



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 322 883**

⑫ Número de solicitud: 200700258

⑬ Int. Cl.:
C07C 43/196 (2006.01)
C07C 41/34 (2006.01)
B01D 11/02 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑭ Fecha de presentación: **24.01.2007**

⑮ Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
30.06.2009

⑰ Solicitante/s:
Universitat de València, Estudi General
Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 Valencia, ES

⑱ Inventor/es: **Berna Prats, Ángel;**
Cháfer Ortega, Amparo;
Pascual Martí, Carmen y
Salvador Carreño, Amparo

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento de extracción y purificación de pinitol y extracto enriquecido en el mismo.**

㉑ Resumen:

Procedimiento de extracción y purificación de pinitol y extracto enriquecido en el mismo.

Método de extracción y purificación del pinitol y extracto enriquecido en el mismo. El método de extracción de la invención se efectúa sobre pulpa de algarrobas, mediante la utilización de anhídrido carbónico supercrítico. Con ello se obtiene, en una sola etapa, un extracto en el que el componente mayoritario es el pinitol, con lo que se simplifica el procedimiento para obtener extractos enriquecidos en pinitol y se aumenta la riqueza conseguida con respecto a otros métodos conocidos aplicados también sobre pulpa de algarrobas. Además, el disolvente utilizado para la extracción, anhídrido carbónico supercrítico, es inocuo y se separa fácilmente al final del proceso, por lo que el extracto, recogido en un disolvente inocuo como el agua, puede servir para consumo humano. El método de extracción puede complementarse con etapas de separación del pinitol del resto del extracto, para conseguir su purificación, utilizando técnicas conocidas tales como la cromatografía líquida.

ES 2 322 883 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de extracción y purificación de pinitol y extracto enriquecido en el mismo

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un procedimiento para obtener un extracto enriquecido en pinitol a partir de pulpa de algarroba, así como al extracto obtenido. La invención se refiere también a un procedimiento para la purificación del pinitol a partir de dicho extracto.

10

Estado de la técnica

El pinitol (número CAS 10284-63-6) es un compuesto que, como el inositol, pertenece al grupo de los ciclitoles, cicloalcanos en los cuales al menos tres átomos de carbono llevan unido un grupo hidroxilo. El pinitol en particular es una forma monometilada del D-qui-ro-inositol, concretamente el 3-O-metil-1,2,4-cis-3,5,6-trans-hexahidroxiciclohexanol. Se trata de un compuesto natural, presente en diferentes plantas como soja (1), alfalfa (2), buganvilla (*Bougainvillea spectabilis*) (3), pino (4) y algarroba (5 y 6), y en algunos productos derivados de plantas como la miel (7). Es un producto que está presente en la dieta de seres humanos y animales, a través de la ingestión de algunas de las materias primas citadas. Dado el consumo de soja en los pueblos asiáticos se considera que este compuesto es seguro, al menos en las dosis habituales de 5-10 mg/kg/día, lo que se ha confirmado con estudios.

20

No sólo se trata de un compuesto seguro sino que, además, se considera que tiene efectos positivos en ciertas situaciones y trastornos. En estos momentos se está comercializando como un suplemento para deportistas, debido a su efecto hipoglucémico, es decir tiene habilidad para reducir el nivel de azúcar en sangre, lo que también es de interés para las personas diabéticas (8). Además aumenta la capacidad de absorción de glucosa por las células musculares. Esta capacidad para incrementar la masa muscular se ha apuntado como interesante para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, sida y tuberculosis. En la bibliografía se apuntan otras aplicaciones interesantes para la salud: así, se habla de que presenta propiedades anti-inflamatorias (4), o de que puede facilitar el efecto de la insulina (9) o incluso sustituirla (1).

30

Así, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT WO 00/71111 A1, de Humanetics Corporation, se describe tanto la estimulación del transporte de glucosa en un tejido mediante la administración de pinitol como la capacidad de este compuesto para incrementar la cantidad de glucógeno presente en un tejido y para aumentar el rendimiento del músculo. Por su parte, la solicitud de patente PCT WO 96/29063, menciona la utilidad del pinitol para disminuir los niveles de ácidos grasos libres en el plasma, para tratar alteraciones relacionadas con la resistencia a insulina, tales como la diabetes mellitus y sus complicaciones, y para otros diversos trastornos y situaciones tales como obesidad, hiperlipidemias, dislipidemias, aterosclerosis, hipertensión, trastornos cardiovasculares, SIDA, cáncer, malnutrición, sepsis, traumas asociados con quemaduras, estrés, envejecimiento, lupus y otras enfermedades autoinmunes; enfermedades endocrinas, hiperuricemia, síndrome del ovario poliquístico y complicaciones surgidas de la práctica de ejercicio físico, y describe composiciones que contienen pinitol o derivados del mismo útiles para el tratamiento de dichas alteraciones.

35

Por todo ello, está creciendo el interés por desarrollar métodos para la extracción y purificación de pinitol a partir de materias primas naturales. En la citada solicitud de patente PCT WO 96/29063, por ejemplo, se describe un procedimiento de obtención de pinitol a partir de fracciones solubles de soja. Dicho procedimiento incluye desproteinización, tratamiento con carbón activo y cromatografía.

45

La patente US5482631, por su parte, se refiere a la purificación de inositol y derivados del mismo, utilizando resinas de intercambio iónico. Las materias primas de partida mencionadas son extractos acuosos de cáscaras de almendras y melazas obtenidas a partir de caña de azúcar, remolacha o soja que, según muestran los ejemplos, requieren alguna etapa de procesamiento previo antes de entrar en contacto con las resinas, tal como filtración.

50

Otro producto natural que ha sido propuesto como fuente de pinitol es la algarroba, que se obtiene del árbol conocido como algarrobo (*Ceratonia siliqua*), un árbol típico del Mediterráneo, poco exigente con el suelo, de crecimiento lento y hoja perenne. España es el principal productor de algarrobas y, dentro de España, la Comunidad Valenciana es la zona donde más se produce. Las vainas producidas por este árbol, las algarrobas, constan de dos partes, la pulpa y el fruto o semilla, al que se conoce como garrofín. Una vez recolectadas, las vainas suelen dejarse almacenadas durante aproximadamente un mes, para que pierdan humedad y facilitar su posterior procesamiento, el cual habitualmente consiste en la trituración de las vainas, por lo general en un molino de martillos, la clasificación por tamaños de las partículas obtenidas haciéndolas pasar por tamices y la separación de las partículas de pulpa de las partículas de garrofín mediante corrientes de aire.

55

El garrofín es la parte minoritaria, pero la más valiosa. Se utiliza para la obtención de la goma de garrofín que tiene una amplia serie de aplicaciones como aditivo alimentario, principalmente como espesante, también se utiliza para la obtención de fibra dietética, en aplicaciones farmacéuticas y cosmética.

