

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 981**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7004	(2006.01) A61P 25/28	(2006.01)
A61K 31/357	(2006.01) A61P 3/10	(2006.01)
A61K 31/352	(2006.01)	
C07D 493/16	(2006.01)	
C07D 311/62	(2006.01)	
C07H 17/06	(2006.01)	
C07H 17/08	(2006.01)	
A61P 3/04	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 29/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2005** **E 05729156 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015** **EP 1734949**

54 Título: **Purificaciones de elagitaninos**

30 Prioridad:

24.03.2004 US 556322 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.08.2015

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**SEERAM, NAVINDRA P. y
HEBER, DAVID**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 543 981 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

Purificaciones de elagitaninos

5 Introduccion

La investigación médica indica que el zumo de fruta de la granada (*Punica granatum L.*) presenta fuertes propiedades antioxidantes atribuibles a la presencia de determinados polifenoles vegetales, o taninos. Los taninos hidrolizables presentes en el zumo de granada, incluyendo isómeros de punicalagina, se han identificado como compuestos activos responsables de proteger al colesterol de lipoproteína de baja densidad de la oxidación *in vivo*, una etapa clave en la patogénesis de la aterosclerosis.

La adicción de antioxidantes es un método conocido para aumentar la vida útil de los productos alimenticios. Los antioxidantes naturales también pueden desempeñar un papel importante en la prevención de la carcinogénesis. Los antioxidantes dietéticos pueden ser eficaces contra el daño peroxidativo en los sistemas vivos. Estudios actuales realizados sobre los taninos de la granada también incluyen la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2; la actividad antiaterosclerótica; la inhibición del factor de transcripción nuclear NF-κB; la represión de la expresión del glutatión y efectos anti adhesión y similares.

A la luz de las prometedoras pruebas médicas, la popularidad de la fruta y del zumo de la granada está aumentando rápidamente a escala nacional. Así mismo, también aumentan las ventas comerciales de la fruta y zumo de la granada, incentivando a su vez aumentos en la producción hortícola y un crecimiento significativo en la industria del procesamiento del zumo comercial. Un subproducto de alto volumen, resultante del proceso de extracción del zumo de granada a gran escala, es la cáscara residual, que comprende la corteza, la médula y las membranas de la fruta. El alto contenido de humedad del residuo hace que su eliminación sea costosa y limite la viabilidad de usos alternativos. Sin embargo, los mismos subproductos, que ofrecen un proceso de extracción y purificación rápido, rentable y de alto rendimiento, tienen la posibilidad de proporcionar una fuente asequible y abundante de un producto refinado rico en elagitaninos hidrolizables, incluyendo la punicalagina.

La punicalagina, que es el tanino predominante en el zumo de granada comercial y que está presente a niveles significativos (> 2 g/l), se extrajo debido a sus propiedades hidrófilas cuando los frutos se presionan hidrostáticamente. Este compuesto es responsable de la alta actividad antioxidante de este zumo, aunque se sabe poco acerca de la biodisponibilidad y del metabolismo de la punicalagina o de otros elagitaninos de los alimentos.

Los métodos anteriores para aislar elagitaninos de la granada incluyen métodos lentos de cromatografía en columna (C-18, poliamidas, celulosa, Sephadex LH-20 Lipófila) y/o de cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (HPLC). En vista del interés comercial de estos compuestos, resulta ser de gran interés el desarrollar métodos económicos de purificación a alto rendimiento.

Mayer et al, Liebigs Ann. Chem., 1977, páginas 1976-1986, describen la punicalagina y la punicalina, dos taninos de la piel de la granada. Tanaka et al, Phytochemistry, vol. 24, no. 9, 1985, páginas 2075-2078, describen la punicalofina, un elagitanino de las hojas de *Punica granatum*. Adicionalmente, en los ejemplos adjuntos se indica una técnica anterior.

Resumen de la invencion

La invención se refiere a composiciones de elagitaninos purificados y biológicamente activos, que incluyen punicalagina, así como métodos para producir dichas composiciones. Los taninos se separan a partir de productos naturales mediante un método de extracción y purificación usando un absorbente polimérico sólido.

