

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 007**

51 Int. Cl.:

A61K 31/716 (2006.01)

A61K 36/899 (2006.01)

A61K 36/8998 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2004 E 04730430 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1620469**

54 Título: **Procedimiento de extracción y de purificación mejorado para beta (1-3) beta (1-4) glucano de cereal**

30 Prioridad:

02.05.2003 US 467146 P

10.06.2003 US 477048 P

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

15.07.2013

73 Titular/es:

CEAPRO INC. (100.0%)

**Enterprise Square, 4174- 10230 Jasper Ave NW
Edmonton, AB T5J 4P6 , CA**

72 Inventor/es:

**REDMOND, MARK, J. y
FIELDER, DAVID, A.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 413 007 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de extracción y de purificación mejorado para beta (1-3) beta (1-4) glucano de cereal

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere generalmente a β -glucanos de cereal. Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para extraer y aislar β (1-3) β (1-4) glucano de avena altamente purificado. La presente descripción también se refiere particularmente a composiciones que comprenden un β (1-3) β (1-4) glucano y un depresor del punto de congelación.

Antecedentes de la invención

- 10 Las gomas son sustancias tanto hidrófobas como hidrófilas de peso molecular que oscila de 10.000 a 50.000.000 Dalton, que en un disolvente apropiado producen geles o suspensiones o disoluciones altamente viscosas con bajo contenido de sustancia seca. Gomas comúnmente usadas en alimentos, medicina y productos industriales incluyen almidones, derivados de celulosa, pululano, agar, aloe, gellan, goma guar, goma de semilla de algarrobo, pectina, algina, carragenina, xantana, β -glucano y goma arábica (véase Whistler, R.L. (1993) *Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives* Eds. Whistler R.L. y BeMiller J.N. (Academic Press) p 2).

- 15 Los glucanos son homopolisacáridos que consisten sólo en glucosa. Sin embargo, como es posible enlazar las moléculas de glucosa en diferentes configuraciones estereoquímicas, los glucanos son un grupo diverso de compuestos con diferentes propiedades químicas, físicas y funcionales.

- 20 Las estructuras químicas de los polisacáridos son de importancia primordial en la determinación de sus propiedades. Esto puede apreciarse comparando las propiedades de algunos homogluconos comunes. Por ejemplo, la celulosa, un β (1-4)-D-glucano, es insoluble en agua y altamente cristalina en comparación con otros polisacáridos. La amilosa, un α (1-4)-D-glucano, es moderadamente soluble en agua, cristaliza menos bien que la celulosa y puede formar geles termo-reversibles rígidos. El dextrano, un (1-6)- α -glucano, con un pequeño grado de ramificación, es extremadamente soluble en agua y no formador de gel (véase Dea, I.C.M. en (1993) *Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives* Eds. Whistler R.L. y BeMiller J.N. (Academic Press) p 21).

- 25 El β (1-3) β (1-4) glucano de avena se clasifica como una goma viscosa (véase Wood, P.J. (1993) *Oat Bran* Ed P.J. Wood (American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN)). Los β (1-3) β (1-4)-glucanos de cereal son polisacáridos estructurales presentes en las paredes celulares de cereales, tales como cebada y avena, entre otros.

- 30 El β (1-3) β (1-4) glucano de avena es reconocido por la FDA de EE.UU. como un agente que puede ayudar en la prevención de enfermedad cardíaca. En 1997, la FDA permitió que los productos de avena hicieran una declaración sanitaria. Es importante observar que ninguna otra fuente de β -glucano, levadura, fúngicos, bacteriana o cereal, es reconocida por tener estos efectos. Por tanto, los β (1-3) β (1-4)-glucanos de avena son distintos.

El β (1-3) β (1-4) glucano de avena sin modificar forma disoluciones altamente viscosas en agua a concentraciones >0,75%. A concentraciones >1,2%, las disoluciones tienen la consistencia de un hidrogel espeso.

- 35 Glucanos de estructura molecular significativamente diferente y con diferentes propiedades físicas y químicas en comparación con la avena se encuentran en levadura, hongos, y ciertas bacterias y bacterias genéticamente manipuladas. Por ejemplo, gellan, (1-3) β -D-glucopiranosil [β (1-3)-glucano] polimérico producido en *Alcaligenes faecalis* se encuentra en Curdlan (Takeda Chemical Ind. Ltd.), β (1-3) α (1-6) glucopiranosido producido en *Aureobasidium pullulans* se encuentra en pululano y β (1-3) β (1-6) glucopiranosido se encuentra en levadura.

- 40 El peso molecular de los glucanos varía con la fuente. La Tabla 1 muestra el peso molecular promedio de gomas típicas.

Tabla 1: Intervalo de pesos moleculares promedio de gomas comunes

GOMA	PESO MOLECULAR PROMEDIO
β (1-3) β (1-4) glucano de avena	500.000 - 1.000.000
Pululano	50.000 - 100.000
Curdlan	~500.000

(continuación)

GOMA	PESO MOLECULAR PROMEDIO
Metilcelulosa	10.000 - 200.000
Carragenina	4.500.000
Xantana	15.000.000 - 50.000.000
Alginato de sodio	10.000 - 18.000.000

La viscosidad de una disolución al 1% de diferentes disoluciones de gomas de polisacáridos varía con el origen y la naturaleza química. La Tabla 2 muestra la viscosidad de disoluciones al 1% de gomas típicas.

5 TABLA 2: Intervalos de viscosidad típicos de disoluciones al 1% de gomas comunes, medida a 25°C

GOMAS	VISCOSIDAD EN DISOLUCIÓN AL 1%, cP
β (1-3) β (1-4) glucano de avena	500-1500
Pululano	2
Goma arábica	1-5
Metilcelulosa	200
Goma de tamarindo	100-200
Goma guar	2.000-3.000
Goma de semilla de algarrobo	2.000-3.000
Xantana	2.000-3.000
Alginato de sodio	200-700

Las propiedades de solubilidad de los glucanos se diferencian según su fuente. Por ejemplo, los β (1-3) β (1-4) glucanos de cereal son normalmente solubles en disolventes acuosos, mientras que los β (1-3) β (1-6)-glucanos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) son insolubles en disolventes acuosos. Los glucanos solubles son deseables. El β -glucano de levadura se ha solubilizado mediante la adición de grupos fosfato (véase Williams y col. Immunopharmacol. 22: 139-156 (1991)). Jamas y col. (patente de EE.UU. nº 5.622.939) describen procedimientos para extraer β (1-3) β (1-6) glucano soluble de *Saccharomyces cerevisiae*. El procedimiento descrito es complejo, implicando hidrólisis ácida, hidrólisis básica y el amplio uso de centrifugación y ultrafiltración. No se proporcionan detalles en cuanto a la estabilidad del β (1-3) β (1-6) glucano de levadura solubilizado.

10 El β -glucano de levadura se ha solubilizado mediante la adición de grupos fosfato (véase Williams y col. Immunopharmacol. 22: 139-156 (1991)). Jamas y col. (patente de EE.UU. nº 5.622.939) describen procedimientos para extraer β (1-3) β (1-6) glucano soluble de *Saccharomyces cerevisiae*. El procedimiento descrito es complejo, implicando hidrólisis ácida, hidrólisis básica y el amplio uso de centrifugación y ultrafiltración. No se proporcionan detalles en cuanto a la estabilidad del β (1-3) β (1-6) glucano de levadura solubilizado.

15 Varias referencias de la técnica anterior desvelan procedimientos de preparación de glucanos y composiciones de glucano líquidas de cereales. Entre estas referencias de la técnica anterior están las siguientes:

Beer y col., Extraction of Oat Gum from Oat Bran: Effects of Process on Yield, Molecular Weight Distribution, Viscosity and (1-3) (1-4) beta-D-Glucan Content of the Gum, Cereal Chemistry 73(1): 58-62 (1996). Esta referencia describe el uso de alcoholes en una cantidad igual a o superior al 50% (v/v) para lograr la precipitación. Se informó que la pureza de los glucanos recuperados estaba entre el 22 y el 63%.

