

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales y cutina obtenida

5 OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de cutina, basado en la extracción secuencial asistida por ultrasonidos, a partir de los residuos vegetales generados en diferentes industrias de alto interés económico. Ventajosamente, el
10 procedimiento que se preconiza permite obtener otros compuestos adicionales de alto valor añadido, tales como antioxidantes, proteínas hidrosolubles y material lignocelulósico.

El objeto de la invención es ofrecer un procedimiento que posibilita la disminución de coste de producción de cutina y genera un valor añadido de los residuos vegetales que se
15 emplean como materia prima en este procedimiento. También es objeto de la presente invención la cutina obtenida por el procedimiento desarrollado, al ser cutina con una reseñable estabilidad térmica por encima de una temperatura de 200 °C, y que podrá ser destinada para su uso en la industria química, cosmética, farmacológica y alimentaria.

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Actualmente, la producción de residuos agroindustriales presenta graves problemas económicos y medioambientales de primera magnitud a nivel mundial, con consecuencias de gran alcance para el medio ambiente y la sociedad.
25

Sólo en la Unión Europea (UE) se generan anualmente alrededor de 88 millones de toneladas de residuos alimentarios, con una estimación de costes asociados de 143.000 millones de euros.

30 Con el objetivo de minimizar el impacto de estos residuos en el medio ambiente, se propone la utilización de residuos de biomasa procedentes de la industria agroalimentaria como fuente de diferentes compuestos de alto valor añadido, tales como la cutina, y subsidiariamente, proteínas hidrosolubles, antioxidantes y material lignocelulósico, no

habiéndose reportado hasta la fecha una metodología secuencial que combine la extracción de dichos materiales, que presentan múltiples aplicaciones industriales.

5 Las metodologías de extracción secuencial han sido aplicadas durante los últimos años (Guandalini et al., 2019; Kazemi et al., 2019; Ninčević Grassino et al., 2020) con el objetivo de maximizar la obtención de compuestos de alto valor añadido en diferentes residuos agroalimentarios, minimizando su impacto social y medioambiental.

10 La patente ES2695874B2 propone una extracción secuencial para la obtención de distintos compuestos de alto valor añadido (proteínas solubles, lípidos, pigmentos y carbohidratos) a partir de biomasa húmeda mediante extracciones sucesivas con agua subcrítica presurizada, etanol expandido con CO₂ sub- o supercrítico y, finalmente, con CO₂ supercrítico.

15 La solicitud internacional de patente WO2007086762A1 describe un método para la obtención de un extracto proteico a partir de residuos, preferentemente de carne, pescado o mariscos, hidrolizando la fuente de proteínas con un complejo enzimático extraído del kiwi o un complejo enzimático que incluya enzimas extraídas de kiwi, a una temperatura de entre 30 y 35 °C durante al menos seis horas y, a continuación, calentar rápidamente el
20 hidrolizado resultante a una temperatura de al menos 60 °C (preferiblemente 80 °C) para desactivar las enzimas y pasteurizar el hidrolizado. Con el mismo objetivo, la patente ES2626434T3 desarrolla un procedimiento para la obtención de diferentes fracciones de proteínas a partir de residuos de biomasa procedentes de semillas de sésamo, utilizando una extracción convencional que implica un calentamiento entre 30-70 °C durante al menos
25 4 horas y una recuperación del extracto proteico mediante ultrafiltración después de un adecuado ajuste del pH de la disolución.

La composición de la fracción proteica depende de la naturaleza de la fuente seleccionada. Asimismo, la composición de la cutina obtenida varía dependiendo de su origen, pero en
30 términos generales ésta puede definirse como un polímero altamente ramificado, compuesto principalmente por ácidos grasos C₁₆ y C₁₈, que contienen principalmente grupos hidroxilo terminales (ω -hidroxilo) y de cadena media, unidos a través de enlaces éster. Otro tipo de grupos funcionales tales como aromáticos, ácidos dicarboxílicos y/o glicerol se pueden encontrar formando parte de la cutina en bajas proporciones. Aunque la

cutina posee una abundancia elevada en diferentes partes de muchas especies vegetales, ésta tiene una baja accesibilidad ya que se encuentra localizada en el interior de la pared celular.

5 En esta línea, se conocen diferentes métodos de extracción que emplean disolventes orgánicos tales como cloroformo y/o metanol, refiriéndose en la inmensa mayoría de los trabajos publicados a extracciones destinadas al desarrollo de técnicas analíticas con el objetivo de analizar la compleja estructura de este polímero lipídico (Chaudhari & Singhal, 2015) (Hernández Velasco et al., 2017). Por ejemplo, Moreira y col. utilizan una
10 combinación de líquidos iónicos para extraer la cutina presente en la piel de tomate durante 6 horas a 100 °C, con el objetivo de estudiar su estructura mediante resonancia magnética nuclear (Moreira et al., 2020). La cutina presente en la piel de tomate ha sido objeto de estudio por otros investigadores, pero en todos los casos se han reportado métodos convencionales de extracción que implican elevadas temperaturas (superiores a 100 °C)
15 y/o presiones, con largos tiempos de extracción (José J. Benítez et al., 2018; José Jesús Benítez et al., 2015; Heredia-Guerrero et al., 2017; Manrich et al., 2017).