La presente invención proporciona un método para producir una composición de elagitaninos, comprendiendo el método: preparar una solución acuosa que contenga elagitaninos de las cáscaras y arilos de la granada; transferir los elagitaninos de la solución acuosa sobre una superficie de un material de resina adsorbente de estireno-divinilbenceno reticulado polimérico; eluir los elagitaninos de la superficie de la resina con un eluyente que es un alcohol que contiene de 1 a 4 átomos de carbono en una solución de elagitaninos eluyente; y separar el eluyente de la solución de elagitaninos eluyente para producir la composición de elagitaninos, en el que la composición de elagitaninos comprende la punicalagina a una concentración de al menos el 10 % en una base de peso/peso. Un alcohol preferido para su uso en el método es el etanol.

La superficie de la resina puede ser una estructura macro reticular con una fase polimérica continua y una fase porosa continua. La superficie de la resina puede ser partículas que tengan un tamaño entre 100 a 200 micras. Las partículas de resina pueden estar en forma de una columna.

El método de la invención, la solución acuosa que contienen los elagitaninos puede obtenerse mediante el método de: romper la cáscara de granada y separar la pulpa; y extraer los elagitaninos de la pulpa en una solución acuosa. El método de la invención puede comprender adicionalmente la etapa de lavar los elagitaninos con un tampón

acuoso después de transferirlos y antes de eluirlos de la superficie de la resina.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una composición de elagitaninos de granada preparada de acuerdo con el método de la invención en el que la composición incluye elagitaninos a una concentración de al menos aproximadamente el 30 %.

La composición puede comprender un extracto de taninos totales de granada (TTG). La composición puede comprender punicalagina a una concentración de al menos el 20 % en peso del peso total de la composición. La composición puede comprender elagitaninos seleccionados del grupo que consiste en ácido elágico, glucósidos de ácido elágico, punicalina, punicalagina y combinaciones de los mismos. El ácido elágico y los glucósidos de ácido elágico pueden estar presentes en una concentración de al menos aproximadamente el 5 % en peso del peso total de la composición.

La composición puede comprender antocianinas y antocianidinas a una concentración de al menos aproximadamente el 5 % en peso del peso total de la composición.

Los extractos que comprenden estos compuestos y los extractos que comprenden taninos totales de granada, son útiles para varias aplicaciones, incluyendo usos farmacéuticos, nutracéuticos, cosméticos y alimenticios.

La presente invención proporciona adicionalmente el uso de composiciones de la invención en una formulación farmacéutica, fitocéutica, nutracéutica o cosmética.

En el presente documento se describe una columna adsorbente polimérica rápida que se usa para purificar taninos de granada de un extracto acuoso, cuyo extracto procede de una fuente de elagitaninos tal como varios extractos vegetales, incluyendo *Punica granatum* L, y similares. Los taninos se adsorben a las columnas, y después de limpiar, evacuar por gravedad y aspirar al vacío el líquido de la columna, los taninos adsorbidos se eluyen del sólido adsorbente y el disolvente se retira al vacío para producir un polvo de taninos totales altamente concentrado que comprende un alto porcentaje (por ejemplo, 80 %) de anómeros de punicalagina así como un porcentaje significativo de ácido elágico. Pueden realizarse etapas adicionales de cromatografía para proporcionar composiciones altamente purificadas de punicalagina.

La presente invención también proporciona un método para producir una mezcla que comprende elagitaninos de granada, como se expone en las reivindicaciones. El material de partida puede ser fresco, o congelado y descongelado rápidamente. Después el material se rompe y los elagitaninos se extraen de la pulpa en una solución acuosa.

