(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 341 428**

(51) Int. Cl.:
A23L 1/212 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A23K 1/14 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08004242 .7**
(96) Fecha de presentación : **07.03.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1967079**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

(54) Título: **Procedimiento para preparar extractos de granada.**

(30) Prioridad: **08.03.2007 EP 07004765**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.03.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.03.2011

(73) Titular/es: **PROBELTE PHARMA, S.A.**
Ctra. Madrid, Km. 389
Polígono Industrial El Tiro
30100 Espinardo, Murcia, ES

(72) Inventor/es: **López Más, José A.;**
Streitenberger, Sergio A.;
Peñalver Mellado, Marcos y
Martínez Ortis, Pedro

(74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

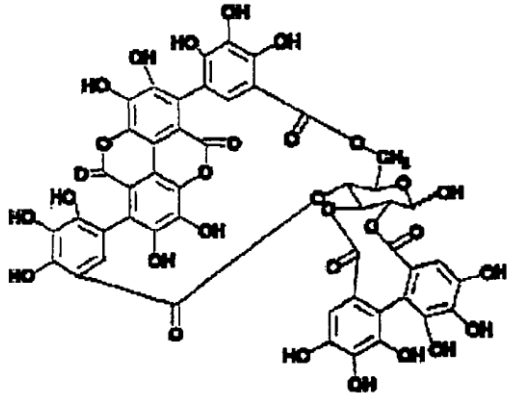
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar extractos de granada y a dichos extractos. Más particularmente, la invención se refiere a la producción de productos que contienen elagitaninos que van a usarse como fuente de elagitaninos de granada en las industrias alimentaria, médica y cosmética. Los taninos son polifenoles vegetales que incluyen dos categorías de compuestos, taninos condensados, proantocianidinas y taninos hidrolizables, incluyendo galotaninos (ésteres de ácido gálico unidos a un núcleo de azúcar) y elagitaninos (éster de ácido elágico también unido a un núcleo de azúcar). Por tanto, los elagitaninos son taninos hidrolizables que incluyen punicalaginas y otros derivados de ácido elágico tales como glucósido de ácido elágico y ramnósido de ácido elágico.

Entre los elagitaninos de la granada, las punicalaginas son los principales taninos de la piel de la fruta. Los anómeros α y β de las punicalaginas están presentes principalmente en la piel de la granada y pasan al zumo primario durante el prensado para la extracción del zumo. Las punicalaginas α y β tienen la siguiente fórmula:



Estudios recientes demostraron que el zumo de granada y los extractos de granada contienen varios compuestos bioactivos, particularmente polifenoles; entre estos polifenoles, los elagitaninos son de una importancia biológica extraordinaria en vista de su actividad antioxidante, antimicrobiana y eliminadora de radicales.

Los estudios han demostrado que el zumo de granada tiene mayores propiedades antioxidantes que cualquier otra bebida, tal como el zumo de arándanos azules, el zumo de arándanos rojos, el té verde o el vino tinto. Los anómeros α y β de las punicalaginas son los elagitaninos predominantes en el zumo de granada, y los principales responsables de las propiedades antioxidantes del zumo. No obstante, la investigación señaló que la combinación de punicalaginas α y β con otros compuestos fitoquímicos tales como el ácido elágico y sus derivados glicosilados y otros elagitaninos de granada minoritarios produce un importante efecto sinérgico que potencia los beneficios para la salud del zumo.

Se ha investigado y está investigándose activamente la producción de extractos que contienen una amplia variedad de elagitaninos y compuestos fitoquímicos procedentes de la granada; un procedimiento de extracción eficaz podría ser muy rentable.

Ha aparecido en el mercado una reciente profusión de extractos de granada, normalizados al 40% de ácido elágico. Sin embargo, la cantidad de ácido elágico *per se* no es relevante, porque se encontró que cuando el ácido elágico libre se administra por vía oral, se absorbe escasamente. De hecho, numerosos estudios concluyeron que la sinergia entre los diversos compuestos fitoquímicos de la granada y no simplemente la concentración de ácido elágico, es un factor clave para evaluar los beneficios para la salud de los extractos de granada.

El documento US 2006/0211635 da a conocer la purificación de elagitaninos de granada a partir de la piel de la fruta, un subproducto de la industria de zumos comerciales. El procedimiento incluye las etapas de preparar, por ejemplo mediante combinación, una suspensión acuosa de piel de granada, eliminar los sólidos suspendidos de la disolución acuosa, adsorber los elagitaninos en una superficie de resina (por ejemplo, resina XAD-16) de la disolución acuosa, eluir la superficie de la resina con etanol o metanol y evaporar el disolvente.

De manera similar, el documento WO2005/097106 y el artículo correspondiente “Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by product of the commercial juice industry” Separation and Purification Technology, ELSEVIER SCIENCE 41, n.º 1, enero de 2005, páginas 49-55, describe la extracción de punicalaginas sólo de la piel y la purificación en una columna aspirada por vacío de resina de adsorción. Los taninos adsorbidos en la columna se recuperan mediante elución con MeOH.

Estos procedimientos tienen el inconveniente de requerir el uso de disolventes orgánicos, incluso tóxicos tales como metanol, y de usar sólo pieles para evitar tener muchos azúcares en la disolución extraída. Por tanto, este

procedimiento genera un extracto que carece de varios compuestos fitoquímicos importantes presentes principalmente en la fracción de zumo de granada y contiene trazas de los disolventes orgánicos usados.

El documento WO2006/127832 da a conocer un método para producir un extracto de granada a partir de subproductos de la industria de zumos. Los sólidos de la granada, el pericarpio, la membrana interna y las semillas se mezclan con una disolución acuosa y se calientan de manera óptima hasta 43-71ºC añadiendo enzimas que degradan parcialmente los sólidos de la granada. Después de eso, el procedimiento continúa tal como sigue: se eliminan los sólidos insoluble restantes mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, microfiltración) para producir el extracto que contiene compuestos fitoquímicos de granada, y se concentra el extracto líquido resultante en un evaporador a vacío, se pasteuriza y se vuelve a concentrar en el evaporador, se enfría, se combina y se normaliza. El procedimiento descrito anteriormente incluye varios tratamientos térmicos en los que el extracto se somete a calentamiento (2 h a 43-71ºC y pasteurización). La pasteurización del zumo de granada produce ácido elágico libre a través de la degradación de elagitaninos más grandes, tales como punicalaginas, lo que disminuye los beneficios para la salud de beber el zumo. Estas etapas generan varios subproductos que son difíciles de eliminar y, además, el uso de sólidos de granada procedentes de la industria de zumos genera un extracto que no contiene algunos compuestos fitoquímicos presentes principalmente en la fracción de zumo de granda. Por este motivo, el documento WO2006/127832 da a conocer en una de las realizaciones la combinación de extracto y zumo de granada, lo que de hecho proporciona un amplio espectro de los compuestos fitoquímicos presentes en toda la granada, pero tiene la desventaja del alto valor calórico debido a los azúcares presentes tanto en el zumo como en el extracto.

BALA *et al.* "Antimutagenic effect of Pomeganate (*Punica granatum var. anardana*) fruit extracts on direct acting and S9-dependent mutagens in Salmonella typhimurium" en J. of Plant Science Research, 8, n.º 1/4, 1992, páginas 14-16, trata el efecto antimutagénico de un extracto acuoso y con cloroformo de granada obtenido sumergiendo fruta prensada en cloroformo y agua. Finalmente, se evaporó el cloroformo y se sustituyó por un volumen igual de dimetilsulfóxido.

El documento US2007/031332 da a conocer el uso de varios extractos de frutas o extractos de plantas diferentes como fuente de ácido gálico para la inhibición de la angiogénesis. El ejemplo 23 de la descripción da a conocer un procedimiento de extracción de fruta de granada en el que las frutas se cortan y se prensan manualmente, se extraen en agua desionizada a una razón 1/15 p/v con ebullición durante 30 min., separación del extracto líquido, concentración y liofilización del extracto bruto, reconstitución del extracto bruto con agua desionizada a una razón 1/15 p/v y purificación en resina de adsorción con elución con etanol.

Cerdà Begoña "Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice" Eur. J. of Nutrition, enero de 2003, 42, 1, páginas 18-28 y en "Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalgin to rats for 37 days is not toxic" J. of Agric. and Food, 51, 11, mayo de 2003, páginas 3493-3501 describe la extracción de punicalagina a partir de una combinación de agua y piel de granada durante 2 horas a temperatura ambiente, filtración a través de una extracción en fase sólida, cromatografía inversa en columnas C-18 y elución con alcohol (MeOH), y mediante HPLC semipreparativa con MeOH-ácido acético -agua (página 3495, columna de la izquierda). Este producto es punicalagina sustancialmente pura.