Por otro lado, en las solicitudes internacionales de patente WO2010093320 y WO2015028299A1 se desarrollan métodos para obtener una fracción rica en suberina y/o
20 cutina a partir de la corteza de abedul y de la piel de tomate, respectivamente. Estos procesos pueden resumirse, principalmente, en tres etapas: a) someter partes de las plantas que contienen suberina y/o cutina a una hidrólisis alcalina a diferentes temperaturas finales superiores a 100 °C entre 10 minutos y 6 horas; b) separar la solución acuosa de la fase sólida residual; y c) acidificar la solución acuosa dando como resultado
25 una fase acuosa y una fracción sólida seguida, opcionalmente, de otra etapa para separar dicha fracción sólida y/o oleosa de la fase acuosa, preferiblemente por centrifugación o por filtración y finalmente secado.

Para solventar los problemas que supone el uso de métodos convencionales de extracción
30 se propone el uso de una metodología de extracción asistida por ultrasonidos (UAE) para la obtención de cutina.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención preconiza un procedimiento de obtención de cutina a partir de residuos vegetales mediante extracción secuencial asistida por ultrasonidos. El objeto de la invención consiste en obtener extractos de cutina utilizando ultrasonidos, resultando en mayores rendimientos de extracción, menor número de etapas y menores requerimientos energéticos que los reportados previamente. Ventajosamente, el procedimiento propuesto permite obtener, adicionalmente, otros compuestos de alto valor añadido, tales como proteínas hidrosolubles, antioxidantes y material lignocelulósico.

La gran mayoría de residuos vegetales contienen cutina en su estructura y, por ello, pueden ser empleados como materia prima del procedimiento que propone la presente invención para la obtención de cutina.

En este sentido, se debe destacar que la mayoría de las células epidérmicas de las partes aéreas de las plantas superiores, tales como hojas, frutos y tallos no leñosos, así como algunas briófitas, están recubiertas por una membrana extracelular continua de lípidos solubles y polimerizados denominada cutícula o membrana cuticular. La cutina supone entre el 40-80% de esta membrana; por lo tanto, se pueden encontrar múltiples fuentes de este polímero en la naturaleza.

De acuerdo con la esencia de la invención, la extracción de la cutina ocurre como consecuencia de los cambios producidos en la estructura celular de la cutícula por la cavitación producida por las ondas de ultrasonidos, cuando éstas interaccionan con el residuo agroalimentario en determinadas condiciones.

Así, la presente invención permite realizar la extracción de la cutina y, opcionalmente, de otros compuestos de alto valor añadido, a partir de residuos vegetales conforme a las siguientes etapas:

- Molturación de los residuos vegetales, donde preferentemente se muelen los residuos vegetales hasta un tamaño entre 0,5 y 1 mm.
- Adición de una disolución alcalina que, preferentemente, es una disolución de hidróxido de sodio con una concentración entre el 1% y el 3% (m/v).

- 5 - Primera extracción por ultrasonidos en medio alcalino, sin necesidad de realizar pretratamiento al residuo agroalimentario molturado, obteniendo un residuo sólido rico en cutina y un sobrenadante, el cual es rico en proteínas hidrosolubles y otros compuestos de valor añadido, tales como antioxidantes. Preferentemente, esta primera extracción por ultrasonidos se realiza durante 6 minutos bajo las siguientes condiciones: potencia entre 50 y 120 W, amplitud de onda entre un 60% y un 100%, densidad de corriente entre 1 y 8 W/cm² y una temperatura menor o igual a 60 °C.
- 10 - Primera separación líquido-sólido del residuo sólido obtenido en la primera extracción por ultrasonidos respecto del sobrenadante, que preferentemente se realiza mediante filtración o centrifugación, a, al menos, 5300 rpm durante, al menos, 10 minutos. Se separa de esta forma el sobrenadante.
- 15 - Adición de una mezcla agua-etanol al residuo sólido obtenido en la etapa anterior, sin necesidad de lavado o secado previo de dicho residuo. Preferentemente, el etanol presenta una concentración entre el 40% y el 100%, v/v.
- 20 - Segunda extracción por ultrasonidos de la disolución obtenida en la etapa anterior, obteniéndose un residuo sólido rico en material lignocelulósico y un sobrenadante rico en cutina. Preferentemente, la segunda extracción por ultrasonidos se realiza durante un tiempo entre 17 y 33 minutos, con una amplitud de onda entre el 60% y el 100%, una potencia entre 30 W y 60 W, entre 1,9 W/cm² y 6 W/cm² de densidad de corriente; y con una temperatura menor o igual a 60 °C. De forma preferente, igualmente, esta segunda extracción se realiza con un control de temperatura, de forma que no se excedan los 60 °C de temperatura para evitar la degradación de la cutina extraída.
- 25 - Segunda separación sólido-líquido del residuo sólido respecto del sobrenadante a una temperatura menor o igual a 25 °C. Ventajosamente, el residuo sólido obtenido en esta etapa puede ser aprovechado, por ejemplo, para la obtención de biocombustibles, al ser rico en material lignocelulósico. De manera opcional, se realiza el secado del residuo sólido rico en material lignocelulósico, preferentemente por liofilización, para su mejor conservación y mantenimiento de sus propiedades en el tiempo.
- 30 - Adición al sobrenadante obtenido en la etapa anterior de un ácido, generándose una disolución con un pH entre 3,5 y 5,5, preferentemente con un pH de 4,5. El ácido puede ser un ácido inorgánico u orgánico. De manera preferente, el ácido empleado es un ácido orgánico, tal como el ácido cítrico, mejorando así la

sostenibilidad del proceso global.

