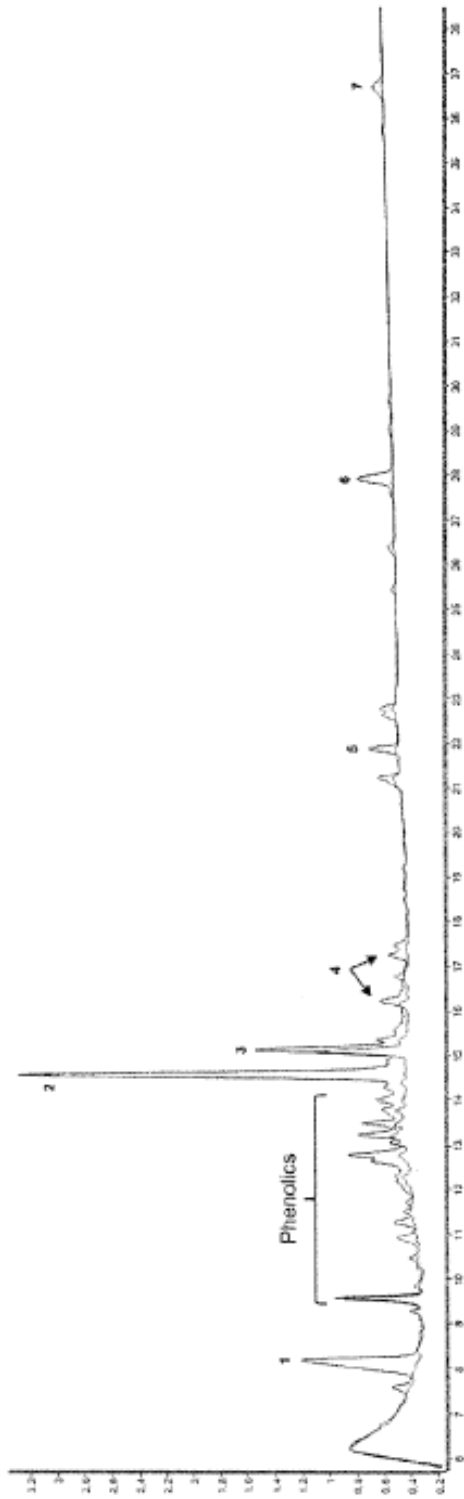


Figura 5



Fenólicos

Figura 6

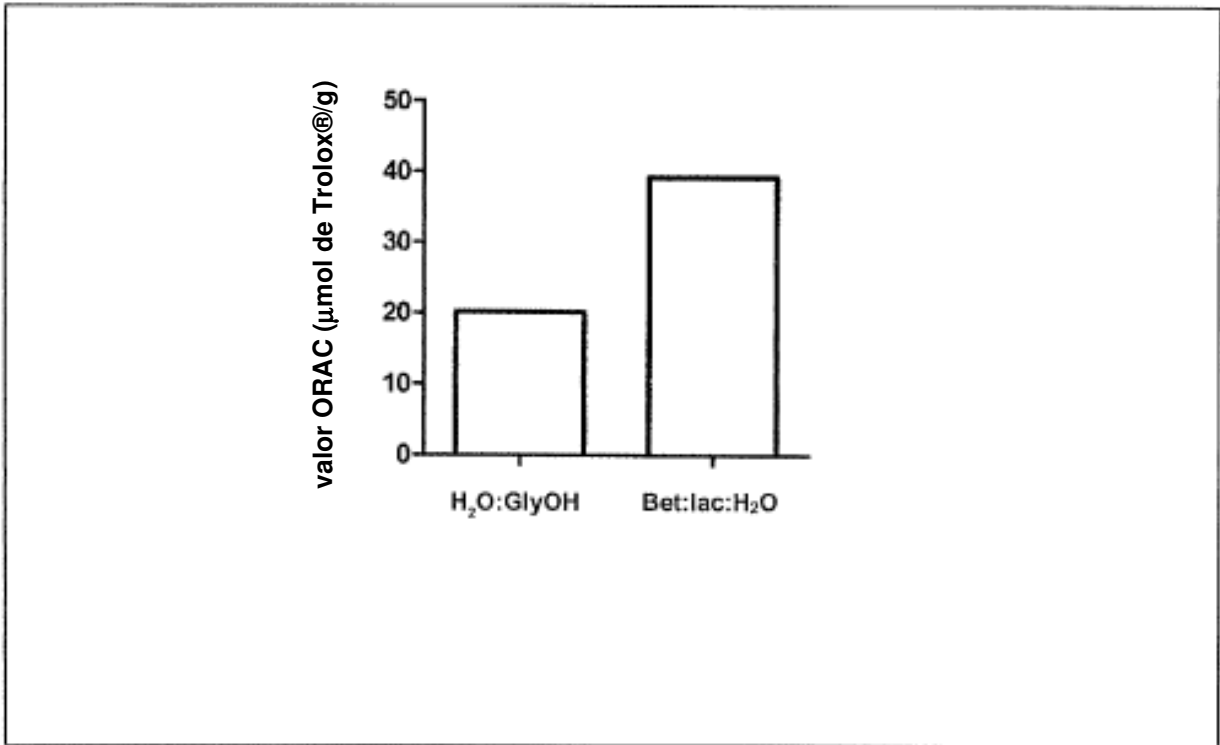


Figura 7

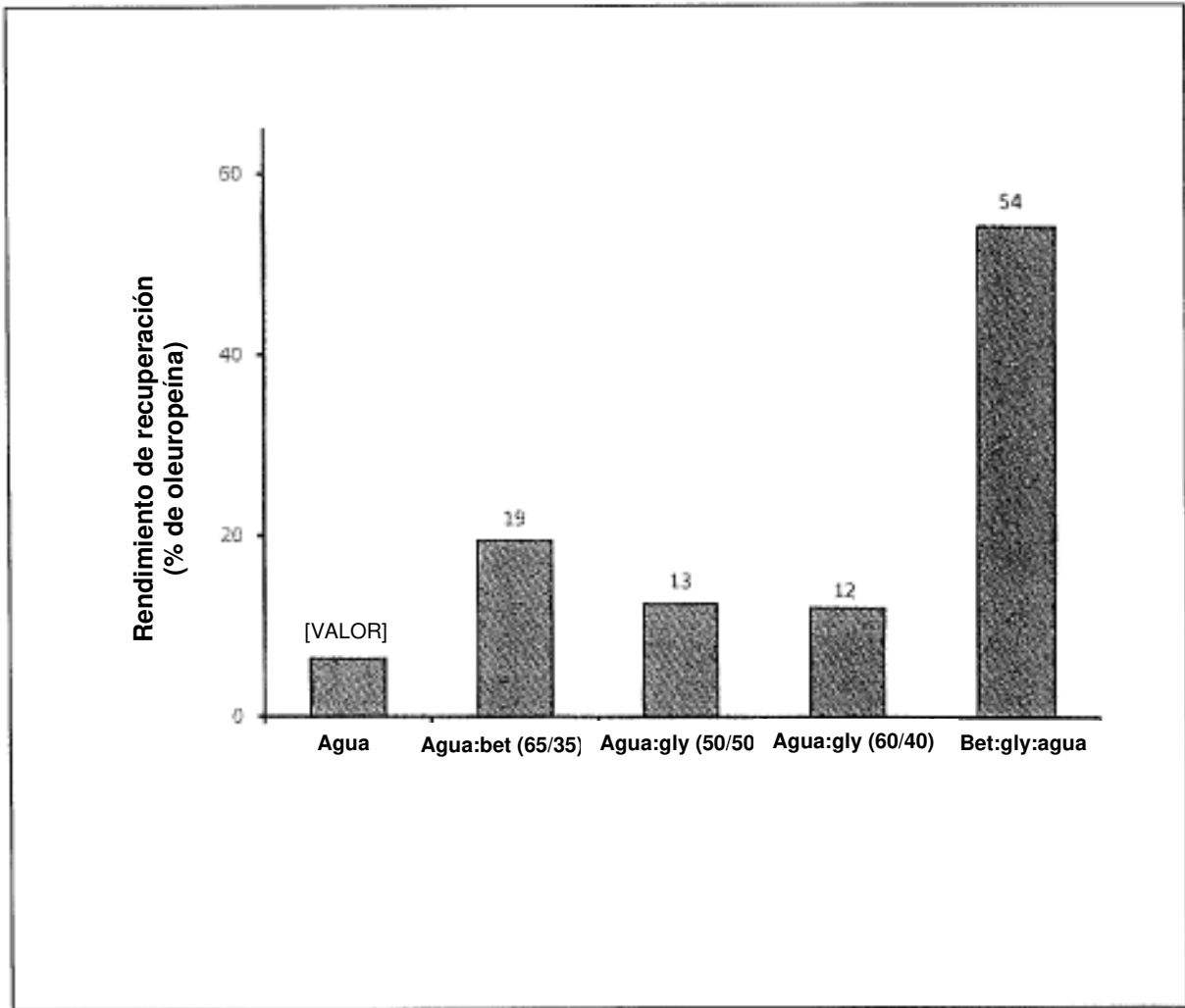