Los extractos obtenidos de este modo pueden utilizarse en la preparación de tintes, cosméticos y otras fórmulas terapéuticas, tales como bioconservantes de alimentos, en la industria nutraceutica y similares. Las composiciones también encuentran uso como una fuente de derivados de ácido elágico, incluyendo elagitaninos hidrolizables, para su uso en estudios biológicos *in vitro* e *in vivo*. Se dice que los compuestos así aislados tienen actividades antioxidantes, anticancerosas, antineurodegenerativas, antidiabéticas y antiinflamatorias. Los compuestos encuentran también uso en el tratamiento de individuos con obesidad y sobrepeso, para reducir la grasa corporal no deseada.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A: cromatograma de HPLC de taninos totales de granada (TTG) purificados de la cáscara de la fruta. Los picos se identifican por comparación de sus tiempos de retención con estándares puros como anómeros de punicalagina (1) y ácido elágico (4), que corresponden a valores m/z 1083 y m/z 301 en LCMS, respectivamente. El pico 4a se identificó como un hexósido de ácido elágico basado en su ion a un valor m/z 463 como se ha indicado anteriormente. Fig. 1B: cromatograma de HPLC de anómeros puros de punicalagina aislados de TTG. Fig. 1C: cromatograma de HPLC de ácido elágico disponible en el comercio. Las longitudes de onda de detección HPLC-UV para la cuantificación de las punicalaginas y del ácido elágico en TTG fueron de 378 nm y 366 nm, respectivamente.

Figura 2: espectros LCMS de taninos totales de granada (TTG) que muestran cromatogramas de iones extraídos de isómeros de punicalagina, m/z 1083; ácido elágico, m/z 301; punicalina m/z 781; hexósido de ácido elágico, m/z 463; ramnósido de ácido elágico m/z 447, pentósido de ácido elágico m/z 433; como se ha indicado anteriormente (1). Los espectros se obtuvieron mediante ionización por electropulverización (ES, *electrospray*) en modo negativo obteniendo iones entre 120 - 1500 uma.

Figura 3: esquema que muestra la estructura química de la punicalagina (1), punicalina (2), ácido galágico (3) y ácido elágico (4) en relación con su información espectral de masa. Fig. 3B: espectros MS-MS por infusión directa de punicalagina (m/z 1083) que muestra la pérdida posterior del resto de hexahidroxidifenilo para dar punicalina (m/z 781) y después hexosa para dar ácido galágico (m/z 601).

Descripción de las realizaciones específicas

Para purificar taninos a partir de un extracto de granada acuoso se utilizan resinas adsorbentes poliméricas. Después de la adsorción, las resinas se someten a limpieza, a evacuación por gravedad y a aspiración de líquidos al vacío. Después, los taninos adsorbidos se eluyen de las resinas y el disolvente se retira al vacío para producir un polvo altamente concentrado de taninos totales, que puede comprender un alto nivel de elagitaninos, incluyendo, por ejemplo, anómeros de punicalagina; ácido elágico, glucósidos de ácido elágico; antocianinas y antocianidinas, etc.

Los extractos obtenidos de este modo pueden utilizarse en estudios biológicos, para usos farmacéuticos; en la preparación de tintes, cosméticos y otras fórmulas terapéuticas, como aditivos de alimentos, en la industria nutracéutica y similares. Las mezclas de elagitaninos aislados también pueden comprimirse y se utilizan como un complemento nutracéutico/dietético natural. En general, los comprimidos proporcionan una dosis diaria de los taninos. La cantidad de los elagitaninos puede ajustarse mediante el aislamiento de los compuestos individuales y mezclándolos entre sí. Los comprimidos pueden comprender la mezcla natural de los elagitaninos que están aislados por la resina.

Debe entenderse que esta invención no está limitada en particular a la metodología, a los protocolos, a las líneas celulares, a las especies o géneros animales, y que los reactivos descritos, como tales, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es con el único fin de describir realizaciones particulares, y que no pretende limitar el alcance de la presente invención, que solo estaría limitada por las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "uno" y "el", "la", incluyen referentes en plural, al menos que el contexto indique claramente otra cosa. De este modo, la referencia a, por ejemplo, "una célula" incluye en una pluralidad de dichas células y la referencia a "el cultivo" incluye la referencia a uno o más cultivos y sus equivalentes, conocidos por los expertos en la técnica y así sucesivamente. Todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención, salvo que se indique claramente otra cosa.

PURIFICACIÓN DE ELAGITANINOS

Las composiciones ricas en elagitaninos se recuperan de material vegetal, pudiendo incluir dicho material vegetal cáscaras y/o pieles y zumo de fruta, hojas, tallos leñosos y similares. Las plantas adecuadas para la extracción incluyen cáscaras y/o pieles de fruta de *Punica granatum*.