- Mantenimiento de la disolución obtenida en la etapa anterior a, al menos, 4 °C durante al menos 4 horas y precipitación de la cutina contenida en la disolución en medio ácido.
- 5 - Recuperación de la cutina precipitada mediante una tercera separación sólido-líquido, que se realiza preferentemente mediante purificación con agua destilada y centrifugación a, al menos, 5300 rpm durante, al menos, 15 min.

De manera opcional, la cutina precipitada se somete a una etapa de secado para preservar su estabilidad. Esta etapa de secado se realiza preferentemente mediante liofilización, 10 congelando el precipitado a una temperatura de, al menos, -80 °C durante, al menos, dos horas y, posteriormente, sometiendo el precipitado a, al menos, -80 °C y a, al menos, 0,079 mbar en un equipo liofilizador, hasta alcanzar un porcentaje de agua menor del 1% en la cutina obtenida.

15 Como se ha detallado anteriormente, en la primera extracción por ultrasonidos y subsecuente separación líquido-sólido, se obtiene un residuo sólido que será procesado hasta obtener la cutina, y un sobrenadante rico en proteínas hidrosolubles (con una concentración entre 600 y 860 mg eq BSA/g de sobrenadante (donde BSA son las siglas 20 en inglés de albúmina de suero bovino, la cual es una proteína que se emplea como estándar de concentración de proteínas). El sobrenadante contiene, asimismo, compuestos antioxidantes con una capacidad antioxidante mínima de $1,5 \pm 0,1$, $1,9 \pm 0,1$ y $2,1 \pm 0,1$ mg eq. Trolox/ g sobrenadante, determinada mediante los métodos espectrofotométricos DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente. Cabe precisar que trolox es una especie 25 antioxidante de referencia, mientras que DPPH es una técnica de evaluación de la capacidad antioxidante basada en la medida de la absorbancia del DPPH (siglas en inglés de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). Por otro lado, ABTS hace referencia a la técnica de evaluación de la capacidad antioxidante basada en la reacción del ABTS (siglas en inglés de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) con el antioxidante. Finalmente, precisar 30 que FRAP (siglas en inglés de capacidad antioxidante de reducción del hierro) es otra técnica espectrofotométrica de evaluación de la capacidad antioxidante.

Por otra parte, el sobrenadante obtenido en la tercera separación sólido-líquido tras la precipitación de la cutina es sometido a una destilación-condensación a una temperatura

entre 50 °C y 60 °C y a una presión de entre 90 y 120 mbar, con objeto de recuperar el etanol para subsecuentes extracciones, y de esta manera ofrecer un procedimiento más sostenible y ventajoso económicamente.

- 5 Ventajosamente, la cutina obtenida mediante el procedimiento detallado anteriormente presenta una estabilidad térmica frente a temperaturas superiores a 200 °C.

10 Tal y como se ha detallado anteriormente, el procedimiento que se preconiza permite obtener otros productos de alto valor añadido, tal como proteínas hidrosolubles y antioxidantes.

Así, de manera opcional, el procedimiento de la invención contempla la adición de un ácido al sobrenadante obtenido en la primera separación líquido-sólido que se realiza tras la primera extracción por ultrasonidos. Este ácido, preferentemente ácido clorhídrico, se
15 adiciona al sobrenadante hasta la precipitación de las proteínas hidrosolubles contenidas en el mismo, cuando se alcanza el punto isoelectrico (PI) de las proteínas. Este valor de PI depende del tipo de proteínas presente y se produce a un determinado pH, en el cual la carga neta de la molécula proteica es nula, resultando en una disminución drástica de su solubilidad en medio acuoso. Este comportamiento permite la separación de las proteínas
20 del resto de compuestos presentes en el sobrenadante mediante precipitación.

Tras la adición del ácido y precipitación de las proteínas, se realiza una separación sólido-líquido, preferentemente a temperatura ambiente, donde el sólido obtenido corresponde a las proteínas hidrosolubles precipitadas y el líquido contiene antioxidantes disueltos. De
25 manera opcional, estas proteínas hidrosolubles precipitadas se someten a un secado para conservar su estabilidad, preferentemente, por liofilización. De igual forma, el líquido que contiene los antioxidantes disueltos es secado para preservar la estabilidad de los productos obtenidos en el tiempo.

30 Cabe destacar igualmente que mediante el procedimiento de la presente invención se elimina la necesidad de realizar un pretratamiento, por ejemplo, de desengrasado, de la materia prima de residuo vegetal. Dicha etapa previa era necesaria en los métodos convencionales de extracción e implicaba el uso de disolventes orgánicos, además de un elevado consumo de tiempo y energía.

