WIPO
WORLD
INTELLECTUAL PROPERTY
ORGANIZATION

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:		**PCT/CR2012/000001**
International filing date:		**11 May 2012 (11.05.2012)**
Document type:		**Certified copy of priority document**
Document details:	Country/Office:	**CR**
	Number:	**2011-0251**
	Filing date:	**12 May 2011 (12.05.2011)**
Date of receipt at the International Bureau:		**02 July 2012 (02.07.2012)**

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-*bis*)

34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
www.wipo.int

N° 22 [illegible]

REGISTRO NACIONAL
REPUBLICA DE COSTA RICA

REPUBLICA DE COSTA RICA
REGISTRO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

CERTIFICADO DE SOLICITUD

Se certifica que en fecha doce de mayo de dos mil once se presentó la solicitud de inscripción de la Patente de Invención denominada:

"MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO RICO EN TANINOS DEL ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE FRUTOS QUE CONTIENEN ESTOS COMPUESTOS Y EXTRACTO OBTENIDO USANDO DICHO MÉTODO."

Expediente N°: 2011-0251

Titulares:

-Universidad de Costa Rica.
-Centro Internacional de Cooperación en Investigación Agrícola para el Desarrollo.
-Centro internacional de estudios superiores en ciencias agronómicas (Montpellier, SupAgro).

Fecha de Expedición: 14/06/2012

REGISTRO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
REGISTRO NACIONAL
REPUBLICA DE COSTA RICA
DIRECCIÓN

Lic. Luis Gustavo Álvarez Ramírez
Director

Nº 2299003

REGISTRO NACIONAL
REPUBLICA DE COSTA RICA

REGISTRO PROPIEDAD INDUSTRIAL, COSTA RICA

11 **Número Publicación** : 164
Fecha Publicación : 26 de Agosto, 2011
21 **Número Solicitud** : 20110251
Número de Concesión :

12 PATENTE DE INVENCION

54 **Título** ***METODO PARA LA OBTENCION DE UN EXTRACTO RICO EN TANINOS DEL ACIDO ELÁGICO A PARTIR DE FRUTOS QUE CONTIENEN ESTOS COMPUESTOS Y EXTRACTO OBTENIDO USANDO DICHO METODO.***

22 **Fecha de presentación:**
12 de Mayo, 2011

30 **Prioridad:**

45 **Fecha de concesión:**

51 **Clasificación Internacional :**
A23L 2/74 ;

73 **Titular(es):**
Universidad de Costa Rica.

Centro Internacional de Cooperación en Investigación Agrícola para el Desarrollo.

Centro internacional de estudios superiores en ciencias agronómicas (Montpellier, SupAgro).

72 **Inventor(es):**
Óscar Gerardo Acosta Montoya; Fabrice Vaillant; Manuel Dornier; Ana Mercedes Pérez Carvajal

74 **Agente:**

57 **Resumen:** La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología y con los procesos que emplean tecnologías membranarias, y en particular se refiere a un método para la obtención de un extracto enriquecido en taninos del ácido elágico a partir del fruto de la mora(Rubus spp.) y de otros frutos que contienen estos compuestos, así como al extracto obtenido usando dicho método.

FORMULARIO DE SOLICITUD DE INSCRIPCIÓN DE PATENTE DE INVENCIÓN, MODELO DE UTILIDAD O DISEÑO INDUSTRIAL

REGISTRO NACIONAL REPÚBLICA DE COSTA RICA

REGISTRO NACIONAL — REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL — DIARIO: NOTIFICACIONES — 12 MAY. 2011 — HORA: 2:16 — FIRMA: — RECIBIDO

Patente de Invención	✔
Modelo de Utilidad	
Diseño Industrial	

Fecha de Presentación ___/___/___

Hora de Presentación ___:___:___

N° de Expediente

2011-0251 Fabián (A)

USO EXCLUSIVO RPI

DATOS DEL SOLICITANTE	
Solicitante Inventor ☐	Solicitante Titular ✔
Nombre: Universidad de Costa Rica	
Identificación: 4-0000-42149-36	
Nacionalidad: institución costarricense	
Domicilio: Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca, San José	
País: Costa Rica	
Fax: 2283-4226	

DATOS DEL INVENTOR
Nombre: Óscar Gerardo Acosta Montoya
Identificación: 1-1045-0329
Nacionalidad: Costarricense
Domicilio: 250 m este del Liceo San Antonio, San Antonio de Desamparados. Apartado 88ZP245. Costa Rica
Fax: 22533762

DATOS DEL APODERADO
Nombre: Silvia Salazar Fallas
Identificación: 1-0622-0930
Domicilio: Santo Tomás de Santo Domingo de Heredia, frente al Hotel Bouganvillea, tapia amarilla porton gris No 3
País: Costa Rica
Fax: 2244 2427

Lugar o medio para notificaciones:	2283-4226
Persona autorizada para retirar notificaciones en el RPI:	Nicolas Miranda Moya
Identificación: 3 424 453	

TITULO O DENOMINACION DE LA INVENCION
MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO RICO EN TANINOS DEL ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE FRUTOS QUE CONTIENEN ESTOS COMPUESTOS Y EXTRACTO OBTENIDO USANDO DICHO MÉTODO

DIVISIONAL DE LA SOLICITUD		
Número	Figura Jurídica	Fecha de Presentación
		___/_____/____

PRIORIDAD RECLAMADA		
País	Fecha de Presentación	N° Serie
	__/____/___	
	__/____/___	
	__/____/___	

Solicita ingreso a fase nacional		N° de solicitud internacional

Clasificación Internacional	Sector tecnológico
A23L2/74	INDUSTRIA AGROALIMENTARIA

USO EXCLUSIVO RPI

LISTA DE VERIFICACION			
	Comprobante de Pago de la Tasa		Documento de Cesión de Derechos
	Descripción y Reinvindicaciones de la Invención		Poder
	Dibujos		Traducción
	Resumen de la Descripción de la Invención		Otro
	Documento de Prioridad		Constancia de Depósito de Material Biológico

Observaciones: No se adjunta el comprobante de pago de las tasas respectivas debido a que la Universidad de Costa Rica se encuentra exenta del pago de tasas y aranceles en virtud de lo que estipulan las leyes No. 3030 del 20 de setiembre de 1962, No. 5684 del 30 de abril de 1975, No. 7015 del 29 de noviembre de 1985, No. 7293 del 31 de marzo de 1992

Licda. Silvia Salazar Fallas Silvia Salazar	San Jose, 12 de mayo de 2011
NOMBRE Y FIRMA DEL SOLICITANTE O APODERADO	LUGAR Y FECHA

AUTENTICACION	TIMBRES

FORMULARIO DE SOLICITUD DE INSCRIPCIÓN DE PATENTE DE INVENCIÓN, MODELO DE UTILIDAD O DISEÑO INDUSTRIAL

DATOS DEL INVENTOR
Nombre: Fabrice Vaillant
Identificación: 09PR29977
Nacionalidad: Francés
Domicilio: Condominio Monteran, casa No. 33 -2 Curridabat,Costa Rica
Fax: 2253-3762

DATOS DEL INVENTOR
Nombre: Manuel Dornier
Identificación: 99LP19059
Nacionalidad: Francés
Domicilio: 85 allée du Bois du Prieur 34830 Clapiers, Francia
Fax: + 33 4 99 61 24 44

DATOS DEL INVENTOR
Nombre: Ana Mercedes Pérez Carvajal
Identificación: 1-618-502
Nacionalidad: Costa Rica
Domicilio: 300 m norte del Banco Nacional, Esparza, Puntarenas
Fax: 2253-3762

DATOS DEL INVENTOR
Nombre:
Identificación:
Nacionalidad:
Domicilio:
Fax:

DATOS DEL INVENTOR
Nombre:
Identificación:
Nacionalidad:
Domicilio:
Fax:

FORMULARIO DE SOLICITUD DE INSCRIPCIÓN DE PATENTE DE INVENCIÓN, MODELO DE UTILIDAD O DISEÑO INDUSTRIAL

DATOS DEL SOLICITANTE			
Solicitante Inventor	☐	Solicitante Titular	☑
Nombre: Centro Internacional de Cooperación en Investigación Agrícola para el Desarrollo			
Identificación: 331 596 270000 40			
Nacionalidad: Francia			
Domicilio: Montpellier, Avenue Agropolis			
País: Francia			
Fax: 2283-4226			

DATOS DEL SOLICITANTE			
Solicitante Inventor	☐	Solicitante Titular	☐
Nombre: Centro internacional de estudios superiores en ciencias agronómicas (Montpellier, SupAgro)			
Identificación: ; 130 002 793 000 11			
Nacionalidad: Francia			
Domicilio: 2 place Viala - 34060 MONTPELLIER cedex 2 - FRANCE			
País: Francia			
Fax: + 33 4 99 61 24 44			

DATOS DEL SOLICITANTE			
Solicitante Inventor	☐	Solicitante Titular	☐
Nombre:			
Identificación:			
Nacionalidad:			
Domicilio:			
País:			
Fax:			

DATOS DEL SOLICITANTE			
Solicitante Inventor	☐	Solicitante Titular	☐
Nombre:			
Identificación:			
Nacionalidad:			
Domicilio:			
País:			
Fax:			

MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO RICO EN TANINOS DEL ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE FRUTOS QUE CONTIENEN ESTOS COMPUESTOS, Y EXTRACTO OBTENIDO USANDO DICHO MÉTODO

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología y los procesos que emplean tecnologías membranarias, y en particular se refiere a un método para la obtención de un extracto enriquecido en taninos del ácido elágico a partir del fruto de la mora y de otros frutos que contienen estos compuestos, así como al extracto obtenido usando dicho método.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los taninos del ácido elágico son compuestos que pertenecen a la clase de polifenoles denominados taninos hidrolizables, y son derivados complejos del ácido elágico. Recientemente, se ha sugerido que los taninos del ácido elágico (además del ácido elágico que se produce a partir de su hidrólisis y la urolitina –la cual se produce a partir de esta molécula a través de la acción de la flora intestinal– presentan una serie de actividades biológicas beneficiosas para la salud humana. Específicamente, y entre otras, estos compuestos: (1) presentan un alto potencial para el tratamiento de la hiperglucemia e hipertensión asociadas a la diabetes tipo 2 (Pinto Mda, S. y otros, Journal of Medicinal Food, 2010, 13 (5), 1027-1035), (2) podrían ser utilizados para el tratamiento de la malaria (Dell'Agli, M. y otros, Malaria Journal, 2010, 9, 208), (3) tienen potencial para ser usados para la prevención del cáncer de seno (Adams, L. S. y otros, Cancer Prevention Research, 2010, 3, 108), (4) podrían reducir el riesgo de desarrollo del cáncer de colon (Kasimsetty, S. G. y otros, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (4), 2180-2187 y Sharma, M. y otros, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (7), 3965-3969). En otros estudios, los extractos de productos vegetales que contienen taninos del ácido elágico mostraron capacidad antioxidante y antimicrobiana, además de actividad citotóxica contra células cancerosas en humanos (Barrajón-Catalán, E. y otros, Food and Chemical Toxicology, 2010, 48 (8-9), 2273-2282).