65

El resto de la vaina de algarroba, la pulpa, representa aproximadamente el 90% del total. En su composición predominan los azúcares, sacarosa principalmente, fructosa y glucosa, contiene también ciclitoles y taninos. Su apli-

cación como alimento animal (caballos y rumiantes) está limitada por su contenido en taninos (10). Por esta razón se han desarrollado procedimientos para hacer crecer microorganismos sobre pulpa de algarroba obteniendo un alimento enriquecido en proteínas (11-13). También se ha utilizado para la alimentación de humanos como harina (14) como sustituto del cacao, o estabilizante. Otros usos descritos son: obtención de productos farmacéuticos, etanol (15), taninos (antidiarreico) o azúcares (16-19).

La composición de la pulpa de algarroba depende de la variedad, origen y tiempo de cultivo. En la tabla 1 se muestra la composición aportada por Batle y Tous (5), en la que los porcentajes se han calculado con respecto a 100 gramos de materia seca total. En cuanto al contenido de agua, varía también según la variedad, origen y tiempo de cultivo, pero puede estimarse que tiene un valor promedio de 10-20% respecto al peso total de la pulpa en las vainas de algarroba recién recolectadas, oscilando entre un 13-16% en las partículas de pulpa seca y ya separada del garroffín.

TABLA 1

Composición promedio de la pulpa de algarroba (másica)

Componente	% peso/peso
Azúcares totales	48-56
Sacarosa	32-38
Glucosa	5-6
Fructosa	5-7
Pinitol	5-7
Taninos condensados	18-20
Celulosa y hemicelulosa	18
Cenizas	2-3
Grasa	0,2-0,6

Destaca el gran contenido en azúcares, y algo menor de taninos, celulosa y hemicelulosa. El contenido en pinitol (5-7%) es elevado, especialmente si se compara con otras fuentes. Otros autores (20), incluso, proporcionan un contenido mayor, del orden del 10-11%. Por ello, ha sido propuesta como materia prima de partida para la obtención de pinitol.

Así, la patente española ES2179767 describe un procedimiento para la obtención de pinitol que parte del jarabe objeto de la patente ES2060544, jarabe que a su vez se obtiene a partir de pulpa de algarroba que es sometida a varias etapas de procesamiento. Para preparar el jarabe, la pulpa se somete a un procedimiento que comprende las etapas de extracción en continuo de componentes de la pulpa con agua, prensado, filtración, descalcificación por medio de resinas de intercambio iónico, nueva filtración, separación cromatográfica de azúcares y no azúcares; desmineralización y decoloración por resinas y concentración por evaporación. El jarabe así obtenido, objeto de la patente ES2060544, contiene sólo un porcentaje en peso respecto al total de materia seca de 4-14% de ciclitols, jarabe que ha de pasar por las etapas descritas en la patente ES2179767 para obtener del mismo pinitol.

El método descrito en la patente ES2179767 implica que el jarabe obtenido según el método de la patente ES2060544 atraviese por los pasos de inversión de la sacarosa (componente mayoritario) y separación del pinitol presente, de nuevo mediante la utilización de resinas de intercambio iónico, obteniéndose una disolución de pinitol en agua, de la que es necesario separar el pinitol. En el Ejemplo 1 descrito en dicha patente, la fracción rica en pinitol obtenida tras el proceso de intercambio iónico tiene una riqueza, expresada en porcentaje respecto al total de materia seca, del 50,61%, siendo necesario desmineralizarla para que el porcentaje del pinitol llegue al 90%. En la patente US6699511, de la misma familia, se describe un Ejemplo adicional, el número 3, redactado en tiempo presente, en el que, partiendo también del jarabe obtenido según la ES2060544, la separación cromatográfica da lugar a una fracción con un 94,64% de pinitol, expresado en porcentaje respecto al total de materia seca. La etapa final de concentración y atomización de la fracción rica en pinitol da lugar a un producto con un 95% de pureza en pinitol, valor idéntico al que se obtenía al final del Ejemplo 1 de dicha memoria, tras someter la fracción final rica en pinitol a concentración y cristalización.

El método descrito en las patentes españolas ES2060544 y ES2179767 requiere de muchas etapas hasta que se obtiene una fracción con una riqueza en pinitol superior al 50%. Dada la riqueza en pinitol de la pulpa de algarroba, sería interesante encontrar un método de enriquecimiento en pinitol de los extractos obtenidos de esta materia prima, que simplificara el procesamiento necesario hasta lograr su purificación. La presente invención proporciona una solución a este problema.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una alternativa a la extracción de pinitol de la pulpa de algarroba que permite la obtención, en una única etapa, de un extracto con una riqueza en pinitol superior al 50%, partiendo de la pulpa seca y triturada. Con ello se simplifica el procesamiento necesario hasta la obtención de pinitol puro partiendo de pulpa de algarroba, un subproducto de la industria de obtención de la goma de garrofín para el cual existen pocas aplicaciones. La técnica propuesta para la simplificación del proceso de extracción del pinitol es la extracción con dióxido de carbono supercrítico, una técnica que puede considerarse sostenible -sustituye disolventes peligrosos por otro más seguro-, ecológica -no contribuye a la contaminación, sino que consume un disolvente obtenido como subproducto de otros procesos- y especialmente adecuada para aplicaciones farmacéuticas y alimentarias, ya que el disolvente puede ser completamente eliminado del extracto y, aunque no lo fuera, la presencia de restos del mismo en los productos finales no supondría un riesgo para la salud. Se trata de un procedimiento que, sin embargo, no es aplicable a la extracción de cualquier tipo de compuesto, pues el dióxido de carbono es apolar y disuelve principalmente a los solutos apolares y de bajo peso molecular, no siendo obvio *a priori* qué sustancias pueden extraerse con esta metodología y el grado de extracción que vaya a alcanzarse.

Así, la presente invención proporciona un método para la obtención de un extracto enriquecido en pinitol, a partir de pulpa de algarroba, mediante la utilización de CO₂ supercrítico. Una vez obtenido dicho extracto, puede combinarse con cualquier método de separación del pinitol para conseguir la purificación del mismo.

Por tanto, un objeto de la presente invención es un método de extracción de pinitol a partir de pulpa de algarroba que comprende las etapas de:

a) obtener partículas de pulpa de algarroba de un diámetro comprendido en el intervalo de 1-5 mm;

b) someter las partículas de pulpa a una extracción con anhídrido carbónico supercrítico a una presión igual o superior a 200 atmósferas y una temperatura igual o superior a 40°C;

c) recoger el extracto obtenido.

Otro objeto de la invención es el extracto obtenido al aplicar el método de la invención sobre pulpa de algarrobas. Otro objeto más de la invención es el uso de un extracto que haya sido recogido sobre agua para el consumo directo por seres humanos.

Es también un objeto de la invención un método de purificación del pinitol que, adicionalmente a las etapas correspondientes al método de extracción de la invención, comprende etapas posteriores de separación del pinitol contenido en el extracto obtenido tras la extracción con CO₂ supercrítico. Para llevar a cabo este método de purificación del pinitol, una posibilidad es recoger el extracto sobre agua, etanol, metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano o cualquier otro disolvente polar y llevar a cabo la separación del pinitol contenido en la disolución resultante mediante técnicas habituales conocidas por los expertos en la técnica, como pueden ser la cromatografía líquida preparativa, cromatografía en columna o cromatografía en capa fina, o la extracción líquido-líquido.