- Por todo lo anterior, el procedimiento propuesto permite la revalorización de diferentes tipos de residuos vegetales generados en diferentes industrias, con rendimientos cuantitativos, minimizando el impacto medioambiental y económico de estos residuos. En este sentido, el objeto de la presente invención se circunscribe al procedimiento de obtención de la cutina, y opcionalmente de otros productos de alto valor añadido, a partir de residuos vegetales, así como la propia cutina obtenida por dicho procedimiento y que procede de residuos vegetales, presentando una estabilidad térmica frente a temperaturas superiores a 200 °C.
- 5
- 10 Ventajosamente, el procedimiento de la presente invención posibilita la obtención o extracción secuencial de cutina incluso en materiales vegetales donde se encuentra material péctico próximo a la membrana cuticular, siendo necesario degradar la pectina para poder dejar expuesta la cutina y poder extraerla. En este sentido, se ha comprobado - tal como y como se detalla en el apartado realización preferente - que el procedimiento de
- 15 la presente invención posibilita la obtención o extracción de cutina incluso para la piel de manzana, tomate y sandía.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 Para complementar la descripción realizada y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción una figura donde con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:
- 25 La figura 1.- Muestra un diagrama de flujo del procedimiento de obtención de cutina de la invención, donde se han representado las extracciones secuenciales por ultrasonidos y los productos obtenidos en las distintas etapas.

REALIZACION PREFERENTE

- 30 Conforme a los ensayos realizados en tres tipos de residuos vegetales distintos, el procedimiento de la presente invención ha permitido obtener cutina, así como proteínas hidrosolubles, componentes antioxidantes y un sólido rico en material lignocelulósico, a partir de dos extracciones secuenciales por ultrasonidos. En este sentido, se detalla

seguidamente el procedimiento seguido para la obtención de cutina a partir de piel de manzana o de tomate y a partir de piel de sandía.

5 Las realizaciones preferentes que se detallan en el presente apartado constituyen ejemplos no limitativos de la invención.

Así, en una primera realización preferente de la invención se obtiene cutina a partir de un residuo vegetal (5) formado por piel de sandía, de acuerdo al diagrama de flujo representado en la figura 1.

10 Para ello, se deposita 1 g de residuo vegetal (5) de piel de sandía, previamente molido hasta un tamaño entre 0,5-1 mm, en 40 ml de hidróxido de sodio al 3% (m/v). La mezcla se somete a una extracción por ultrasonidos (1) durante 6 minutos, utilizando un sonotrodo de 22 mm de diámetro, bajo las siguientes condiciones: 98,6 W de potencia, 100% de
15 amplitud de onda, 6,48 W/cm² de densidad de corriente y 60 °C de temperatura.

A continuación, se lleva a cabo una primera separación líquido-sólido para separar el residuo sólido (R1) del sobrenadante (S1) mediante filtración a temperatura ambiente.

20 El sobrenadante (S1) recuperado, rico en proteínas hidrosolubles y antioxidantes, se somete a una etapa de precipitación (4). Para ello, al sobrenadante (S1) se le adiciona ácido clorhídrico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de las proteínas extraídas con objeto de precipitarlas, separándolas de la disolución mediante centrifugación a temperatura ambiente y 10000 rpm durante 7 minutos. De esta etapa de precipitación (4) y posterior
25 separación líquido-sólido se obtiene un sólido que corresponde a las proteínas hidrosolubles precipitadas (R4) y un líquido (S4) que contiene antioxidantes disueltos.

Por otra parte, al residuo sólido (R1), recuperado tras la primera extracción por ultrasonidos (1) y posterior separación líquido-sólido, sin necesidad de lavado o secado previo de dicho
30 residuo, se le adicionan 40 ml de una mezcla de etanol-agua al 40% v/v. La disolución obtenida se somete a una segunda extracción por ultrasonidos (2) durante 32,4 minutos, utilizando un sonotrodo de 22 mm de diámetro, bajo las siguientes condiciones: 30 W de potencia, 60% de amplitud de onda, 5,9 W/cm² de densidad de corriente y 60 °C de temperatura. En esta segunda extracción por ultrasonidos (2) se obtiene un residuo sólido

(R2) rico en material lignocelulósico y un sobrenadante (S2) rico en cutina.

A continuación, se realiza una segunda separación sólido-líquido para separar el residuo sólido (R2) del sobrenadante (S2) rico en cutina. El sobrenadante (S2) se somete a una etapa de precipitación (3). Para ello, al sobrenadante (S2) se le adiciona ácido cítrico 3 M hasta un pH final de 4,5. La disolución obtenida se mantiene a 4 °C durante un mínimo de 4 horas. Finalmente, esta disolución se centrifuga a 5300 rpm durante 15 minutos, obteniendo cutina precipitada (R3) sólida y un sobrenadante (S3). Para purificar la cutina sólida obtenida se añaden 10 ml de agua destilada y se repite el proceso de centrifugación bajo las mismas condiciones. La cutina precipitada (R3) es llevada a sequedad antes de su almacenamiento a vacío, para mantener todas sus propiedades. Por otro lado, el residuo sólido (R2) rico en material lignocelulósico es también secado para preservar su estabilidad durante su almacenamiento. El sobrenadante (S3) obtenido tras la precipitación de la cutina (R3) es sometido a un proceso de destilación-condensación a temperaturas moderadas (50 -60 °C) y baja presión (90-120 mbar), con objeto de recuperar el etanol para posteriores extracciones de cutina.