La granada (*Punica granatum* L.) ha sido ampliamente estudiada en años recientes, ya que se han reportado aplicaciones terapéuticas de esta fruta desde tiempos

antiguos, y se ha demostrado recientemente que esta fruta actúa como agente antioxidante, antidiabético e hipolipidémico. También se ha encontrado que esta fruta presenta actividades antibacteriales, antiinflamatorias, antivirales y anticarcinogénicas. Estos beneficios han sido atribuidos a los fitoquímicos contenidos en la fruta, los cuales son predominantemente polifenoles, que incluyen a su vez principalmente taninos hidrolizables, en los cuales los taninos del ácido elágico son los más importantes (Viuda-Martos, M. y otros, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010, 9 (6), 635-654). El amplio potencial de aplicación terapéutica de la granada, ha causado que una gran parte de la literatura científica sobre los taninos del ácido elágico se refiera a los obtenidos a partir de esta fruta. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que la mora (fruta producida por alguna de varias especies del género *Rubus*, familia Rosaceae), específicamente *Rubus adenotrichus* Schltdl., bien podría presentar mayores contenidos de taninos del ácido elágico que la granada misma (Acosta-Montoya, O. y otros, Food Chemistry, 2010, 119(4), 1497-1501). Las altas concentraciones de estas moléculas en las moras en diferentes estados de maduración, hacen que sean una materia prima potencialmente interesante para la obtención de extractos ricos en taninos del ácido elágico.

Las moras empleadas en el estudio mencionado anteriormente, se pueden utilizar en los tres grados de madurez expuestos (**Figura 1**). Los segmentos de los cromatogramas (cromatografía líquida de alto desempeño acoplada a un detector de arreglo de diodos o HPLC-DAD) a 280 nm del extracto acuoso – cetónico de las moras de este estudio se muestran en la **Figura 2**. Como se aprecia, los compuestos A1, A2 y E1, E2 presentan características espectrales en el ultravioleta-visible (UV-visible) de antocianinas (A1, A2) y taninos del ácido elágico (E1, E2). Estas moléculas se identificaron usando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) e información UV-visible en un estudio previo (Mertz, C. y otros, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55 (21), 8616-8624). Los picos A1 y A2 se identificaron tentativamente como cianidina glucósido y cianidina malonil-glucósido, mientras que los picos E1 y E2 como lambertianina C y sanguiina H-6. En el estudio mencionado, se mostró además que las moras de la especie *Rubus glaucus* también son fuente importante de taninos del ácido elágico. En otros estudios se ha mostrado la variedad de estos compuestos que se encuentran presentes en la mora del cultivar Apache (Hager, T. J. y otros, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56 (3), 661-669).

Los métodos para la obtención de extractos a partir de fuentes ricas en taninos del ácido elágico (purificados en menor o mayor medida) han sido investigados ampliamente, de forma particular para el uso de la granada como fuente de estos compuestos. Diversas publicaciones científicas, pero principalmente solicitudes de patentes, han sido publicadas sobre este tema.

El documento US 2006/0269629 divulga un método para la producción de un extracto que contiene fitoquímicos a partir de la granada, creando una mezcla de sólidos de la fruta (pericarpio, semillas, etc.) con agua, adicionando preparados enzimáticos para degradar (al menos parcialmente) los sólidos, aumentando la temperatura de la mezcla y finalmente eliminando los sólidos insolubles residuales. El documento US 2006/0211635, por su parte, presenta un método para la purificación de taninos del ácido elágico presentes en la granada, para lo que realizan etapas de extracción y purificación mediante la aplicación de extracciones empleando solventes (como metanol) y cromatografía con adsorbentes sólidos poliméricos. Similarmente, el documento WO 2005/097106 describe una técnica análoga, basada en extracción y purificación, empleando un adsorbente sólido polimérico.

El documento US 2006/0251753 presenta un método para la obtención de un extracto que contiene taninos del ácido elágico, a partir de materiales obtenidos de la planta de la granada. Para obtener este producto, se realizan extracciones sucesivas empleando solventes como etanol y éter acético, y finalmente se lleva a cabo una concentración bajo vacío.

El documento EP 1967079 divulga un método para la preparación de extractos de granada, para lo que se utilizan frutas enteras, las cuales se disgregan y dispersan en agua. Posteriormente se realiza un ajuste del pH, se procede a una clarificación por filtración o centrifugación, ocurre adsorción en una resina no iónica y se produce la elución con una solución acuosa. Finalmente se concentra por ósmosis inversa o nanofiltración y se deshidrata por atomización, evaporación bajo vacío o liofilización.

En los casos anteriormente descritos se presentan diversos inconvenientes. En algunos procesos es necesario el uso de solventes para la extracción de las moléculas de interés o para realizar la desorción de dichas moléculas a partir de las resinas (al utilizar adsorbentes sólidos poliméricos). Por consiguiente, podría obtenerse un producto final con residuos de esos solventes, dando como resultado un extracto que no podría ser calificado como "natural". En otros procesos descritos, puede producirse una adición excesiva de agua para la extracción de los compuestos de interés a partir de los sólidos

de la fruta, lo cual afectaría significativamente la eficiencia del proceso, ya que se requerirá una etapa importante de concentración, incrementándose el costo energético. En otras técnicas, se deben aplicar operaciones de concentración bajo vacío, las cuales podrían provocar daño térmico a las moléculas de interés, afectando así la funcionalidad del producto terminado.

Hasta la fecha no se ha divulgado un proceso que permita la separación, purificación y concentración de taninos del ácido elágico, sin emplear solventes ni altas temperaturas. Particularmente, no se ha descrito un proceso que permita separar los compuestos polifenólicos de interés (taninos del ácido elágico) usando las interacciones entre sus propiedades físico-químicas y el material de la membrana, además de considerar su masa molar.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Un objetivo de la presente invención es obtener un extracto natural proveniente de frutos que contienen taninos del ácido elágico, específicamente de la mora, y en particular de la mora *Rubus adenotrichus* Schltdl. totalmente madura, extracto que se encuentra enriquecido con taninos del ácido elágico y puede incluir de forma opcional diferentes contenidos de antocianinas, azúcares y ácidos. El extracto de la presente invención, además no incorpora residuos de productos químicos, pues en el método que se emplea para su obtención no se utilizan solventes químicos durante la extracción. En una realización particular de la invención, la materia prima para el método de obtención del mencionado extracto pueden ser los desechos sólidos que se obtienen durante la extracción del jugo de los frutos de la mora.

Para la obtención del extracto de la invención, se aplican tecnologías membranarias las cuales permiten una separación mecánica o fraccionamiento efectivo entre los compuestos polifenólicos presentes en el extracto, de acuerdo con su masa molar y en función de su afinidad con las membranas, lo que posibilita enriquecer una de las fracciones del extracto en taninos del ácido elágico, así como modular el contenido de antocianinas (además de azúcares y ácidos) en el mismo, seleccionando para ello el material de la membrana y regulando su poder de corte y la presión transmembranaria aplicada en el proceso.

En contraste con otras técnicas, el método de la invención no emplea solventes químicos, lo que implica una importante reducción en el costo del proceso y una mayor conservación de la calidad del extracto obtenido.

De manera resumida, puede decirse que la invención consiste en el desarrollo de un proceso que involucra una etapa o paso de extracción mediante el uso de preparados enzimáticos y operaciones de prensado, una etapa de clarificación por microfiltración para remover los sólidos insolubles en suspensión, una etapa de fraccionamiento mediante ultrafiltración o nanofiltración, la que permite separar a los taninos del ácido elágico de los demás compuestos solubles, una etapa de purificación por diafiltración y finalmente una etapa de concentración.

Mediante la aplicación del proceso descrito, el producto resultante presenta una concentración elevada de taninos del ácido elágico (para el caso de la mora *Rubus adenotrichus* Schltdl., corresponden a lambertianina C y sanguiina H-6), una concentración modulable de antocianinas y otras moléculas solubles en agua (como azúcares) y bajas concentraciones de ácidos orgánicos.

Con la presente invención se ha constatado que, si bien los taninos del ácido elágico presentan masas molares entre 1 800 y 2 900 Da, y las antocianinas entre 450 y 550 Da, resulta completamente sorprendente que durante la ultrafiltración sobre membranas con poder de corte de hasta 50 000 Da, se obtenga una retención del 100 % de los taninos del ácido elágico, mientras que se observa una retención parcial de las antocianinas, lo que significa que, desde el punto de vista técnico, la separación de los taninos del ácido elágico es mucho más fácil y económica de lo que se podría prever, si el proceso objeto de la presente invención es aplicado con este fin.

La invención propuesta también puede ser aplicada a todos los frutos que contienen taninos del ácido elágico, entre los que se encuentran (pero no se limita a ellos) la granada, la frambuesa, la fresa, la uva, la mora y varias otras especies del género *Rubus*, siendo preferida la mora.

Sobre el uso particular del extracto que se obtiene mediante la presente invención, se prevé que el mismo se pueda utilizar en la industria alimentaria como un aditivo (líquido o en polvo, si se deshidrata mediante tecnologías convencionales como la liofilización o el secado por atomización) para incrementar el contenido de taninos del ácido elágico en alimentos líquidos tales como jugos o bebidas, o en alimentos sólidos tales como barras de cereal y fruta, cereales de desayuno, etc.

Puesto que el extracto producido utilizando el método de la invención podría tener un cambio en su coloración por la reducción del contenido de antocianinas, esto permitiría adicionalmente su aplicación más amplia, tanto en la industria farmacéutica para la elaboración de medicamentos con propiedades específicas, en la industria alimentaria para la fabricación de suplementos nutricionales, y también en la industria cosmética.

En consecuencia, es un objeto de la presente invención un método para la obtención de un extracto rico en taninos del ácido elágico a partir de frutos que contienen estos compuestos (particularmente la mora *Rubus adenotrichus* Schltdl. y *Rubus glaucus*, totalmente madura). Dicho método comprende los pasos de:

i. extracción de la fracción líquida del fruto o los residuos de dichos frutos con prensado y empleando enzimas;
ii. clarificación de la fracción líquida del paso (i) mediante microfiltración tangencial;
iii. fraccionamiento del permeado luego de la microfiltración tangencial del paso (ii) mediante ultrafiltración y nanofiltración;
iv. purificación por diafiltración de la fracción retenida en la membrana a partir del proceso de filtración anterior (iii); y
v. concentración final del extracto rico en taninos del ácido elágico utilizando tecnologías térmicas y tecnologías atérmicas, como por ejemplo ósmosis inversa o evaporación osmótica o procesos combinados.

En la **Figura 3** se muestra un diagrama de flujo del método de la presente invención, donde se detallan los pasos mencionados anteriormente.

En el método proporcionado por la invención, la extracción de las moléculas de interés se logra mediante el proceso mecánico de prensado, el cual se lleva a cabo en conjunto con un tratamiento enzimático, utilizando enzimas celulolíticas y pectinolíticas, o mezclas y combinaciones de dichas enzimas.