Se prefiere que las partículas de pulpa de algarroba utilizadas como materia prima para la extracción del pinitol sean las que se obtienen como subproducto del proceso de separación del garrofín por medios mecánicos anteriormente descrito, proceso del que resulta pulpa de algarroba que ya está troceada y seca. De esta manera se le da una nueva utilidad a un subproducto para el que, en la actualidad, no se han encontrado muchas aplicaciones. La humedad media de la pulpa de algarrobas obtenida por este método es de 15%. A efectos de la invención, se considera pulpa seca la que tiene un valor de humedad de 20% o inferior al mismo. Aunque se tiene preferencia por la utilización de pulpa seca, se considera que el proceso de la invención es compatible con pulpa de algarrobas de humedad superior, por lo que está comprendido dentro del alcance de la invención cualquier proceso de extracción de pinitol con CO₂ supercrítico que utilice como materia prima pulpa de algarroba con un valor de humedad superior al 20%, u obtenido por un método diferente de la trituración mediante molinos de martillo y separación mediante corriente de aire comúnmente utilizado para la separación del garrofín de la pulpa.

En una realización preferida del método de extracción de la invención, la relación materia prima/caudal de CO₂ es de 1,2-1,4 gramo de pulpa de algarroba/mL/min. Se prefiere especialmente que la cantidad de CO₂ a utilizar sea del orden de 74 g CO₂/g de pulpa de algarroba y que la proporción de caudal de CO₂/masa de materia prima sea de aproximadamente 0,6 g de CO₂/(min x gramo de pulpa de algarroba).

En el Ejemplo 1 que se describe posteriormente se expone una realización del método de la invención, llevada a cabo a escala de laboratorio aplicando el método de la invención sobre algarrobas de la Comunidad Valenciana, utilizando un extractor ISCO SFX 3560, equipado con una bomba modelo 260D, en cuyo cartucho de extracción se introdujeron 0,6-0,7 g de pulpa triturada (diámetro medio de partícula: 2 mm), situada en un cartucho de extracción cilíndrico de 1,5 cm x 5,5 cm, por el cual se hizo pasar CO₂ durante aproximadamente 2 horas. Para esa cantidad de muestra, se considera que el consumo óptimo de CO₂ en relación al peso de pinitol extraído por peso de CO₂ (g de pinitol/g CO₂) es de 0,5 mL/minuto. El método de la invención, sin embargo, es igualmente aplicable en instalaciones a gran escala. Para realizar el cambio de escala, se recomienda mantener las condiciones preferidas mencionadas:

mantener la relación materia prima/caudal en 1,2-1,4 (g x min)/mL, la proporción caudal de CO₂/masa de materia prima en 0,6 g de CO₂/(min x g de pulpa de algarroba) y la cantidad consumida de CO₂/masa de materia prima en 74 g de CO₂/g de pulpa de algarroba. Para establecer estas relaciones se ha considerado el trabajo de Clavier *et al.* (21).

5 El extracto resultante de la aplicación del método de la invención puede obtenerse de varias maneras. La elección del método de obtención del extracto depende, en gran medida, del procedimiento que se piense utilizar cuando el extracto vaya a servir para continuar su enriquecimiento en pinitol hasta su purificación. En una realización particularmente preferida del método de extracción de la invención, el extracto se recoge sobre agua, disolvente inocuo que además permite que la purificación del pinitol contenido en dicho extracto se realice, por ejemplo, mediante fraccionamiento posterior por cromatografía líquida. También son realizaciones preferidas de la invención aquellas en las que el extracto se recoge sobre otro disolvente diferente, que permite igualmente el fraccionamiento posterior por cromatografía líquida, como pueden ser etanol, metanol, tetrahidrofurano, acetonitrilo o cualquier otro disolvente polar. Son también realizaciones del método de extracción de la invención aquellas en las que el extracto se obtiene en forma sólida por descompresión de la corriente que sale del extractor, para recuperar el dióxido de carbono en fase gas; en este caso, precipitarán junto al pinitol los azúcares, aunque también sería posible realizar una precipitación escalonada, (procedimiento este último en el que el cambio de las condiciones de presión y temperatura a las que se encuentra el extracto hasta las condiciones atmosféricas se hace de manera escalonada en diferentes separadores, buscando que en cada separador precipite un componente o un grupo de ellos), de manera análoga a la descrita por Cretnik *et al.* (22).

20 Independientemente de cómo se recoja el extracto obtenido por aplicación del método de extracción de la invención, el componente mayoritario del mismo, sin tener en cuenta el posible disolvente, es el pinitol, al contrario de lo que sucedía en la materia prima original, la pulpa, en la que el componente mayoritario es la sacarosa. En la realización del método de la invención que se describe en el Ejemplo 1 que se expone posteriormente, en el que el extracto se recogió sobre agua, se obtuvo un extracto con una composición, expresada en porcentaje respecto al total de materia seca del extracto, de 60-61% en pinitol, 24-25% de azúcares y 15% de componentes no identificados. Así, la relación entre el contenido de pinitol y de azúcares que se obtiene utilizando este método de extracción es bastante diferente de la obtenida aplicando los métodos hasta ahora habituales, en los que la primera extracción de componentes de la pulpa de algarroba se realiza con agua. A efectos comparativos, un extracto obtenido con agua, a temperatura ambiente durante 120 minutos de tratamiento y posterior filtración, a partir de 0,6 g de pulpa de algarroba extraída, muestra una mayor proporción de azúcares. Comparando la pureza del extracto obtenido con CO₂ supercrítico con la pureza del extracto obtenido con agua, para el mismo período de extracción, se puede observar una mayor pureza realizando la extracción con CO₂ supercrítico:

- Extracción con agua: %pinitol/%azúcares totales = 0,06
- Extracción con CO₂ supercrítico: %pinitol/%azúcares totales = 2,40-2,54
- Materia prima: %pinitol/% azúcares totales = 0,09-0,15
- Jarabe de la patente ES2060544: %pinitol/%azúcares totales = 0,04-0,16

(estos últimos valores se han calculado a partir de la composición porcentual del jarabe indicada en la patente, suponiendo que el total de los ciclitales (4-14%) correspondiera a pinitol: en el caso menos favorable, el porcentaje de pinitol sería el menor valor citado para los ciclitales, 4%, mientras el porcentaje de azúcares totales sería el máximo posible, el resultado de restar a 100 la parte de los ciclitales y el valor mínimo de impurezas orgánicas, 0,5%: $4/(100-4-0,5) = 0,04$; en el caso más favorable, el porcentaje de pinitol sería el máximo citado, 14%, mientras el porcentaje de azúcares totales sería el mínimo posible, el resultado de restar a 100 el porcentaje máximo de ciclitales y el valor máximo de impurezas orgánicas, 2%: $14/(100-14-2) = 0,16$)