La tabla 1 resume la composición de ácidos grasos obtenida para la cutina extraída a partir de residuo vegetal de sandía, utilizando las condiciones detalladas anteriormente para la segunda extracción por ultrasonidos (2), C1 en la tabla 1, y unas condiciones alternativas, C2 para la segunda extracción por ultrasonidos (2). Las composiciones de ácidos grasos detalladas en la tabla 1 no pretenden limitar el alcance de la invención, sino ser ilustrativas, ya que la composición final de la cutina dependerá de las condiciones utilizadas durante la extracción, así como del tipo de residuo agroalimentario utilizado.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos mayoritarios (%) para la cutina obtenida a partir de piel de sandía utilizando diferentes condiciones de extracción en la etapa 2. C1: 30 W, 60% amplitud, 5,9 W/cm², 60 °C y 32,4 min. C2: 58 W, 60% amplitud, 1,9 W/cm², 60 °C y 17,05 min.

Compuesto	C1	C2
Ácido hexadecanoico	44 ± 1	43 ± 1

Ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z)	13 ± 1	11 ± 1
Ácido linoleico	20 ± 1	16 ± 1
Ácido octadecanoico	8 ± 1	12 ± 1
Ácido 9,10-Dihidroxiocetadecanedioico	-	3 ± 1
Ácido 10,16-hexadecanoico	3 ± 1	-

Por otro lado, en una segunda realización preferente de la invención se obtiene cutina a partir de un residuo vegetal (5) de piel de manzana.

5

Para ello, se deposita 1 g de residuo vegetal (5) de piel de manzana, previamente molido hasta un tamaño entre 0,5-1 mm, en 40 ml de hidróxido de sodio al 3% (m/v). La mezcla se somete a una extracción por ultrasonidos (1) durante 6 minutos, utilizando un sonotrodo de 22 mm de diámetro, bajo las siguientes condiciones: 98,6 W de potencia, 100% de amplitud de onda, 6,48 W/cm² de densidad de corriente y 60 °C de temperatura.

10

A continuación, se lleva a cabo una primera separación líquido-sólido para separar el residuo sólido (R1) del sobrenadante (S1) mediante centrifugación a 5300 rpm durante 10 minutos.

15

El sobrenadante (S1) recuperado, rico en proteínas hidrosolubles y antioxidantes, se somete a una etapa de precipitación (4). Para ello, al sobrenadante (S1) se le adiciona ácido clorhídrico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de las proteínas extraídas con objeto de precipitarlas, separándolas de la disolución mediante centrifugación a temperatura ambiente y 10000 rpm durante 7 minutos. De esta etapa de precipitación (4) y posterior separación líquido-sólido se obtiene un sólido que corresponde a las proteínas hidrosolubles precipitadas (R4) y un líquido (S4) que contiene antioxidantes disueltos.

20

Por otra parte, al residuo sólido (R1), recuperado tras la primera extracción por ultrasonidos (1) y posterior separación líquido-sólido, sin necesidad de lavado o secado previo de dicho residuo, se le adicionan 80 ml de una mezcla de etanol-agua al 40% v/v. La disolución obtenida se somete a una segunda extracción por ultrasonidos (2) durante 17,05 minutos,

25

utilizando un sonotrodo de 22 mm de diámetro, bajo las siguientes condiciones: 58 W de potencia, 60% de amplitud de onda, 1,9 W/cm² de densidad de corriente y 60 °C de temperatura. En esta segunda extracción por ultrasonidos (2) se obtiene un residuo sólido (R2) rico en material lignocelulósico y un sobrenadante (S2) rico en cutina.

5

A continuación, se realiza una segunda separación sólido-líquido para separar el residuo sólido (R2) del sobrenadante (S2) rico en cutina. El sobrenadante (S2) se somete a una etapa de precipitación (3). Para ello, al sobrenadante (S2) se le adiciona ácido clorhídrico 3 M hasta un pH final de 2,5. La disolución obtenida se mantiene a 4 °C durante un mínimo de 4 horas. Finalmente, esta disolución se centrifuga a 5300 rpm durante 15 minutos, obteniendo cutina precipitada (R3) sólida y un sobrenadante (S3). Para purificar la cutina sólida obtenida se añaden 10 ml de agua destilada y se repite el proceso de centrifugación bajo las mismas condiciones. La cutina precipitada (R3) es llevada a sequedad antes de su almacenamiento a vacío, para mantener todas sus propiedades. Por otro lado, el residuo sólido (R2) rico en material lignocelulósico es también secado para preservar su estabilidad durante su almacenamiento. El sobrenadante (S3) obtenido tras la precipitación de la cutina (R3) es sometido a un proceso de destilación-condensación a temperaturas moderadas (50-60 °C) y baja presión (90-120 mbar), con objeto de recuperar el etanol para posteriores extracciones de cutina.

20

La tabla 2 resume la composición de ácidos grasos obtenida para la cutina extraída a partir de residuo vegetal de piel de manzana, utilizando las condiciones detalladas anteriormente para la segunda extracción por ultrasonidos (2), C1 en la tabla 2, y unas condiciones alternativas, C2 para la segunda extracción por ultrasonidos (2). Las composiciones de ácidos grasos detalladas en la tabla 2 no pretenden limitar el alcance de la invención, sino ser ilustrativas, ya que la composición final de la cutina dependerá de las condiciones utilizadas durante la extracción, así como del tipo de residuo agroalimentario utilizado.