Mayer W *et al.* en "Punicalagin und punicalin zwei gerbstoffe aus den schalen del granatäpfel", Justus Liebigs Annalen der Chemie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 11/12, 1 enero de 1977, páginas 1976-1986, da a conocer el aislamiento a partir de una mezcla de taninos obtenida de cáscaras de granadas, de los dos taninos cristalinos, denominados punicalagina y punicalina, mediante una serie prolongada de separaciones cromatográficas. Debe observarse que el aislamiento sólo tiene un fin analítico, que es la caracterización fisicoquímica de la punicalagina y la punicalina obtenidas a escala de laboratorio.

En resumen, las técnicas mencionadas anteriormente tienen la desventaja de que o bien sólo están usando la piel y/o los subproductos de la industria de zumos, o bien están aplicando condiciones duras que dan como resultado un extracto rico en ácido elágico que requiere metanol o etanol para su purificación.

Un problema adicional es que los procedimientos de extracción conocidos no siempre dan los mismos resultados en la composición del extracto final; concretamente, los inventores encontraron que, aunque siguiendo los mismos procedimientos, la cantidad de punicalaginas y ácido elágico en el extracto final puede variar espectacularmente.

Por tanto, existe la necesidad de un procedimiento de extracción de granadas que pueda dar un producto final que sea rico en punicalaginas y que tenga una cantidad reducida de ácido elágico, y que pueda dar composiciones constantes y repetibles del extracto final.

Es un objeto de la presente invención resolver los problemas mencionados anteriormente y proporcionar un procedimiento de producción de extracto de granada que sea sencillo, eficaz, económico, que pueda proporcionar punicalaginas solubles en agua en lugar de ácido elágico soluble en disolventes, y que pueda proporcionar de una forma repetible un producto final (líquido o sólido) que tenga el amplio espectro de los compuestos químicos orgánicos naturales diferentes que están presentes en la fruta de granada completa, por ejemplo tanto elagitaninos como

antocianinas. Dicho de otro modo, es un objeto de la presente invención obtener un extracto que pueda usarse para transferir las propiedades útiles de la granada a cualquier preparación o alimento.

Un objeto de este tipo se logra por medio de la presente invención que proporciona un procedimiento según la reivindicación 1.

Según la invención, el procedimiento prevé una extracción en ausencia de disolventes orgánicos, de toda la fruta, es decir, frutas de granda completas; preferiblemente las frutas enteras, previamente lavadas, se combinan con una mezcladora, conocida en la técnica a temperatura ambiente. En la etapa de combinación, las palas de la mezcladora cortan los trozos de fruta para obtener una suspensión, es decir, una dispersión de partículas de fruta en agua. La razón agua/granadas está dentro del intervalo de 1:1 a 1:2 (litros/kg) y la combinación/corte se lleva a cabo hasta que las frutas se han dispersado homogéneamente en agua.

En un aspecto preferido de la invención, las frutas se tratan con una disolución acuosa de un ácido, a un pH dentro del intervalo de 1,0 a 2,0. Los inventores encontraron que este tratamiento da como resultado resultados mucho más constantes en la composición final: concretamente, mediante el tratamiento con ácido mineral, la cantidad de ácido elágico siempre se mantiene por debajo del valor del 5% (p/p) del extracto final. Se cree que el tratamiento con ácido es una etapa de inactivación eficaz para la enzima tanasa y tiene en cuenta la omnipresencia de hongos filamentosos en la granada, que pueden producir tanasa tanto de manera extracelular como intracelular.

El tratamiento con ácido puede llevarse a cabo antes, durante o tras la etapa de extracción, pero antes de la etapa de purificación en columnas. Preferiblemente, el tratamiento con ácido se lleva a cabo durante la etapa de extracción, es decir, cuando las frutas completas se combinan en agua para proporcionar una dispersión fina homogénea.

Según este aspecto de la invención, el agua del tratamiento con ácido usada para la combinación se acidifica previamente añadiendo un ácido, preferiblemente ácido sulfúrico, estando la concentración de ácido final dentro del intervalo del 0 al 1% (p/v de agua). El pH de la mezcla homogeneizada que resulta de la combinación está dentro del intervalo de 1,0 a 2,0.

Si es necesario, se reajusta el pH del extracto bruto de granada dentro del intervalo de 3,5 a 5,0 añadiendo una base, preferiblemente NaOH, y se clarifica mediante métodos físicos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante filtración y/o centrifugación, para eliminar los sólidos insolubles de la disolución acuosa, y para obtener una disolución clarificada sustancialmente libre de sólidos insolubles.

Según la invención, las etapas de extracción anteriores van seguidas por una etapa de purificación en la que se carga la disolución acuosa, es decir, el producto obtenido previamente, en una columna cromatográfica de una resina seleccionada de resinas no iónicas adsorbentes para adsorber los compuestos de interés que posteriormente se recuperan mediante elución de la columna de adsorción con una disolución débilmente básica acuosa, preferiblemente una disolución tampón, lo más preferiblemente obtenida con tampón bicarbonato de sodio. La elución se completa mediante una etapa de desplazamiento con agua desmineralizada.

Según otra realización preferida de la invención, el extracto bruto de granada se somete a un tratamiento térmico, que puede llevarse a cabo antes o después de la etapa de clarificación, pero en todos los casos antes de la etapa de purificación en columnas. Este procedimiento supone el tratamiento con calor del producto bruto a una temperatura que no supera los 100ºC, preferiblemente dentro del intervalo de 70ºC a 100ºC y lo más preferiblemente, en el intervalo de 80ºC a 90ºC con un tiempo de residencia dentro del intervalo de 1 segundo a 120 segundos y lo más preferiblemente en el intervalo de 5 segundos a 30 segundos. El pH de la disolución acuosa clarificada que se somete al tratamiento con calor está dentro del intervalo de 1,0 a 5,0 y lo más preferiblemente en el intervalo de 3,5 a 5,0.

Según un aspecto adicional de la invención, el producto líquido purificado en columna obtenido con o sin tratamiento térmico durante su procesamiento, se concentra mediante nanofiltración y/o concentración por ósmosis inversa, para eliminar el agua y las sales presentes en la disolución.

Según una etapa adicional, tras la purificación cromatográfica y la nanofiltración y/o concentración por ósmosis inversa, el producto líquido resultante se lleva a una forma sólida, por ejemplo mediante liofilización, rotaevaporación a vacío o secado por pulverización, con o sin vehículos tales como maltodextrinas o fibra soluble.

Un objeto adicional de la invención son los extractos que contienen elagitaninos que pueden obtenerse según el procedimiento mencionado anteriormente. Estos productos pueden estar en forma sólida y están caracterizados por tener un contenido en punicalaginas de al menos el 30% (p/p), una pureza de al menos el 70%, un contenido en ácido elágico de menos del 15% (p/p) y un contenido en antocianinas de al menos el 0,1% (p/p), preferiblemente de al menos el 1%.

La invención proporciona varias ventajas con respecto a las técnicas de la técnica anterior.

Lo primero de todo, la etapa de extracción se lleva a cabo usando frutas de granada completas (enteras) y agua, operando a temperatura ambiente, la extracción resultante de elagitaninos solubles en agua casi se completa en aproximadamente una hora, sin formación significativa de subproductos tales como ácido elágico libre.

El tratamiento ácido da como resultado la inactivación de la enzima tanasa, lo que evita la hidrólisis de los elagitaninos para dar ácido elágico. La etapa de extracción, es decir, la combinación mecánica en agua ácida (pH del agua dentro del intervalo de 0,5 a 1,5) permite obtener, en un tiempo corto, un rendimiento muy bueno en elagitaninos hidrolizables solubles en agua, por la rápida inactivación de la tanasa. De hecho, se encuentra más comúnmente que los hongos filamentosos que producen tal enzima atacan a las frutas de granada especialmente durante su almacenamiento tras la recolección y el procesamiento adicional, aunque la infección por hongos puede producirse en cualquier momento durante la época de crecimiento, en el momento de la recolección, durante la manipulación, el almacenamiento, el transporte y la comercialización.

La etapa de extracción, llevada a cabo según la invención, prevé otra ventaja. El uso exclusivo de agua (ácida) evita la extracción de enormes cantidades del ácido elágico ligeramente soluble en agua. De hecho, la etapa de extracción da como resultado una composición del extracto de granada que es completamente soluble en agua.