50 El método de extracción, por tanto, permite obtener, en un solo paso, partiendo de pulpa de algarroba troceada y, preferiblemente, seca, un extracto muy enriquecido en pinitol, tanto si se compara con la materia prima como si se compara con los extractos obtenidos simplemente con agua o con el jarabe de la patente ES2060544, obtenido también a partir de pulpa de algarroba, por lo cual se trata de un método ventajoso con respecto a la técnica anterior, que da lugar a un extracto muy enriquecido en pinitol, a partir del cual puede purificarse fácilmente el pinitol utilizando técnicas convencionales. El extracto se obtiene, además, aplicando un disolvente inocuo del que en general se acepta que no provoca modificaciones químicas sobre las moléculas extraídas, por lo que no es de esperar que el proceso genere compuestos peligrosos para la salud. El disolvente preferido para recoger dicho extracto es, además, un disolvente totalmente inocuo, el agua, por lo que el extracto obtenido, recogido sobre agua, puede considerarse adecuado para el consumo humano. Por todo ello, es un objeto más de la presente invención el extracto obtenido a partir de la aplicación del método de la invención. También constituye un objeto adicional de la invención el uso del extracto obtenido para el consumo por seres humanos.

La relación exacta entre el pinitol y los azúcares totales que se obtenga en el extracto dependerá, entre otros factores, de la materia prima concreta que se utilice pues, como se ha comentado, hay variaciones en el contenido concreto de pinitol según la variedad de la algarroba; también dependerá de las condiciones específicas de presión, temperatura y caudal de CO₂ utilizadas. La composición del extracto, en cualquier caso, será diferente de cualquier otro extracto conocido hasta ahora en el estado de la técnica, pues dependerá especialmente de la afinidad que el CO₂ tenga por cada uno de los componentes extraídos, en las condiciones utilizadas en el método de la invención.

Tal como se ha comentado, el extracto recogido sobre agua puede ser objeto de un posterior procesamiento para separar el pinitol de los restantes componentes, para obtener pinitol con un alto grado de pureza. Este ulterior procesamiento, al que se alude como método de purificación del pinitol, constituye también otro objeto de la invención. En la realización del método de purificación descrito posteriormente en el Ejemplo 2 de la presente memoria, dicha purificación se lleva a cabo mediante cromatografía líquida preparativa, eluyendo el pinitol con una mezcla de agua y acetonitrilo 1:1. Este último compuesto no ofrece problemas para su eliminación, pues se evapora fácilmente (punto de ebullición, 81,6°C). El soluto (pinitol) no parece verse afectado por las temperaturas necesarias para ello. De esta manera, la aplicación del método de la invención con un proceso adicional de separación da lugar a un producto cuya pureza en pinitol, expresada como porcentaje sobre materia seca, es superior al 95%, pureza mayor que la obtenida tras la aplicación del procedimiento de las patentes españolas ES2060544 y ES2179767 (que requiere de muchas más etapas para su aplicación), y equivalente a la obtenida en el ejemplo teórico adicional descrito en la patente US6699511, que es del 94,64% antes de la atomización. Es por ello que el método que comprende el proceso adicional de separación que da lugar a un producto con una pureza de al menos el 95% se le considera un método de purificación del pinitol.

La invención se explicará ahora con más detalle por medio de las Figuras y los Ejemplos que se presentan a continuación.

Breve descripción de las figuras

Las Figs. 1a, 1b y 1c, muestran gráficos en los que se representa la influencia de los parámetros instrumentales y químicos indicados en abscisas sobre el pinitol recuperado, que aparece en cada uno de los gráficos en el eje de ordenadas, expresado como gramos de pinitol (pintl.) recuperados por cada 100 gramos de pinitol presentes en la muestra sometida a extracción, un patrón de pinitol. Los parámetros considerados son: presión (Fig. 1a, en la que dicha magnitud se expresa en bares), temperatura (Fig. 1b, en la que dicha magnitud se expresa en grados centígrados) y el porcentaje de etanol presente en el medio de extracción (Fig. 1c, en la que el porcentaje corresponde a los mililitros de etanol presentes por cada 100 mililitros de medio de extracción).

La Fig. 2 muestra un gráfico donde se representa la influencia del tiempo de extracción, (indicado en abscisas, expresado en minutos), sobre los gramos de pinitol extraídos por 100 g de pulpa de algarroba seca.

La Fig. 3 muestra un gráfico donde se representa la influencia de flujo de CO₂ (indicado en abscisas, expresado en mililitros/minuto) sobre el pinitol extraído, indicado en ordenadas como la relación entre los gramos de pinitol extraídos con respecto a los gramos de disolvente utilizado.

La Fig. 4 muestra el cromatograma obtenido al someter a cromatografía líquida preparativa el extracto obtenido de pulpa de algarroba, recogido sobre agua. El pico correspondiente al pinitol se indica mediante la abreviatura "Pinte".

Ejemplos

Ejemplo 1

Extracción de pinitol de pulpa de algarroba mediante CO₂ su ercrítico

El proceso, puesto a punto a escala de laboratorio, se llevó a cabo utilizando un extractor SFX 3560 de ISCO (Lincoln, NE, EE.UU.) equipado con una bomba modelo 260D de la misma casa suministradora, según se detalla a continuación.

Se realizaron distintos ensayos variando las condiciones de: adición de modificador de polaridad (etanol), presión, temperatura y caudal, para encontrar tanto las condiciones aceptables como las condiciones óptimas para la extracción del pinitol. Se consideraron como condiciones óptimas aquellas en las que la cantidad de pinitol total obtenido por gramo de pulpa de algarroba seca fueran las máximas posibles. También se realizaron ensayos comprobando la posible influencia que el tiempo de extracción pudiera tener en el rendimiento obtenido.

1.1. Determinación de las condiciones de presión, temperatura y presencia de modificador

En primer lugar, se realizaron ensayos sobre un patrón de pinitol, para determinar las condiciones de trabajo aceptables (presión, temperatura y ausencia o presencia de modificador) para llevar a cabo una extracción que diera lugar a un buen rendimiento de extracción. Los patrones de pinitol se prepararon utilizando pinitol de la Compañía General del Algarrobo (Liria, Valencia, España). Los patrones se prepararon en disolución de etanol, que se adsorbió sobre tierra de diatomeas; el etanol se evaporó y el pinitol adsorbido en la tierra de diatomeas se sometió a extracción con CO₂ supercrítico.

En las Figs. 1a, 1b y 1c pueden observarse los resultados obtenidos al llevar a cabo el proceso de extracción del pinitol a partir de dicho patrón

- En la Fig. 1a se muestra la influencia de la presión sobre el porcentaje de recuperación de pinitol. La gráfica se obtuvo a una temperatura de 40°C y en ausencia de modificador (etanol). Tal y como puede apreciarse, una presión de

200 bar es suficiente para obtener rendimientos cercanos al 100%. El rendimiento se mantiene en valores similares, cercanos al 100%, trabajando en el intervalo de 200 a 400 bar. Los estudios posteriores se realizaron utilizando una presión de 300 bar para garantizar un margen de seguridad. Superar esa presión no supone obtener una mejora apreciable pero sí supone un encarecimiento del proceso, por lo que se prefiere que el valor de presión de trabajo se elija del intervalo de 200 a 300 bar.