25

Tabla 2. Composición de ácidos grasos mayoritarios (%) para la cutina obtenida a partir de piel de manzana utilizando diferentes condiciones de extracción en la etapa 2. C1: 30 W, 60% amplitud, 5,9 W/cm², 60 °C y 32,4 min. C2: 58 W, 60% amplitud, 1,9 W/cm², 60 °C y 17,05 min.

Compuesto	C1	C2
Ácido hexadecanoico	13 ± 1	8 ± 1
Ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z)	35 ± 5	20 ± 1
Ácido Trans-9-octadecenoico	-	12 ± 1
Ácido oleico	18 ± 1	-
Ácido octadecanoico	6 ± 1	5 ± 1
Ácido 10,16-hexadecanoico	2 ± 1	7 ± 1
Ácido 9,10,18-trihidroxi-octadecanoico	5 ± 1	11 ± 1

5

En un tercer ejemplo de realización de la invención se empleó un 1 g de residuo de piel de tomate y se realizó el mismo procedimiento y con las mismas condiciones que para el segundo ejemplo de realización detallado anteriormente (piel de manzana).

10

Así, en la tabla 3 se detalla la composición de ácidos grasos obtenida para la cutina extraída a partir de residuo vegetal de piel de tomate utilizando las condiciones detalladas anteriormente para la segunda extracción por ultrasonidos (2), C1 en la tabla 3, y unas condiciones alternativas, C2 para la segunda extracción por ultrasonidos (2). Las composiciones de ácidos grasos detalladas en la tabla 3 son meramente ilustrativas y no limitativas de la presente invención.

15

Tabla 3. Composición de ácidos grasos mayoritarios (%) para la cutina obtenida a partir de piel de tomate utilizando diferentes condiciones de extracción en la etapa 2. C1: 30 W, 60% amplitud, 5,9 W/cm², 60 °C y 32,4 min. C2: 58 W, 60% amplitud, 1,9 W/cm², 60 °C y 17,05 min.

Compuesto	C1	C2
Ácido hexadecanoico	25 ± 1	13 ± 2
Ácido 9,12-octadecadienoico (Z,Z)	40 ± 3	9 ± 2
Ácido oleico	15 ± 2	5 ± 1
Ácido octadecanoico	5 ± 1	3 ± 1
Ácido 10,16-hexadecanoico	5 ± 2	59 ± 7

5

Finalmente, en la tabla 4, a modo ilustrativo, se muestran los resultados obtenidos tras la aplicación del procedimiento de extracción secuencial por ultrasonidos propuesto, utilizando diferentes residuos vegetales tales como piel de sandía, de manzana y de

10

Tabla 4. Composición de los extractos obtenidos tras la aplicación de la extracción secuencial de proteínas y cutina a partir de diferentes residuos vegetales bajo las siguientes condiciones: Primera extracción por ultrasonidos (1): 98,6 W, 100% de amplitud, 6,48 W/cm², 60 °C y 6 min. Segunda extracción por ultrasonidos (2): 58 W, 60% amplitud, 1,9 W/cm², 60 °C y 17,05 min.

15

Residuo vegetal	Proteínas	Proteínas	Cutina obtenida (R3, %)*
	hidrosolubles precipitadas (R4, %)*	hidrosolubles precipitadas (R4) (mg eq BSA/g R4)**	
Piel de manzana	7 ± 2	857 ± 1	20 ± 1
Piel de sandía	5 ± 1	625 ± 2	7 ± 1
Piel de tomate	9 ± 1	590 ± 3	14 ± 2

* Respecto a la cantidad de residuo vegetal (5) de partida.

** Respecto a la cantidad de proteínas hidrosolubles obtenidas.

5 Además, se ha comprobado que la cutina obtenida en todos los casos es estable a temperaturas superiores a 200 °C, presentando así una elevada estabilidad térmica para su procesado en diferentes aplicaciones.

10 Por otro lado, en esta metodología se eliminan etapas de pretratamiento de muestra propuestas por diferentes autores, tales como desengrasado inicial y secado, en los distintos procesos de extracción, que implican el uso de disolventes orgánicos, además de un elevado consumo de tiempo y energía. En esta línea, esta metodología permite realizar la recuperación del etanol utilizado durante la extracción para ser reutilizado en posteriores procesos de extracción, disminuyendo la huella de carbono e implicando a su vez una
15 reducción significativa de los costes derivados del procedimiento propuesto.

Referencias bibliográficas:

20 Benítez, José J., Castillo, P. M., del Río, J. C., León-Camacho, M., Domínguez, E., Heredia, A., Guzmán-Puyol, S., Athanassiou, A., & Heredia-Guerrero, J. A. (2018). Valorization of Tomato Processing by-Products: Fatty Acid Extraction and Production of Bio-Based Materials. *Materials*, 11(11), 2211. <https://doi.org/10.3390/ma11112211>.

25 Benítez, José Jesús, Heredia-Guerrero, J. A., Guzmán-Puyol, S., Barthel, M. J., Domínguez, E., & Heredia, A. (2015). Polyhydroxyester Films Obtained by Non-Catalyzed Melt-Polycondensation of Natural Occurring Fatty Polyhydroxyacids. *Frontiers in Materials*, 2, 24. <https://doi.org/10.3389/fmats.2015.00059>.