Cuando se emplean frutos como materia prima inicial, el prensado se realiza bajo determinadas condiciones de operación importantes para el resultado obtenido, tales como por ejemplo: el prensado puede ser continuo o discontinuo, aplicarse presiones de entre 2 000 y 10 000 kPa, por tiempos de entre 5 y 40 minutos, contra una malla con tamaño de abertura de entre 0,2 y 1 mm. El jugo obtenido es mezclado nuevamente con el residuo sólido y se adiciona un preparado enzimático que presente al menos una actividad pectinasa correspondiente a una actividad poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) superior a 100 $UE \cdot mL^{-1}$ (y/o una actividad pectin-liasa (EC 4.2.2.10) superior a

100 UE·mL^{-1}) y al menos una actividad celulasa correspondiente a una actividad endo-celulasa (EC 3.2.1.4) superior a 20 UE·mL^{-1} y/o una actividad exo-celulasa (EC 3.2.1.91) superior a 1 UE·mL^{-1}. Se utiliza una concentración del preparado enzimático de entre 10 y 500 mg·kg^{-1}, empleando temperaturas de entre 20 y 50 °C, a tiempos de acción de entre 30 y 90 minutos.

Las actividades enzimáticas son expresadas en UE (Unidades Enzimáticas), es decir en micromoles de grupos reductores liberados a partir de un sustrato estándar. Dichos sustratos son el ácido poligalacturónico para la actividad poligalacturonasa (EC 3.2.1.15); la pectina cítrica altamente esterificada (80 %) para la actividad pectin-liasa (EC 4.2.2.10); la carboximetil-celulosa para la actividad endo-celulasa (EC 3.2.1.4) y la celulosa cristalina para la actividad exo-celulasa (EC 3.2.1.91). Las condiciones experimentales estándares para la determinación de estas actividades enzimáticas son respectivamente las siguientes: pH 4, a 30 °C; pH 6 a 40 °C; pH 4,6 a 38 °C y pH 4,8 a 50 °C.

Nuevamente se aplica prensado bajo determinadas condiciones de operación: el cual puede ser continuo o discontinuo, aplicándose presiones de entre 2 000 y 10 000 kPa, por tiempos de entre 5 y 40 minutos, contra una malla con tamaño de abertura de entre 0,2 y 1 mm.

El paso anterior permite remover una parte importante de los sólidos insolubles en suspensión, tales como los residuos de la pared celular y las semillas. La fracción líquida que se obtiene luego de este paso presenta un alto rendimiento de extracción de compuestos polifenólicos, permitiendo extraer entre el 60 y el 90 % del contenido inicial de antocianinas y taninos del ácido elágico.

Cuando se parte de residuos de los frutos, los compuestos de interés se extraen bajo determinadas condiciones de operación importantes para el resultado obtenido. Tales condiciones son, por ejemplo: se adiciona agua que ha sido previamente acidificada a pH entre 3,0 y 5,0 en proporciones variables con respecto a la masa de los residuos de entre 1 y 10, la mezcla se deja reposar durante un período de tiempo entre 20 y 120 minutos, manteniendo la temperatura de la mezcla entre 20 y 50 °C con agitación variable o constante. Luego se adiciona un preparado enzimático que presenta al menos una actividad pectinasa correspondiente a una actividad poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) superior a 100 UE·mL^{-1} (y/o una actividad pectin-liasa (EC 4.2.2.10) superior a 100 UE·mL^{-1}) y al menos una actividad celulasa correspondiente a una actividad endo-celulasa (EC 3.2.1.4) superior a 20 UE·mL^{-1} y/o una actividad exo-celulasa (EC 3.2.1.91)

superior a 1 UE·mL^{-1}. Se utiliza una concentración del preparado enzimático de entre 10 y 500 mg·kg^{-1}, empleando temperaturas de entre 20 y 50 °C, a tiempos de acción de entre 30 y 90 minutos.

Luego del período de extracción, los sólidos se eliminan por filtración a través de una malla con un tamaño de abertura de entre 1 y 5 mm. Este proceso de extracción puede ser repetido de forma sucesiva de 1 a 4 veces, conservando y mezclando las fracciones acuosas.

Finalmente, al residuo sólido se le aplica un prensado, el cual puede ser continuo o discontinuo, con presiones de entre 2 000 y 10 000 kPa, durante 5 hasta 40 minutos, empleando una malla con un tamaño de abertura de entre 0,2 y 1 mm. El líquido resultante se mezcla con las fracciones acuosas obtenidas en el paso anterior.

Este paso de prensado y extracción enzimática permite remover una parte importante de los sólidos insolubles en suspensión, tales como los residuos de la pared celular y las semillas. La fracción líquida que se obtiene luego del mismo, presenta un alto rendimiento de extracción de compuestos polifenólicos, permitiendo extraer entre el 30 y el 90 % de antocianinas y taninos del ácido elágico del contenido inicial de la fracción.

La fracción líquida obtenida en los pasos anteriores se clarifica empleando la tecnología de microfiltración, utilizando una membrana que puede ser tanto orgánica como inorgánica, y que tiene de manera preferible un tamaño de poro de entre 0,05 y 1,0 µm. La operación se realiza bajo determinadas condiciones tales como: velocidad tangencial de entre 4 y 7 m·s^{-1}, presión transmembranaria de entre 120 y 350 kPa, temperatura de entre 25 y 50 °C. Esta filtración se continúa hasta alcanzar un factor de reducción volumétrico (FRV) de entre 5 y 30.

Como resultado de la microfiltración tangencial, la totalidad de los sólidos insolubles en suspensión en el extracto se eliminan, el permeado es microbiológicamente estable (si se emplean tamaños de poro menores a 0,2 µm) y se obtiene una alta concentración de los compuestos polifenólicos en esta fracción (durante la operación no se retienen los compuestos de interés).

El retenido que se produce a partir de la operación de microfiltración puede considerarse un residuo de los frutos, y extraerse los compuestos de interés del mismo, conforme los pasos descritos anteriormente.

Luego del paso de remoción total de los sólidos insolubles en suspensión mediante microfiltración, se obtiene un permeado que contiene únicamente sólidos solubles, el cual es nuevamente sometido a una operación de separación membranaria

(fraccionamiento), específicamente ultrafiltración o nanofiltración, utilizando para ello una membrana orgánica o inorgánica, tubular o plana, con un poder de corte de entre 0,1 y 50 kDa, y una presión transmembranaria aplicada de entre 250 y 4 000 kPa. La operación se realiza bajo determinadas condiciones: velocidad tangencial de entre 0,2 y 4 $m \cdot s^{-1}$, temperatura de entre 25 y 50 °C. Esta operación se continúa hasta alcanzar un factor de reducción volumétrico (FRV) de entre 5 y 30.

En este nuevo fraccionamiento, se observa que las moléculas solubles, tales como las antocianinas, azúcares y ácidos, no se retienen totalmente en la membrana y una parte puede pasar al permeado, según el grado de retención. Los taninos del ácido elágico, son totalmente retenidos por la membrana, pudiéndose así realizar la separación y concentración de estas moléculas.

A partir de estas operaciones de ultrafiltración o nanofiltración, se obtienen dos fracciones:

(a) un permeado, que es una fracción líquida con elevada concentración de moléculas solubles, como azúcares y ácidos, principalmente. Esta fracción podrá contener antocianinas en cantidades variables, según el poder de corte de la membrana y la presión transmembranaria aplicada, y

(b) un retenido, que es igualmente una fracción líquida con una concentración alta de taninos del ácido elágico, una concentración variable de antocianinas y una concentración baja de otras moléculas solubles, tales como azúcares y ácidos. La concentración de los taninos del ácido elágico en el retenido será directamente proporcional al FRV obtenido durante la ultrafiltración, dependiendo además de la concentración de las moléculas en la materia prima usada para esta etapa.

El retenido que se obtiene en el paso anterior, se purifica aplicando una diafiltración, para la cual se emplea una membrana orgánica o inorgánica, tubular o plana, con un poder de corte de entre 0,1 y 50 kDa, y una presión transmembranaria aplicada de entre 250 y 4 000 kPa. La operación se realiza bajo determinadas condiciones: velocidad tangencial de entre 0,2 y 4 $m \cdot s^{-1}$, temperatura de entre 25 y 50 °C. La diafiltración se realiza a volumen constante, adicionando agua purificada en un flujo igual que el del permeado. Esta filtración se continúa hasta alcanzar una pureza de 90 % para los taninos del ácido elágico, con respecto a los demás sólidos solubles presentes en el retenido.

Esta etapa de diafiltración tiene como objetivo facilitar la separación de los taninos del ácido elágico de otras moléculas solubles. Así, se observa el mismo efecto descrito para la etapa de fraccionamiento: las moléculas solubles, como las antocianinas,

azúcares y ácidos, no se retienen totalmente en la membrana y pasan al permeado. Dado que los ácidos atraviesan las membranas de ultrafiltración y de nanofiltración al ser arrastrados por el agua, se produce también la desacidificación del extracto, lográndose eliminar hasta un 80 % de los ácidos del retenido. Los taninos del ácido elágico son totalmente retenidos por la membrana, pudiéndose así realizar la purificación de estas moléculas.

A partir de esta operación de diafiltración empleando las mismas membranas y condiciones de la etapa de fraccionamiento, se obtienen nuevamente dos fracciones:

(a) un permeado, que es una fracción líquida con elevada concentración de moléculas solubles, como antocianinas, azúcares y ácidos, principalmente, y

(b) un retenido, que es igualmente una fracción líquida con una concentración alta de taninos del ácido elágico, y una concentración baja de moléculas solubles, como antocianinas, azúcares y ácidos, principalmente. En esta etapa no se produce una concentración de los taninos del ácido elágico, ya que el volumen del retenido se mantiene constante, pero se produce una purificación de estas moléculas, por la salida de las antocianinas, azúcares y ácidos a través del permeado.

Los retenidos obtenidos en las etapas de fraccionamiento (por ultrafiltración y nanofiltración) y purificación (por diafiltración, empleando las membranas de ultrafiltración y nanofiltración), pueden concentrarse adicionalmente bajo condiciones térmicas o atérmicas, preferiblemente bajo las últimas para evitar al máximo la degradación de los compuestos de interés. Particularmente, podrán utilizarse tecnologías convencionales o tecnologías membranarias atérmicas, como la evaporación osmótica y la ósmosis inversa. Dicho extracto concentrado podrá deshidratarse, empleando para ello tecnologías convencionales, tales como la liofilización o el secado por atomización, obteniéndose así un extracto en polvo.

El método de la invención es particularmente útil para obtener un extracto con elevado contenido de taninos del ácido elágico, cuando se emplea como materia prima frutos como la mora tropical de montaña *Rubus adenotrichus* Schltdl. o *Rubus glaucus*.

El extracto rico en taninos del ácido elágico objeto de la presente invención, se caracteriza por presentar un contenido de estos compuestos que constituyen entre el 50 y el 90 % de la masa en base seca, mientras que su contenido de antocianinas puede variar entre 0 y 50 % de la masa en base seca, dependiendo del poder de corte de las membranas y la presión transmembranaria aplicada en las etapas de filtración, que se llevan a cabo como parte del proceso de la invención.

Otros objetos adicionales de la invención lo constituyen una composición alimenticia que comprende el extracto obtenido mediante el proceso de la invención, y que incluye adicionalmente un excipiente alimenticio aceptable; una composición farmacéutica que comprende dicho extracto y un excipiente farmacéuticamente aceptable y una composición cosmética que comprende dicho extracto y un excipiente cosméticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra las moras (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) empleadas en el estudio realizado previo a la invención, para determinar la composición química de las frutas en tres estados de maduración.

La **Figura 2** muestra los segmentos de los cromatogramas obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD) a 280 nm del extracto acuoso – cetónico de las moras en los tres estados de maduración, del estudio previamente referido.