Wood y col., Large Scale Preparation and Properties of Oat Fractions Enriched in (1-3)(1-4) beta-D-Glucan, Cereal Chemistry 66(2): 97-103 (1989). Esta referencia describe el uso de alcoholes en una cantidad igual a o superior al 50% (v/v) para lograr la precipitación de glucanos.

La patente de EE.UU. nº 6.323.338 desvela un procedimiento de aislamiento de β -glucano de avena como una piel enriquecida de un extracto de salvado de avena. El procedimiento desvelado no utiliza bajas concentraciones de alcoholes de cadena corta para la precipitación del glucano.

Redmond (patente de EE.UU. nº 6.284.886) desvela composiciones de β (1-3) β (1-4) glucanos de cereal y procedimientos de producción de estas composiciones. Las composiciones desveladas cumplen los estrictos requisitos de la industria cosmética, en términos de su viscosidad, fuerza de cizallamiento y propiedades de potenciamiento de la humedad. No se describe procedimiento para la extracción o purificación de β (1-3) β (1-4)

glucano.

Resumen de la invención

La presente invención se resume en los siguientes párrafos numerados:

- 5 1. Un procedimiento de aislamiento de un β (1-3) β (1-4) glucano de un grano de cereal triturado o una parte triturada del grano de cereal, que comprende:
- (i) extraer el grano de cereal triturado o la parte triturada del grano de cereal con una disolución alcalina que tiene un valor de pH entre 9 y 10 durante un periodo de tiempo de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 minutos para producir un extracto que contiene al menos aproximadamente el 0,4 por ciento en peso de β (1-3) β (1-4) glucano;
- 10 (ii) eliminar el material insoluble, y eliminar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm de dicho extracto para producir un extracto purificado;
- (iii) añadir de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25% (vol/vol) de un alcohol C₁-C₄ al extracto purificado para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano, y
- (iv) aislar el β (1-3) β (1-4) glucano.
- 15 2. El procedimiento del párrafo 1, en el que en dicha etapa de añadir (etapa iii), aproximadamente del 10% a aproximadamente el 20% (vol/vol) de un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol e isopropanol se usa para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano de dicho extracto purificado.
3. El procedimiento del párrafo 2, en el que aproximadamente el 10% a aproximadamente 20% (vol/vol) de etanol se usa para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano de dicho extracto purificado.
- 20 4. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicha etapa de eliminar el material particulado comprende además una o más de una etapa de añadir un floculante, un coagulante o tanto un floculante como un coagulante a dicho extracto para coagular material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm , y eliminar el material coagulado de dicho extracto;
- digerir el material de almidón en dicho extracto, y
- 25 filtrar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a 0,2 μm de dicho extracto para producir el extracto purificado.
5. El procedimiento del párrafo 4, en el que en dicha etapa de digerir, dicho material de almidón se digiere con una enzima.
- 30 6. El procedimiento del párrafo 5, en el que antes de digerir dicho material de almidón, dicha disolución alcalina se neutraliza.
7. El procedimiento del párrafo 6, en el que tras la digestión de dicho material de almidón, dicha enzima se inactiva.
8. El procedimiento del párrafo 7, en el que dicha enzima se inactiva acidificando la disolución neutralizada.
9. El procedimiento del párrafo 5, en el que dicha enzima es una amilasa.
- 35 10. El procedimiento del párrafo 9, en el que dicha amilasa no requiere un cofactor de calcio.
11. El procedimiento del párrafo 1, en el que el cereal está seleccionado del grupo que consiste en un cultivar de cebada, un cultivar de avena, un cultivar de trigo, un cultivar de centeno, un cultivar de sorgo, un cultivar de mijo y un cultivar de maíz.
- 40 12. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicha etapa de añadir (etapa iii) se realiza a una temperatura de aproximadamente 1°C a aproximadamente 10°C.
13. El procedimiento del párrafo 1 que comprende además una o más de una etapa de disolver el β (1-3) β (1-4) glucano aislado en una disolución acuosa, precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano añadiendo entre 10% y 25% (vol/vol) del alcohol C₁-C₄ a la disolución acuosa y aislar el β (1-3) β (1-4) glucano.

14. El procedimiento del párrafo 4, en el que el floculante está seleccionado del grupo que consiste en una poli(acrilamida), una sal de acrilato cuaternaria y una macromolécula de floculante natural, y el coagulante está seleccionado del grupo que consiste en alumbre, cal, cloruro férrico, sulfato ferroso, un polímero orgánico y un polielectrolito sintético con grupos funcionales aniónicos o catiónicos.

5 15. El procedimiento del párrafo 1, en el que aproximadamente el 15% a aproximadamente el 17% (vol/vol) del alcohol C₁-C₄ se añade al extracto purificado en la etapa (iii).

16. El procedimiento del párrafo 1, en el que el grano de cereal triturado o la parte triturada del grano de cereal se extrae con una disolución alcalina que tiene un valor de pH de aproximadamente 9,25 a aproximadamente 9,75.

10 17. El procedimiento según el párrafo 4, en el que la etapa de filtrar el material que tiene un tamaño de partícula superior a 0,2 µm de dicho extracto se realiza usando un filtro recubierto con una precapa de un ayudafiltros que tiene una porosidad de 0,2 µm.

La presente invención se refiere generalmente a β-glucanos de cereal. Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para extraer y aislar β (1-3) β (1-4) glucano de avena altamente purificado. La presente descripción también se refiere particularmente a composiciones que comprenden un β (1-3) β (1-4) glucano y un depresor del punto de congelación.

15

En un aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento para la extracción y purificación de un β-glucano de cereal. El β-glucano de cereal se deriva de un grano de cereal o una parte del grano de cereal.

En particular, la presente descripción proporciona un procedimiento de aislamiento de un β (1-3) β (1-4) glucano de un grano de cereal triturado o una parte triturada del grano de cereal, que comprende:

20

(i) extraer el grano de cereal triturado o la parte triturada del grano de cereal con una disolución alcalina para producir un extracto que contiene al menos aproximadamente el 0,4 por ciento en peso de β (1-3) β (1-4) glucano;

25 (ii) eliminar el material insoluble, y eliminar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 µm del extracto para producir un extracto purificado;

(iii) añadir de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25% (peso/peso) de un alcohol C₁-C₄ al extracto purificado para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano, y

(iv) aislar el β(1-3) β(1-4) glucano.

30 En un ejemplo del procedimiento anteriormente definido, aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% (peso/peso) de un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol e isopropanol se usa para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano del filtrado. Preferentemente, aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% (peso/peso) de etanol se usa para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano.

En un ejemplo de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de eliminar el material particulado comprende:

35 una o más de una etapa de añadir un floculante, un coagulante o tanto un floculante como un coagulante al extracto para coagular material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 µm, y eliminar el material coagulado del extracto;

digerir el material de almidón en el extracto, y

40 filtrar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 µm del extracto para producir un extracto purificado.

En un ejemplo del procedimiento que acaba de describirse, el material de almidón se digiere con una enzima, tal como una amilasa. Más particularmente, la enzima se digiere con una amilasa que no requiere un cofactor de calcio. En otro ejemplo, el extracto alcalino se neutraliza antes de digerir el material de almidón. En otro ejemplo, la enzima se inactiva tras la digestión del material de almidón, por ejemplo, acidificando el extracto alcalino que contiene el material de almidón digerido.

45

La presente descripción también se refiere a los procedimientos anteriormente definidos, en los que el cereal está

seleccionado del grupo que consiste en un cultivar de cebada, un cultivar de avena, un cultivar de trigo, un cultivar de centeno, un cultivar de sorgo, un cultivar de mijo, un cultivar de maíz, y una mezcla de los mismos.

La presente descripción también se refiere a los procedimientos anteriormente descritos, en los que el grano de cereal o la parte del grano de cereal extraído en la etapa (i) está en forma de una harina gruesamente triturada o una harina finamente triturada.

En otros ejemplos de los procedimientos anteriormente descritos, el valor de pH de la disolución alcalina es de aproximadamente 9,00 a aproximadamente 10,00, de aproximadamente 9,25 a aproximadamente 9,75, o de aproximadamente 9,30 a aproximadamente 9,50. En otro ejemplo, la etapa de extraer (etapa i) se lleva a cabo durante un periodo de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 minutos.