Además, la etapa de purificación hace uso de una disolución acuosa, débilmente básica, libre de disolventes orgánicos, y de agua desmineralizada, para recuperar los polifenoles adsorbidos en la resina. Esto significa que ningún disolvente orgánico se pone en contacto con el extracto acuoso, obteniéndose así un extracto de granada que es particularmente adecuado para usarse en el campo alimentario, cosmético y farmacéutico. La elución con agua también da como resultado la recuperación de los otros polifenoles extraídos de la pulpa de las frutas y adsorbidos en la resina, de modo que se obtiene un amplio espectro de los compuestos beneficiosos originales de la fruta completa.

Otra ventaja de la etapa de purificación es que permite separar la fracción de azúcar de la fracción de elagitaninos y polifenoles. Esta etapa de purificación proporciona un extracto de granada “libre de azúcar”, con todos los beneficios de la granada pero sin las calorías, caracterizado por un alto contenido en punicalaginas y muy poco ácido elágico, que puede concentrarse y secarse directamente sin los inconvenientes asociados con los extractos de alto contenido en azúcar (por ejemplo, materiales pegajosos). Siempre según la presente invención, la posibilidad de obtener un producto final sólido que no está mezclado con ningún vehículo, por ejemplo maltodextrinas, proporciona la oportunidad de formular un extracto de granada según su uso previsto final y según cualquier requisito formal, posiblemente requerido.

Adicionalmente, cuando el extracto bruto de granada se somete al tratamiento térmico dado a conocer anteriormente, se obtiene la inactivación de enzimas y/o microorganismos, es decir, de sus esporas. De esta forma, el extracto bruto de granada podría procesarse adicionalmente sin degradación por microorganismos que pueden excretar tanasa neoformada y otras sustancias no deseadas. El extracto de granada final está completamente libre de microorganismos que forman tanasa y/o de enzimas extracelulares libres que pueden hidrolizar elagitaninos complejos, tales como punicalaginas, cuando el extracto se incorpora en un alimento o bebida.

La invención se dará a conocer adicionalmente en mayor detalle con referencia a los dibujos adjuntos no limitativos en los que:

- la figura 1 es una vista esquemática de un aparato no según la invención;
- la figura 2A es un cromatograma de HPLC de un extracto de granada obtenido según una realización del procedimiento de la invención;
- la figura 2B es un cromatograma de HPLC de anómeros de punicalaginas puros aislados del extracto de granada;
- la figura 2C es un cromatograma de HPLC de ácido elágico disponible comercialmente;
- la figura 3 es una comparación de tres cromatogramas de HPLC diferentes, que muestran los perfiles de picos característicos de una extracción de frutas de granada atacadas por hongos filamentosos a diferentes pH (mediante la acidificación del agua usada para la extracción);
- la figura 4A y la figura 4B son comparaciones de los cromatogramas de HPLC de los resultados del tratamiento térmico en el procedimiento de la invención; y
- la figura 5 es el cromatograma de HPLC del producto de punicalina obtenido mediante la hidrólisis enzimática del producto de punicalagina de la invención.

Con referencia a la figura 1, la invención muestra un aparato preferido, es decir, una planta, para la extracción con agua de compuestos fotoquímicos potenciadores de la salud de la granada, que comprende un medio de combinación, o molino, 1, en el que se lleva a cabo la extracción según el procedimiento de la invención.

El molino 1 está dotado de medios 2 de alimentación para alimentar los materiales de partida, concretamente la fruta de granada completa, es decir, la fruta entera que comprende peladura, piel, pulpa, semillas, etc., preferiblemente

cortadas previamente en dos mitades o cortadas en trozos, para un funcionamiento más fácil de las palas 1B del molino/mezcladora 1.

Tal como se mencionó anteriormente, puede llevarse a cabo un tratamiento con agua a un pH dentro del intervalo de 0,5 a 1,5, durante de 0,5 a 2,0 horas, de manera preferible aproximadamente 1 hora, en las frutas; las frutas pueden tratarse antes de combinarse en agua, durante la etapa de extracción, es decir, cuando se agitan y se combinan en el molino, o tras la etapa de extracción/combinación.

En la realización mostrada, el molino 1 está conectado a un suministro de agua 3; normalmente, la razón de agua (o bien neutra o bien ácida) con respecto a sólidos está dentro del intervalo de 1:1 a 1:2 v/p, es decir, entre 1,0 y 0,5 litros de agua por 1,0 Kg de granada húmeda. Tal como ya se ha mencionado, la extracción se lleva a cabo en la fruta entera, incluyendo las semillas y la pulpa, y por tanto el zumo de la fruta se mezcla en la dispersión, o suspensión, de partículas de fruta obtenidas por el molino.

Si la combinación se lleva a cabo con agua ácida, esta se obtiene generalmente con una acidificación previa del agua añadiendo un ácido, preferiblemente ácido sulfúrico del recipiente 12, estando la concentración de ácido final dentro del intervalo del 0 al 1% (p/v de agua). El pH del agua ácida está dentro del intervalo de 0,5 a 1,5 y el pH final de la mezcla combinada es de 1,0 a 2,0. La etapa de combinación se lleva a cabo a una temperatura dentro del intervalo de 4 a 30ºC, preferiblemente a temperatura ambiente dentro del intervalo de 10 a 25ºC; el molino 1 está dotado de una camisa 1A para el control de la temperatura, cuando sea necesario.

Tal como ya se ha mencionado, la extracción se lleva a cabo en agua, sin ningún disolvente orgánico, es decir, en ausencia de disolventes orgánicos.

Mezcladoras, o molinos, adecuados son por ejemplo los que proporcionan desde 1.000 hasta 12.000 rpm de las palas 1 B; el motor de la mezcladora se enfría para evitar el sobrecalentamiento, si es necesario. La etapa de agitación y disgregación de la mezcladora se lleva a cabo hasta que se obtiene una suspensión sustancialmente uniforme. En una planta, el tiempo de agitación está generalmente dentro de 2,0 a 2,5 horas para una cantidad de 60 a 70 kg de granada que va a tratarse. El tamaño de partícula de los sólidos tras la combinación está dentro del intervalo de 5 mm a 0,5 mm, y proporciona una suspensión homogénea de las frutas en agua acidificada.

Una vez finalizada la extracción ácida, se reajusta el pH del extracto dentro del intervalo de 3,5 a 5,0 añadiendo una base, preferiblemente NaOH.

La salida del molino 1 está conectada con un filtro 4 para eliminar los sólidos de la mezcla que contiene elagitaninos y otros fenoles. La parte filtrada se envía entonces a un medio de separación adicional, preferiblemente una centrífuga 5, en la que se eliminan los sólidos insolubles adicionales de la mezcla de reacción para obtener un líquido sustancialmente libre de sólidos y adecuado para las siguientes etapas de purificación y concentración. El líquido clarificado A, tras la centrifugación, tiene un color rojo-parduzco y preferiblemente se almacena en un depósito 6A que está conectado a medios de tratamiento térmico HE1, HE2.

En la realización preferida mostrada, el líquido clarificado A se somete a tratamiento térmico a una temperatura que no supera los 100ºC, preferiblemente dentro del intervalo de 70ºC a 100ºC y lo más preferiblemente en el intervalo de 80ºC a 90ºC mediante el calentamiento continuo de la disolución acuosa clarificada usando un primer intercambiador de calor HE1, por ejemplo un intercambiador de calor tubular, con un tiempo de residencia dentro del intervalo de 1 segundo a 120 segundos y lo más preferiblemente en el intervalo de 5 segundos a 30 segundos. El pH de la disolución acuosa clarificada que se somete al tratamiento con calor está dentro del intervalo de 1,0 a 5,0 y lo más preferiblemente en el intervalo de 3,5 a 5,0. La disolución acuosa clarificada tras el tratamiento con calor se enfría inmediatamente a una temperatura por debajo de 60ºC, preferiblemente dentro del intervalo de 20ºC a 60ºC y lo más preferiblemente en el intervalo de 30ºC a 40ºC mediante el enfriamiento continuo de la disolución acuosa clarificada usando un segundo intercambiador de calor HE2, por ejemplo un intercambiador de calor tubular.

El líquido B enfriado tras el tratamiento térmico se almacena preferiblemente en el depósito 6B que está conectado a medios de purificación.

La salida del molino 1 también está conectada directamente con medios de tratamiento térmico HE1, HE2 de modo que, según una realización de la invención, puede alimentarse directamente el extracto bruto de granada al tratamiento con calor sin someterse a clarificación.

Los medios de purificación comprenden al menos una columna 7 cromatográfica de una resina 8 seleccionada de resinas adsorbentes, preferiblemente no iónicas.

Las resinas de adsorción adecuadas son a base de polímero aromático reticulado macrorreticular, hidrófobo, no iónico. Tales resinas son normalmente polímeros aromáticos, tales como copolímeros de estireno y divinilbenceno, que pueden estar reticulados. Tales resinas se conocen y se preparan generalmente mediante la polimerización de los monómeros apropiados. Las resinas de adsorción usadas como resina cromatográfica para la purificación de

elagitaninos de la presente invención no están limitadas particularmente, siempre que puedan eluirse usando una disolución tampón acuosa ligeramente básica.