Una suspensión de material procedente del material vegetal se prepara mediante varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mezclado, extracción acuosa etc. La solución acuosa que comprende elagitaninos se aplica una columna de adsorbente polimérica, que después se lava con un tampón acuoso para retirar el material no unido. Los taninos de interés se unen a la resina y pueden eluirse con un disolvente alcohol C1-4, por ejemplo, metanol, etanol, etc.

La resina tiene una superficie a la cual se adsorben los elagitaninos. Una clase preferida de resinas adsorbentes son las resinas reticuladas poliméricas compuestas de estireno y divinilbenceno, tales como, por ejemplo, la serie de resinas AMBER-LITE, por ejemplo AMBERLITE XAD-4 y AMBERLITE XAD-16, que están disponibles en el comercio de Rohm & Haas Co., Filadelfia, Pa. Otras resinas adsorbentes de estireno y divinilbenceno reticuladas poliméricas adecuadas para su uso de acuerdo con la invención son XFS-4257, XFS-4022, XUS-40323 y XUS-40322 fabricadas por The Dow Chemical Company, Midland, Mich., y similares.

Se prefiere usar resina copolimérica reticulada de estireno-divinilbenceno (SDVB), disponible en el comercio, autorizada por la FDA (por ejemplo AMBERLITE XAD-16). Por tanto, en una realización, como resina se usa AMBERLITE XAD-16, disponible en el comercio de Rohm y Haas Company, y descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.297.220. Esta resina es una resina adsorbente de poliestireno divinilbenceno, reticulada, hidrófoba, no iónica. AMBERLITE XAD-16 tiene una estructura macro reticular, con una fase tanto polimérica como porosa continua. En una realización particularmente preferida, la resina usada en la presente invención tiene un tamaño de partícula que varía de 100-200 micras.

Otros adsorbentes, tales como los de la serie de adsorbentes de AMBERLITE XAD, que contienen perlas de resina macro reticulares hidrófobas, con tamaños de partícula en el intervalo de 100-200 micras, son también eficaces en los métodos de la presente invención. Además, también son adecuadas diferentes variaciones de las AMBERLITES, tales como las de la serie de adsorbentes de AMERCHROM CG, usadas con tamaños de partícula en el intervalo de 100-200 micras, para su uso en la presente invención. Se prefiere la AMBERLITE XAD-16 dado que puede volver a usarse muchas veces (más de 100 veces). Sin embargo, en la presente invención, se contempla que el uso de resinas aprobadas por el gobierno, para su uso en la alimentación, puede considerarse importante y/o deseable. Para la purificación pueden usarse varias geometrías, incluyendo la adsorción en lotes, la cromatografía en columna y similares, como se conoce en la técnica.

Las resinas se lavan, como por ejemplo, con agua o con un tampón acuoso para retirar el material no unido del extracto.

Para retirar los elagitaninos adsorbidos se usan alcaloides inferiores que contienen de 1 a 4 átomos de carbono, siendo el más preferido el etanol (alcohol etílico) ya que su uso está autorizado en la alimentación. Normalmente el etanol se azeotropiza con agua; sin embargo, puede usarse etanol absoluto. El agua que contiene ácido málico y azúcares en la granada pasa a través de la columna. Estos pueden recogerse y pueden usarse en los alimentos como saborizantes.

Los taninos diluidos se purifican sustancialmente con respecto al material de partida y pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía, etc., o pueden usarse directamente en formulaciones de interés. La composición final puede concentrarse, filtrarse, dializarse etc., usando métodos conocidos en la técnica. Para aplicaciones terapéuticas, los taninos se administran a un mamífero en una forma de dosificación fisiológicamente aceptable, incluyendo aquellos que pueden administrarse a un ser humano por vía oral etc. como un bolo o mediante una infusión continua durante un periodo de tiempo. Como vías de administración alternativas se incluyen la vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, tópica o por inhalación.