En otro ejemplo de los procedimientos anteriormente definidos, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de aproximadamente 1°C a aproximadamente 10°C, o de aproximadamente 1°C a aproximadamente 5°C. En incluso otro ejemplo, el alcohol usado para realizar la etapa de precipitación se enfría a una temperatura de al menos aproximadamente -20°C antes de añadirse a la disolución de $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano.

Los procedimientos anteriormente definidos pueden comprender además una o más de una etapa de disolver el $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano aislado de la etapa (iv) en una disolución acuosa, precipitar el $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano añadiendo aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25% (peso/peso) del alcohol C_1-C_4 a la disolución acuosa y aislar el $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de aislamiento de un $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano de un grano de cereal triturado o una parte triturada del grano de cereal, que comprende:

(i) extraer el grano de cereal triturado o la parte triturada del grano de cereal con una disolución alcalina para producir un extracto que comprende al menos aproximadamente el 0,4 por ciento en peso de $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano;

(ii) eliminar el material insoluble, y eliminar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm del extracto para producir un extracto purificado, en el que la etapa de eliminar el material particulado comprende:

una o más de una etapa de añadir un floculante, un coagulante o tanto un floculante como un coagulante al extracto para coagular material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm , y eliminar el material coagulado del extracto;

digerir enzimáticamente el material de almidón en el extracto, y

filtrar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm del extracto para producir el extracto purificado;

(iii) añadir aproximadamente del 10% a aproximadamente el 25% (peso/peso) de un alcohol C_1-C_4 al extracto purificado para precipitar el $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano, y

(iv) aislar el $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano.

En un segundo aspecto, la presente descripción proporciona una composición de β -glucano de cereal que tiene una pureza de al menos aproximadamente el 75%, y que contiene menos del 10% de impurezas de ceniza, menos del 10% de impurezas de proteína y menos del 5% de impurezas de lípido. Más particularmente, la presente descripción se refiere a una composición de β -glucano de cereal que tiene una pureza de al menos aproximadamente el 92%, y que contiene menos del 3,5% de impurezas de ceniza, menos del 3,5% de impurezas de proteína y menos del 1% de impurezas de lípido. La composición de β -glucano de cereal también puede tener un valor de claridad de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 NTU.

En un tercer aspecto, la presente descripción proporciona una composición que comprende un $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ glucano y de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 40% en peso de un depresor del punto de congelación.

En los ejemplos de la composición anteriormente definida, el $\beta(1-3)$ $\beta(1-4)$ está presente en una cantidad de aproximadamente el 1,2% a aproximadamente el 1,6% o de aproximadamente el 1,2% a aproximadamente el 1,3% en peso. En otro ejemplo, el depresor del punto de congelación está seleccionado del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol, butilenglicol y pentilenglicol.

5 En otro ejemplo de la composición anteriormente descrita, el β (1-3) β (1-4) glucano es una composición de β (1-3) β (1-4) glucano que tiene una pureza de al menos aproximadamente el 75%, y que contiene menos del 10% de impurezas de ceniza, menos del 10% de impurezas de proteína y menos del 5% de impurezas de lípido. Más particularmente, la composición de β -glucano tiene una pureza de al menos aproximadamente el 92%, y contiene menos del 3,5% de impurezas de ceniza, menos del 3,5 % de impurezas de proteína y menos del 1% de impurezas de lípido. La composición de β (1-3) β (1-4) glucano también puede tener una claridad de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 NTU. Más particularmente, el β (1-3) β (1-4) glucano usado en la composición del cuarto aspecto de la presente descripción se prepara según los procedimientos de aislamiento anteriormente definidos.

10 El depresor del punto de congelación evita la gelificación apreciable de composiciones de β (1-3) β (1-4) glucano durante el almacenamiento o transporte. Las composiciones de β (1-3) β (1-4) glucano que contienen el depresor del punto de congelación son, por tanto, ventajosas desde un punto de vista comercial, porque pueden usarse directamente después de almacenarse o transportarse sin ninguna etapa de tratamiento para hacer más fluidas las composiciones.

15 El procedimiento de purificación de la presente descripción se diferencia del procedimiento desvelado en la patente de EE.UU. nº 6.323.338 en que se elimina la materia particulada fina, además de una gran proporción de proteína (~90%) presente en el grano de cereal original.

20 El procedimiento de purificación de la presente descripción permite el uso de concentraciones de alcohol de menos del 50% (peso/peso), por ejemplo, disoluciones alcohólicas acuosas al 10-25% para precipitar β -glucano de cereal. La capacidad de uso de tales concentraciones de alcohol es sorprendente en vista de los procedimientos de purificación de la técnica anterior, que han usado disoluciones de etanol al 50% para precipitar β -glucano de cereal (véase, por ejemplo, Wood y col. Large Scale Preparation and Properties of Oat Fractions Enriched in β (1-3) β (1-4) D-glucan Cereal Chem. 66 97-103 (1989)). Se cree que la eliminación de la materia particulada y la mayoría del material de proteína, según el procedimiento de la presente descripción, reduce la cantidad de alcohol necesaria para precipitar el β -glucano de cereal en la disolución.

25 El uso de disoluciones alcohólicas acuosas al 10-25% para precipitar el β -glucano de cereal es ventajoso porque se evita la grave deshidratación del β -glucano de cereal, produciendo un precipitado de β -glucano de cereal que puede suspenderse fácilmente en agua. Además, el uso de estas concentraciones de alcohol relativamente inferiores permite procesar el grano de cereal de partida en una planta de fabricación convencional sin la necesidad de sistemas medioambientales resistentes a la explosión. Por ejemplo, el uso de disoluciones alcohólicas acuosas al 30 20% a una temperatura final de 7-10°C produce una presión de vapor inferior al límite de explosión inferior (LEI) del etanol. Además, la eficiencia de la etapa de extracción y la producción de disoluciones intermedias que contienen β -glucano de cereal a una concentración superior al 0,4% permite el procesamiento usando volúmenes de procedimiento relativamente pequeños.

Descripción de la realización preferida

35 La presente invención se refiere generalmente a β -glucanos de cereal. Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para extraer y aislar β (1-3) β (1-4) glucano de avena altamente purificado. La presente descripción también se refiere particularmente a composiciones que comprenden un β (1-3) β (1-4) glucano y un depresor del punto de congelación.

40 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, química de cereales y bioquímica, dentro de la habilidad de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse por ejemplo, Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives Eds. Whistler R.L. y BeMiller J.N. (Academic Press), Oats: Chemistry and Technology ed. Webster F.H. (American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN).

45 Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contenido indique claramente de otro modo.

Definiciones

En la descripción de la presente invención, los siguientes términos se emplearán, y pretenden definirse como se indica más adelante.

50 Por "cereal" se indica cualquiera de los varios granos tales como, pero no se limitan a, cultivares de cebada, avena, trigo, centeno, sorgo, mijo y maíz.

Por "glicano" se indica un polímero de monosacáridos ligados juntos por enlaces glicosídicos.

Por "glucano" se indica un homopolisacárido que sólo consiste en glucosa.

Por "β-glucano de cereal" se indica un glucano con un esqueleto de glucopiranosilo ligado en β (1-3), o un esqueleto de glucopiranosilo ligado en β (1-4), o un esqueleto de glucopiranosilo mixto ligado en β (1-3) β (1-4), que se deriva de una fuente de cereal.

5 Por "β (1-3) β (1-4) glucano" se indica un β-glucano de cereal.

Por "goma" se indica un polisacárido vegetal o microbiano o sus derivados, que son dispersables en tanto agua fría como agua caliente, para producir mezclas o disoluciones viscosas. Las gomas pueden clasificarse por origen, e incluyen: gomas de exudado, gomas de algas marinas, gomas de semilla, derivados de almidón y celulosa, y gomas microbianas.

10 Por "compuesto de interés" se indica cualquier material farmacéutico, médico, botánico o terapéutico mezclado con un β (1-3) β (1-4) glucano para producir una composición.