- En la Fig. 1b se muestra la influencia de la temperatura sobre el porcentaje de recuperación de pinitol. La gráfica se obtuvo a una presión de 300 bar y en ausencia de modificador (etanol). Se observa que, en el intervalo de 40°C a 70°C, el rendimiento de la extracción se mantiene en un valor casi constante, aunque parece ir disminuyendo ligeramente al aumentar la temperatura. La variación es muy pequeña, por lo que se considera que el intervalo de 40°C a 70°C es válido para llevar a cabo el proceso de extracción. Sin embargo, por ser el intervalo en el que se obtiene mayor rendimiento, se prefiere que la temperatura de trabajo se elija en el intervalo de 40°C a 50°C. Los estudios posteriores descritos se realizaron utilizando una temperatura de 40°C que permite asegurar la condición de fluido supercrítico del CO₂.

- En la Fig. 1c se muestra la influencia del modificador de polaridad (etanol). La gráfica se obtuvo a una presión de 300 bar y una temperatura de 40°C. Se observa que la presencia de etanol disminuye el rendimiento de la extracción. Así pues, se prescindió de su utilización en todos los estudios posteriores.

1.2. Experimentación con pulpa de algarroba: Influencia del tiempo de extracción

Una vez fijadas las condiciones de presión y temperatura, se procedió a realizar experimentos con pulpa de algarroba para encontrar las condiciones más adecuadas de tiempo y caudal de CO₂ para llevar a cabo la extracción y comprobar la validez del procedimiento de extracción.

Para ello, se utilizaron partículas de pulpa de algarrobas de la variedad Matalafera, subproducto del proceso de separación del garrofín por medios mecánicos, cedidas amablemente por la Compañía General de Algarrobo (Liria, Valencia, España). Las partículas utilizadas tenían un diámetro medio de partícula de 2 mm. Además, se caracterizaron midiendo su humedad media, medida que se realizó manteniendo una muestra en una estufa modelo Memmert UFB-400, a 110°C, hasta obtener un valor constante en la pesada de la muestra. El valor medio obtenido para la humedad fue de 15 g de agua/100 g de sólido húmedo. Las partículas de pulpa descrita pueden utilizarse tal como llegan aunque, si se prefiere, pueden dejarse secar al aire para disminuir aún más su humedad.

Para realizar los ensayos sobre las condiciones de extracción, se introdujeron 0,6-0,7 g de la pulpa triturada en el cartucho de extracción, un cartucho cilíndrico de 1,5 cm x 5,5 cm, y se procedió a su extracción en el aparato anteriormente citado.

Para ver la influencia del tiempo de extracción, se llevaron a cabo ensayos para obtener la cinética de extracción que se muestra en la Fig. 2, a una presión de 300 bar (297,03 atmósferas) y una temperatura de 40°C, con un caudal de 2 mL de CO₂ por minuto. Los valores representados en dicha Fig. 2 se indican en la Tabla 2:

TABLA 2

Cinética de la extracción del pinitol

Tiempo de extracción (minutos)	g pinitol/100 g muestra
15	0,83
30	2,02
45	3,13
60	4,01
75	4,83
90	5,41
105	5,57
120	5,67

Puede observarse como, tras 2 horas de extracción, el total de pinitol extraído supone un 5,67% con respecto al total de masa de pulpa de algarroba seca sometida a extracción. Tal como se comentó antes, los contenidos de pinitol en la algarroba, dependiendo de la variedad, oscilan entre 5-7%, por lo que se puede estimar que el rendimiento en la extracción es de un 80-100%. Prolongar la extracción más allá de esas 2 horas no consigue aumentar apreciablemente el rendimiento.

El extracto obtenido en esas condiciones de ensayo (300 bar de presión, 40°C de temperatura y caudal de 2 mL de CO₂ por minuto) tras 2 horas de extracción presentaba una riqueza del 60-61% en pinitol, estando presente, además, un 24-25% de azúcares y un 15% de componentes no identificados, todo ello calculado respecto a 100 gramos de materia seca. La composición del extracto se verificó mediante cromatografía líquida de alta resolución: se obtuvieron las áreas del pico cromatográfico correspondiente al pinitol y de los azúcares, y dichos valores se interpolaron en curvas de calibrado preparadas a partir de los compuestos puros cromatografiados en las mismas condiciones que el extracto.

El extracto se recogió sobre agua, lo que facilitó la utilización del mismo en el Ejemplo 2.

1.3. Experimentación con pulpa de algarroba: Influencia del flujo de CO₂

A continuación, se realizaron ensayos para comprobar la influencia del flujo de CO₂ utilizado en el rendimiento de la extracción, observando la relación entre la masa de pinitol extraída y el consumo de CO₂ para un mismo tiempo de extracción de 30 minutos, una presión de 300 bar y una temperatura de 40°C. Los resultados obtenidos aparecen representados en la Fig. 3. Tal y como puede observarse en la misma, la relación g pinitol/g CO₂ es mas favorable para flujos bajos, aunque la utilización de un caudal bajo implica ampliar el tiempo de extracción.

1.4. Condiciones recomendadas para el proceso

De acuerdo con los resultados anteriores, las conclusiones respecto a las condiciones óptimas para llevar a cabo la extracción son las siguientes:

- La presión mínima debe ser de 200 atmósferas, no siendo necesarias presiones mucho más altas para obtener un buen rendimiento.
- Temperatura preferiblemente entre 40-50°C; temperaturas superiores disminuyen el rendimiento;
- Tal como se comentó antes, el caudal óptimo, a escala de laboratorio, considerando el consumo de g CO₂/g de pinitol es de 0,5 mL/min. Este caudal es óptimo para 0,6-0,7 g de muestra situada en un cartucho de extracción cilíndrico de 1,5 cm x 5,5 cm. Es por ello por lo que se propone una relación materia prima/caudal de 1,2-1,4 g x min/mL. Para realizar el cambio de escala se recomienda mantener la proporción caudal de CO₂/masa de materia prima, que en las condiciones señaladas es de aproximadamente 0,6 g de CO₂/(min g) de pulpa de algarroba, y de cantidad consumida de CO₂/masa de materia prima, que en las condiciones señaladas es de unos 74 g de CO₂/g de pulpa de algarroba.

Ejemplo 2

Purificación del pinitol por cromatografía líquida preparativa

La cromatografía líquida puede ser utilizada de manera preparativa para obtener pinitol prácticamente puro. Para comprobarlo, se realizó un ensayo en el que sometió a cromatografía líquida una muestra del extracto obtenido en el Ejemplo 1 anterior. Para ello, se utilizó una columna Lichrocart 250-4 (MZ-Analysentechnik GmbH) con una fase reversa RP-selectB (5 µm) como fase estacionaria y como eluyente una mezcla de agua y acetonitrilo 1:1. El caudal a escala de laboratorio fue de 0,5 mL/minuto.