Figura 8

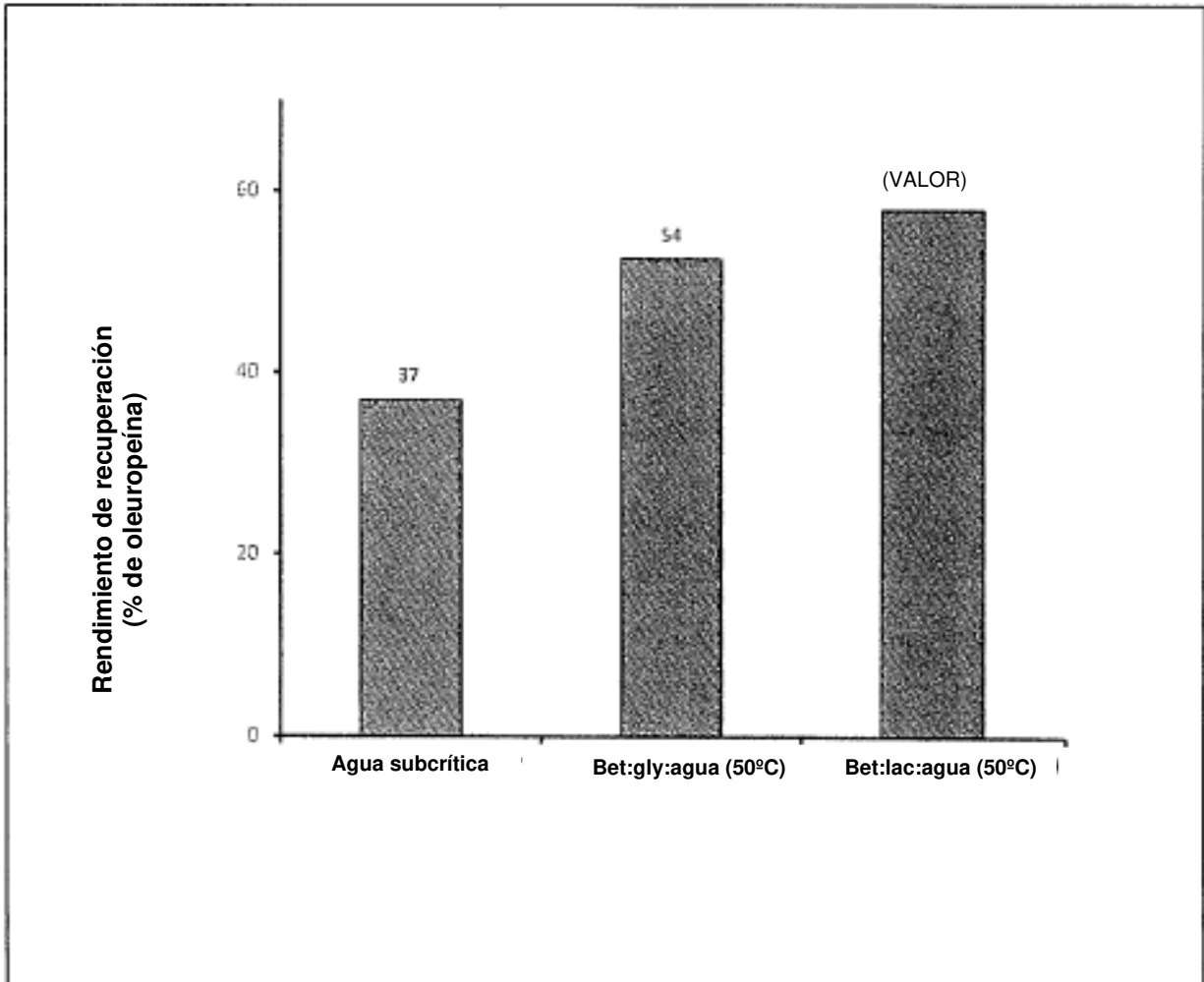
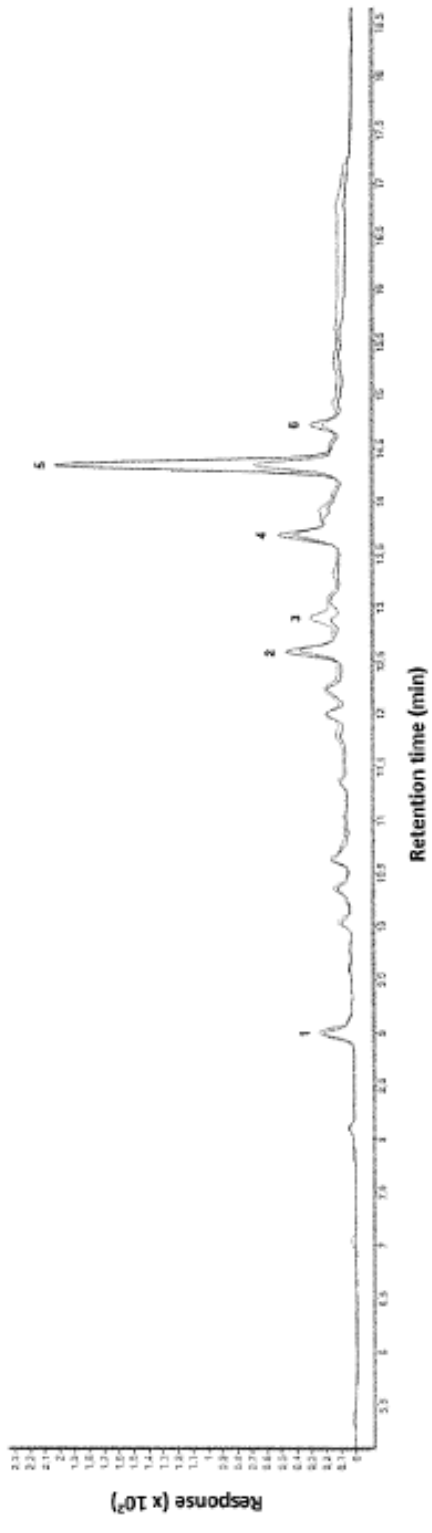


Figura 9



Response ( $\times 10^2$ )

Tiempo de retención (min)