15 Por "floculante" y "coagulante" se indica moléculas que pueden coalescer con sólidos en suspensión (finos) para formar partículas más densas más grandes que pueden separarse por centrifugación. En ejemplos particulares, los coagulantes son moléculas que pueden juntar partículas en suspensión que son menores de 1 μm de tamaño, y los floculantes son moléculas que pueden juntar partículas en suspensión que son mayores de 1 μm de tamaño.

Por "material insoluble" se indica material que no es soluble bajo las condiciones de extracción alcalinas iniciales del procedimiento de la invención. Ejemplos no limitantes de tal material incluyen fibra, hemicelulosa y ligninas.

Por "material particulado" se indica un material sólido o coloidal que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm.

20 Por "un grano de cereal triturado" o "una parte triturada del grano de cereal" se indica un grano de cereal o parte del grano de cereal que ha sido molido, erosionado o picado en una harina. En un ejemplo particular, la parte triturada del grano de cereal es salvado que ha sido erosionado del grano de cereal, y opcionalmente adicionalmente molido y purificado por, por ejemplo, clasificación con aire o tamizado para proporcionar un perfil de partícula específico.

25 Por "cantidad eficaz" se indica la cantidad del uno o más de un compuesto de interés necesario para lograr un efecto deseado, tal como un efecto fisiológico, o un efecto estimulante.

Por "secuestrado" se indica la incorporación, atrapamiento o solubilización de compuestos hidrófilos, o compuestos hidrófobos, por ejemplo, compuestos hidrófobos de pequeño peso molecular, tales como aceites esenciales, agentes farmacéuticos, médicos y terapéuticos.

30 Por "depresor del punto de congelación" se indica un compuesto que reduce el punto de congelación de una composición que contiene un β (1-3) β (1-4) glucano, por ejemplo, aproximadamente 1°C a 15°C, con respecto al de la misma composición que carece del depresor del punto de congelación. El depresor del punto de congelación también debería actuar para reducir o prevenir sustancialmente la gelificación de la composición que contiene el β (1-3) β (1-4) glucano.

35 La presente invención proporciona un procedimiento de aislamiento de un β (1-3) β (1-4) glucano de un grano de cereal triturado o una parte triturada del grano de cereal, como se describe en las reivindicaciones. También en el presente documento se describe un procedimiento que comprende:

(i) extraer el grano de cereal triturado o la parte triturada del grano de cereal con una disolución alcalina para producir un extracto que contiene al menos aproximadamente el 0,4 por ciento en peso de β (1-3) β (1-4) glucano;

40 (ii) eliminar el material insoluble, y eliminar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm del extracto para producir un extracto purificado;

(iii) añadir de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25% (peso/peso) de un alcohol C₁-C₄ al extracto purificado para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano, y

(iv) aislar el β(1-3) β(1-4) glucano.

45 El β-glucano de cereal puede aislarse según el procedimiento de purificación de la presente invención a partir de un grano de cereal triturado o una parte triturada del grano de cereal, tal como el salvado triturado del grano de cereal.

Preferentemente se usa el salvado del grano de cereal. El grano de cereal, o una parte del mismo que se extrae, puede estar en forma de una harina gruesamente triturada o harina finamente triturada. Los cereales que pueden usarse en la presente invención incluyen, sin limitación, uno cualquiera de los cultivares de cebada, avena, trigo, centeno, maíz, sorgo y mijo.

- 5 En la primera etapa del procedimiento de purificación de la presente descripción, el grano triturado o la parte triturada del grano se suspende en agua purificada por ósmosis inversa (OI) o desionizada (DI) a una concentración de sólidos final de aproximadamente el 4 a aproximadamente el 10%, o aproximadamente el 6 a aproximadamente el 8%.

10 El valor de pH del agua usada en la primera etapa del procedimiento de purificación puede ser de aproximadamente 9,00 a aproximadamente 10,00, más particularmente de aproximadamente 9,25 a aproximadamente 9,75, o de aproximadamente 9,30 a aproximadamente 9,50, y puede ajustarse usando una base inorgánica, tal como hidróxido sódico o hidróxido potásico. En un ejemplo, el hidróxido potásico se usa a una concentración de aproximadamente 28 mM a aproximadamente 35 mM. El uso de una disolución que tiene un valor de pH entre 9-10 generalmente reduce la cantidad de polisacáridos de no glucano y proteína que se extrae durante la primera etapa y, por tanto,
15 proporciona extracción selectiva de moléculas de β -glucano de cereal de alto peso molecular.

La extracción del β -glucano de cereal puede llevarse a cabo durante un periodo de 15 a 45 minutos, o durante un periodo de 15-30 minutos. Sin embargo, deberá apreciarse que pueden usarse periodos de extracción más largos o más cortos dependiendo del tipo de β -glucano de cereal usado.

- 20 En la segunda etapa del procedimiento de purificación se elimina cualquier material insoluble que no pueda extraerse, por ejemplo, hemicelulosas o ligninas. Ejemplos de procedimientos que pueden usarse para separar el material insoluble incluyen, sin limitación, centrifugación, preferentemente con una centrífuga de decantación, y tamizado vibratorio.

25 Cualquier material particulado fino que incluya algún material basado en proteínas también se elimina de la disolución alcalina en la segunda etapa del procedimiento de la presente invención. Este material puede eliminarse añadiendo un floculante o coagulante externo, o ambos. Los floculantes o coagulantes que pueden usarse en la segunda etapa pueden tener una carga neta tanto positiva, negativa como neutra. La etapa de coagulación puede repetirse una, o más de una vez.

30 Ejemplos de floculantes que pueden usarse incluyen, sin limitación, floculantes sintéticos tales como poliacrilamidas, sales de acrilato cuaternarias y macromoléculas de floculantes naturales tales como quitosano, un polímero natural derivado de quitina. Ejemplos particulares de floculantes incluyen Tramfloc[®] (Tramfloc Inc.), el floculante catiónico SURFLOC[®] 34030 (Jes-Chem Ltd.), floculantes de poliacrilamida (PAM) tales como un floculante Aquamark[®] AQ 600 Series, o un floculante SuperFloc[®] C-500 Series (QEMI Inc.).

35 Ejemplos de coagulantes que pueden usarse en el procedimiento de la presente invención incluyen, sin limitación, electrolitos inorgánicos tales como alumbre, cal, cloruro férrico y sulfato ferroso, polímeros orgánicos, polielectrolitos sintéticos con grupos funcionales aniónicos o catiónicos, y poliacrilamidas.

Los floculantes, coagulantes, o una mezcla de los mismos, pueden usarse a una concentración de aproximadamente el 0,09% a aproximadamente el 0,20% (peso/vol), o de aproximadamente el 0,10% a aproximadamente el 0,13% (peso/vol).

40 La disolución alcalina puede incubarse con el floculante o coagulante durante aproximadamente 10 a aproximadamente 40 minutos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 minutos, a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 40°C, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30°C. Sin embargo, deberá apreciarse que pueden usarse periodos de tiempo más largos o más cortos para efectuar la coagulación del material particulado.

45 Si van a eliminarse materiales negativamente cargados de la disolución que contiene el β -glucano de cereal, entonces se prefiere que el floculante o coagulante esté positivamente cargado. Si van a eliminarse materiales positivamente cargados de la disolución, entonces se prefiere un floculante o coagulante negativamente cargado.

Sin desear ceñirse a teoría alguna, los floculantes y coagulantes que pueden usarse en el procedimiento de la presente invención funcionan formando agregados densos grandes con materia particulada fina, que pueden ser fácilmente separados de la disolución acuosa que contiene el β -glucano de cereal.

50 El material coagulado puede eliminarse por centrifugación usando, por ejemplo, una centrífuga de pila de discos. También pueden usarse otros procedimientos de separación física conocidos para aquellos expertos en la materia para efectuar la separación del material coagulado.