En la Figura 6 puede observarse un cromatograma obtenido en dicho proceso de cromatografía, midiendo la absorbancia a 200 nm. En él se puede ver que el pico del pinitol se encuentra claramente separado del resto. El tiempo de retención fue de 17,4 minutos. La pureza en pinitol del producto obtenido es superior al 95%, valor que se obtuvo obteniendo el espectro de absorción UV, mediante un detector de fila de diodos L7455 de Hitachi, en diversas zonas del pico cromatográfico y comparándolo con el espectro obtenido en el pico de un patrón de pinitol cromatografiado en las mismas condiciones. Este estudio mostró que el espectro del pico proveniente del extracto era formalmente idéntico en todas las zonas del pico y formalmente idéntico al espectro del patrón, lo que indica que el pico cromatográfico correspondía a pinitol de una pureza de al menos 95%.

La eliminación del acetonitrilo y el agua tuvo lugar mediante evaporación del disolvente a 90°C. El residuo cristalino obtenido no mostraba degradación, como se comprobó mediante el espectro UV. Esto último se comprobó sometiendo 1 mL de una disolución de pinitol en acetonitrilo:agua (50:50) a 90°C durante cuatro horas (tiempo este más que suficiente para la evaporación de disolvente); una vez seco, el residuo se disolvió en agua y se comparó su espectro UV con el obtenido para una disolución idéntica pero que no había sido sometida a tratamiento térmico.

Bibliografía

- (1) **Streeter, J. G. (2001)** Simple partial purification of D-pinitol from soybean leaves. *Crop Science* 41: 1985-1987.

(2) **Starke, I., Holzberger, A., Kamm, B., Kleinpeter, E.** (2000) Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in green juices (wild mix grass and alfalfa) from a green biorefinery by gas chromatography/mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367: 65-72.

(3) **Bialeski, R.L.** (1994) Pinitol is a major carbohydrate in leaves of some plants indigenous to New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 32: 73-78.

(4) **Singh, R.K., Pandey, B.L., Tripathi, M., Pandey, V.B.** (2001) Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia* 72: 168-170.

(5) **Battle, I., Tous, J.** (1997) Carob tree. *Ceratonia Siliqua* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

(6) **Albanell, E.; Plaixats, J.; Caja, G.** Determination of chemical composition of carob pods by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Sci. Food Agric.* 1993, 63 (3) 309-312.

(7) **Sanz, M.L., Sanz, J., Martínez Castro, I.** (2004) Presence of some cyclitols in honey. *Food Chemistry* 84: 133-135.

(8) **Narayanan, C.R., Joshi, D.D., Mudjummer, A.M., Dhenke, V.V.** (1987) Pinitol, a new anti-diabetic compound from the leaves of *Bougainvillea spectabilis*, *Current Science* 56: 139-141.

(9) **Bates, S.H., Jones, R.B., Bailey, C.J.** (2000) Insulin-like effect of pinitol. *British Journal of Pharmacology* 130:1944-1948.

(10) **Kumar, R.; Singh, M.** Tannins: their adverse role in ruminants nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 1984, 32, 447-453.

(11) **Marakis, S. G.; Karagouni, A.D.** Screening of carob bean yeast chemical composition of *Schizosaccharomyces versatilis* grown on aqueous carob extract. *Biotechnol. Lett.* 1985, 7(11), 831-836.

(12) **Roukas, T.; Biliaderis, C.G.** Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *App. Biochem. Biotechnol.* 1995, 55 (1), 27-44.

(13) **Cañellas, J.; Pou, J. and Mulet, A.** Protein enrichment of carob kibbles after sugar extraction. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1989, 22(2), 73-77.

(14) **Fito, P.; Chiralt, A.; Vidal, D.** Obtención de harina de algarroba. Problemática y perspectivas. En Jornadas sobre el aprovechamiento de la algarroba en el área del Mediterráneo; Cátedra Ramón Llull: Palma de Mallorca, Spain, 1985; pp 69-80.

(15) **Roukas, T.** Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed-bed reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1994, 59(4), 387-393.

(16) **Petit, M.D.; Pinilla, J.M.** Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995, 28(1), 145-152.

(17) **Mulet, A.; Berna, A.; Heredero, V.; Rosselló, C.** Temperature influence on the sugar extraction from carob pods. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1988, 21, 108-112.

(18) **Roseiro, J.C.; Gírio, F.M.; Collaço, M.T.M.** Yield improvements in carob sugar extraction. *Process Biochem.* 1991, 26, 179-182.

(19) **Marakis, S.G.** Sucrose syrup from carob pod. *Biotechnol. Lett.* 1992, 14 (11) 1075-1080.

(20) **Saura-Calixto, F.** (1987) Determination of chemical composition of carob pods (*Ceratonia siliqua*). Sugars, tannins, pectins and amino acids. *Anal. Bromatol.* 34, 81-93.

(21) **Clavier, J.Y., Majewski, W., Perrut, M.** (1996) Extrapolation from pilot plant to industrial scale SFE: a case study, in: P. Von Rohr, C. Trepp (Eds.) High pressure Chemical Engineering, *Elsevier*, p.639.

(22) **Čretnik, L., Skerget, M., Knez, Z.** (2005) Separation of parthenolide from feverfew: performance of conventional and high-pressure extraction techniques. *Separation and Purification Technology*, 41, 13-20.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de extracción de pinitol a partir de pulpa de algarrobas que comprende las etapas de:

- a) obtener partículas de pulpa de algarroba de un diámetro comprendido en el intervalo de 2-5 mm;
- b) someter las partículas de pulpa a una extracción con anhídrido carbónico supercrítico a una presión igual o superior a 200 bar y una temperatura igual o superior a 40°C;
- c) recoger el extracto obtenido.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la pulpa de algarroba sometida a extracción es pulpa seca.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la relación materia prima/caudal de CO₂ es de 1,2-1,4 gramos de pulpa de algarroba/mL/minuto.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la cantidad de CO₂ utilizado es de 74 gramos de CO₂/gramo de pulpa de algarroba.

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la presión es de 200-400 bar.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la presión es de 200-300 bar.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura es de 40°C-70°C.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la temperatura es de 40°C-50°C.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el extracto se recoge sobre agua.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el extracto se obtiene en forma sólida por descompresión de la corriente que sale del extractor.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el extracto se somete a una precipitación escalonada.

12. Procedimiento según las reivindicaciones 1, 2, 6, 8 y 9, en el que la pulpa de algarroba sometida a extracción es pulpa seca, la presión es 300 bar, la temperatura es 40°C y el extracto se recoge sobre agua.

13. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende una o más etapas adicionales de purificación del pinitol presente en el extracto obtenido.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el extracto obtenido a partir de pulpa de algarroba se ha recogido sobre agua, etanol, metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano o cualquier otro disolvente polar y la separación del pinitol presente en el extracto se realiza mediante cromatografía líquida preparativa, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina o extracción líquido-líquido.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el extracto obtenido a partir de pulpa de algarroba se ha recogido sobre agua y la separación del pinitol presente en el extracto se realiza mediante cromatografía líquida preparativa.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el eluyente es una mezcla de acetonitrilo y agua 1:1.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, que comprende una etapa adicional de separación del acetonitrilo.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que la separación del acetonitrilo se produce por evaporación.