Figura 10

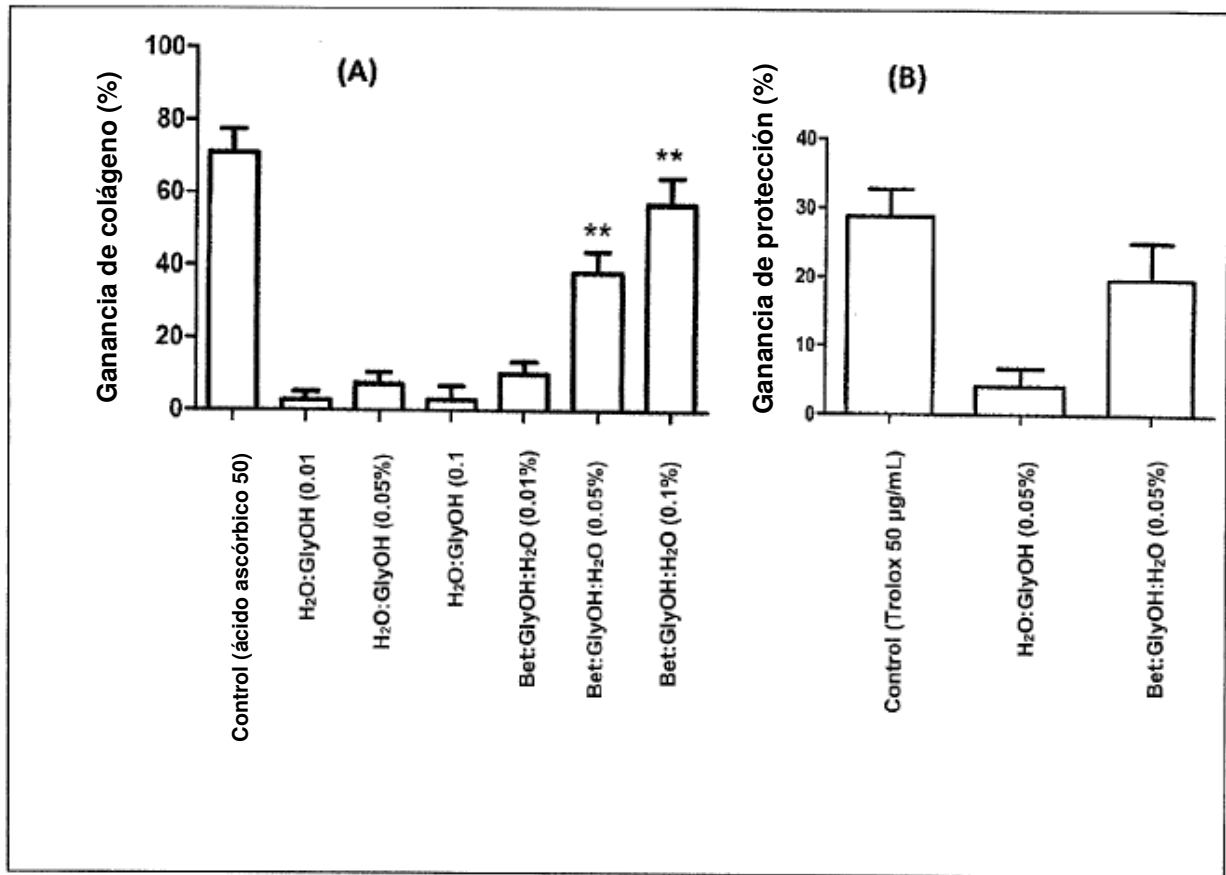
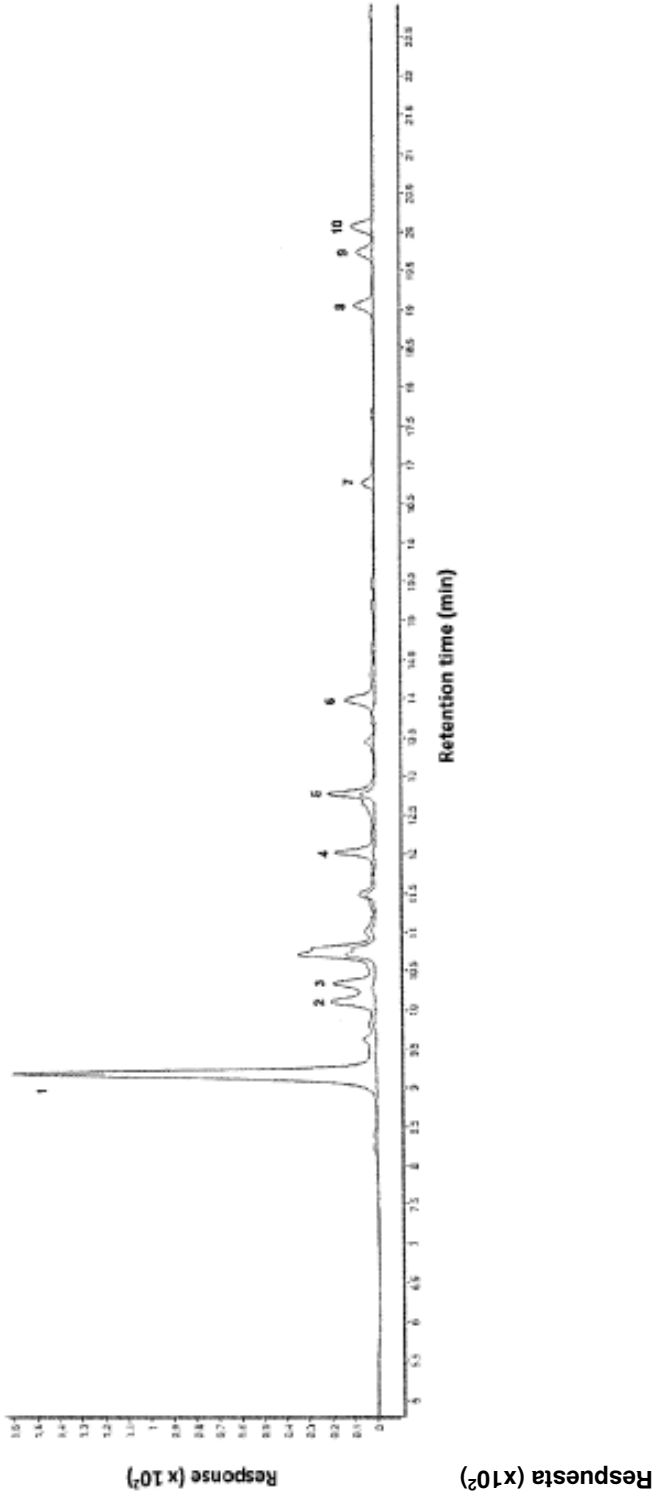


Figura 11



Tiempo de retención (min)