En la segunda etapa, cualquier almidón o material relacionado que esté presente puede digerirse usando una enzima tal como, pero no se limita a, una amilasa. La enzima puede usarse a una concentración de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 0,20% (vol/vol), de aproximadamente el 0,09% a aproximadamente el 0,15% (vol/vol), o de aproximadamente el 0,09% a aproximadamente el 0,11% (vol/vol). Si se usa una amilasa, se prefiere que la disolución alcalina se lleve a un valor de pH aproximadamente neutro (es decir, ~pH 7) antes de añadir la amilasa. En un ejemplo, la disolución que contiene la amilasa se calienta a una temperatura de aproximadamente 50°C a aproximadamente 100°C, o de aproximadamente 70°C a aproximadamente 90°C durante aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos para gelatinizar el almidón. La amilasa hidrolizará el almidón y cualquier material relacionado. Generalmente, la amilasa que se elige para romper el material de almidón debe ser funcional y estable dentro de los intervalos de temperatura indicados anteriormente. Es particularmente preferido que la amilasa no requiera un cofactor de calcio para digerir el material de almidón. Ejemplos de una amilasa tal incluyen, sin limitación, Termamyl[®] LC (Novozymes A/S) y Spezyme[®] FRED (Genencor International Inc.).

La completitud de la reacción de hidrólisis se determina cuando una muestra sacada de la disolución ya no produce una prueba de yodo positiva. En este momento, la enzima puede inactivarse, por ejemplo, reduciendo el pH a un valor de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,0. El pH de la disolución puede reducirse usando ácidos inorgánicos fuertes tales como ácido clorhídrico o ácidos orgánicos débiles tales como ácido málico o ácido cítrico. Sin embargo, se prefiere usar un ácido inorgánico fuerte tal como ácido clorhídrico. Además, se prefiere que la temperatura de la disolución se eleve a entre 85-90°C para desnaturalizar la proteína presente en disolución.

La disolución acidificada resultante puede entonces filtrarse para eliminar cualquier partícula y contaminantes microbiológicos mediante una almohadilla de filtro que tiene preferentemente un punto de corte de aproximadamente 20 µm. Este filtro puede recubrirse con una precapa de un ayudafiltros que tiene un espesor de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mm, tal como Celite[®] C65 (World Minerals), que tiene una porosidad nominal de aproximadamente 0,2 µm. También puede añadirse un peso equivalente de un ayudafiltros, por ejemplo, un ayudafiltros de calidad farmacéutica lavado con ácido tal como Celite[®] C300 (World Minerals) como alimentación de cuerpos a la disolución acidificada antes de realizar la etapa de filtración.

La filtración puede realizarse usando uno cualquiera de varios dispositivos de filtración. Un ejemplo particular de un dispositivo de filtración que puede usarse es un filtro prensa. En el caso en el que el tamaño de partícula del material contenido en el extracto sea inferior a 0,5 micrómetros, entonces pueden usarse microfiltración y ultrafiltración cerámica alternativamente a filtrar la disolución acidificada.

En la tercera etapa del procedimiento de purificación, el β-glucano de cereal se precipita en la disolución añadiendo un alcohol C₁-C₄. El alcohol usado para precipitar el β-glucano de cereal puede seleccionarse del grupo que consiste en metanol, etanol e isopropanol. Si el β-glucano de cereal aislado según el procedimiento de la presente invención va a usarse en la preparación de un producto farmacéutico, o comestible, entonces se prefiere usar etanol o isopropanol, más preferentemente etanol.

Como la concentración del alcohol en la disolución es elevada, el β-glucano de cereal se precipita como una fina suspensión coloidal. La cantidad total de alcohol que se requiere para llevar a cabo la etapa de precipitación puede depender de la concentración de β-glucano de cereal en disolución. El alcohol se añade a una concentración final de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25% en volumen, preferentemente de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 17% en volumen. Por tanto, la presente invención evita el uso de altas concentraciones de alcohol (es decir, concentraciones superiores al 50% en volumen), que pueden producir una grave deshidratación del β-glucano de cereal y llevar a la necesidad de homogeneizadores para dispersar el β-glucano de cereal.

Se prefiere que la etapa de precipitación se realice a una baja temperatura tal como de aproximadamente 1°C a aproximadamente 10°C, preferentemente de aproximadamente 1°C a aproximadamente 5°C. Además, se prefiere que el alcohol usado en la etapa de precipitación se enfríe a una temperatura de al menos aproximadamente -20°C antes de añadirlo a la disolución de β(1-3) β(1-4) glucano.

El material de β-glucano de cereal aislado final es una microdispersión o una nanodispersión que está libre de partículas grandes y no requiere filtración adicional. Disoluciones acuosas del β-glucano de cereal aislado según la presente invención siguen siendo homogéneas después de más de un año de ser preparadas.

La centrifugación usando, por ejemplo, una centrífuga de pila de discos, o un hidrociclón, puede usarse para aislar el β-glucano de cereal suspendido. Si se desea, el β-glucano aislado puede re-disolverse en una disolución acuosa y re-precipitarse con el alcohol C₁-C₄ para aumentar la pureza del β-glucano. Entonces, el sólido aislado puede secarse dando un polvo usando, por ejemplo, secado a vacío, secado por pulverización o secado en tambor. El procedimiento preferido de secado es secado a vacío, que produce un sólido gruesamente granular que puede triturarse adicionalmente a un tamaño de partícula deseado, por ejemplo, trituración por martillos, púas o chorro. Sin embargo, el secado a vacío requiere menos calor, y puede producir un β-glucano de cereal relativamente más puro

ya que se minimizan Maillard y otros subproductos.

Para prevenir la gelificación del β -glucano de cereal en cada una de las etapas del procedimiento de purificación de la presente invención se prefiere que la adición de sales se minimice durante todo el procedimiento. Por ejemplo, se prefiere que se use agua purificada por ósmosis inversa (OI) o desionizada (DI), además de una amilasa que no requiere un cofactor de calcio, tal como Termamyl® LC (Novozymes A/S).

Sin desear ceñirse a teoría alguna, una forma en la que la gelificación de disoluciones de β -glucano de cereal puede tener lugar es por reticulación de las moléculas de β -glucano de cereal, que se inicia por coordinación de las moléculas de β -glucano de cereal con iones tales como calcio. Usando bajas cantidades de sal durante todo el procedimiento, la reticulación de las moléculas de β -glucano de cereal en las disoluciones intermedias formadas en el procedimiento de la presente invención puede, por tanto, minimizarse. Además, limitando la cantidad de sal introducida durante todo el procedimiento de la presente invención, el β -glucano de cereal puede aislarse esencialmente libre de sales en la etapa final del procedimiento.

La composición de β -glucano de cereal preparada mediante el procedimiento de purificación de la presente invención generalmente tiene una pureza de al menos aproximadamente el 75%, y contiene menos del 10% de impurezas de ceniza, menos del 10% de impurezas de proteína y menos del 5% de impurezas de lípido. Más particularmente, la composición de β -glucano de cereal producida mediante los procedimientos de la presente invención tiene una pureza de al menos aproximadamente el 92%, y contiene menos del 3,5% de impurezas de ceniza, menos del 3,5% de impurezas de proteína y menos del 1% de impurezas de lípido. El rendimiento de β -glucano de cereal preparado según el procedimiento de purificación de la presente invención es generalmente de aproximadamente el 70 a aproximadamente el 72%.

Pueden prepararse disoluciones homogéneas del β -glucano de cereal precipitado suspendiendo el β -glucano de cereal en agua tratada por ósmosis inversa o desionizada a una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 45°C durante un periodo de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 minutos, o hasta que se haya solubilizado la mayoría del β -glucano de cereal. La disolución puede entonces pasteurizarse y añadirse un conservante.

Las disoluciones acuosas que contienen 1% de β -glucano de cereal, aisladas según el procedimiento de la presente invención, generalmente tienen las siguientes características:

- una viscosidad de aproximadamente 200 a aproximadamente 1500 cP, más particularmente de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1500 cP.
- un valor de claridad de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 NTU (unidades de turbidez normales), más particularmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 NTU.
- una concentración de cenizas de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 0,2%, más particularmente de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 0,07%.
- una concentración de proteína de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 0,2%, más particularmente de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 0,07%.
- una concentración de lípidos de aproximadamente el 0,005% a aproximadamente el 0,1%, más particularmente de aproximadamente el 0,005% a aproximadamente el 0,02%.