Los ejemplos de resinas de adsorción preferidas incluyen: Amberlite.RTM. XAD-4, XAD-7, XAD-1180, FPX66, XAD-16 y XAD-1600 (disponibles de Rohm & Haas); XUS-40323.00, XUS-40285.00 y XUS-40283.00 (disponibles de Dow Chemical Co.); y SP-700, SP-825, SP850, Diaion HP 10, HP 20, HP 30, HP 40 y HP 50 (disponibles de Mitsubishi Chemical).

Estos tipos de resinas son particularmente adecuadas para el procedimiento de la invención en vista de su capacidad de adsorción muy alta para elagitaninos, incluyendo punicalaginas y del hecho de que las punicalaginas adsorbidas pueden recuperarse mediante elución con agua y poca cantidad de bicarbonato de sodio, solo, sin ningún disolvente polar tal como metanol o etanol, tal como se requería en cambio en las técnicas de la técnica anterior que usaban resinas diferentes.

Las punicalaginas, polifenoles y flavonoides adsorbidos se recuperan de manera sustancialmente cuantitativa.

En la realización preferida mostrada, el procedimiento de la invención prevé una purificación de una etapa en la columna cromatográfica.

El líquido A, tal como se obtiene de las etapas iniciales a) y b), es decir, extracción y separación de sólidos, o el líquido B obtenido de las etapas iniciales a) y b) y c) (siendo c) tratamiento térmico) se carga en la columna 7, que contiene la resina 8 de adsorción tal como se detalló anteriormente. El permeado, que contiene los azúcares, se envía al tratamiento de residuos (no mostrado). Entonces se alimenta agua desmineralizada del suministro 9 de agua a la columna 7 para lavar los productos no unidos restantes.

Según la presente invención, con el fin de recuperar los compuestos adsorbidos de interés, se carga una disolución básica de elución en la columna 7. Esta disolución acuosa es una disolución acuosa débilmente básica, sin disolventes orgánicos, que tiene un pH dentro del intervalo de 7,8 a 8,8, preferiblemente de 8,0 a 8,5. La disolución acuosa preferiblemente es una disolución tampón. Tampones adecuados son bicarbonato de Na, acetato de Na y acetato de amonio. Esta disolución de elución está libre de disolventes orgánicos, concretamente no contiene metanol ni etanol como en la técnica anterior conocida.

De hecho, la invención se basa en la idea de eluir los productos adsorbidos cambiando el pH del medio de elución (es decir, agua) en lugar de cambiar la polaridad del medio de elución usando alcoholes. Sin dar una explicación completa o vinculante, se cree que cuando la disolución tampón básica acuosa se alimenta a la columna, el cambio del pH del agua genera, de una manera controlada, fuerzas de repulsión entre los grupos -OH de los elagitaninos y los polímeros de la resina. Esto da como resultado una elución selectiva sólo de los compuestos de interés, todavía sin usar disolventes orgánicos.

La disolución tampón preferida consiste en de 0,5 a 4,0 volúmenes de lecho de bicarbonato de sodio, preparado en el tanque 10 de elución, a una concentración dentro del intervalo de 500 mM a 5 mM. En la realización más preferida, el tampón de elución consiste en 2 volúmenes de lecho de bicarbonato de sodio 50 mM a temperatura ambiente. Se carga en la columna 7, potenciándose la elución, mediante el cambio del pH, de las punicalaginas y otros elagitaninos y polifenoles adsorbidos en la resina 8.

Finalmente, se alimenta entonces agua desmineralizada, de 2 a 3 volúmenes de lecho, del suministro 9 de agua a la columna 7 para completar la elución desplazando los productos no unidos restantes y se recoge el líquido eluido en el depósito 11

El producto líquido así obtenido (líquido C) tiene una pureza en punicalaginas de al menos el 55%, y generalmente de al menos el 70%, determinándose la pureza como el % de las áreas de los picos en un cromatograma mediante HPLC a 360 nm. La recuperación de las punicalaginas retenidas de la resina es de al menos el 85% y generalmente es de al menos el 90%.

La figura 1 también muestra una fuente de ácido sulfúrico 12 que está conectada a la columna 7 para la activación de la superficie de la resina 8 y una fuente de NaOH 13 u otra base adecuada para la regeneración de la misma.

El líquido C se libera preferiblemente de las sales y se concentra en los medios 14 de concentración, preferiblemente mediante nanofiltración u ósmosis inversa, hasta un contenido en punicalagina que puede alcanzar el 10% (p/v).

En una etapa adicional del procedimiento de la invención, el extracto líquido obtenido mediante las etapas tratadas anteriormente se seca en los medios 15 de secadora, por ejemplo liofilizador, rotoevaporador a vacío o preferiblemente mediante secadora por pulverización, para producir un producto final sólido. Esta etapa de secado se lleva a cabo preferiblemente en el producto líquido C, tras la eliminación de sal y la concentración tal como se dio a conocer anteriormente. La etapa de secado, en una realización, puede hacer uso de vehículos adecuados para el uso

final del producto seco; vehículos adecuados son por ejemplo maltodextrinas, fibra soluble, fibra soluble rica en beta-glucano de avena, fibra soluble rica en beta-glucano de cebada, lactosa, caseinatos, etcétera.

Las técnicas de secado adecuadas se conocen en la técnica y comprenden secado por pulverización (en una realización preferida sin el uso de vehículos), liofilización y evaporación de agua a vacío. Los productos resultantes tendrán un contenido en punicalaginas del 0,5% al 35% (p/p) si se usa un vehículo, el contenido en punicalaginas puede alcanzar hasta aproximadamente el 65% (p/p) si no se usa vehículo. Debe observarse que el procedimiento de la invención proporciona un producto líquido purificado C que está libre de azúcar: esto da como resultado la gran ventaja de que el líquido C puede concentrarse y evaporarse para dar un polvo seco sin vehículos.

Los productos de extracción obtenidos mediante el procedimiento de la invención son productos que contienen elagitaninos en forma líquida o sólida y se caracterizan por tener las características siguientes:

- Un contenido en punicalaginas (como % p/p) de no menos del 5% y preferiblemente de no menos del 30% y más preferiblemente de no menos del 50%.
- Una pureza de no menos del 55% y preferiblemente de no menos del 70% y más preferiblemente de no menos del 80%.
- Un contenido en ácido elágico (ácido libre) (como % p/p) de no más del 5% y preferiblemente de no más del 2% y más preferiblemente de no más del 1,5%.
- Un contenido en fenol total (como % p/p equivalente de ácido gálico) de no menos del 3% y preferiblemente de no menos del 20% y más preferiblemente de no menos del 35%.
- Una solubilidad en agua (como % p/v) de no menos del 3% y preferiblemente de no menos del 7% y más preferiblemente de no menos del 10%.
- Un contenido en disolvente orgánico residual de 0 ppm (es decir, el extracto está libre de cualquier tipo de disolvente orgánico).
- Un contenido en azúcar total (expresado in ppm) de no más de 500 y preferiblemente de no más de 300 y más preferiblemente de no más de 50.
- Un contenido (como % p/p) en antocianinas de al menos el 0,1% y preferiblemente de no menos del 1%.

Otro producto no según la invención son extractos de granada ricos en punicalina preparados mediante hidrólisis con tanasa de extractos ricos en punicalaginas de la siguiente forma.

Se complementó el extracto de granada, líquido o sólido (tras disolución en agua), rico en punicalaginas, con un 10% de extracto bruto que contenía tanasa. Se agitó suavemente la mezcla durante una noche hasta la hidrólisis completa de las punicalaginas para dar punicalina y ácido elágico. A continuación, se inactivó la enzima mediante tratamiento térmico de la disolución acuosa de producto en un baño de agua a una temperatura de 100ºC y un tiempo de residencia de 20 segundos, seguido por enfriamiento por debajo de 40ºC.

Una vez completado el tratamiento térmico, la disolución acuosa de producto debe cargarse en una columna que contiene una resina de adsorción. Tras desechar el permeado, se lava la resina con 2 volúmenes de lecho de agua desmineralizada para eluir la punicalina. Finalmente, el extracto acuoso purificado que contiene punicalina podría secarse para obtener un polvo mediante una secadora por pulverización.