Figura 12



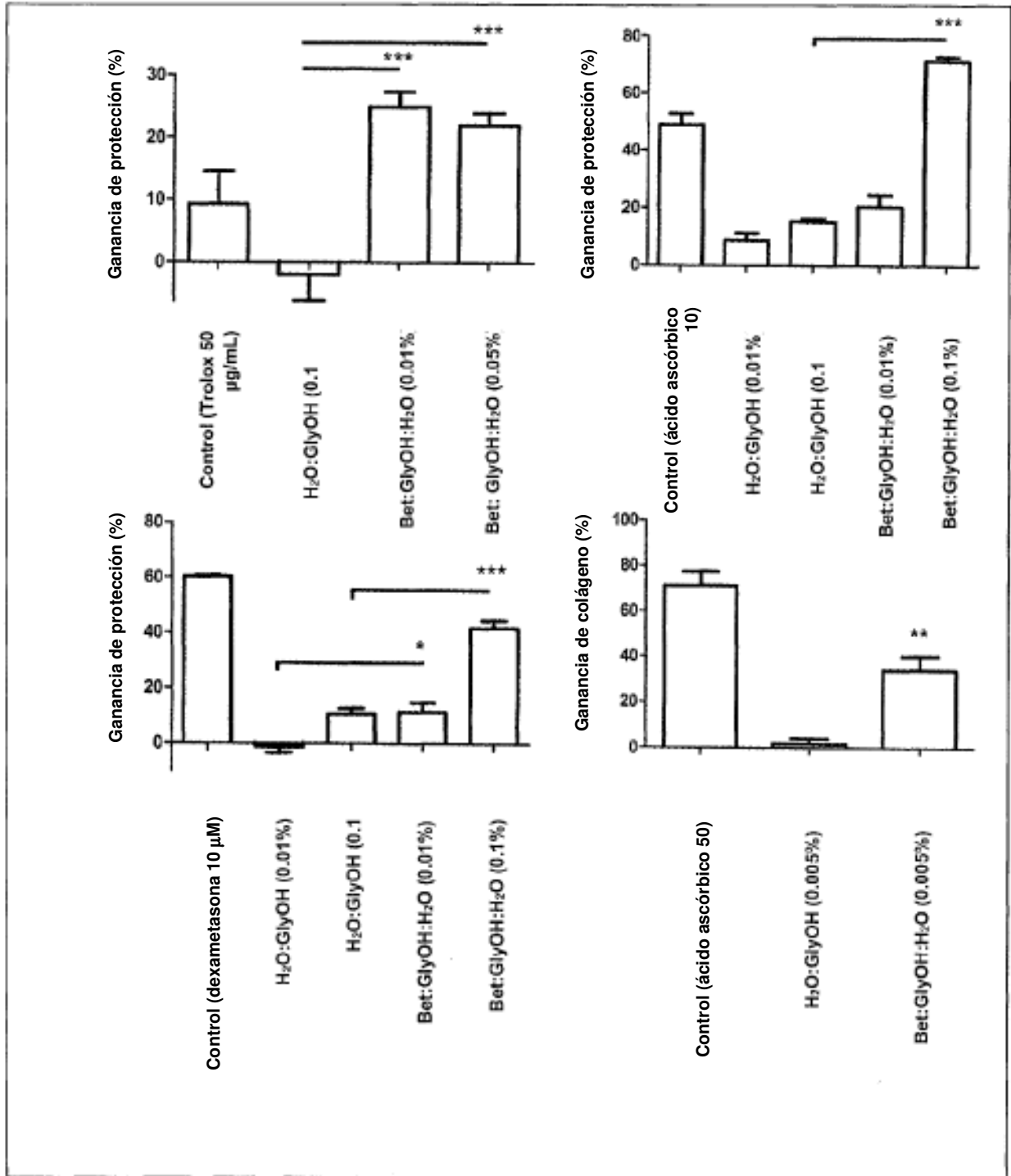


Figura 13

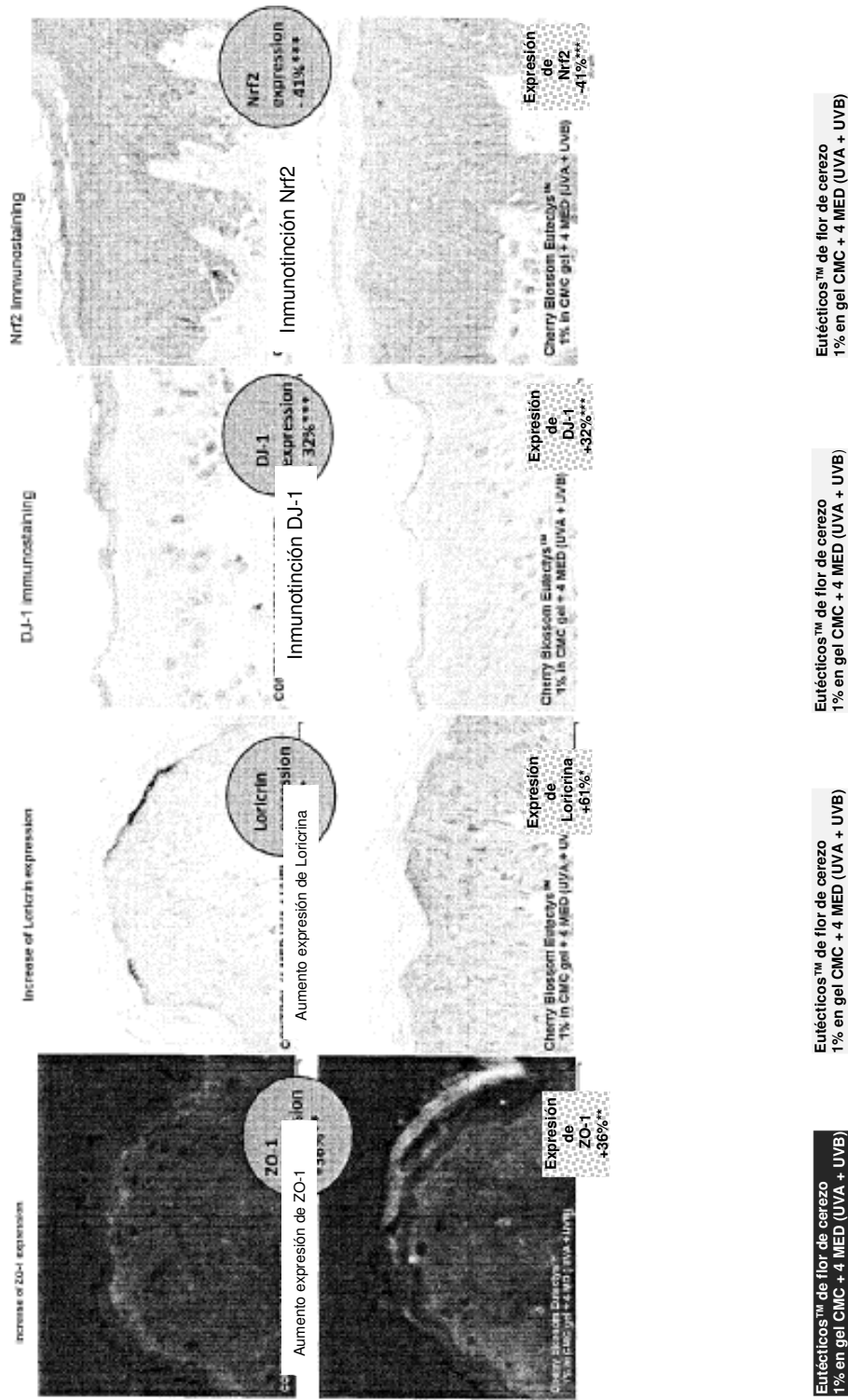


Figura 14