Disoluciones de β -glucano de cereal estabilizadas aisladas según el procedimiento de la presente invención pueden prepararse en el modo descrito en la patente de EE.UU. nº 6.284.886. Si estas disoluciones van a usarse en la preparación de composiciones de pastelería, farmacéuticas, u otras composiciones relacionadas, entonces el conservante usado en el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. nº 6.284.886 debe ser unos que esté autorizado para consumo humano y uso farmacéutico tal como, pero no se limitan a, sorbato de potasio, ácido sórbico, cloruro de benzalconio y parabenos.

El β -glucano de cereal aislado según el procedimiento de la presente invención es de particular uso en cicatrización y en reducir arrugas, en el que la transferencia de β -glucano de cereal a través de la piel intacta puede conducir a la reconstrucción del colágeno mediante la estimulación del crecimiento de fibroblastos.

En otro aspecto de la presente descripción se proporciona una composición farmacéutica que comprende:

una cantidad eficaz de un β (1-3) β (1-4) glucano, y

una cantidad eficaz de un extracto botánico, o un agente farmacéuticamente activo.

El β (1-3) β (1-4) glucano usados en la composición farmacéutica anteriormente definida puede prepararse según los procedimientos de aislamiento que se han descrito anteriormente. El β (1-3) β (1-4) glucano de las composiciones farmacéuticas anteriormente definidas puede derivarse de un grano de cereal o una parte del grano de cereal. En un

ejemplo, el cereal está seleccionado del grupo que consiste en un cultivar de cebada, un cultivar de avena, un cultivar de trigo, un cultivar de centeno, un cultivar de sorgo, un cultivar de mijo, un cultivar de maíz, y una mezcla de los mismos.

El β (1-3) β (1-4) glucano usado en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción puede ser una composición de β (1-3) β (1-4) glucano que tiene una pureza de al menos aproximadamente el 75%, y que contiene menos del 10% de impurezas de ceniza, menos del 10% de impurezas de proteína y menos del 5% de impurezas de lípido. Más particularmente, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición de β (1-3) β (1-4) glucano que tiene una pureza de al menos aproximadamente el 92%, y que contiene menos del 3,5% de impurezas de ceniza, menos del 3,5 % de impurezas de proteína y menos del 1% de impurezas de lípido.

Las composiciones de la presente descripción pueden formarse mezclando una disolución acuosa que comprende aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 20% en peso, aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 1,2%% en peso, aproximadamente el 0,1% en peso a aproximadamente el 1,1% en peso, o aproximadamente el 0,5% en peso a aproximadamente el 1% en peso del β (1-3) β (1-4) glucano con uno o más de un compuesto de interés, tal como un extracto botánico, o un agente farmacéuticamente activo. El uno o más de un compuesto de interés puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 40% en peso, de aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 25% en peso, de aproximadamente el 0,01% en peso a aproximadamente el 4% en peso, de aproximadamente el 0,1% en peso a aproximadamente el 1,4% en peso, o de aproximadamente el 0,5% en peso a aproximadamente el 1,2% en peso. Se prefiere que las composiciones resultantes queden sin perturbar después de mezclarse durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de una composición homogénea en forma de una suspensión, emulsión o gel. En muchos casos, la cantidad de tiempo requerida para obtener una composición homogénea es de aproximadamente ocho a aproximadamente 16 horas. Sin embargo, deberá apreciarse que pueden requerirse periodos de tiempo más cortos o más largos dependiendo de la cantidad y pureza del β (1-3) β (1-4) glucano usado, además de la cantidad y naturaleza de cada uno del uno o más de un compuesto de interés. Las composiciones de la presente descripción que están en forma de un gel pueden convertirse en un estado más fluido por agitación suave.

Sin desear ceñirse a teoría alguna, se cree que la formación de la suspensión homogénea, emulsión o gel se produce por el uno o más de un compuesto de interés que es secuestrado o encapsulado dentro del β (1-3) β (1-4) glucano, y por la posterior formación de enlaces de hidrógeno entre moléculas del uno o más de un compuesto de interés y el β (1-3) β (1-4) glucano. Otra posibilidad es que el β (1-3) β (1-4) glucano actúe de tensioactivo o agente emulsionante reduciendo la tensión interfacial en los límites entre el uno o más de un compuesto de interés y la fase acuosa dentro de la cual está dispersada el β (1-3) β (1-4) glucano y, por consiguiente, solubilice eficazmente el uno o más de un compuesto dentro de la fase acuosa.

Las disoluciones de beta-glucano usadas en la preparación de las composiciones de la presente descripción se preparan generalmente a partir de un beta-glucano que tiene una pureza de aproximadamente el 65% a aproximadamente el 100%, de aproximadamente el 75% a aproximadamente el 100%, o de aproximadamente el 85% a aproximadamente el 100%. En particular, las disoluciones de beta-glucano usadas en la preparación de las composiciones de la presente descripción contienen generalmente menos del 20%, más particularmente menos del 15%, incluso más particularmente menos del 10%, lo más particularmente menos del 5% de impurezas, tales como impurezas de proteína, lípido, hidratos de carbono y particuladas.

Ejemplos del extracto botánico que puede usarse en las composiciones farmacéuticas según la presente descripción incluyen, sin limitación, extractos de guaraná, *Ginkgo biloba*, nuez de cola, sello de oro, Golo Kola, *Schizandra*, baya del saúco, hierba de San Juan, valeriana y *Ephedra*, té negro, té blanco, té de java, aceite de ajo, fibra, té verde, aceite de limón, macis, regaliz, aceite de cebolla, aceite de naranja, romero, cardo mariano, *Echinacea*, ginseng siberiano o *Panax ginseng*, bálsamo de limón, *Kava kava*, mate, arándano, soja, pomelo, alga marina, espino blanco, flores de lima, salvia, clavo, albahaca, cúrcuma, taurina, hierba de avena silvestre, grano de avena, diente de león, genciana, aloe vera, lúpulo, canela, menta piperita, uva, manzanilla, eneldo, malvaisco, jengibre, corteza del olmo, cardamomo, cilantro, anís, tomillo, rehmanna, eucalipto, mentol, schisandra, withania, primula, lycium y flor de la pasión

En un ejemplo particular, el extracto botánico es un extracto de un grano de avena. Más particularmente, el extracto botánico es un extracto de grano de avena que contiene avenantramida.

Como un ejemplo de un agente farmacéuticamente activo se menciona un antihistamínico, un descongestionante, un corticosteroide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, un broncodilatador, un vasodilatador o un anestésico local.

Otros ejemplos del extracto botánico de agente farmacéuticamente activo que puede usarse en las composiciones

farmacéuticas de la presente descripción incluyen, sin limitación, beta-sitosterol, cafeína, cafestol, D-limoneno, kahweol, nomilina, oltipraz, sulforafano, tangeretina, ácido fólico y mentol.

5 La composición farmacéutica de la presente descripción puede usarse en forma de un espray, un líquido, que puede estar en forma de gotas, o un gel. En un ejemplo, el extracto botánico, y el agente farmacéuticamente activo comprende compuestos que son fácilmente absorbidos por la mucosa de la cavidad bucal, la mucosa de la fosa nasal, o por el tejido de la encía.

10 Se prefiere que las composiciones farmacéuticas de la presente descripción que contienen un anestésico se apliquen a una región localizada específica de las encías o una superficie de la cavidad bucal de un sujeto. También se prefiere que las composiciones de la presente descripción, que contienen un agente vasodilatador tal como nitroglicerina, se apliquen debajo de la lengua de un sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción que comprenden un antihistamínico, un descongestionante, un corticosteroide o un fármaco antiinflamatorio no esteroideo pueden aplicarse a la parte trasera de la cavidad bucal o a la fosa nasal de un sujeto para permitir que la medicación sea liberada de la composición para ser inhalada por el sujeto. Las composiciones farmacéuticas según la presente descripción que comprenden un extracto botánico consumible pueden usarse como enjuague bucal y expectorarse después de ser usadas o, alternativamente, pueden tragarse.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden contener un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable que se elige basándose en la vía de administración prevista y práctica farmacéutica convencional.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden administrarse por vía oral en forma de comprimidos o cápsulas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en forma de elixires o suspensiones que contienen aromatizantes o colorantes. Pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente. Para administración parenteral se usan mejor en forma de una disolución acuosa estéril isotónica.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden administrarse tópicamente cuando se tratan afecciones inflamatorias de la piel en forma de una crema, una gelatina, un gel, una pasta o una pomada. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción que contienen un corticosteroide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo o un extracto botánico pueden usarse como composición tópica, en forma de una crema.