19. Un extracto obtenido tras la aplicación del procedimiento de extracción de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

20. Extracto según la reivindicación 19, que está en forma de disolución acuosa.

21. Extracto según la reivindicación 20, que tiene el siguiente contenido de pinitol y azúcares, referido a 100 gramos de materia seca:

- Pinitol: 60-61%
- Azúcares: 24-25%

22. Uso del extracto de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 para el consumo por seres humanos.

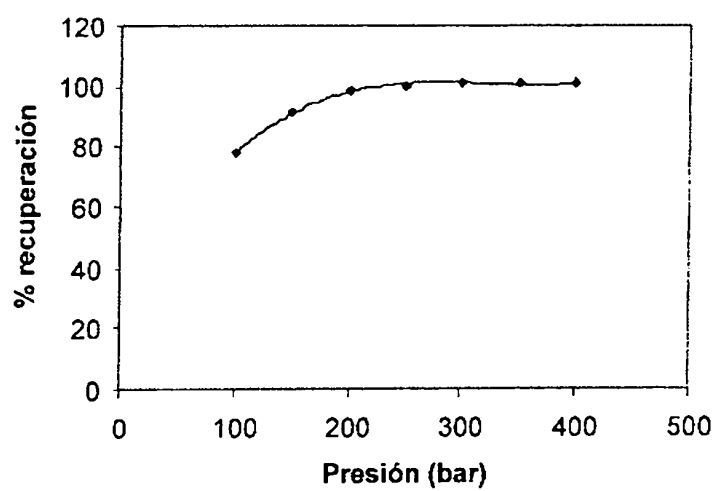


Fig. 1a

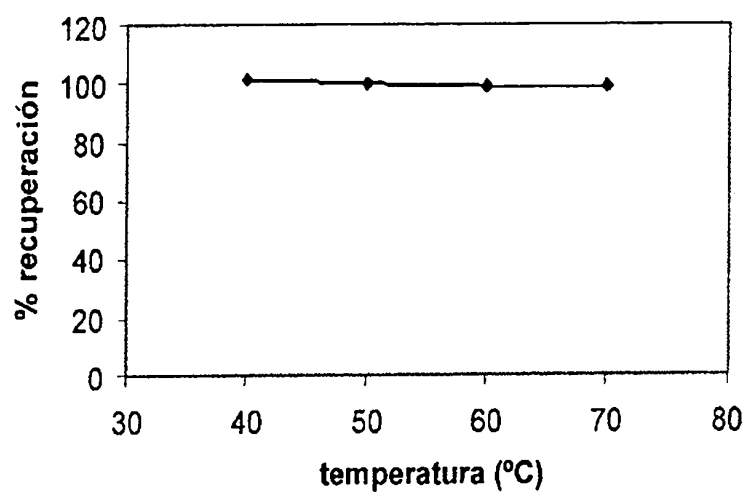


Fig. 1b

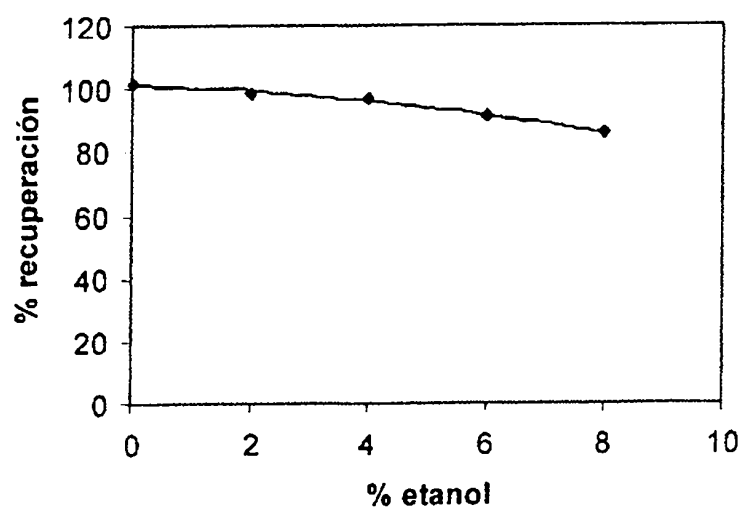


Fig. 1c

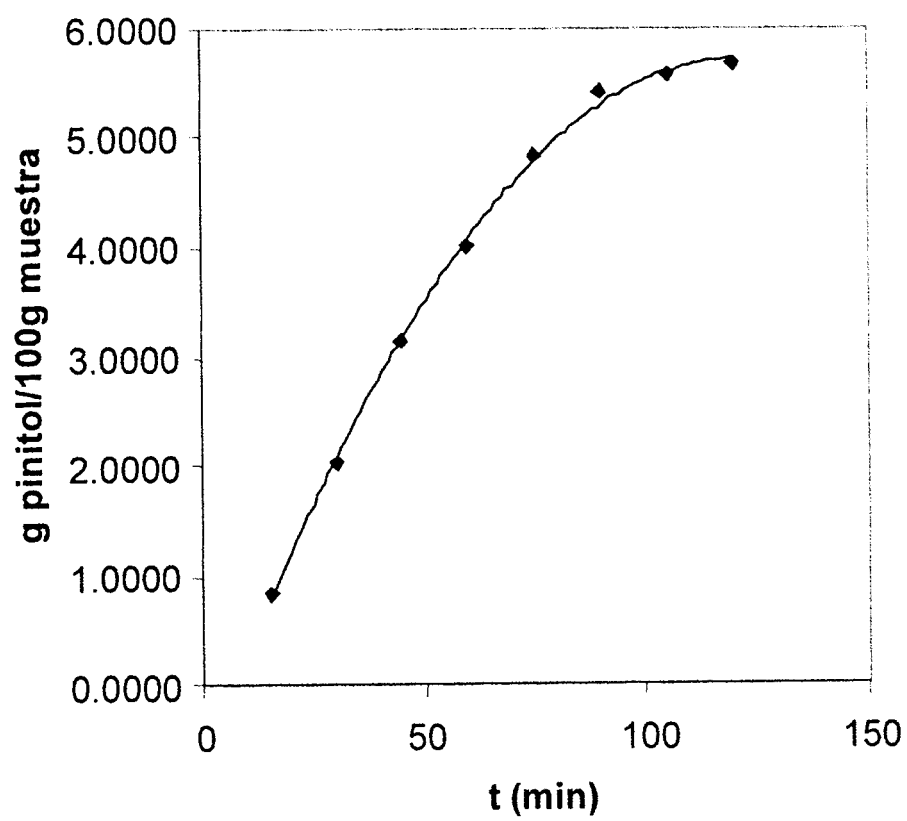


Figura 2

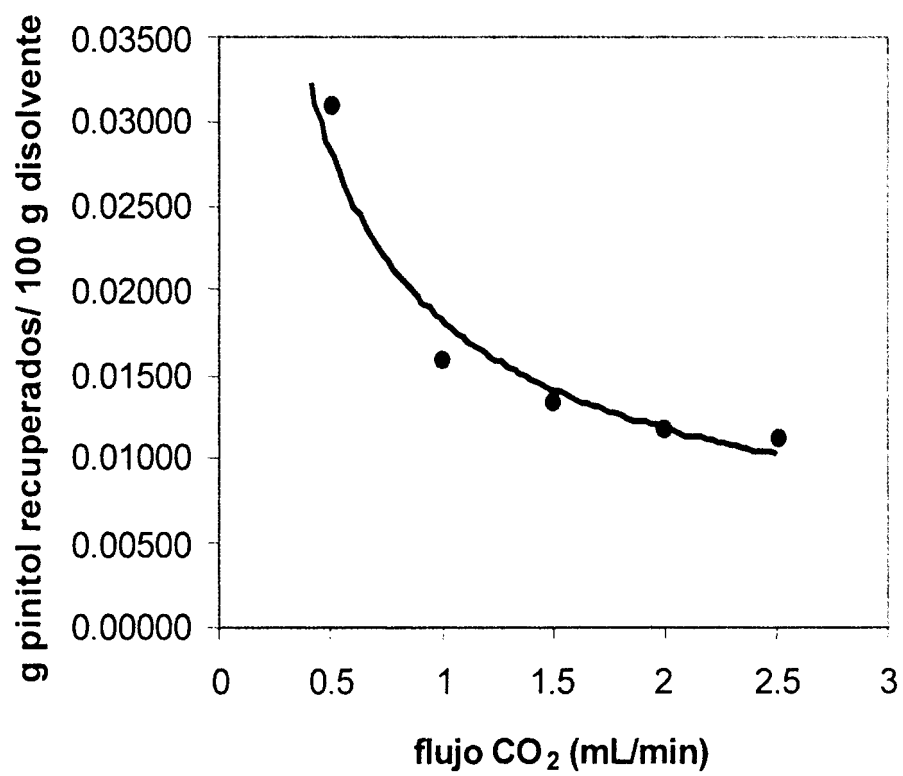


Fig. 3

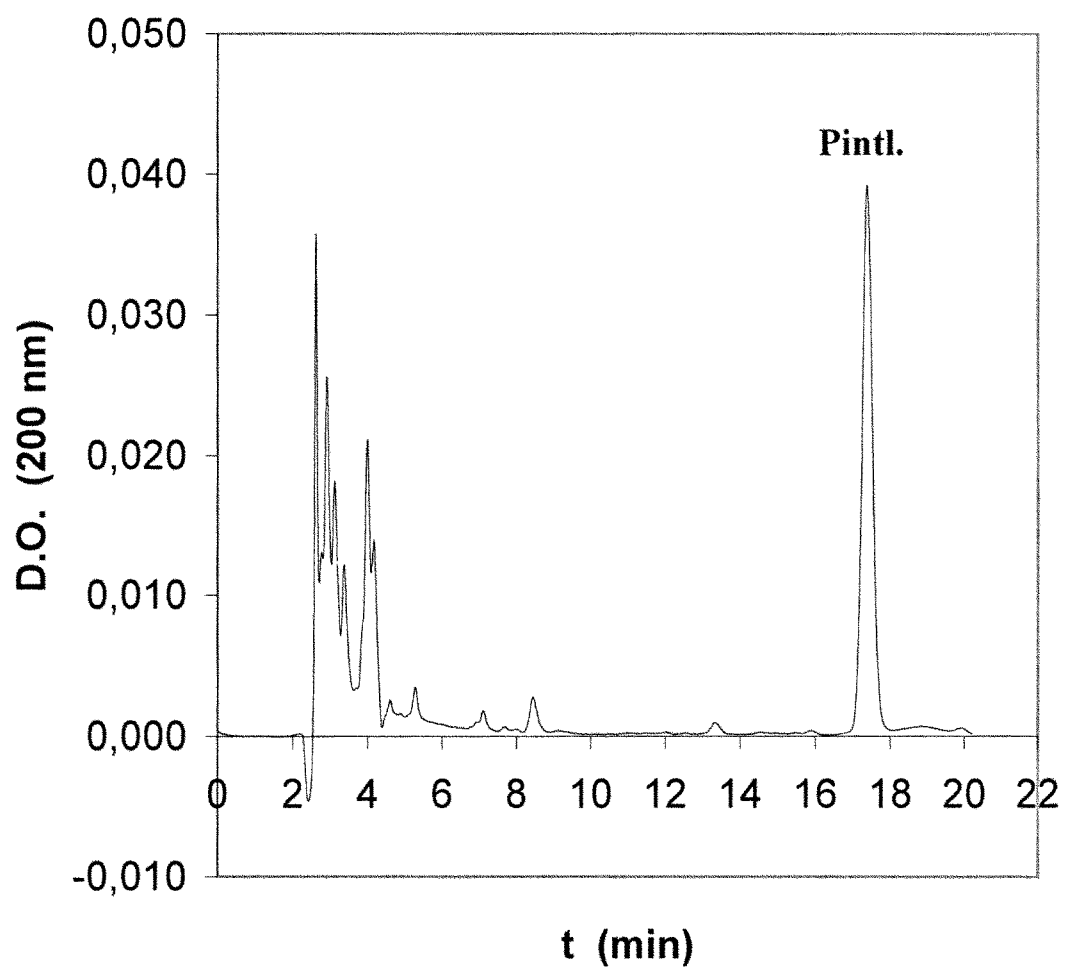


Fig. 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 322 883

⑫ Nº de solicitud: 200700258

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 24.01.2007

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	ES 2284381 A1 (COMPANIA GENERAL DEL ALGARROBO) 01.11.2007, páginas 1-3; reivindicaciones 1-3.	1,2,5-10, 12-14,19, 20