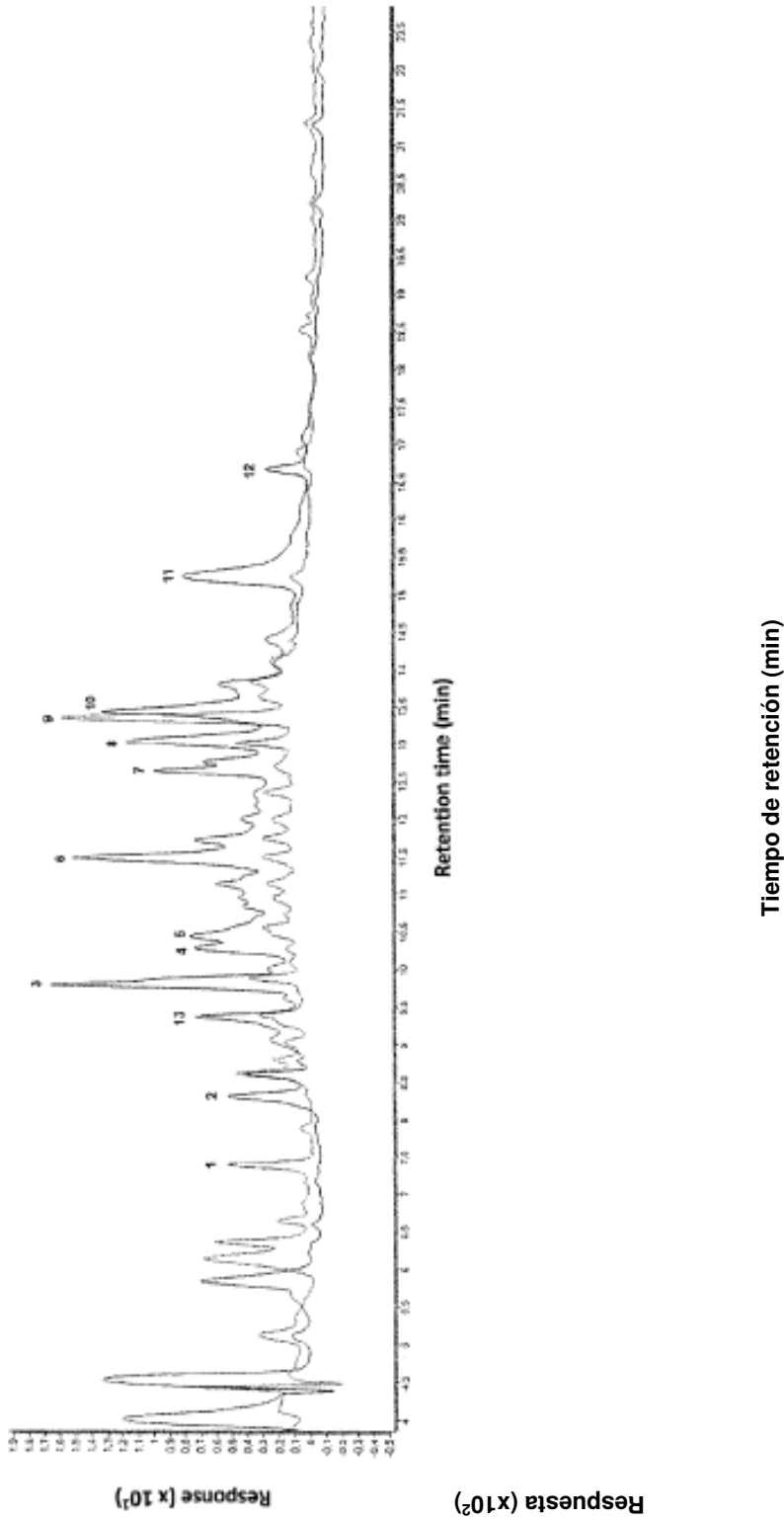


Figura 15

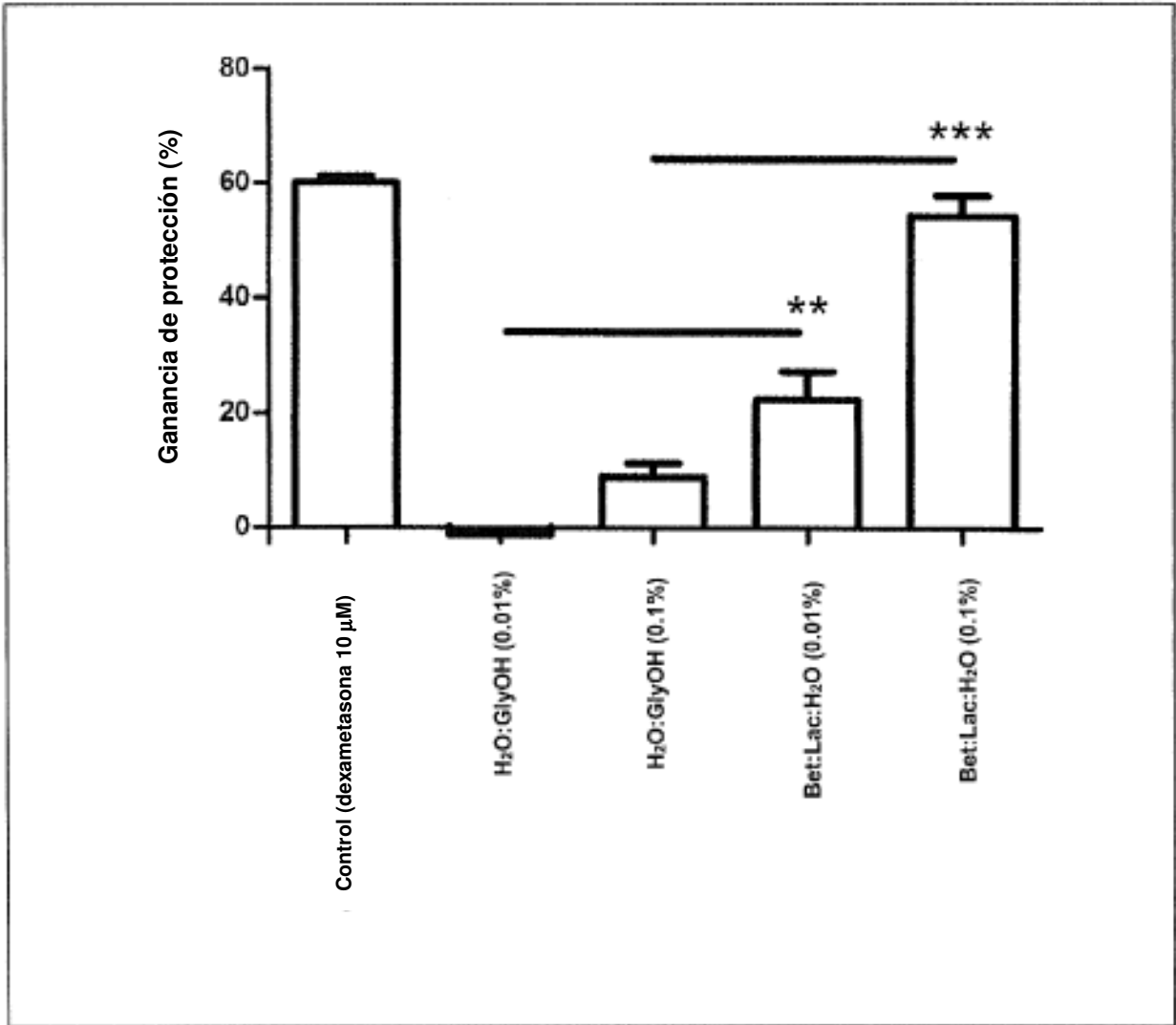


Figura 16

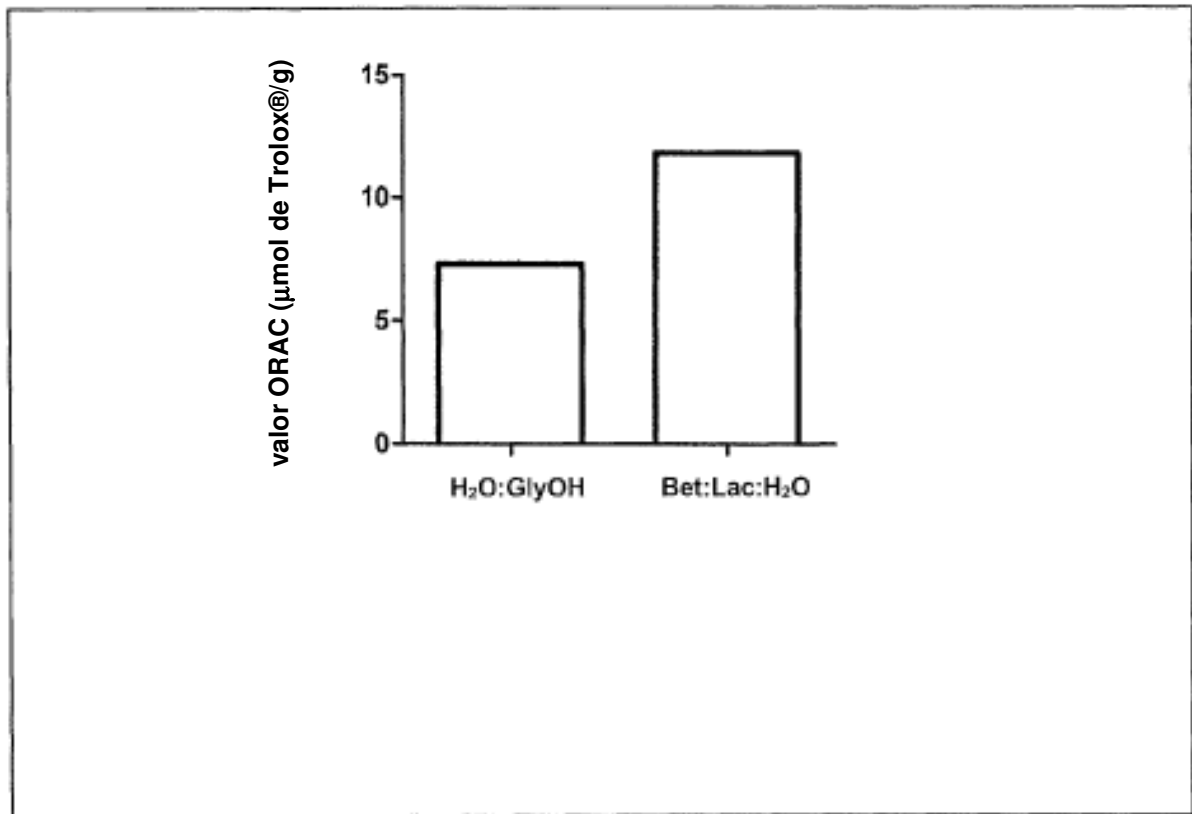