COMPOSICIONES

Las composiciones de interés se obtienen a partir del proceso de purificación anterior. Las composiciones comprenden elagitaninos y fracciones de los mismos, como se describe más adelante, y pueden proporcionarse como un polvo, en solución, por ejemplo, en agua o en tampón acuoso, etanol, etc. Las soluciones también pueden comprender zumo de granada u otros zumos de fruta o alimentos. Dichas composiciones pueden comprender al menos aproximadamente 30 % de elagitaninos bien en peso/volumen o en porcentaje de peso; y pueden comprender al menos aproximadamente 40 % de elagitaninos; al menos aproximadamente 50 % de elagitaninos; al menos aproximadamente 60 % de elagitaninos; o más. La identidad de los elagitaninos puede confirmarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante HPLC; etc.

En las composiciones de la invención se incluyen extractos que comprenden punicalagina (Figura 3A), que pueden estar presentes como un componente de los taninos totales, o pueden aislarse de otros taninos presentes en los extractos de granada. La punicalagina puede estar presente a una concentración de al menos aproximadamente 10 %, normalmente al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, o más, hasta e incluyendo una composición sustancialmente pura de punicalagina.

A partir de los taninos totales producidos por los métodos descritos anteriormente o por métodos convencionales, puede obtenerse una composición de punicalagina por cromatografía. Los taninos totales se adsorben sobre una columna lipófila, por ejemplo, una columna Sephadex LH-20 Lipófila previamente equilibrada con una solución acuosa de metanol, y se eluyen con cantidades crecientes de metanol. Opcionalmente, los compuestos resultantes se secan y vuelven a cromatografiarse.

Las composiciones de la invención pueden incluir ácido elágico y glucósidos de ácido elágico (Figura 3A), que pueden estar presentes como un componente de los taninos totales o pueden aislarse de otros taninos presentes en los extractos de granada. El ácido elágico y los glucósidos de ácido elágico pueden estar presentes a una concentración de al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, o mayor.

Las composiciones de la invención pueden incluir antocianinas y antocianidinas, que pueden estar presentes como un componente de los taninos totales o pueden aislarse de otros taninos presentes en los extractos de granada. Las antocianinas y antocianidinas pueden estar presentes a una concentración de al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, o mayor.

USO DE ELAGITANINOS

Los taninos obtenidos mediante los métodos de la invención pueden usarse para formular compuestos farmacéuticos, fitocéticos, nutracéticos, hierbas medicinales, aditivos alimenticios, cosméticos, etc. Las hierbas medicinales de interés incluyen, pero sin limitación, fracciones activas de determinadas preparaciones herbáceas, tales como ortigas (*Urtica dioica*) o cúrcuma (*Curcuma longa*), productos de animales marinos o terrestres, por ejemplo, lípidos bioactivos de *Perna canaliculus*, *Dromaius nova hollandiae*, etc.

Los extractos en la invención pueden proporcionarse como una composición con un transportador farmacéuticamente aceptable. Dichas formas de dosificación incluyen transportadores fisiológicamente aceptables que intrínsecamente no son tóxicos ni terapéuticos. Los ejemplos de dichos transportadores incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales, o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogeno fosfato disódico, hidrógeno fosfato potásico, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de

magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa y PEG. Los transportadores para formas de taninos tópicos o basadas en gel, incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa sódica o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliácridatos, polímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno, PEG y alcoholes de ceras de madera. Para todas las administraciones, las formas de tipo depósito convencionales se usan adecuadamente.

5 Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, parches, formas para inhalación, pulverizaciones nasales, comprimidos sublinguales, y preparaciones de liberación sostenida. Los extractos normalmente se formularán en dichos vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 µg/ml a 100 µg/ml.

10 Las formulaciones nutraceuticas pueden definirse como “un alimento o parte de un alimento que ofrece beneficios médicos y/o sanitarios, incluyendo la prevención o el tratamiento de enfermedades” (Dr. Stephen DeFelice, director de la Foundation for Innovation In Medicine). Los productos varían desde nutrientes aislados, complementos dietéticos y dietas, a alimentos diseñados modificados genéticamente, alimentos funcionales, productos herbáceos y alimentos procesados tales como cereales, sopas y bebidas. Los alimentos funcionales, término más conocido entre los consumidores aunque lejos de ser una categoría de productos, se definen por Clare Hasler, Ph.D., de la
15 Universidad de Illinois, como alimentos que incluyen “cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado que pueda proporcionar un beneficio sanitario más allá de los nutrientes tradicionales que los contiene”. Por tanto, los extractos biológicamente activos descritos en el presente documento son, en sí mismos, nutraceuticos. Además, los extractos pueden añadirse a alimentos para proporcionar un beneficio sanitario.