Un producto adicional no según la invención son las pastas “procesadas” obtenidas tras la separación de los sólidos de la disolución que contiene punicalagina en la etapa b) del procedimiento de la invención. En realidad, se encontró que las pastas, es decir, la parte de la mezcla de extracción que contiene los sólidos una vez que se ha separado la disolución acuosa de la mezcla de extracción, contenían polifenoles en una cantidad suficiente para conferirles una actividad antioxidante suficiente para justificar el uso de la pasta como pronutriente o como producto alimenticio para animales, para proporcionar una dieta equilibrada para rumiantes, cerdos, aves de corral, caballos, pájaros, mascotas domésticas y otras especies, en las que los polifenoles de granada son beneficiosos para mejorar su estado antioxidante.

La invención se dará a conocer ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1

Extracción de elagitaninos de granada de fruta completa, clarificación de la fase acuosa

Se mezclan 1000 g de una muestra de frutas de granada con 1000 ml de agua desmineralizada. Se combina la mezcla obtenida durante algunos minutos. Después de eso, se separa la fase acuosa del residuo sólido, mediante filtración en un filtro. Se lava la fase sólida, retenida en el filtro, con 100 ml de agua desmineralizada, y se recoge el

agua procedente de esta operación de lavado con la fase acuosa previamente recuperada. Entonces se refina mediante centrifugación la fase acuosa, aproximadamente 1700 ml, para eliminar las partículas sólidas que pasaron a través del filtro. Tras la eliminación de los sólidos, se obtienen1495 ml de extracto acuoso bruto, que contiene 9,62 g de los anómeros α, β de punicalagina, con una pureza mediante HPLC del 68,8%.

EJEMPLO 2

Inactivación de tanasa mediante extracción de pH con agua acidificada

Se mezclan tres muestras de 350 g de una muestra de frutas de granada que muestran señales de haber sido atacadas por hongos filamentosos cada una con 275 de agua desmineralizada previamente acidificada añadiendo 1,4 g (trazo a), 0,7 (trazo b) g o 0 g (trazo c) de una disolución de ácido sulfúrico al 98%, respectivamente. Se combinan las mezclas obtenidas durante algunos minutos y después de eso se agitan suavemente durante 1 hora para completar la extracción de los elagitaninos. Tras esto, se midió que el pH de cada prueba era de 1,5, 2,5 y 4,1, respectivamente. Se analizó una alícuota de cada prueba mediante HPLC para evaluar la aparición o no de subproductos formados por la hidrólisis de punicalaginas mediante la enzima tanasa como resultado de la eficacia del procedimiento de inactivación.

La figura 3 muestra el cromatograma de HPLC de las muestras analizadas. En esta figura puede observarse que además de los dos picos a los 15,5 y 19,0 min., correspondientes a las punicalaginas, aparecieron o aumentaron sus concentraciones otros productos relacionados con la hidrólisis catalizada mediante tanasa, punicalina a los 10,4 min. y ácido elágico libre a los 41,0 min. cuando se llevó a cabo la extracción a pH 2,5 (trazo b) o pH 4,1 (trazo c), mientras que cuando se llevó a cabo la extracción a pH 1,5 (trazo a) los picos de punicalaginas permanecieron sin señales de hidrólisis y por tanto el ácido elágico libre no aumenta su concentración. En conclusión, la enzima tanasa podría inactivarse mediante una acidificación adecuada del agua usada para extraer los elagitaninos de las frutas de granada.

EJEMPLO 3

Extracción de elagitaninos de granada a partir de fruta completa con agua acidificada, clarificación de la fase acuosa y preparación de la pasta de granada procesada.

Se mezclan 70 Kg de una muestra de frutas de granada con 55 l de agua desmineralizada previamente acidificada añadiendo 300 g de una disolución de ácido sulfúrico al 98%. Se combinó la mezcla obtenida durante algunos minutos y a continuación se agitó suavemente durante 1 hora para completar la extracción de los elagitaninos al mismo tiempo que se producía la inactivación por pH de la enzima tanasa. Tras esto, se reajustó el pH a 4,6 añadiendo 560 g de una disolución de NaOH al 50% con agitación y, entonces, se separó la fase acuosa del residuo sólido, mediante filtración en un filtro. La fase sólida, retenida en el filtro, se lava con 21,5 l de agua desmineralizada, y se recoge el agua procedente de esta operación de lavado con la fase acuosa recuperada anteriormente. Se seca la pasta de granada procesada sólida retenida, 33,3 Kg, hasta que se obtiene un producto seco, aproximadamente 6,84 Kg, con una humedad del 7,3%, y se analiza para determinar su perfil polifenólico. La tabla 1 muestra la concentración en mg/Kg de diferentes polifenoles vegetales presentes en la pasta de granada procesada seca.

Tabla 1

Polifenoles	concentración en mg/Kg
Ácido elágico	3,1 ± 0,3
Punicalaginas	2,9 ± 0,3
Ácido gálico	825,0 ± 91,0
Ácido cafeico	63,6 ± 13,3
Ácido ferúlico	23,9 ± 2,8
Ácido cumárico	71,5 ± 7,2
Naringina	22,4 ± 1,2
Apigenina	7,0 ± 0,5
Luteolina	7,9 ± 0,6
Ácido rosmarínico	10,1 ± 1,4
Carnosol	47,8 ± 7,9
Ácido carnósico	102,5 ± 11,7

Adicionalmente, se determinaron la actividad de eliminación de radicales libres y la capacidad antioxidante de la pasta de granada procesada seca y se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

Ensayo	Valor
Ensayo de DPPH, CI_{50} (μM de Trolox)	6,37
Ensayo de ABTS (μM de Trolox)	251,8
Ensayo de FRAP (mM de Fe^{2+})	15,4

Por otro lado, se refina entones mediante centrifugación la fase acuosa, aproximadamente 110 l, para eliminar las partículas sólidas que pasaron a través del filtro. Tras la eliminación de los sólidos, se obtienen 108 l de extracto acuoso bruto, que contiene 408 g de los anómeros α, β de punicalagina, con una pureza mediante HPLC del 63,8%.

EJEMPLO 4

Purificación de punicalaginas mediante adsorción

Se carga una muestra de 1495 ml de extracto acuoso bruto que contiene 9,62 g de los anómeros α, β de punicalagina obtenidos según el ejemplo 1, en una columna que contiene una resina de adsorción. En este ejemplo, se usó XAD 1180, pero pueden usarse otras resinas de adsorción. La fase líquida recuperada al final de la columna no contiene ninguna punicalagina. Tras desechar el permeado, se lava la resina con 1 volumen de lecho de agua desmineralizada para eliminar los productos no unidos restantes. Se eluyen de manera continua las punicalaginas usando una estrategia de elución por cambio de pH. Se promueve el cambio de pH haciendo pasar a través de la resina 2 volúmenes de lecho de bicarbonato de sodio 50 mM. A continuación, se completa la elución haciendo pasar agua desmineralizada hasta que se recupera al menos un 90% de las punicalaginas inicialmente cargadas. La fase eluida contiene aproximadamente 9,42 g de punicalaginas con una pureza mediante HPLC de aproximadamente el 73,4%.

La figura 2A muestra el cromatograma de HPLC del producto purificado obtenido. En esta figura, puede observarse que además de los dos picos a los 16 y 20 min., correspondientes a las punicalaginas, están presentes otros productos. Concretamente, punicalinas, glicósido de ácido elágico, ácido elágico libre, etc.

La figura 2B es la HPLC de punicalaginas obtenidas a partir del procedimiento de la invención, purificadas adicionalmente para proporcionar un patrón.

EJEMPLO 5

Microorganismos que forman tanasa e inactivación enzimática libre de tanasa mediante tratamiento térmico

Se mezcla una muestra de 350 g de fruta de granada que muestra señales de haber sido atacada por hongos filamentosos con 275 de agua desmineralizada sin acidificación. Se combina la mezcla obtenida durante algunos minutos. Tras esto, se separa la fase acuosa del residuo sólido, mediante filtración en un filtro. Entonces, se refina por centrifugación la fase acuosa para eliminar las partículas sólidas que pasaron a través del filtro.

Se sometieron 6 muestras del extracto acuoso clarificado por centrifugación de aprox. 25 ml cada una a tratamiento con calor a diferentes temperaturas de calentamiento. Para el equilibrado del sistema de tratamiento térmico, se alimentó agua desmineralizada a 10,8 ml/min. usando una bomba peristáltica a través de un bucle de acero inoxidable de 600 cm de longitud y con un volumen muerto interno de 3,6 ml sumergido en un baño de agua con la temperatura deseada. Por tanto, se estableció un tiempo de residencia de 20 segundos para todas las temperaturas sometidas a prueba como valor fijo. A continuación, se hizo pasar la disolución caliente a través del 2º bucle de acero inoxidable sumergido en un baño de agua a 8ºC para enfriar el extracto acuoso por debajo de 40ºC.