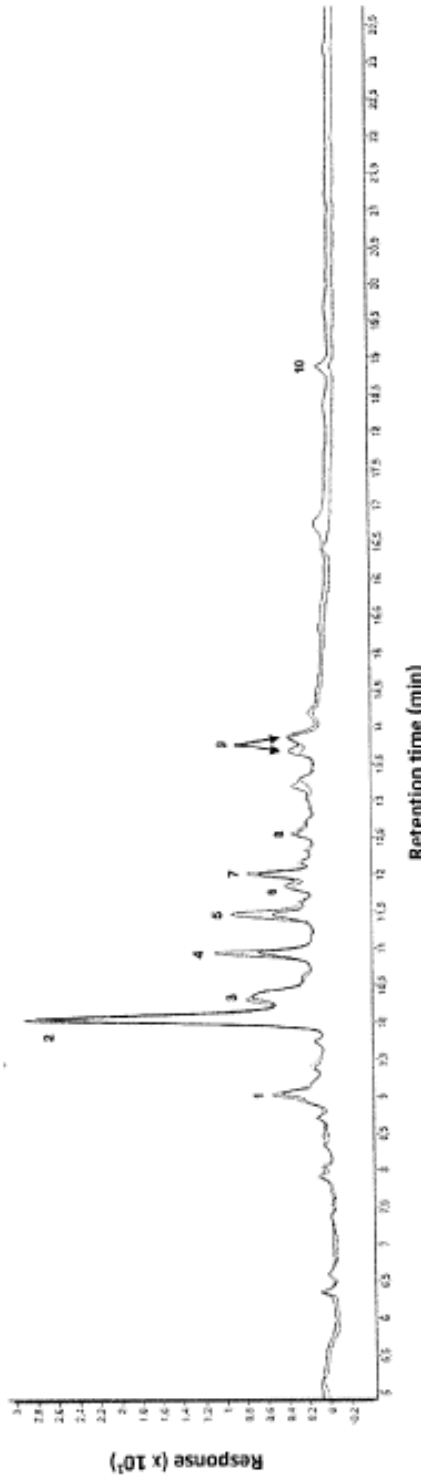


Figura 17



Resposta ( $\times 10^2$ )

Retention time (min)

Tiempo de retención (min)