La **Figura 3** representa un diagrama de flujo del método de la presente invención, para la obtención de un extracto rico en taninos del ácido elágico, a partir del fruto de la mora.

La **Figura 4** muestra la evolución del flujo de permeado al variar el FRV durante la operación de microfiltración. Se muestran los resultados obtenidos al aplicar dos formas de extracción de la materia prima: prensado continuo o discontinuo.

La **Figura 5** muestra los valores de a) concentración de antocianinas, b) concentración de taninos del ácido elágico y c) capacidad antioxidante de las fracciones de jugo (permeado y retenido), según cuatro concentraciones de preparado enzimático utilizadas (Klerzyme 150®). Se muestran los valores de las materias primas como referencia. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=2.

La **Figura 6** muestra el comportamiento de a) concentración de antocianinas, b) concentración de taninos del ácido elágico y c) capacidad antioxidante de las fracciones de jugo (permeado y retenido), a través del tiempo de operación. Se muestran los valores de las materias primas como referencia. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=4.

La **Figura 7** muestra los valores de a) concentración de antocianinas, b) concentración de taninos del ácido elágico y c) capacidad antioxidante de las fracciones

de jugo (permeado y retenido), según tres rangos de presión transmembranaria aplicada. Se muestran los valores de las materias primas como referencia. Las barras de error muestran la desviación estándar para n=2.

La **Figura 8** representa de forma gráfica la concentración sanguínea de triglicéridos ($mg \cdot dL^{-1}$) en voluntarios sanos sometidos a una dieta de una semana rica en carbohidratos y grasa, antes y después del consumo de agua azucarada (A) o de una bebida elaborada a partir de jugo de mora microfiltrado (B).

La presente invención será descrita en más detalle en los siguientes ejemplos de realización de la misma, los cuales se proporcionan a manera de ilustración de la invención y en ningún modo para limitar su alcance.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Ejemplo 1: Extracción mecánica y enzimática de una fracción líquida con alto contenido de taninos del ácido elágico a partir del fruto de la mora.

Se parte de una materia prima que contiene una alta concentración de taninos del ácido elágico, en particular los frutos de la mora tropical de montaña *Rubus adenotrichus* Schltdl. o *Rubus glaucus*, o el residuo resultante luego de la extracción del jugo de dichos frutos. Esta materia prima contiene como compuestos polifenólicos principales las antocianinas y los taninos mencionados. En el **Cuadro 1** se muestra la composición relevante típica promedio de 9 muestras de mora *R. adenotrichus* madura.

Cuadro 1. Propiedades químicas de la mora *R. adenotrichus*. *

Parámetro evaluado		Base húmeda	Base seca
Humedad ($g \cdot 100$ g muestra^{-1})		83,8 ± 0,5	NA
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·g muestra^{-1})		1,22 ± 0,05	7,6 ± 0,2
Taninos del ácido elágico (mg ácido elágico·g muestra^{-1})		3,0 ± 0,1	19 ± 2
Capacidad antioxidante (ORAC) (µmol TE·g muestra^{-1})		74 ± 3	466 ± 18
Sólidos solubles (°Brix) **		9,1 ± 0,1	NA
pH		2,61 ± 0,01	NA
Acidez (g ácido málico·100 g muestra^{-1})		2,22 ± 0,06	13,9 ± 0,5
Azúcares ($g \cdot 100$ g muestra^{-1})	Glucosa	1,48 ± 0,06	9,2 ± 0,4
	Fructosa	1,5 ± 0,1	9,6 ± 0,8
	Sacarosa	ND ***	ND ***

* Promedio ± intervalo de de confianza (n=9), nivel de confianza del 95 %, ** Dato corregido por acidez, *** Menor a 0,2 g·100 g muestra^{-1}, NA= no aplica, ND= no detectado, TE= Equivalente de Trolox

La materia prima mencionada (en este caso, la mora de la variedad *Rubus adenotrichus*, totalmente madura) se somete a una extracción mecánico-enzimática. Las moras –que normalmente son suministradas en estado congelado– son descongeladas durante 36 horas, a 2 °C. Posteriormente, se extrae la fracción líquida mediante un prensado discontinuo, empleando una prensa, como por ejemplo la Hydraulic Shop Press OTC 25 Ton, aplicando a la fruta (que se encuentra dentro de una malla con un tamaño de abertura de 0,7 mm) una presión de 3 000 kPa por 10 minutos.

Las fracciones líquida y sólida obtenidas son mezcladas entonces en un recipiente apropiado, se aplica calor hasta que la mezcla alcanza 35 °C, y se adiciona un preparado enzimático, seleccionado a partir de los que se muestran en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Actividades de preparados enzimáticos usados para la extracción de jugo de mora.

Preparado enzimático	Actividad (UE·mL^{-1})				
	Pectinliasa	Poligalacturonasa	Pectinesterasa	Endocelulasa	Exocelulasa
Klerzyme 150®*	344	866	409	112	4
Clarex Citrus 12 XL®*	317	549	350	112	36
Rapidase Vegetable Juice®*	188	369	433	124	10

* DSM Food Specialties

El tiempo de acción del preparado enzimático corresponde a 75 minutos, durante los cuales debe mantenerse la temperatura en 35 °C. Luego de ese tiempo, se aplica nuevamente la operación de prensado, la cual puede ser en este caso discontinua, por ejemplo, empleando la prensa Hydraulic Shop Press OTC 25 Ton, usando una malla con un tamaño de abertura de 0,7 mm, aplicando una presión de 3 500 kPa por 15 minutos, o continua, por ejemplo, empleando la prensa de tornillo Chisholm-Ryder, usando una malla con un tamaño de abertura de 0,9 mm, aplicando una presión de 2 000 kPa.

En la **Figura 4** se muestra la evolución del flujo de permeado ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$) al variar el FRV durante la operación de microfiltración, de acuerdo con la materia prima usada en esta operación, ya sea aplicando prensado continuo o prensado discontinuo. Como se puede apreciar en esta figura, los valores de flujo de permeado obtenidos al emplear prensado discontinuo para extraer el jugo de la materia prima son mayores que aquellos obtenidos al emplear prensado continuo. Esto se debe a la presencia de una mayor concentración de sólidos insolubles suspendidos en el jugo alimentado –cuando se utiliza prensado continuo–, los cuales provocan una mayor colmatación de la membrana y por consiguiente, un decrecimiento del flujo de permeado.

La concentración aplicada de enzima en la etapa anterior, deberá ser preferiblemente de 250 $mg \cdot kg^{-1}$ o superior. En el **Cuadro 3** se muestran los resultados de los rendimientos de obtención del jugo y la concentración de los compuestos de interés en el mismo, al variar las concentraciones del preparado enzimático Klerzyme 150®.

La actividad del preparado enzimático es apreciable, según se muestra en el **Cuadro 4**, observándose el efecto de la adición de la enzima Klerzyme 150® sobre el rendimiento de obtención del jugo y en la concentración de los compuestos de interés en el mismo.

Cuadro 3. Cambios en las variables respuestas medidas al evaluar el efecto de la concentración del preparado enzimático Klerzyme 150®, aplicado para la obtención de una fracción líquida enriquecida en los compuestos de interés de la mora.

Concentración de preparado enzimático ($mg \cdot kg^{-1}$)	Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·g muestra^{-1})	Taninos del ácido elágico (mg ácido elágico·g muestra^{-1})	Rendimiento de extracción de jugo ($g \cdot 100\ g^{-1}$)
1000	$1,13 \pm 0,06^{a}$	$0,93 \pm 0,06^{a}$	$71,7 \pm 0,8^{a}$
500	$0,98 \pm 0,03^{a}$	$0,85 \pm 0,08^{a}$	70 ± 1^{ab}
250	$1,13 \pm 0,12^{a}$	$0,89 \pm 0,10^{a}$	68 ± 1^{ab}
150	$1,12 \pm 0,04^{a}$	$0,96 \pm 0,07^{a}$	66 ± 4^{b}
50	$0,99 \pm 0,12^{a}$	$0,84 \pm 0,06^{a}$	66 ± 1^{b}

* Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p<0,05$).

Cuadro 4. Efectos de la adición del preparado enzimático Klerzyme 150®, aplicado para la obtención de una fracción líquida enriquecida en los compuestos de interés de la mora.

Tratamiento enzimático	Antoclaninas (mg cianidina-3-glucósido·g muestra^{-1})	Taninos del ácido elágico (mg ácido elágico·g muestra^{-1})	Rendimiento de extracción de jugo (g·100 g^{-1})
Klerzyme 150® (250 mg·kg^{-1})	1,13 ± 0,12^{a}	0,89 ± 0,10^{a}	68 ± 1^{a}
Sin preparado enzimático	0,83 ± 0,06^{b}	0,63 ± 0,09^{b}	62 ± 3^{b}

* Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, p<0,05).

En la **Figura 5** también se muestra que el uso de diferentes concentraciones del preparado enzimático Klerzyme 150®, no disminuye de manera significativa la concentración de los compuestos de interés en el permeado obtenido (ni la capacidad antioxidante, medida por el método de ORAC), con respecto a valores medidos en la materia prima usada, al aplicar la operación de microfiltración tangencial.

Luego del segundo prensado, se obtienen las fracciones líquidas del fruto de la mora, las cuales presentan características similares a las que se muestran en el **Cuadro 5**. De la información suministrada en ese cuadro, se aprecia que fue posible lograr la extracción de un 66 a un 87 % de las antocianinas y un 23 a un 60 % de los taninos del ácido elágico. Se observa además que los jugos resultantes poseen un bajo contenido de sólidos insolubles en suspensión y valores de turbidez bajos.

Cuadro 5. Características físico-químicas de las fracciones líquidas obtenidas de la extracción mecánico-enzimática de los frutos de la mora, empleando dos operaciones de prensado.

Parámetro evaluado	Prensado discontinuo	Prensado continuo
Rendimiento (%)	76 ± 1^{a}	75 ± 3^{a}
Humedad (g·100 g muestra^{-1})	92,67 ± 0,06^{a}	91 ± 2^{a}
Sólidos solubles (°Brix)	8,25 ± 0,03^{b}	9,00 ± 0,03^{a}

pH	2,784 ± 0,008[a]	2,792 ± 0,003[a]
Acidez (g ácido málico·100 g muestra^{-1})	2,48 ± 0,06[b]	2,77 ± 0,08[a]
Sólidos insolubles en suspensión (g·100 g muestra^{-1})	0,8 ± 0,3[b]	19 ± 3[a]
Turbidez (NTU)	218 ± 31[b]	11 000 ± 2 975[a]
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·g muestra^{-1})	0,80 ± 0,04[b]	1,06 ± 0,08[a]
Taninos del ácido elágico (mg ácido elágico·g muestra^{-1})	0,7 ± 0,1[b]	1,8 ± 0,3[a]

* Datos son reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3), con un nivel de confianza del 95 %. Promedios en una misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p<0,05$).

Ejemplo 2: Obtención de un producto clarificado con alto contenido de taninos del ácido elágico, mediante microfiltración tangencial.