30 El Ejemplo 2 demuestra que el β (1-3) β (1-4) glucano preparado según el procedimiento de la presente invención, y aplicado en forma de una composición tópica a la superficie de una sección de piel, puede atravesar significativamente la capa córnea, la epidermis, la dermis y las capas de la hipodermis de la piel. Estos resultados sugieren que un agente farmacéuticamente activo o un extracto botánico encapsulado por el β (1-3) β (1-4) glucano aislado según la presente invención también podrían transferirse eficazmente a la dermis y las capas de la hipodermis de la piel de un sujeto.

35 Según el tercer aspecto de la presente descripción, se refiere a una composición que comprende un β (1-3) β (1-4) glucano y de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 40% en peso de un depresor del punto de congelación. En otros ejemplos, el depresor del punto de congelación está presente en una cantidad de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30% en peso, o de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% en peso.

40 El β (1-3) β (1-4) glucano usado en la composición del tercer aspecto de la presente descripción puede prepararse según los procedimientos de aislamiento de la presente invención. Otros beta-glucanos de cereal que pueden usarse en esta composición incluyen aquellos disponibles de proveedores comerciales tales como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y Ceapro Inc. (Edmonton, AB, Canadá).

45 En un ejemplo de la composición del tercer aspecto de la presente, el β (1-3) β (1-4) está presente en una cantidad de aproximadamente el 1,2% a aproximadamente el 1,6% o de aproximadamente el 1,2% a aproximadamente el 1,3% en peso. En otro ejemplo, el depresor del punto de congelación está seleccionado del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol, butilenglicol y pentilenglicol.

50 En otro ejemplo de la composición del tercer aspecto de la presente descripción, el β (1-3) β (1-4) glucano es una composición de β (1-3) β (1-4) glucano que tiene una pureza de al menos aproximadamente el 75%, y que contiene menos del 10% de impurezas de ceniza, menos del 10% de impurezas de proteína y menos del 5% de impurezas de lípido. Más particularmente, la composición de β -glucano tiene una pureza de al menos aproximadamente el 92%, y contiene menos del 3,5% de impurezas de ceniza, menos del 3,5 % de impurezas de proteína y menos del 1% de impurezas de lípido. El β (1-3) β (1-4) glucano también puede tener un valor de claridad de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 NTU.

El contenido de β -glucano de cereal puede determinarse usando varios procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia (método AOAC de McCleary). Por ejemplo, el contenido de β -glucano de cereal puede evaluarse colorimétricamente y/o por técnicas analíticas convencionales tales como cromatografía de exclusión por tamaño y HPLC (véase Wood y col. Cereal Chem. (1977) 54:524; Wood y col. Cereal Chem. (1991) 68:31-39; y Wood y col. Cereal Chem. (1991) 68:530-536). Los β -glucanos también pueden analizarse enzimáticamente usando kits comercialmente disponibles tales como Megazyme (Irlanda) empleando las técnicas de McCleary y Glennie-Holmes J. Inst. Brew. (1985) 91:285.

Las viscosidades pueden medirse con un viscosímetro rotacional de tipo cizallamiento tal como Brookfield Syncro-Lectric o Haake Rotovisco. Los procedimientos de uso del instrumento son conocidos para aquellos expertos en la materia. Rutinariamente se hacen mediciones a cuatro velocidades de rotación del disco a una temperatura constante de 25°C.

El siguiente ejemplo se proporciona para ejemplificar la presente invención. Variaciones y alteraciones serán rápidamente evidentes para aquellos expertos en la materia.

Ejemplo 1: Procedimiento para purificar β -glucano de cereal derivado de salvado de avena

Se suspendió salvado de avena (The Quaker Oats Company) con agua de ósmosis inversa (OI) alcalina a un pH de aproximadamente 9,5 a una concentración de sólidos final del 4-10%. La temperatura se mantuvo a 45°C \pm 5°C. El β -glucano de cereal se extrajo del salvado de avena durante un periodo de 30 minutos. Después de este tiempo, los sólidos se eliminaron por centrifugación con una centrífuga de decantación. El concentrado se enfrió hasta temperatura ambiente, y el floculante catiónico SURFLOC[®] 34030 (Jes-Chem Ltd.) se añadió a una concentración del 0,2%. Tras un periodo de incubación de 20 minutos, el material coagulado particulado se eliminó por centrifugación usando una centrífuga de pila de discos. El pH del concentrado se ajustó a aproximadamente neutro, se calentó a >72°C para gelatinizar el almidón y se trató con la amilasa estable al calor Termamy[®] LC (Novozymes A/S). Cuando la disolución ya no produjo una prueba de yodo positiva, el pH se redujo a aproximadamente 4,0 para inactivar la enzima, y la mezcla se calentó a 85°C durante 30 minutos para desnaturalizar la proteína presente. La disolución se enfrió a 4°C durante una hora, y luego se calentó a una temperatura de aproximadamente 72°C. Se añadió un peso equivalente de CELITE[®] C300 (World Minerals) a la disolución, y entonces la mezcla se filtró usando un filtro prensa que contenía papeles de filtro de 25 μ m y se pre-cubrió a una profundidad de aproximadamente 4 mm con CELITE[®] C65 (World Minerals). El filtro prensa se precalentó a una temperatura de aproximadamente 65°C, y el pH de la corriente de alimentación para el filtro prensa se ajustó a 4,5 antes de filtrar la disolución de β -glucano. Después de pasar la disolución de β -glucano a través del filtro, la prensa se lavó con agua de ósmosis inversa produciendo una disolución de β -glucano clara de color amarillo pálido. La disolución de β -glucano se enfrió a 5°C y se añadió 95% de etanol a una temperatura de -20°C a un volumen final de aproximadamente el 15% (peso/peso) con agitación. Se formó una suspensión de β -glucano que se separó inmediatamente de la disolución por centrifugación con una centrífuga de pila de discos. El β -glucano sólido aislado se añadió a agua OI a 45°C, se dejó que se dispersara y luego se calentó a entre 60-70°C para producir una disolución incolora clara que contenía aproximadamente el 1% de β -glucano. El β -glucano separado fue incoloro, tuvo una pureza superior al 75%, una viscosidad >500 cP y una claridad de excepción <50 NTU, como se mide usando un turbidímetro.

Ejemplo 2. Cuantificación de la distribución de β -glucano purificado aplicado como una composición acuosa a secciones de piel abdominal

Se recibió piel abdominal humana bajo consentimiento informado de cinco donantes sanos que se habían sometido a cirugía plástica. La piel de cada paciente se liberó de la grasa subcutánea y se cortó en tres secciones. Las secciones de piel se congelaron en nitrógeno líquido y se esterilizaron durante la noche con una dosis de 25 kGy de radiación gamma. Las muestras irradiadas se montaron cada una en una cámara de perfusión similar a FRANZ-CELL[®] de 20 ml de volumen (PHACOCELL[®], PhaCos GmbH, D-82131-Gauting, Alemania; véase Artmann, C. W. In vitro percutaneous absorption into human skin, Fundam. Appl. Toxicol., 28, 1-5 (1996)) que contenía un medio aceptor. Usando un aplicador de microdosis, las muestras de piel irradiadas se recubrieron con una dosificación de 5 mg/cm² de la Composición 1455, Composición 1450 o una composición de control. Las composiciones 1455 y 1450 fueron composiciones acuosas que contenían 5% y 50%, respectivamente, del β (1-3) β (1-4) glucano preparado según el procedimiento de aislamiento de la presente invención (véase el Ejemplo 1). La composición de control era una composición acuosa que no contenía β (1-3) β (1-4) glucano. La cámara se mantuvo libre de burbujas de aire mientras que se llenaba con el fin de garantizar el aclarado completo y uniforme del tejido de piel. La compensación de presión, dentro y fuera de la cámara, y una humedad constante del aire se proporcionó por ventilación. La temperatura de la piel se monitorizó con sensores de temperatura y el contenido de humedad de las secciones de piel se monitorizó con un corneómetro. El medio se reguló a 36°C y se circuló continuamente. La humedad de la piel se mantuvo a aproximadamente 65 unidades del corneómetro, y la temperatura de la superficie de la piel se mantuvo a 32°C mediante un canal de ventilación. Las condiciones anteriores se mantuvieron por regulación de la temperatura del medio usando una placa calefactora en la base de la cámara, y tubos de aire, y ajustando el flujo de aire en la cámara. Las secciones de piel se suministraron por el medio nutritivo uniformemente en circulación, que aclaró sus superficies inferiores. El área de aplicación para todas las muestras se fijó a 10 cm². Las muestras de piel

se incubaron durante ocho horas bajo condiciones no oclusivas (abierto).