Una vez que se equilibró el sistema con agua, se sometió a prueba la primera muestra a 100ºC para el baño de agua, y se trataron las muestras posteriores a 90, 80, 70, 60 y 25ºC para el baño de agua. Se desechó la parte inicial, 10 ml, de cada tratamiento de la muestra y se recogieron los siguientes 5 ml en condiciones asépticas.

Se preparó entonces una disolución madre disolviendo en agua estéril en condiciones asépticas una muestra adecuada de extracto de granada sólido para reconstituir el extracto a un contenido en punicalaginas de aproximadamente 4 g/l. Entonces, se dividieron en alícuotas 25 ml de esta disolución madre en siete tubos Falcon estériles de una forma aséptica, y se inocularon a cada tubo 2,5 ml de:

Trazo a: agua estéril

Trazo b: muestra tratada con calor a 25ºC

Trazo c: muestra tratada con calor a 60ºC

Trazo d: muestra tratada con calor a 70ºC

Trazo e: muestra tratada con calor a 80ºC

Trazo f: muestra tratada con calor a 90ºC

Trazo g: muestra tratada con calor a 100ºC

Se tomaron muestras de las alícuotas de cada tubo Falcon en el día 0 para el análisis por HPLC y tras 2 semanas de incubación en un agitador.

La figura 4A muestra el cromatograma de HPLC de las muestras analizadas en el día 0. En esta figura puede observarse que además de los dos picos a los 15,5 y 19,0 min., correspondientes a las punicalaginas, aparecieron o aumentaron sus concentraciones otros productos relacionados con la hidrólisis catalizada mediante tanasa, punicalina a los 10,4 min. y ácido elágico libre a los 41,0 min. cuando se llevó a cabo el tratamiento con calor a 25ºC (línea b, control positivo) o a 60ºC (línea c) mientras que cuando se llevó a cabo el tratamiento con calor a 70, 80, 90 o 100ºC (líneas d, e, f, y g respectivamente) los picos de punicalaginas permanecieron intactos sin señales de hidrólisis y por tanto, el ácido elágico libre no aumenta su concentración. En conclusión, la enzima tanasa extracelular podría inactivarse mediante un tratamiento térmico adecuado.

La figura 4B muestra el cromatograma de HPLC de las muestras analizada en el día 14. En esta figura, puede observarse que además de los dos picos a los 15,5 y 19,0 min., correspondientes a las punicalaginas, aparecieron o aumentaron sus concentraciones otros productos relacionados con la hidrólisis catalizada mediante tanasa, punicalina a los 10,4 min. y ácido elágico libre a los 41,0 min. cuando el tratamiento con calor se llevó a cabo a 25ºC (línea b, control positivo), 60ºC (línea c) o a 70ºC (línea d) mientras que cuando se llevó a cabo el tratamiento con calor a 80, 90 o 100ºC (líneas e, f, y g respectivamente) los picos de punicalaginas permanecieron intactos sin señales de hidrólisis y por tanto, el ácido elágico libre no aumenta su concentración. En conclusión, los microorganismos que forman tanasa podrían inactivarse mediante un tratamiento térmico adecuado.

EJEMPLO 6

Purificación de punicalaginas mediante adsorción tras tratamiento térmico

Se alimenta una muestra de 108 l de extracto acuoso bruto que contiene 408 g de los anómeros α, β de punicalagina obtenidos según el ejemplo 3, usando una bomba peristáltica a través de un sistema de intercambiador de calor doble tubular. El 1º intercambiador de calor tubular aumenta la temperatura del extracto acuoso bruto hasta 90ºC y a esta temperatura se estableció un tiempo de residencia de 25 segundos. A continuación, se hizo pasar el extracto acuoso bruto caliente a través del 2º intercambiador de calor tubular para enfriar el extracto acuoso por debajo de 40ºC. Se cargó entonces el extracto acuoso tratado térmicamente en una columna que contenía una resina de adsorción. En este ejemplo, se usó Amberlite FPX66 pero pueden usarse otras resinas de adsorción. La fase líquida recuperada al final de la columna no contiene ninguna punicalagina. Tras desechar el permeado, se lava la resina con 1 volumen de lecho de agua desmineralizada para eliminar los productos no unidos restantes. Se eluyen de manera continua las punicalaginas usando una estrategia de elución por cambio de pH. Se promueve el cambio de pH haciendo pasar a través de la resina 2 volúmenes de lecho de bicarbonato de sodio 50 mM. A continuación, se completa la elución haciendo pasar agua desmineralizada hasta que se recupera al menos un 85% de las punicalaginas inicialmente cargadas. La fase eluida contiene aproximadamente 348 g de punicalaginas con una pureza mediante HPLC de aproximadamente el 70,5%.

EJEMPLO 7

Concentración del extracto de granada enriquecido en punicalaginas mediante nanofiltración

Se concentra una muestra de 160 l de extracto acuoso bruto tratado térmicamente que contiene 348 g de punicalaginas obtenido en una planta piloto según el ejemplo 6, usando una planta piloto de nanofiltración equipada con una membrana polimérica, con el fin de obtener un concentrado de extracto de granada que contiene un 5,8% de punicalaginas.

EJEMPLO 8

Secado por pulverización del extracto acuoso purificado enriquecido en punicalaginas

Se alimenta lentamente una muestra de 5,82 l de extracto acuoso purificado que contiene 338 g de punicalaginas obtenido según el ejemplo 7, en una secadora por pulverización. Se usa una bomba peristáltica para alimentar la secadora por pulverización, que se equilibra previamente con una temperatura de aire de entrada de 135ºC. Se ajusta la velocidad de alimentación con el fin de obtener una temperatura de aire de salida que es inferior a 90ºC. Se

obtienen 595,6 g de un polvo de color pardo amarillento, con una humedad del 4,5% (Karl Fischer), un contenido en ácido elágico del 0,4% y una riqueza en punicalaginas del 56,6%.

Los siguientes ejemplos se refieren a un aspecto ventajoso adicional de la invención en los que el extracto de granada según la invención se hidroliza para dar punicalina y ácido elágico y ácido elágico y se obtiene punicalina en alta pureza y concentración (ej. 9).

Todavía según la invención, los extractos de granada de la invención y/o la punicalina obtenida a partir de los mismos, se concentran y se secan en presencia de fibras solubles, especialmente fibras solubles ricas en beta-glucano de avena y cebada (ej. 10, 11). Estas fibras solubles actúan como vehículos y se proporcionan en una cantidad preferida de al menos el 30%. Preferiblemente, las fibras solubles tienen un contenido en beta-glucano (base seca) de al menos el 30% y dentro del intervalo del 30% al 60%.

Los extractos secos caracterizados según las reivindicaciones 9 a 12 son por tanto un objeto adicional de la invención.

EJEMPLO 9

Preparación de un extracto de granada rico en punicalina mediante hidrólisis con tanasa de un extracto rico en punicalaginas

Se disolvió una muestra de 100 g de extracto de granada obtenido según el ejemplo 8 en 1 l de agua desmineralizada. Entonces, se añadieron 10 ml de un extracto bruto que contenía tanasa, obtenido mediante la eliminación previa de los sólidos en suspensión mediante centrifugación de una muestra de 100 ml de disolución preparada según el ejemplo 2, trazo c, y se agitó suavemente durante una noche hasta prácticamente la hidrólisis completa de las punicalaginas para dar punicalina y ácido elágico. A continuación, se inactivó la enzima mediante tratamiento térmico de la disolución acuosa producto en un baño de agua a una temperatura de 100ºC y un tiempo de residencia de 20 segundos, seguido por enfriamiento por debajo de 40ºC.

Una vez que completado el tratamiento térmico, se cargó la disolución acuosa producto, aproximadamente 1000 ml, en una columna que contenía 350 g de resina de adsorción XAD 1180. Tras desechar el permeado, se lava la resina con 2 volúmenes de lecho de agua desmineralizada para eluir la punicalina. La fracción eluida 1 (F1), 700 ml de extracto acuoso purificado que contiene punicalina, contiene al menos el 80% de la punicalina inicialmente cargada.

Se alimenta lentamente una muestra de 350 ml de F1 en una secadora por pulverización. Se usa una bomba peristáltica para alimentar la secadora por pulverización, que se equilibra previamente con una temperatura de aire de entrada de 150ºC. Se ajusta la velocidad de alimentación con el fin de obtener una temperatura de aire de salida que es inferior a 100ºC. Se obtienen 29,9 g de un polvo de color marrón amarillento, con una humedad del 3,8% (Karl Fischer), un contenido en punicalagina del 0,2%, un contenido en ácido elágico del 0,1% y un contenido en punicalina del 47,8%.