X	CHÁFER, A. et al. Determination of D-pinitol in carob pulp (ceratonia siliqua) by SFE and HPLC. Comunicación Internacional. VI Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines. Vigo. Noviembre, 2006.	1,2,5-9, 12-22
X	CHÁFER, A. et al. D-Pinitol Solubility in Supercritical CO ₂ : Experimental Data and Correlation. Journal of Chemical and Engineering Data. Vol.51, Nº2, páginas 612-615. 2006. ISSN 0021-9568.	1,2,5-9
A	US 4427707 A (HEINE et al.) 24.01.1984, todo el documento.	1,2,5-8,22
A	ES 2060544 A1 (ES) 16.11.1994, páginas 1-6.	1
A	ES 2234422 A1 (COMPANIA GENERAL DEL ALGARROBO) 16.06.2005, páginas 1-4.	1
A	KR 20040016338 A (AMICOGEN CO LTD) 21.02.2004, (resumen) [en línea] [Recuperado el 16.06.2009] Recuperado de EPO EPODOC Database.	1
A	ES 2103238 A1 (INVEST DE LA IND AGROALIMENTAR) 01.09.1997, páginas 1-3; reivindicaciones 1,2.	1-22

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

16.09.2009

Examinador

E. Ulloa Calvo

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C 43/196 (2006.01)

C07C 41/34 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)