La fracción líquida obtenida en el paso de prensado y tratamiento enzimático, se procesa mediante la aplicación de microfiltración tangencial, sobre una membrana cerámica tubular multicanal con un tamaño de poro de 0,2 µm, a una velocidad de 5 m·s^{-1}, aplicando una presión transmembranaria de 200 kPa y una temperatura de 35 °C. Con este paso, la totalidad de los sólidos insolubles en suspensión se eliminan, y se obtiene un permeado microbiológicamente estable –si se utiliza una membrana cuyo tamaño de poro es inferior o igual a 0,2 µm–. Después de la operación de microfiltración, se obtiene un jugo clarificado (permeado) que conserva las mismas propiedades antioxidantes y las concentraciones de taninos del ácido elágico y antocianinas de la materia prima.

La **Figura 6** muestra que la aplicación de la microfiltración tangencial no disminuye de manera significativa la concentración de los compuestos de interés en el permeado obtenido (ni la capacidad antioxidante, medida por el método de ORAC), con respecto a valores medidos en la materia prima usada, a diferentes valores de FRV. La **Figura 7** muestra cómo la aplicación de diferentes presiones transmembranarias durante la microfiltración tangencial, no disminuye de manera significativa la concentración de los compuestos de interés en el permeado obtenido (ni la capacidad antioxidante, medida por

el método de ORAC. Por otra parte, en el **Cuadro 6** se presenta un ejemplo de las características del jugo obtenido, antes y después de la microfiltración tangencial.

Cuadro 6. Ejemplo de las características de jugos de mora antes y después de la microfiltración tangencial.*

Parámetro evaluado	Jugo prensado inicial	Jugo microfiltrado
Humedad (g·100 g muestra^{-1})	90,7 ± 0,2	90,7± 0,2
Sólidos insolubles (g·100 g muestra^{-1})	1,5 ± 0,1	ND **
Turbidez (NTU)	452 ± 100	0,08 ± 0,01
Sólidos solubles (°Brix) ***	9,0 ± 0,3	9,01 ± 0,02
Antocianinas (mg cianidina-3-glucósido·g muestra^{-1})	1,27 ± 0,03	1,30 ± 0,07
Taninos del ácido elágico (mg ácido elágico·g muestra^{-1})	0,58 ± 0,04	0,64 ± 0,07

* Promedio ± intervalo de confianza (n=3), nivel de confianza del 95 %, ** Menor a 0,3 g·100 g muestra^{-1}, *** Dato corregido por acidez, ND= no detectado

Ejemplo 3: Fraccionamiento del extracto clarificado de mora, mediante ultrafiltración.

El permeado obtenido luego de aplicar la operación de microfiltración, es fraccionado aplicando la tecnología membranaria de ultrafiltración. Para ello, se selecciona una membrana plana, con un poder de corte de 5 000 Da. Las condiciones de la operación de ultrafiltración son las siguientes: presión transmembranaria de 3 500 kPa, velocidad tangencial de 2 m·s^{-1} y temperatura de 35 °C.

Las retenciones observadas durante la aplicación de la ultrafiltración, luego de 1 hora de operación (FRV de 1,13) se muestran en el **Cuadro 7**.

Cuadro 7. Retenciones observadas durante la operación de ultrafiltración de jugo clarificado de mora*.

Parámetro evaluado	Retención (%)

Sólidos solubles (°Brix)	39,2 ± 0,2
Acidez	38,2 ± 0,8
Antocianinas totales	91,8 ± 0,7
Taninos del ácido elágico totales	98,6 ± 0,2

* Promedio ± intervalo de confianza (n=2), nivel de confianza del 95 %

La operación de ultrafiltración culmina cuando se alcanza un factor de reducción volumétrico (FRV) de 10.

Ejemplo 4: Fraccionamiento del extracto clarificado de mora, mediante nanofiltración.

El permeado obtenido luego de aplicar la operación de microfiltración, es fraccionado alternativamente aplicando la tecnología membranaria de nanofiltración. Para ello, se selecciona una membrana plana, con un poder de corte de 500 Da. Las condiciones de la operación de nanofiltración son las siguientes: presión transmembranaria de 2 000 kPa, velocidad tangencial de 2 $m \cdot s^{-1}$ y temperatura de 35 °C.

Las retenciones observadas durante la aplicación de la nanofiltración, luego de 4,5 horas de operación (FRV de 1,57) se muestran en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Retenciones observadas durante la operación de nanofiltración de jugo clarificado de mora*.

Parámetro evaluado	Retención (%)
Sólidos solubles (°Brix)	93,7 ± 0,6
Acidez	82 ± 3
Antocianinas totales	101 ± 10
Taninos del ácido elágico totales	106 ± 4

* Promedio ± intervalo de confianza (n=3), nivel de confianza del 95 %

La operación de nanofiltración culmina cuando se alcanza un factor de reducción volumétrico (FRV) de 10.

Ejemplo 5: Purificación del extracto clarificado de mora, mediante diafiltración.

El retenido obtenido luego de aplicar la operación de ultrafiltración, se diafiltra a volumen constante, utilizando la misma membrana y las mismas condiciones descritas para la operación de ultrafiltración. Las retenciones observadas durante la aplicación de la diafiltración, luego de 2,5 horas de operación se muestran en el **Cuadro 9.**

Cuadro 9. Retenciones observadas durante la operación de diafiltración del retenido obtenido a partir de la ultrafiltración*.

Parámetro evaluado	Retención (%)
Sólidos solubles (°Brix)	47 ± 2 %
Acidez	41,6 ± 0,5
Antocianinas totales	96,0 ± 0,3
Taninos del ácido elágico totales	98,9 ± 0,5

* Promedio ± intervalo de confianza (n=4), nivel de confianza del 95 %

La operación de diafiltración culmina cuando se alcanza una pureza de los taninos del ácido elágico (con respecto al resto de polifenoles) de 80 %.

Ejemplo 6: Concentración del extracto rico en taninos del ácido elágico, mediante evaporación osmótica.

El producto resultante de las etapas anteriores se concentra mediante evaporación osmótica, hasta alcanzar un factor de concentración de 5. En el **Cuadro 10** se muestra el efecto de la aplicación de evaporación osmótica sobre un jugo clarificado de mora, utilizando una membrana de fibras huecas, una solución saturada de cloruro de calcio como solución osmótica, y una sobrepresión del producto de 100 kPa. La operación se llevó a cabo a 10 °C.

Cuadro 10. Características de jugos clarificados de mora (concentrado y no concentrado)*.

Parámetro evaluado	Jugo clarificado	Jugo clarificado concentrado

Humedad (g·100 g muestra^{-1})	90 ± 1	38,43 ± 0,07
Sólidos solubles (°Brix)	10 ± 1	65,567 ± 0,007
Polifenoles totales (mg ácido gálico·mL muestra^{-1})	2,6 ± 0,2	18,9 ± 0,2

* Promedio ± intervalo de confianza (n=3), nivel de confianza del 95 %

Ejemplo 7. Utilización de jugo de mora microfiltrado como alimento funcional y su efecto protector contra el estrés oxidativo en voluntarios sanos.

En un estudio clínico realizado conjuntamente entre CITA (Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos) e INIFAR (Instituto de Investigaciones Farmacéuticas) de la Universidad de Costa Rica, se evaluó el efecto de la ingesta de una bebida elaborada a partir de jugo de mora microfiltrado sobre marcadores específicos del perfil lipídico y la capacidad antioxidante en 15 voluntarios sanos, sometidos durante una semana a una dieta rica en grasa y carbohidratos.

El grupo de voluntarios sanos (n = 15; 4 hombres, 11 mujeres, edad promedio 25 ± 4 años, con un rango de 34-20 años) fue sometido a un tratamiento con una bebida elaborada a partir de jugo de mora microfiltrado y un placebo mediante un diseño experimental aleatorio cruzado. Los participantes recibieron una dieta balanceada baja en antioxidantes durante los tres días previos al inicio del estudio. Posteriormente, durante una semana se administró una dieta de reto rica en grasa y carbohidratos, eliminando el consumo de frutas, vegetales, café, té, chocolate y cualquier producto conocido con alta capacidad antioxidante. Durante este periodo los participantes recibieron la bebida de mora o el placebo según correspondiera, en un volumen de 250 mL tres veces al día. Para la elaboración de la bebida se adicionó agua al jugo de mora puro microfiltrado en una proporción 50/50 (% m/m) y azúcar *ad libitum*. El placebo correspondió a bebidas azucaradas con baja actividad antioxidante (<0,5 micromol TE·mL^{-1}). Los participantes completaron dos periodos de dieta de reto con un lapso de tres semanas entre tratamientos. Se tomó una muestra de sangre al final de la dieta balanceada y de la dieta de reto para cada periodo. Se midió la concentración en plasma de colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos. Además, se determinaron dos actividades enzimáticas indicadoras de estrés oxidativo, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

En la Figura 8 se observa el descenso de algunos marcadores de perfil lipídico como los niveles de triglicéridos, los cuales disminuyeron significativamente en un 20 % en el grupo que ingirió la bebida de mora, en comparación con un grupo control que consumió agua azucarada (p=0,003).

Asimismo, se determinó una disminución en las actividades de enzimas que neutralizan la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, cuando un organismo está sometido a estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), cuyas actividades se redujeron en un 27% y 36 %, con una p=0,001 y p=0,013, respectivamente.

En este ensayo clínico se demostró que la ingesta de una bebida elaborada a partir de jugo de mora microfiltrado presenta un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido en voluntarios sanos, que ingirieron una dieta rica en grasa y carbohidratos. Estos resultados evidencian que el consumo de una bebida elaborada a partir de un jugo microfiltrado de mora es beneficioso para la salud humana.

REIVINDICACIONES

1. Método para la obtención de un extracto rico en taninos del ácido elágico a partir de frutos que contienen estos compuestos, caracterizado porque comprende los pasos de:
   I. extracción de la fracción líquida del fruto o los residuos de dicho fruto con prensado y empleando enzimas;
   II. clarificación de la fracción líquida del paso (i) mediante microfiltración tangencial;
   III. fraccionamiento del permeado luego de la microfiltración tangencial del paso (II) mediante una operación de separación membranaria;
   IV. purificación por diafiltración de la fracción retenida en la membrana a partir de la operación de separación membranaria anterior (III); y
   V. concentración final del extracto rico en taninos del ácido elágico mediante un método seleccionado del grupo que consiste de métodos atérmicos y métodos térmicos.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el prensado se realiza de forma continua o discontinua, aplicando presiones de entre 2 000 y 10 000 kPa, por tiempos de entre 5 y 40 minutos, contra una malla con tamaño de abertura de entre 0,2 y 1 mm.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque las enzimas utilizadas en la extracción con prensado se seleccionan del grupo que consiste de enzimas celulolíticas, enzimas pectinolíticas, o mezclas y combinaciones de las mismas.
4. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la extracción de la fracción líquida de los residuos de dichos frutos se realiza en agua acidificada.
5. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso de clarificación mediante microfiltración tangencial se realiza sobre una membrana con un tamaño de poro de entre 0,05 y 1,0 µm.
6. Método según la reivindicación 5 caracterizado porque la membrana es orgánica o inorgánica.
7. Método según las reivindicaciones 5 y 6, caracterizado porque la microfiltración tangencial se lleva a cabo a una velocidad tangencial de entre 4 y 7 $m \cdot s^{-1}$, aplicando una presión transmembranaria de entre 120 y 350 kPa y a una temperatura de entre 25 y 50 °C.

8. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la operación de separación membranaria para el fraccionamiento del permeado se realiza mediante un proceso seleccionado del grupo que consiste de ultrafiltración y nanofiltración.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque la ultrafiltración y la nanofiltración se realizan usando una membrana con un poder de corte de entre 0,1 y 50 kDa.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque la membrana es orgánica o inorgánica, tubular o plana.
11. Método según las reivindicaciones de la 8 a la 10, caracterizado porque la ultrafiltración y la nanofiltración se realizan a una presión transmembranaria de entre 250 y 4 000 kPa, una velocidad tangencial de entre 0,2 y 4 $m \cdot s^{-1}$ y una temperatura de entre 25 y 50 °C.
12. Método según las reivindicaciones de la 8 a la 11, caracterizado porque la ultrafiltración y la nanofiltración se realizan hasta alcanzar un factor de reducción volumétrico (FRV) de entre 5 y 30.
13. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la purificación del retenido obtenido luego de la ultrafiltración y la nanofiltración se realiza mediante diafiltración.
14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque la diafiltración se realiza usando una membrana con poder de corte de entre 0,1 y 50 kDa.
15. Método según la reivindicación 14, caracterizado porque la membrana es orgánica o inorgánica, tubular o plana.
16. Método según las reivindicaciones de la 13 a la 15, caracterizado porque la diafiltración se realiza a una presión transmembranaria de entre 250 y 4 000 kPa, una velocidad tangencial de entre 0,2 y 4 $m \cdot s^{-1}$, una temperatura de entre 25 y 50 °C y a volumen constante.
17. Método según las reivindicaciones de la 13 a la 16, caracterizado porque la diafiltración se realiza hasta alcanzar una pureza del 90 % para los taninos del ácido elágico.
18. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el extracto se concentra bajo un método atérmico seleccionado del grupo que consiste de ósmosis inversa y evaporación osmótica, o una combinación de los mismos.
19. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el extracto se concentra bajo un método térmico tal como evaporación al vacío.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 19, caracterizado porque el fruto para la extracción de los taninos del ácido elágico se selecciona del grupo que consiste de granada, frambuesa, fresa, uva, mora y otras especies del género *Rubus*.
21. Método según la reivindicación 20, caracterizado porque el fruto es la mora tropical de montaña *Rubus adenotrichus* Schltdl. o *Rubus glaucus*.
22. Extracto rico en taninos del ácido elágico obtenido mediante el método de las reivindicaciones de la 1 a la 21.
23. Extracto rico en taninos del ácido elágico según la reivindicación 22, caracterizado porque el contenido de taninos del ácido elágico se encuentra entre el 50 y el 90 % de la masa en base seca, y el contenido opcional de antocianinas se encuentra entre 0 y 50 % de la masa en base seca.
24. Composición alimenticia caracterizada porque comprende el extracto de las reivindicaciones 22 ó 23, y un excipiente alimenticio aceptable.
25. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende el extracto de las reivindicaciones 22 ó 23, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
26. Composición cosmética caracterizada porque comprende el extracto de las reivindicaciones 22 ó 23, y un excipiente cosméticamente aceptable.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología y con los procesos que emplean tecnologías membranarias, y en particular se refiere a un método para la obtención de un extracto enriquecido en taninos del ácido elágico a partir del fruto de la mora (*Rubus* spp.) y de otros frutos que contienen estos compuestos, así como al extracto obtenido usando dicho método. El método se basa fundamentalmente en tecnologías baromembranarias que permiten la separación mecánica y el fraccionamiento efectivo entre los compuestos polifenólicos, según las interacciones entre sus propiedad físico-químicas, el material de la membrana y su masa molar, permitiendo enriquecer una fracción de dicho extracto natural con taninos del ácido elágico y modular su contenido de antocianinas y otros compuestos como azúcares y ácidos.

FIGURA 1

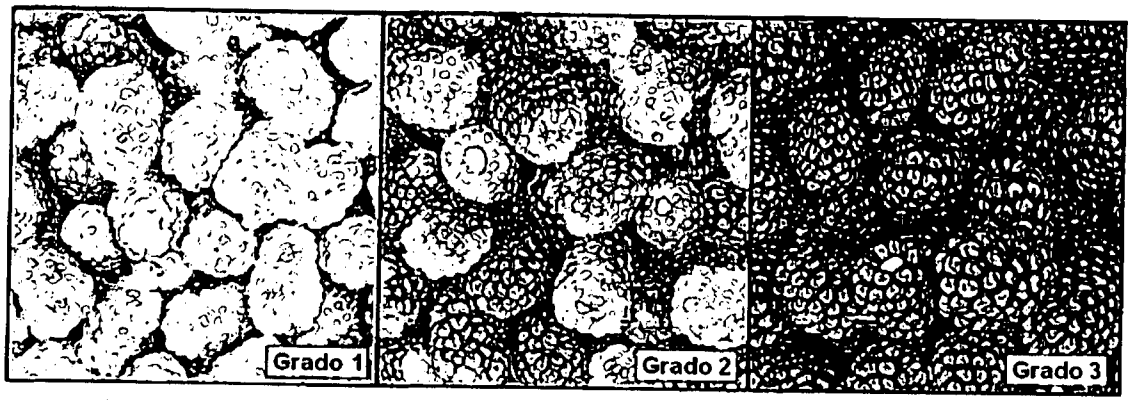
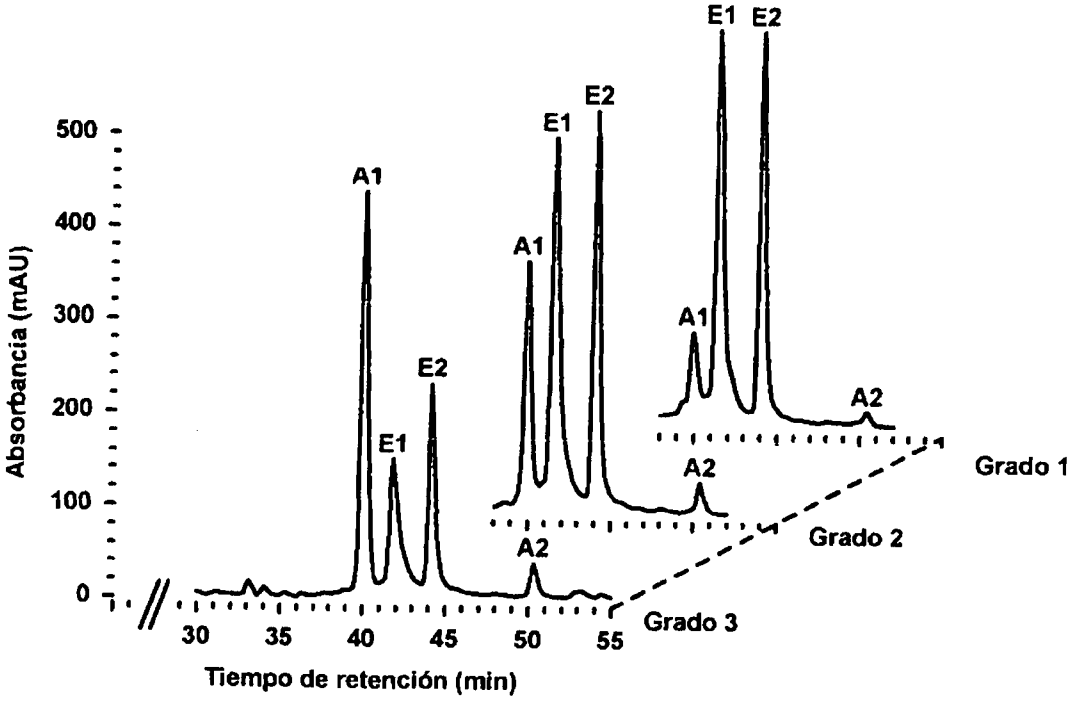


FIGURA 2

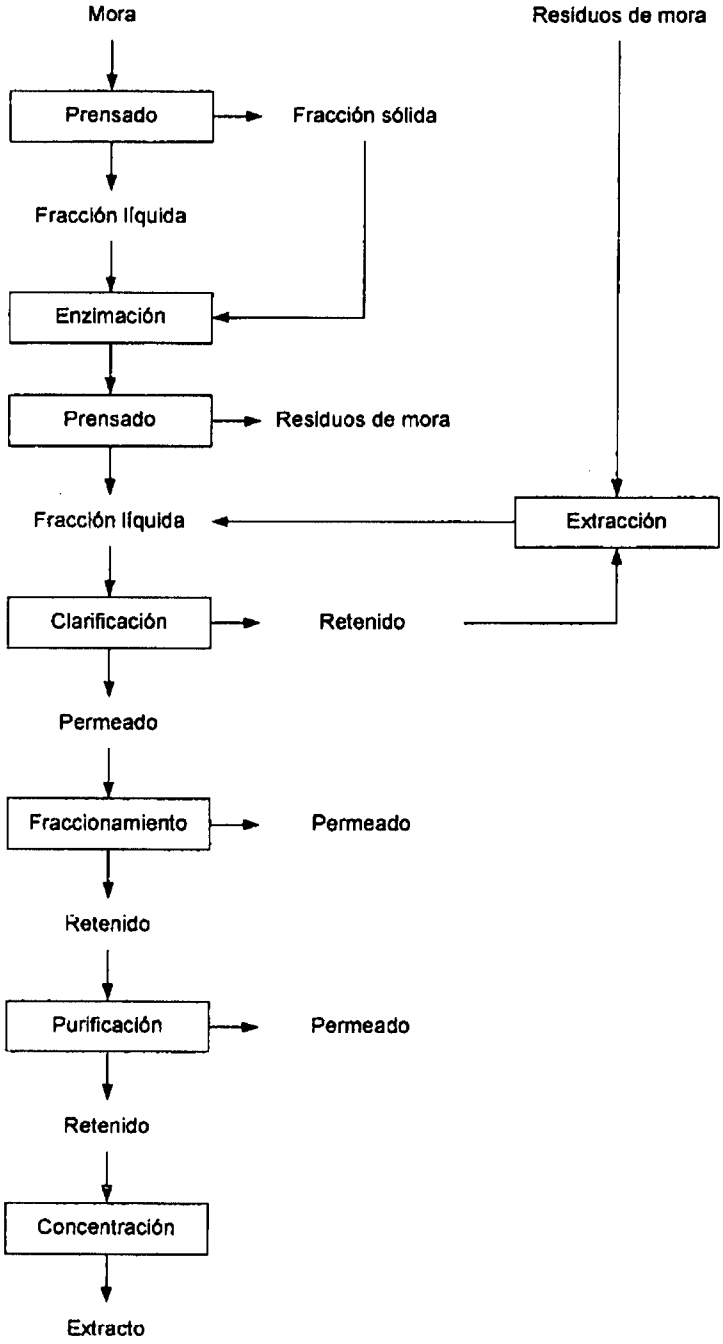


EXCELENCIA • RELEVANCIA • PERTENENCIA

éfono: (506) 2511 - 1350 • Fax: (506) 2224 - 9367
·artado: 11501 - 2060 – San José, Costa Rica

Portal de la Investigación: www.vinv.ucr.ac.cr
Correo-electrónico: vi@vinv.ucr.ac.cr

FIGURA 3



EXCELENCIA • RELEVANCIA • PERTENENCIA
Teléfono: (506) 2511 - 1350 • **Fax:** (506) 2224 - 9367
Apartado: 11501 - 2060 – San José, Costa Rica
Portal de la Investigación: www.vinv.ucr.ac.cr
Correo-electrónico: vi@vinv.ucr.ac.cr