La figura 5 muestra el cromatograma de HPLC del producto purificado obtenido. En esta figura puede observarse un pico a 10,4 min., correspondiente a punicalina. El ácido elágico formado durante la hidrólisis permanece unido a la resina debido a que no se eluía haciendo pasar simplemente agua.

EJEMPLO 10

Secado por pulverización de un extracto de granada rico en punicalina usando fibra soluble rica en beta-glucano de cebada como vehículo

Se añadieron a una muestra de 350 ml de un extracto líquido rico en punicalina (F1) obtenido según el ejemplo 9, 33 g de fibras solubles ricas en beta-glucano de avena. Una vez que se disolvió completamente la fibra, se alimentó lentamente la disolución en una secadora por pulverización. Se usa una bomba peristáltica para alimentar la secadora por pulverización, que se equilibra previamente con una temperatura de aire de entrada de 150ºC. Se ajusta la velocidad de alimentación con el fin de obtener una temperatura de aire de salida que es inferior a 100ºC. Se obtienen 53,5 g de un polvo amarillento, con una humedad del 5,8% (Karl Fischer), y una riqueza en punicalina del 20,8%.

EJEMPLO 11

Secado por pulverización del extracto acuoso bruto que contiene punicalaginas usando fibras solubles ricas en beta-glucano de avena como vehículo

Se añadieron a 3 l de extracto acuoso bruto, que contenía 11,4 g de punicalaginas obtenidas según el ejemplo 3, 170 g de fibra soluble rica en beta-glucano de avena. Una vez que se disolvió completamente la fibra, se alimentó lentamente la disolución en una secadora por pulverización. Se usa una bomba peristáltica para alimentar la secadora por pulverización, que se equilibra previamente con una temperatura de aire de entrada de 150ºC. Se ajusta la velocidad de alimentación con el fin de obtener una temperatura de aire de salida que es inferior a 90ºC. Se obtienen 346,1 g de un polvo ligeramente rojizo, con una humedad del 5,4% (Karl Fischer), un contenido en ácido elágico del 0,1% y una riqueza en punicalaginas del 2,8%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de un extracto de granada que comprende las etapas de:

a) moler y combinar la fruta entera en agua para producir una suspensión de partículas de fruta en agua;

b) eliminar los sólidos de la suspensión de la etapa a) para obtener una disolución acuosa clarificada (A);

c) cargar el producto obtenido de la etapa b) en una columna cromatográfica de una resina no iónica adsorbente;

caracterizado porque comprende además la etapa de

d) recuperar los productos retenidos en dicha columna cromatográfica mediante elución con una disolución básica acuosa que tiene un pH dentro del intervalo de 7,5 a 8,8.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha disolución básica acuosa es una disolución tampón.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de eluir dicha columna con agua tras la elución con dicha disolución básica acuosa.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa de tratar dichas frutas en agua a un pH dentro del intervalo de 0,5 a 2,0 antes de la etapa b) o la etapa c).

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha combinación según la etapa a) se lleva a cabo en agua a un pH dentro del intervalo de 0,5 a 2,0.

6. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, que comprende además la etapa de elevar el pH de la mezcla de extracción hasta un valor dentro del intervalo de 3,5 a 5,0 antes de llevar a cabo dicha etapa de purificación c).

7. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de:

e) eliminar el agua y las sales del producto líquido eluido de dicha resina.

8. Procedimiento según cualquier reivindicación anterior, que comprende además antes de la etapa b) o la etapa c) las etapas de:

- calentar el producto a una temperatura dentro del intervalo de 70ºC a 100ºC durante un tiempo dentro del intervalo de 1 segundo a 120 segundos y posteriormente enfriar dicho producto calentado hasta una temperatura por debajo de 60ºC, preferiblemente dentro del intervalo de 20ºC a 60ºC.

9. Extracto de granada líquido o sólido que puede obtenerse a través de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque tiene:

un contenido en punicalaginas de al menos el 30% (p/p) con una pureza de punicalaginas de al menos el 70% (mediante HPLC 360 nm);

un contenido de ácido elágico de no más del 1,5% (p/p);

un contenido de antocianinas de al menos el 0,1% (p/p);

un contenido en fenol total (como % p/p equivalente de ácido gálico) de al menos el 35%;

un contenido en azúcar total de no más de 500 ppm;

una solubilidad en agua (como % p/v) de no menos del 7%.

10. Extracto según la reivindicación 9, que comprende como vehículo una fibra soluble que tiene un contenido en beta-glucano (base seca) de al menos el 30%.

11. Extracto según la reivindicación 10, en el que dicha fibra soluble se selecciona de una o más de fibra soluble rica en beta-glucano de avena, fibra soluble rica en beta-glucano de cebada o su mezcla.

12. Extracto según cualquier reivindicación 9 a 11 como dependiente de la reivindicación 8, caracterizado por estar libre de microorganismos que forman tanasa y/o libre de enzimas extracelulares que pueden hidrolizar elagitaninos complejos.

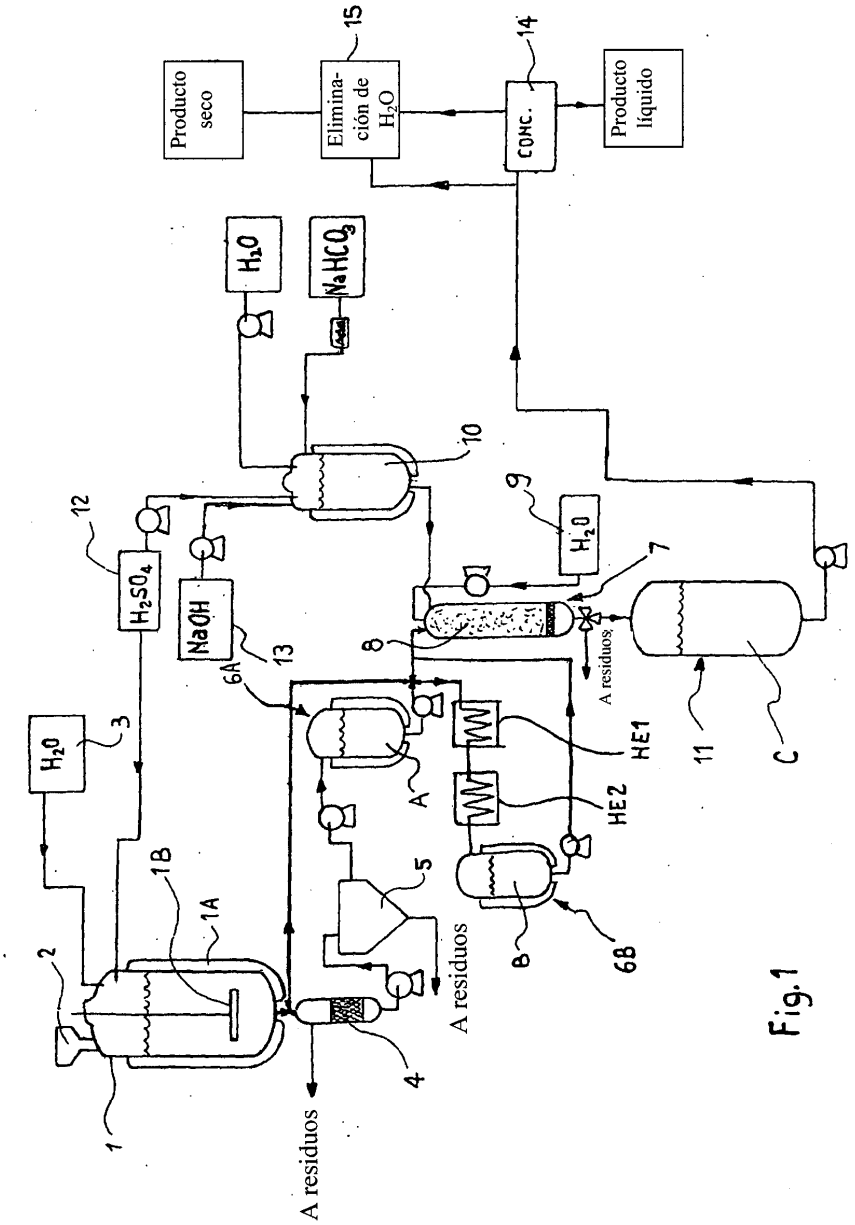
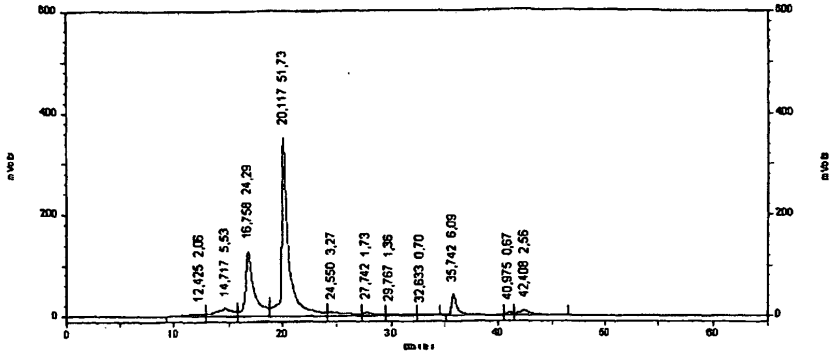