Figura 18

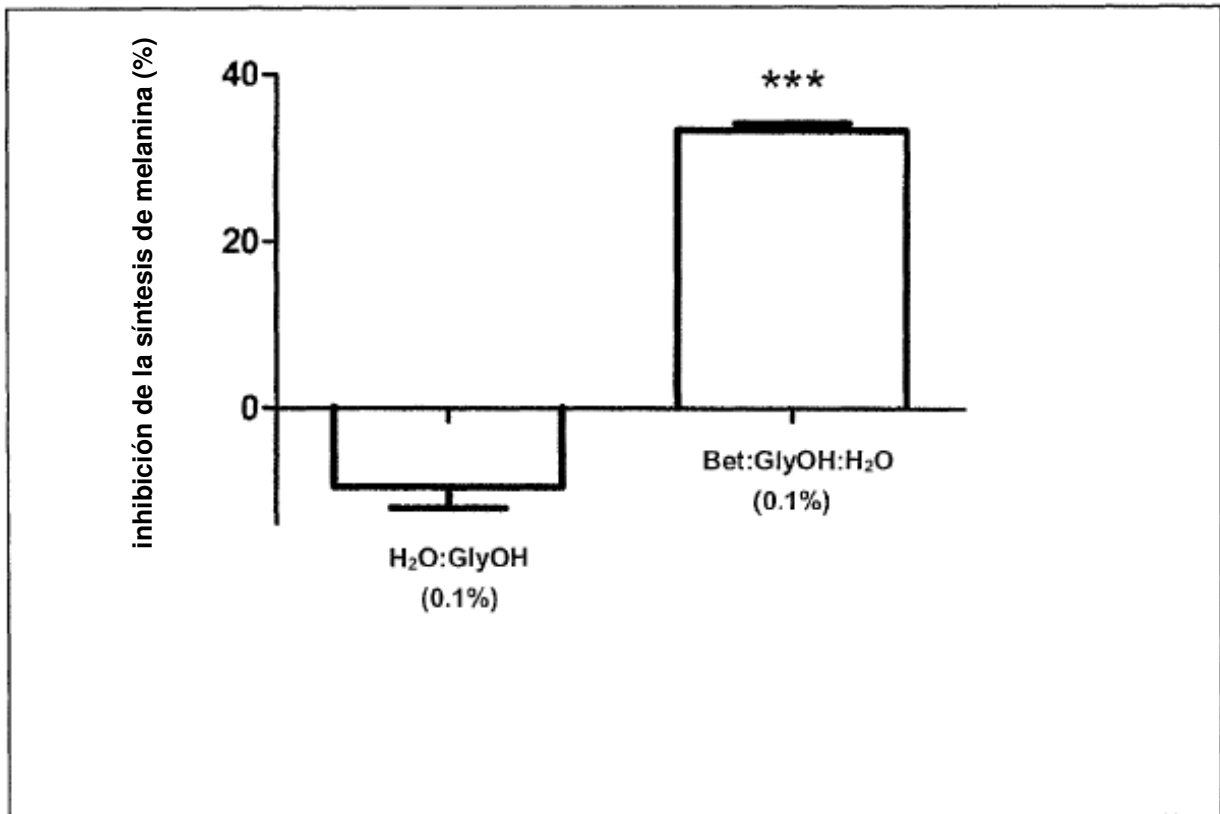
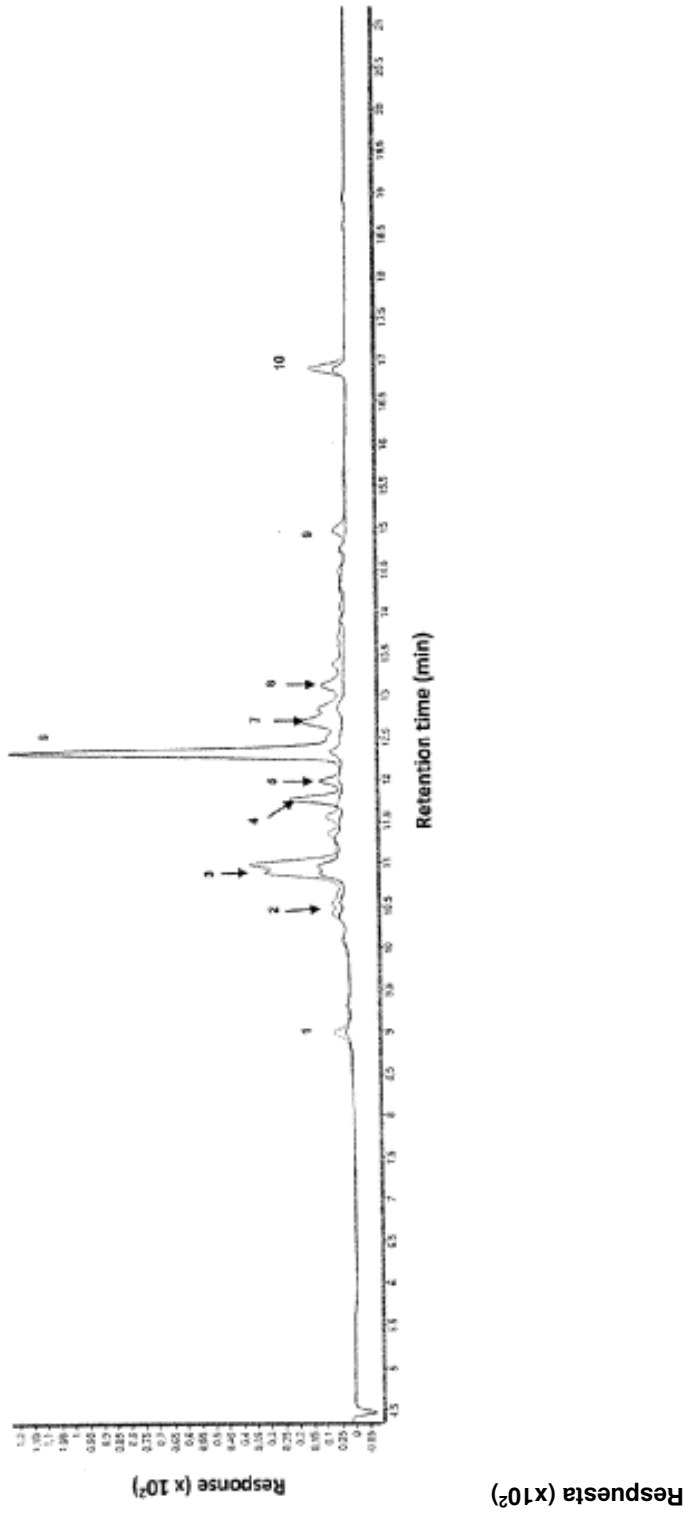


Figura 19



Tiempo de retención (min)