FIGURA 4

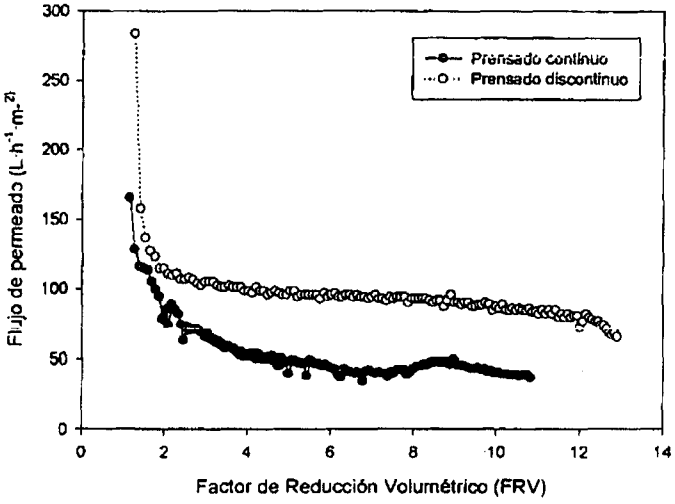
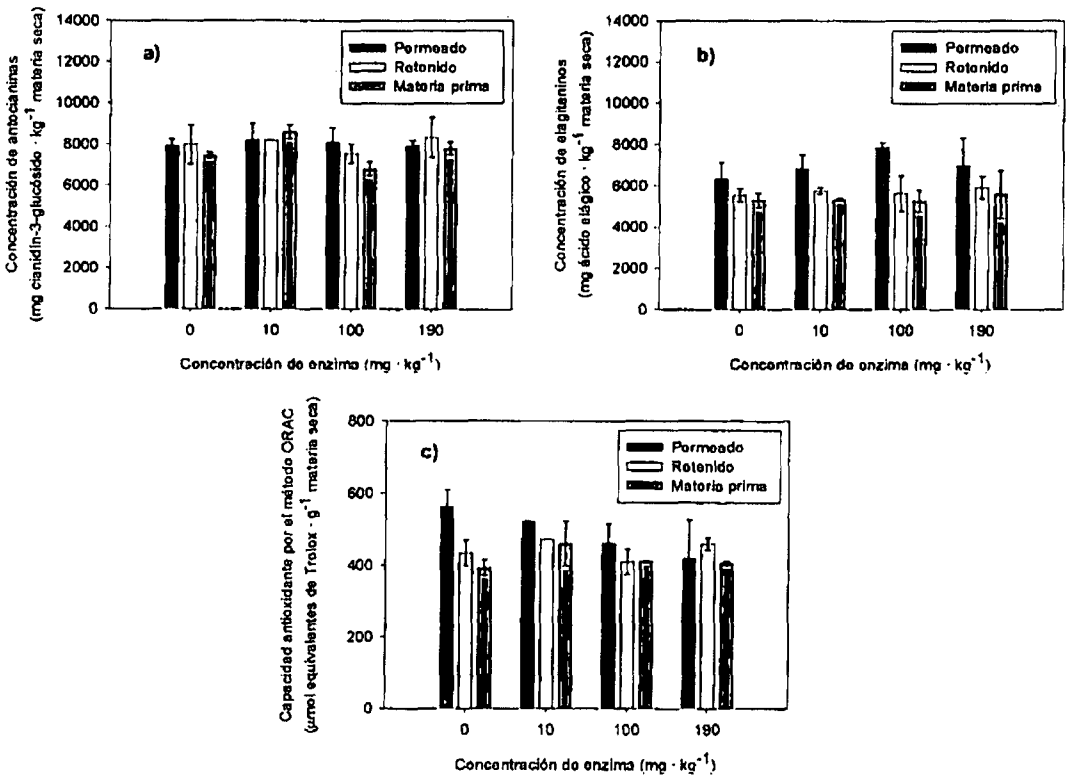


FIGURA 5

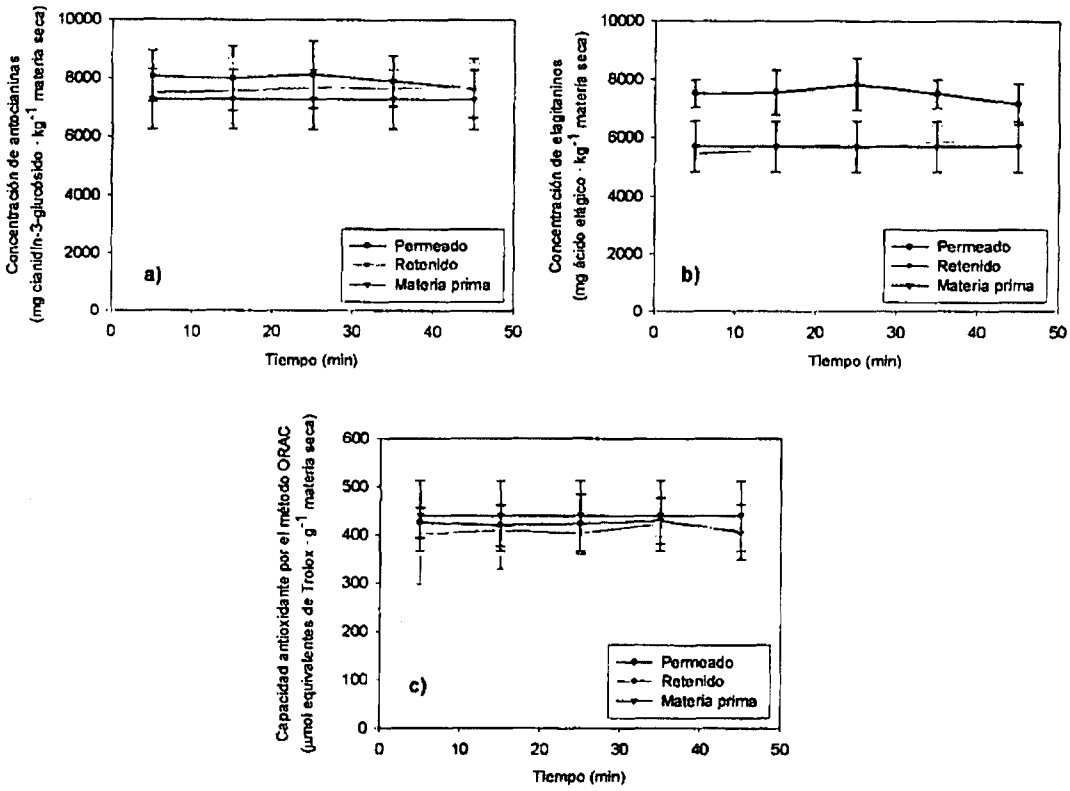


EXCELENCIA • RELEVANCIA • PERTENENCIA

Teléfono: (506) 2511 - 1350 • Fax: (506) 2224 - 9367
Apartado: 11501 - 2060 – San José, Costa Rica

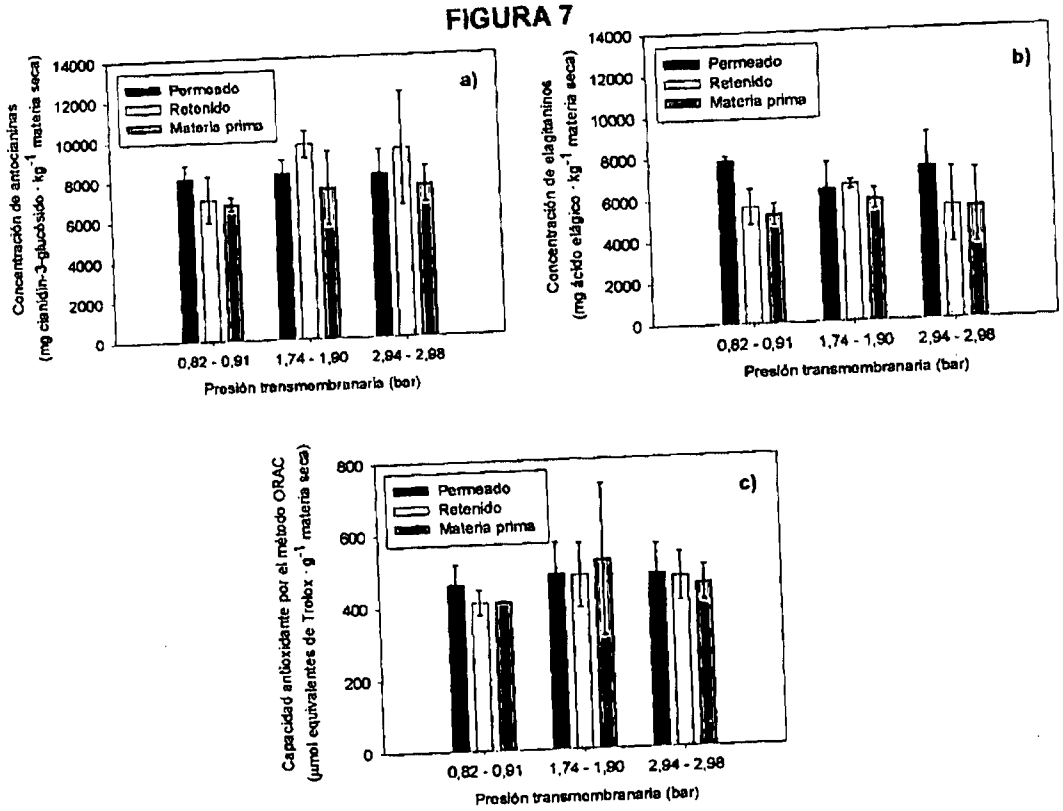
Portal de la Investigación: www.vinv.ucr.ac.cr
Correo-electrónico: vi@vinv.ucr.ac.cr

FIGURA 6



EXCELENCIA • RELEVANCIA • PERTENENCIA
eléfono: (506) 2511 - 1350 • **Fax:** (506) 2224 - 9367
ıpartado: 11501 - 2060 – San José, Costa Rica
Portal de la Investigación: www.vinv.ucr.ac.cr
Correo-electrónico: vi@vinv.ucr.ac.cr

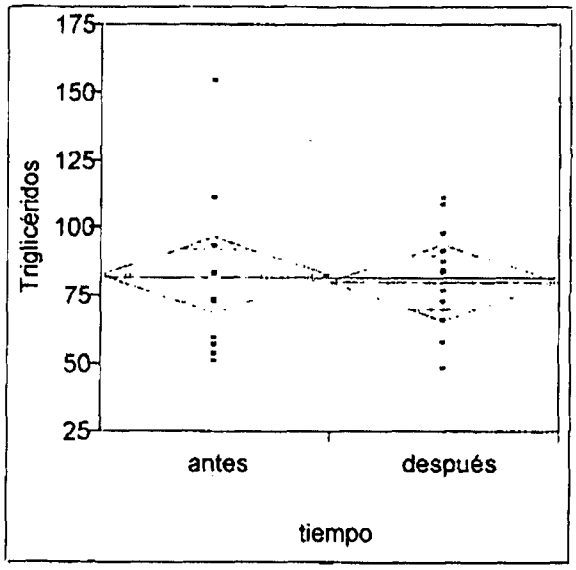
FIGURA 7



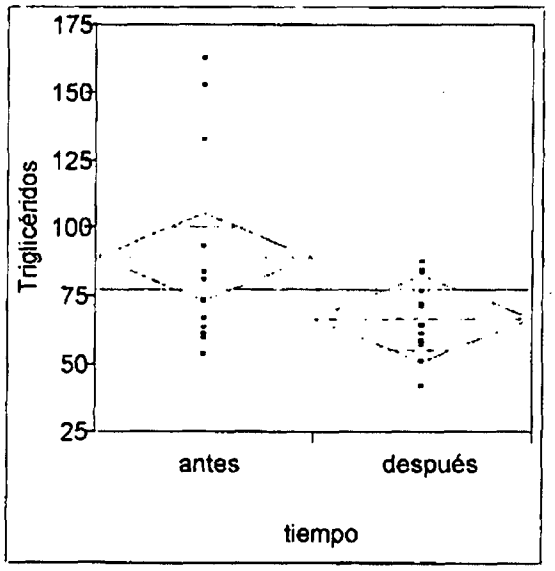
EXCELENCIA • RELEVANCIA • PERTENENCIA
Teléfono: (506) 2511 - 1350 • Fax: (506) 2224 - 9367
Apartado: 11501 - 2060 – San José, Costa Rica
Portal de la Investigación: www.vinv.ucr.ac.cr
Correo-electrónico: vi@vinv.ucr.ac.cr

FIGURA 8

A = agua azucarada



B = bebida de mora



La presente invención será descrita en más detalle en los siguientes ejemplos de realización de la misma, los cuales se proporcionan a manera de ilustración de la invención y en ningún modo para limitar su alcance.