Producto seco
Elimina-ción de H_2O
15
CONC.
14
Producto líquido
H_2O
$NaHCO_3$
10
9
H_2O
12
H_2SO_4
NaOH
13
6A
8
7
A residuos
HE1
HE2
11
C
A
H_2O
3
1B
1A
2
5
6B
B
A residuos
4
A residuos
1

Fig.1

Fig. 2A



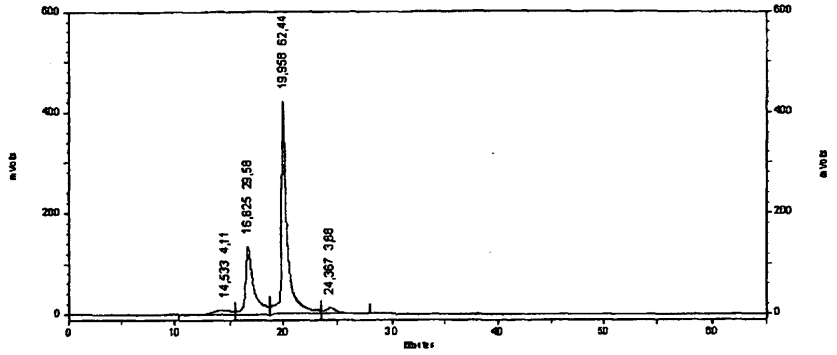


Fig. 2B

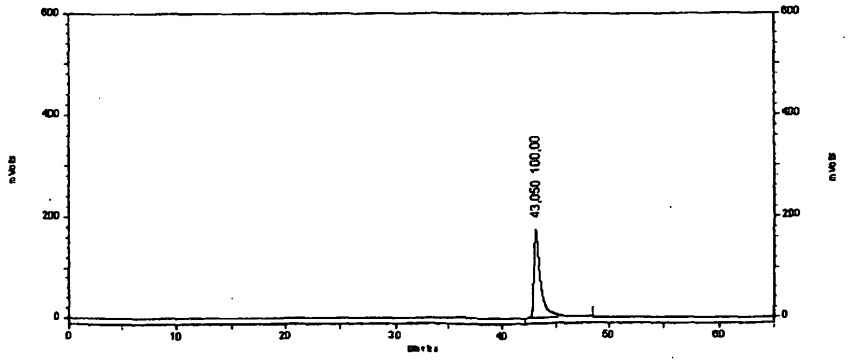


Fig. 2C

Fig 3

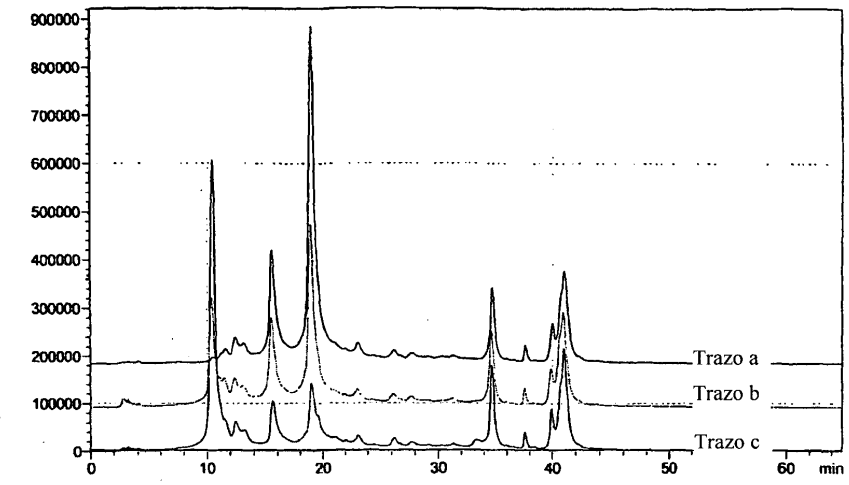

900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
10
20
30
40
50
60
min
Trazo a
Trazo b
Trazo c

Fig 4A

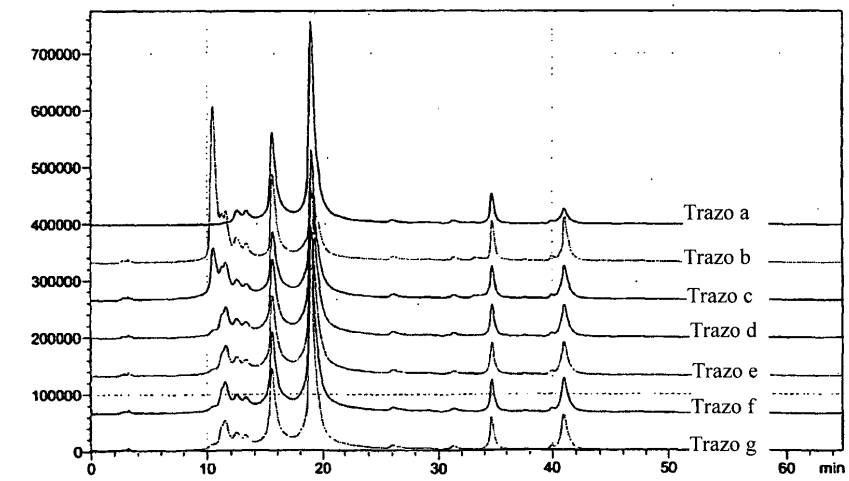

700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
10
20
30
40
50
60
min
Trazo a
Trazo b
Trazo c
Trazo d
Trazo e
Trazo f
Trazo g

Fig 4B

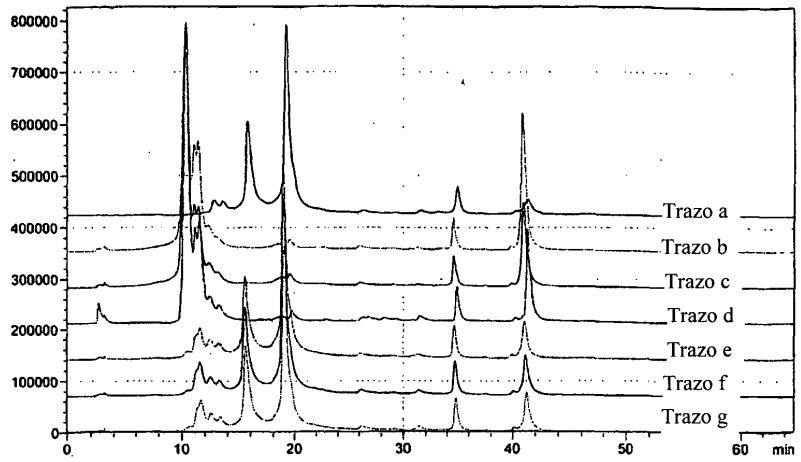
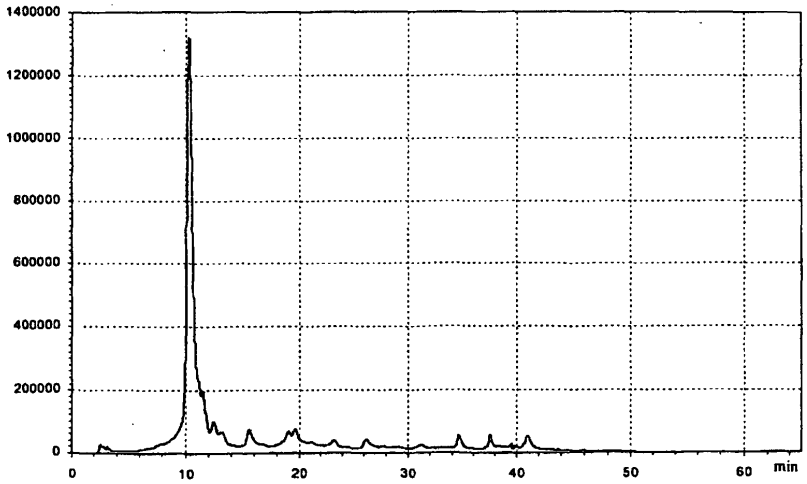

800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0
10
20
30
40
50
60
min
Trazo a
Trazo b
Trazo c
Trazo d
Trazo e
Trazo f
Trazo g

Fig 5


1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0
10
20
30
40
50
60
min