Figura 20



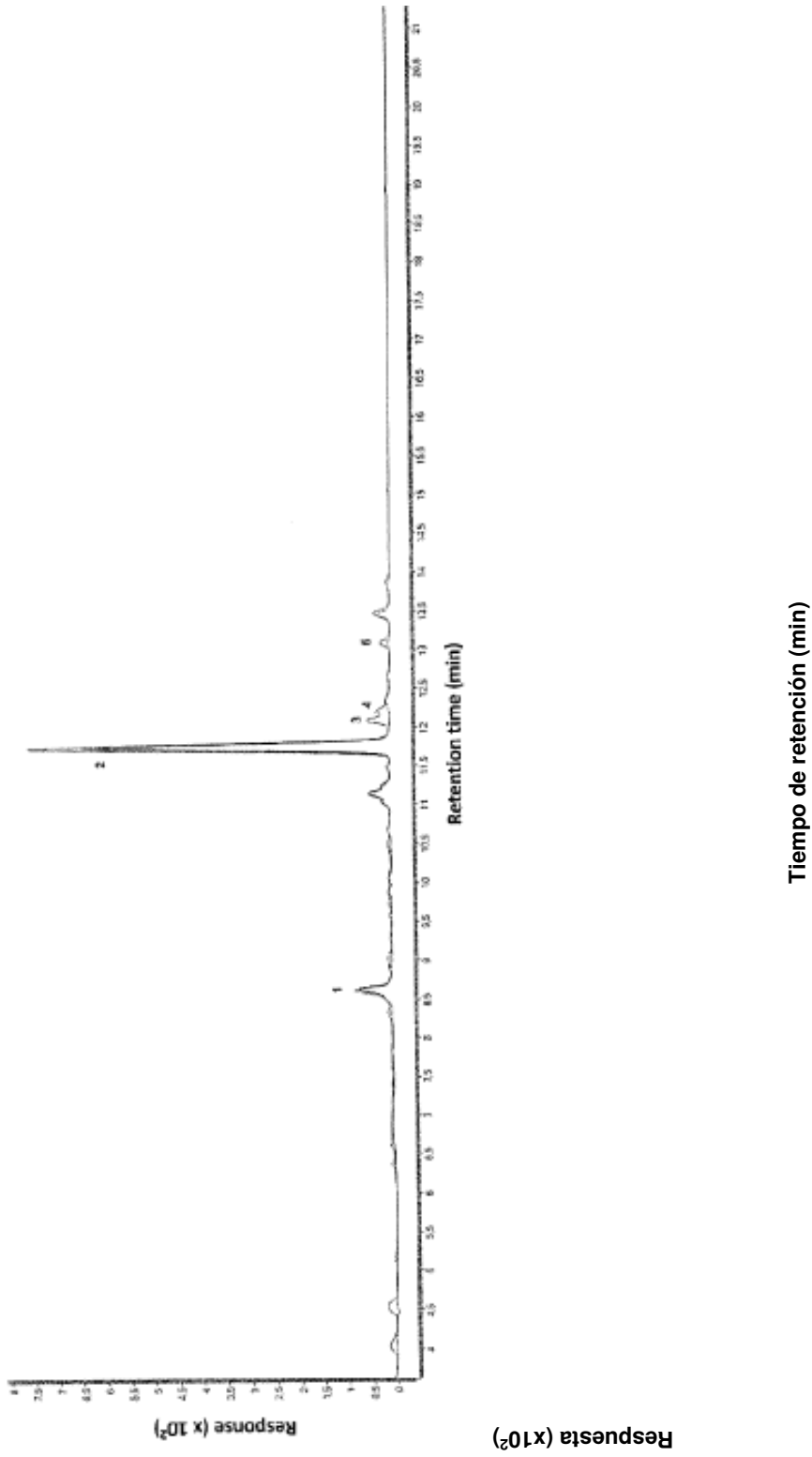


Figura 21

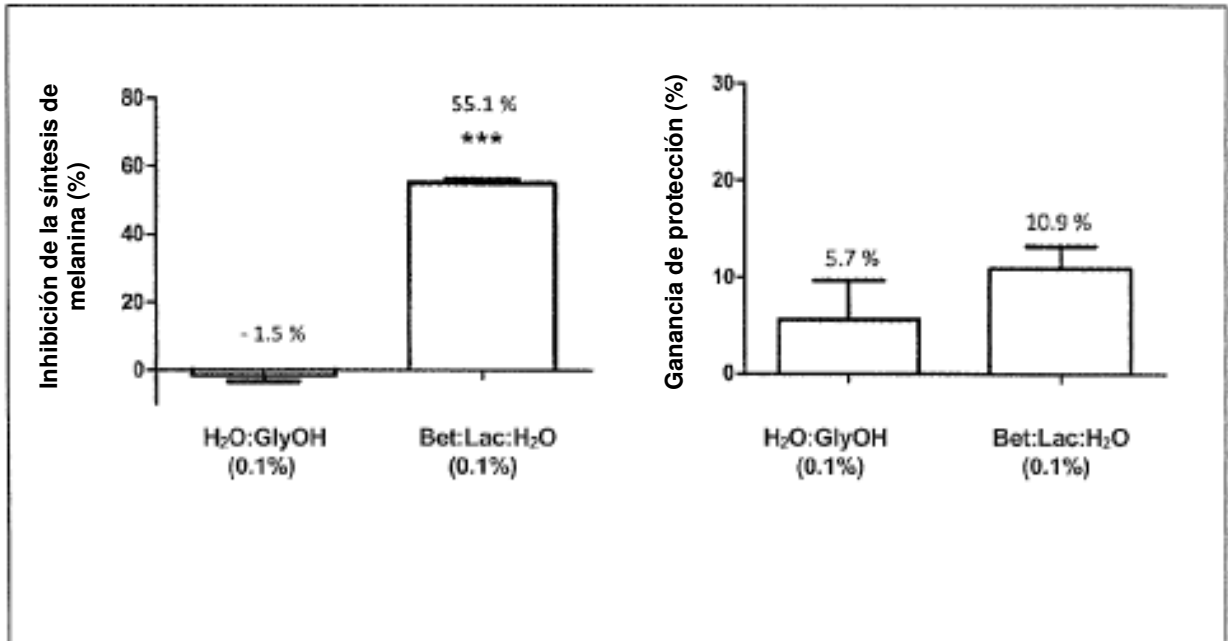
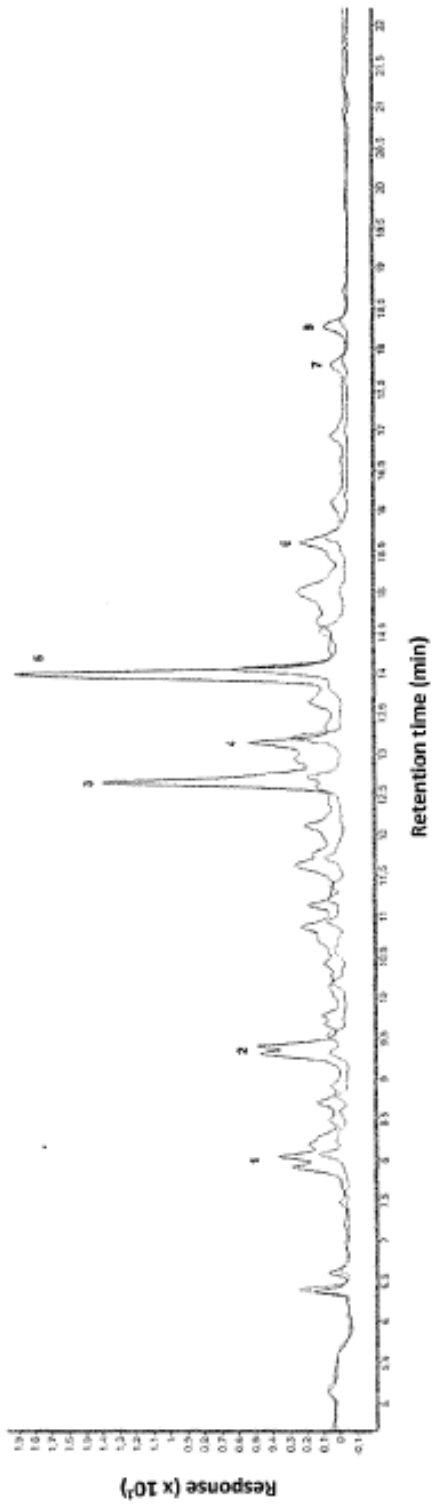


Figura 22



Respuesta ( $\times 10^4$ )

Tiempo de retención (min)

Figura 23

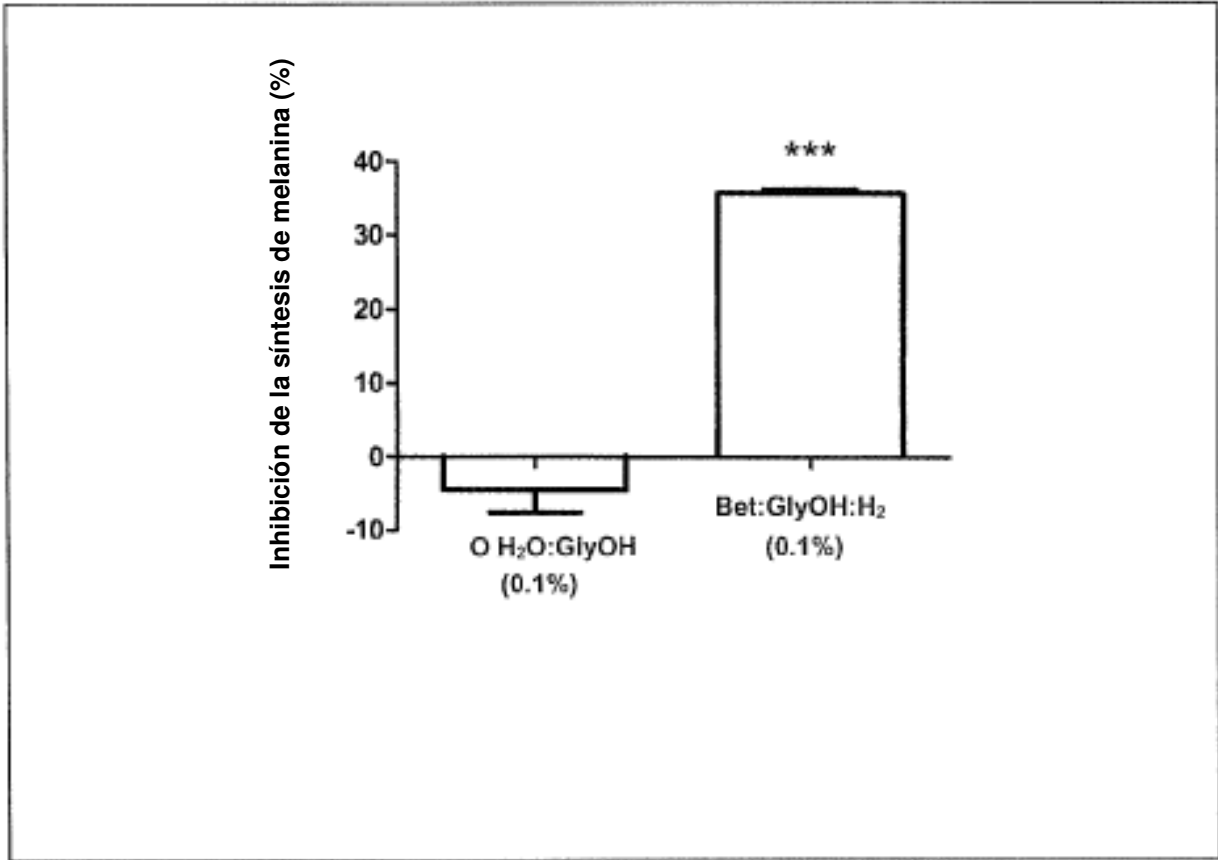


Figura 24