FIGURA 9

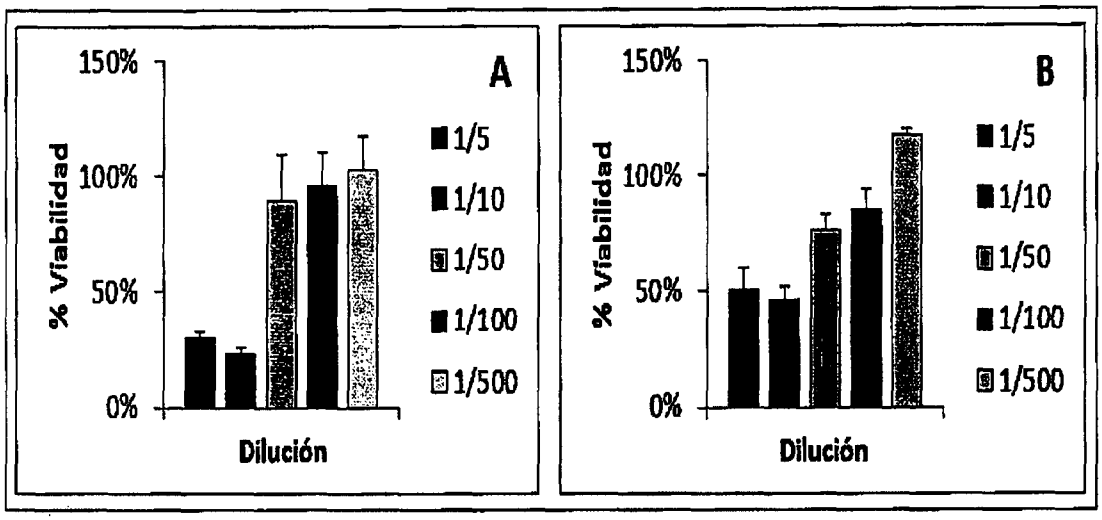


FIGURA 10

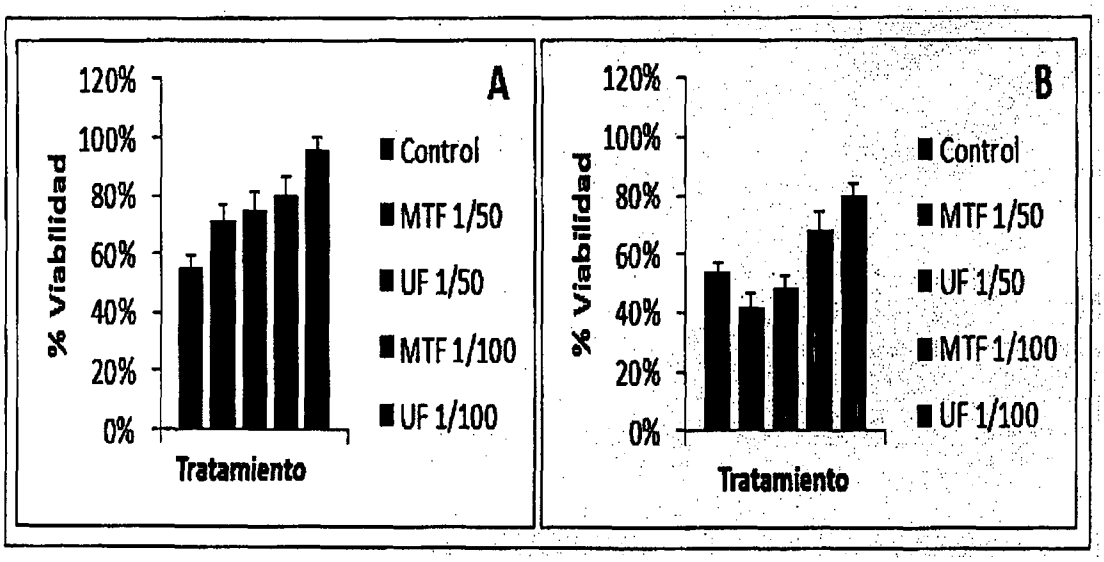


FIGURA 11

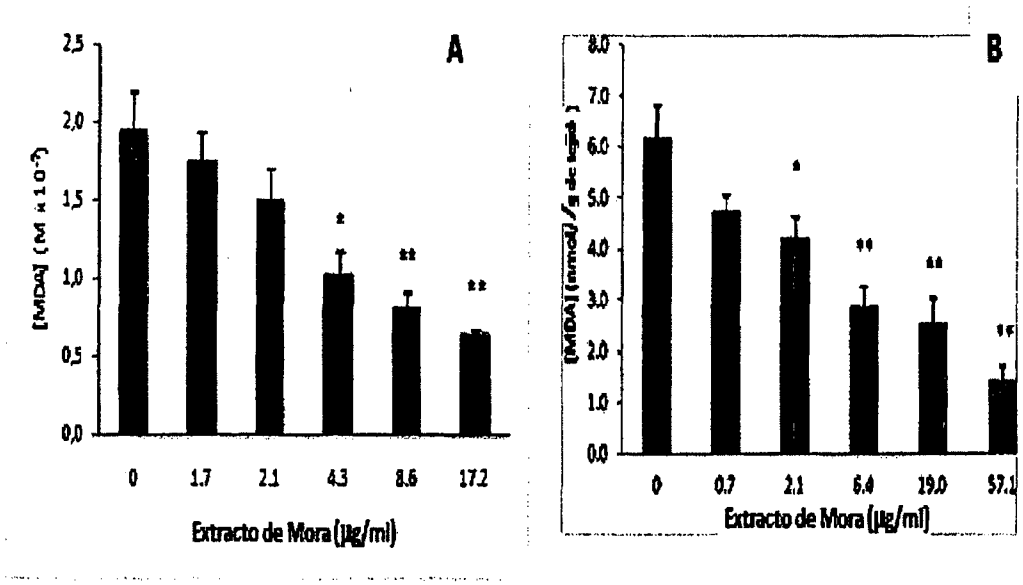


FIGURA 12

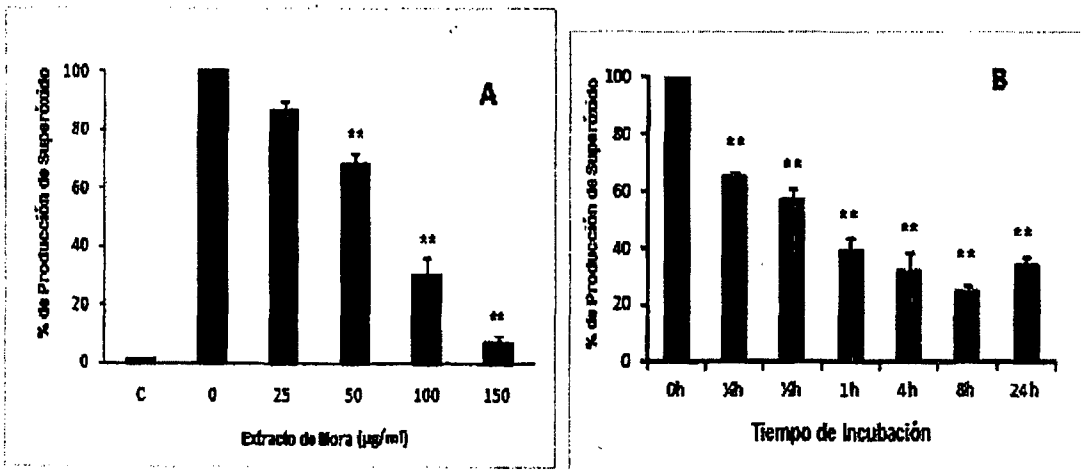
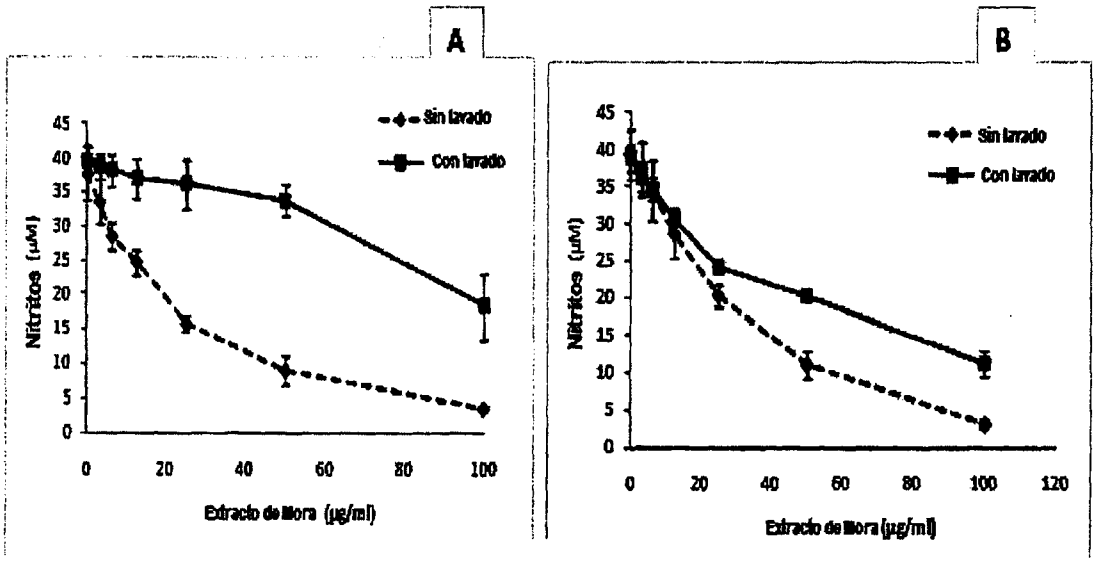


FIGURA 13


A
Sin lavado
Con lavado
Nitritos (µM)
Extracto de llora (µg/ml)
B
Sin lavado
Con lavado
Nitritos (µM)
Extracto de llora (µg/ml)