Al final del periodo de incubación se tomaron muestras con hisopo de las secciones de piel con hisopos de gasa tanto secos como hisopos de gasa de algodón humedecidos con 0,2 ml de metanol del 70%/H₂O. Las secciones de piel se sacaron de la cámara Phacocell[®] e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Las secciones de piel se cortaron entonces en rebanadas de 15 µm de la capa córnea a la dermis más profunda. Las secciones de piel se dejaron secar al aire sobre portaobjetos de vidrio limpios y no se fijaron con ningún fluido. Entonces, las rebanadas se tiñeron con BACTIDROP[™] Calcofluor White durante 30 segundos y luego se lavaron de la tinción en exceso con agua desionizada. Las etapas de tinción y de lavado se repitieron dos veces. La muestra teñida se cubrió con un cubreobjetos de vidrio limpio y se examinó por fluorescencia con un microscopio fluorescente LEIKA[®] que tenía un filtro excitador que oscilaba entre 400-500 nm con un pico de 440 nm, un filtro de barrera de 500-520 nm y una lámpara de arco de xenón (quemador). BACTIDROP[™] Calcofluor White es un fluorocromo no específico que se une a celulosa, y tras la excitación con luz ultravioleta de larga longitud de onda delinea las paredes celulares de organismos que contienen celulosa. La deposición de las moléculas de β-glucano se monitorizó y se cuantificó usando fluorescencia brillante, el foco se invirtió a manchas blancas (3 - 5 µm) observadas sobre las paredes celulares de las muestras y en los intersticios intercelulares.

El porcentaje medio de deposiciones como se ha determinado por el procedimiento de tinción por fluorescencia anterior se muestra en la Tabla 3. Se observaron valores de tinción fluorescente significativos (>5%) en la capa córnea y en la epidermis de las muestras de piel tratadas con la Composición 1455 y la Composición 1450. Se observaron valores relativamente menores en la dermis y las capas de la hipodermis de las muestras de piel tratadas con la Composición 1450 y la Composición 1455. Los valores de tinción por fluorescencia de <1% se observaron con las secciones de piel que se trataron con la composición de control.

Tabla 3. Porcentaje medio de deposiciones de β (1-3) β (1-4) glucano en diferentes capas de piel abdominal

	Porcentaje medio de deposiciones					
	COMPOSICIÓN 1455		COMPOSICIÓN 1450		Control	
	Porcentaje	Desviación estándar	Porcentaje	Desviación estándar	Porcentaje	Desviación estándar
Medio	-	-	-	-	-	-
Hisopo	-	-	-	-	-	-
Capa córnea	8,7	1,2	12,8	1,9	0,6	0,2
Epidermis	5,9	1,3	11,6	2,0	0,8	0,2
Dermis	2,4	0,5	4,1	1,1	0,6	0,1
Hipodermis	1,4	0,5	1,5	0,4	0,9	0,1

La documentación de los hallazgos por fotografías (no mostradas) también demostró una captación significativa del β-glucano en la capa de la epidermis de las muestras de piel.

La medición de la fluorescencia se realizó según los procedimientos y documentaciones del control de calidad. Los números de control de BACTIDROP[™] Calcofluor White se probaron usando organismos de control de calidad reconocidos y se encontró que eran aceptables. (Microbiology M. Pettenkofer Institute, Múnich). La evaluación estadística se llevó a cabo por el paquete de software estadístico SAS/STATISTICA[®]. Tanto el hardware como el software usados fueron validados.

La presente invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas. Sin embargo, será obvio para personas expertas en la materia que pueden hacerse varias variaciones y modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de aislamiento de un β (1-3) β (1-4) glucano de un grano de cereal triturado o una parte triturada del grano de cereal, que comprende:
 - 5 (i) extraer el grano de cereal triturado o la parte triturada del grano de cereal con una disolución alcalina que tiene un valor de pH entre 9 y 10 durante un periodo de tiempo de aproximadamente 15 a aproximadamente 45 minutos para producir un extracto que contiene al menos aproximadamente el 0,4 por ciento en peso de β (1-3) β (1-4) glucano;
 - (ii) eliminar el material insoluble, y eliminar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm de dicho extracto para producir un extracto purificado;
 - 10 (iii) añadir de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 25% (vol/vol) de un alcohol C₁-C₄ al extracto purificado para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano, y
 - (iv) aislar el β (1-3) β (1-4) glucano.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en dicha etapa de añadir (etapa iii), aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% (vol/vol) de un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol e isopropanol se usa para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano de dicho extracto purificado.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% (vol/vol) de etanol se usa para precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano de dicho extracto purificado.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de eliminar el material particulado comprende además:
 - 20 una o más de una etapa de añadir un floculante, un coagulante o tanto un floculante como un coagulante a dicho extracto para coagular material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a aproximadamente 0,2 μm , y eliminar el material coagulado de dicho extracto;
 - digerir el material de almidón en dicho extracto, y
 - 25 filtrar el material particulado que tiene un tamaño de partícula superior a 0,2 μm de dicho extracto para producir el extracto purificado.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que en dicha etapa de digerir, dicho material de almidón se digiere con una enzima.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que antes de digerir dicho material de almidón, dicha disolución alcalina se neutraliza.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que tras la digestión de dicho material de almidón, dicha enzima se inactiva.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha enzima se inactiva acidificando la disolución neutralizada.
9. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicha enzima es una amilasa.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha amilasa no requiere un cofactor de calcio.
- 35 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cereal está seleccionado del grupo que consiste en un cultivar de cebada, un cultivar de avena, un cultivar de trigo, un cultivar de centeno, un cultivar de sorgo, un cultivar de mijo y un cultivar de maíz.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de añadir (etapa iii) se realiza a una temperatura de aproximadamente 1°C a aproximadamente 10°C.
- 40 13. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una o más de una etapa de disolver el β (1-3) β (1-4) glucano aislado en una disolución acuosa, precipitar el β (1-3) β (1-4) glucano añadiendo entre el 10% y el 25% (vol/vol) de alcohol C₁-C₄ a la disolución acuosa y aislar el β (1-3) β (1-4) glucano.
- 45 14. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el floculante está seleccionado del grupo que consiste en una poliacrilamida, una sal de acrilato cuaternaria y una macromolécula de floculante natural, y el coagulante está seleccionado del grupo que consiste en alumbre, cal, cloruro férrico, sulfato ferroso, un polímero orgánico y un polielectrolito sintético con grupos funcionales aniónicos o catiónicos.

15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 17% (vol/vol) del alcohol C₁-C₄ se añade al extracto purificado en la etapa (iii).

5 16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el grano de cereal triturado o la parte triturada del grano de cereal se extrae con una disolución alcalina que tiene un valor de pH de aproximadamente 9,25 a aproximadamente 9,75.

17. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la etapa de filtrar el material que tiene un tamaño de partícula superior a 0,2 µm de dicho extracto se realiza usando un filtro recubierto con una precapa de un ayudafiltros que tiene una porosidad de 0,2 µm.