Chaudhari, S. A., & Singhal, R. S. (2015). Cutin from watermelon peels: A novel inducer for cutinase production and its physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 398–404. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2015.05.006>.

30 Guandalini, B. B. V., Rodrigues, N. P., & Marczak, L. D. F. (2019). Sequential extraction of phenolics and pectin from mango peel assisted by ultrasound. *Food Research International*, 119, 455–461. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.12.011>.

- Heredia-Guerrero, J. A., Heredia, A., Domínguez, E., Cingolani, R., Bayer, I. S., Athanassiou, A., & Benítez, J. J. (2017). Cutin from agro-waste as a raw material for the production of bioplastics. In *Journal of experimental botany* (Vol. 68, Issue 19, pp. 5401–5410). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx272>.
- 5 Hernández Velasco, B. L., Arrieta-Baez, D., Cortez Sotelo, P. I., Méndez-Méndez, J. V., Berdeja Martínez, B. M., & Gómez-Patiño, M. B. (2017). Comparative studies of cutins from lime (*Citrus aurantifolia*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) after TFA hydrolysis. *Phytochemistry*, 144, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.08.017>.
- 10 Kazemi, M., Khodaiyan, F., Hosseini, S. S., & Najari, Z. (2019). An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan. *Waste Management*, 100, 101–111. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2019.09.013>.
- 15 Moreira, C. J. S., Bento, A., Pais, J., Petit, J., Escórcio, R., Correia, V. G., Pinheiro, Â., Haliński, Ł. P., Mykhaylyk, O. O., Rothan, C., & Silva Pereira, C. (2020). An Ionic Liquid Extraction That Preserves the Molecular Structure of Cutin Shown by Nuclear Magnetic Resonance. *Plant Physiology*, 184(2), 592–606. <https://doi.org/10.1104/pp.20.01049>.
- 20 Ninčević Grassino, A., Djaković, S., Bosiljkov, T., Halambek, J., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Petrović, M., & Rimac Brnčić, S. (2020). Valorisation of Tomato Peel Waste as a Sustainable Source for Pectin, Polyphenols and Fatty Acids Recovery Using Sequential Extraction. *Waste and Biomass Valorization*, 11(9), 4593–4611. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-019-00814-7>.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales que comprende las siguientes etapas:

5

- molturación de los residuos vegetales (5),
- adición de una disolución alcalina,
- primera extracción por ultrasonidos (1), obteniendo un residuo sólido (R1) y un sobrenadante (S1), el cual contiene proteínas hidrosolubles y antioxidantes,

10

- primera separación líquido-sólido del residuo sólido (R1) respecto del sobrenadante (S1),

- adición de una mezcla agua-etanol al residuo sólido (R1) obtenido en la etapa anterior,

15

- segunda extracción por ultrasonidos (2) de la disolución obtenida en la etapa anterior, obteniendo un residuo sólido (R2) rico en material lignocelulósico y un sobrenadante (S2),

- segunda separación sólido-líquido del residuo sólido (R2) respecto del sobrenadante (S2) a una temperatura menor o igual a 25 °C,

20

- adición al sobrenadante (S2) de un ácido, generándose una disolución con un pH entre 3,5 y 5,5,

- mantenimiento de la disolución obtenida en la etapa anterior a, al menos, 4 °C durante al menos 4 horas y precipitación de la cutina contenida en la disolución en medio ácido,

25

- recuperación de la cutina precipitada (R3),

donde la cutina obtenida presenta una estabilidad térmica frente a temperaturas superiores a 200 °C.

30

2. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1ª, caracterizado por que en la etapa de molturación se muelen los residuos vegetales (5) hasta un tamaño entre 0,5 y 1 mm.

3. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1ª, caracterizado por que la disolución alcalina es una disolución de hidróxido

de sodio con una concentración entre el 1% y el 3% (m/v).

4. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que la primera extracción por ultrasonidos (1) se realiza aplicando durante 6 minutos ultrasonidos bajo las siguientes condiciones: entre 50 y 120 W de potencia, entre 60% y 100% de amplitud de onda, entre 1 y 8 W/cm² de densidad de corriente y una temperatura menor o igual a 60 °C.
5. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que la primera separación líquido-sólido se realiza mediante centrifugación a, al menos, 5300 rpm durante, al menos, 10 minutos.
6. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que el etanol presenta una concentración entre el 40% y el 100% (v/v).
7. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que la segunda extracción por ultrasonidos (2) se realiza aplicando durante un tiempo entre 17 y 33 minutos ultrasonidos bajo las siguientes condiciones: entre 60%-y 100% de amplitud de onda, potencia entre 30 W y 60 W, densidad de corriente entre 1,9 W/cm² - 6 W/cm² y temperatura menor o igual a 60 °C.
8. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que el ácido adicionado al sobrenadante (S2) recuperado en la segunda extracción por ultrasonidos (2) es un ácido orgánico, tal como el ácido cítrico.
9. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que se realiza el secado del residuo sólido (R2) obtenido en la segunda separación líquido-sólido.
10. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que la recuperación de la cutina precipitada (R3) se realiza mediante purificación con agua destilada y centrifugación a 5300 rpm durante, al

menos, 15 minutos.

- 5
11. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que se realiza el secado de la cutina precipitada (R3).
12. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 11^a, caracterizado por que el secado de la cutina precipitada (R3) se realiza por liofilización hasta alcanzar un porcentaje de agua menor del 1% en la cutina obtenida.
- 10
13. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que el sobrenadante (S3) obtenido tras la precipitación de la cutina es sometido a una destilación-condensación a una temperatura entre 50 °C y 60 °C y a una presión de entre 90 y 120 mbar para la recuperación del etanol.
- 15
14. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 1^a, caracterizado por que al sobrenadante (S1) obtenido en la primera separación líquido-sólido se le adiciona un ácido hasta la precipitación de las proteínas hidrosolubles contenidas en el sobrenadante (S1), cuando se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas hidrosolubles.
- 20
15. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 14^a, caracterizado por que el ácido utilizado es ácido clorhídrico.
- 25
16. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 14^a, caracterizado por que se realiza una separación sólido-líquido a temperatura ambiente, donde el sólido obtenido corresponde a las proteínas hidrosolubles precipitadas (R4) y el líquido (S4) contiene antioxidantes disueltos.
- 30
17. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 16^a, caracterizado por que se realiza el secado de las proteínas hidrosolubles precipitadas (R4).
18. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 17^a, caracterizado por que el secado de las proteínas hidrosolubles

precipitadas (R4) se realiza por liofilización.

5 19. Procedimiento para la obtención de cutina a partir de residuos vegetales, según reivindicación 16^a, caracterizado por que se realiza el secado del líquido (S4) que contiene los antioxidantes disueltos.

20. Cutina obtenida conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la cutina procede de residuos vegetales y presenta una estabilidad térmica frente a temperaturas superiores a 200 °C.

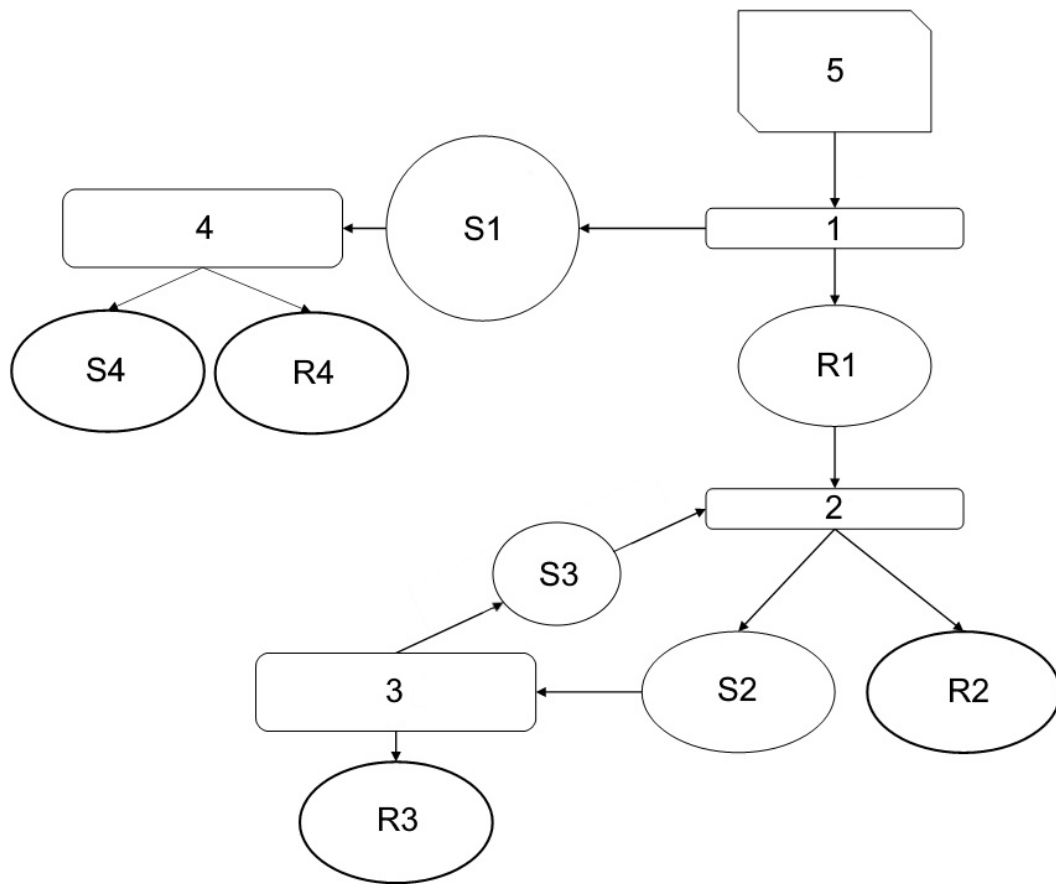


FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202230335

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.04.2022

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. ci.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2015028299 A1 (CHIESA VIRGINIO et al.) 05/03/2015, Resumen y figuras	1-20
A	WO 2007086762 A1 (VITAL FOOD PROCESSORS LTD et al.) 02/08/2007, Resumen	1-20
A	WO 2017100636 A1 (APEEL TECH INC et al.) 15/06/2017, Resumen	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.10.2022

Examinador
I. Abad Gurumeta

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B01J19/10 (2006.01)

C11B1/10 (2006.01)

C12P21/06 (2006.01)

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

B01J, C11B, C12P

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

INVENES, EPODOC