20 Las formulaciones nutraceuticas de interés incluyen alimentos para uso veterinario y humano, incluyendo barritas dietéticas, bebidas y complementos para bebidas, y similares. Estos alimentos se refuerzan mediante la inclusión de un extracto biológicamente activo de la invención. Por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis, la dieta normal de un paciente puede complementarse con una fórmula nutraceutica consumida regularmente.

25 Para las formulaciones cosméticas, las composiciones de la invención pueden comprender opcionalmente materiales beneficiosos para la piel. Estos incluyen estradiol; progesterona; pregnenolona; coenzima Q10; metilsulfonilmetano (MSM); péptidos de cobre (extracto de cobre); extracto de plancton (fitosoma); ácido glicólico; ácido kójico; ascorbil palmitato; retinol todo trans; ácido azelaico; ácido salicílico; broparestrol; estrona; adrostenediona, androstanediones; etc. Los esteroides generalmente estarán presentes a una concentración menor de aproximadamente 2 % del total en peso de la composición, aunque los otros materiales beneficiosos para la piel
30 pueden estar presentes a niveles más elevados, por ejemplo, tanto como del 10 al 15 %.

35 Las composiciones de la invención pueden comprender un vehículo cosméticamente aceptable que actúa como un diluyente, un dispersante o un transportador, para facilitar su distribución cuando la composición se aplica a la piel. Los vehículos distintos de o además de agua pueden incluir emolientes líquidos o sólidos, disolventes, humectantes, espesantes y polvos.

40 El vehículo cosméticamente aceptable normalmente formará del 5 % al 99,9 %, preferentemente del 25 % al 80 % en peso de la composición, y puede, en ausencia de otros complementos cosméticos, formar el equilibrio de la composición.

45 Los siguientes ejemplos se proponen para ofrecer a los expertos habituales en la técnica una completa divulgación y descripción de cómo preparar y usar la presente invención y no pretenden limitar el ámbito de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden representar que los experimentos indicados a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura se da en grados centígrados y la presión es la atmosférica o
50 próxima a la misma.

La presente invención se ha descrito en términos de realizaciones particulares descubiertas o propuestas por el autor de la presente invención para comprender modos preferidos para la realización práctica de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que, a la luz de la presente divulgación, pueden realizarse numerosas
55 modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ilustradas sin alejarse del ámbito de la invención que se pretende. Todas dichas modificaciones pretenden incluirse en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

EXPERIMENTOS

60 EJEMPLO 1

Los frutos de la granada (*Punica granatum L.*) se consumen generalmente frescos y en forma de zumos, concentrados, vino y mermelada. La cáscara de la granada, un subproducto de la industria comercial, es una fuente asequible y abundante de taninos hidrolizables denominados elagitaninos. Los métodos previos para aislar taninos de la granada incluyen extracciones laboriosas y lentas en fase sólida por cromatografía en columna (C-18, poliamidas, celulosa, Sephadex LH-20 Lipófila, Daialon HP20) y/o el uso de instrumental especializado, tal como
65

cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento (HPLC). Se usó una columna de resina Amberlite XAD-16 aspirada al vacío para purificar rápidamente un extracto acuoso de cáscara de granada para obtener taninos totales de granada (TTG) en rendimientos sustanciales (58-60 g TPT/Kg de cáscara; tiempo <1h). Usando HPLC analítica y LC-ES/MS en tándem, la evaluación de TPT mostró que contenía el tanino principal de la cáscara de fruta, la punicalagina (85 % p/p) y ácido elágico (1,3 % p/p) y cantidades no cuantificadas de punicalina y glucósidos de ácido elágico (hexósido, ramnósido y pentósido). Dado que se dice que los taninos de la granada muestran una fuerte actividad antioxidante, antiaterosclerótica y anticancerosa, este método puede usarse para la producción a gran escala de TPT para estudios biológicos *in vitro* e *in vivo*. Este método es práctico para aplicaciones industriales y puede proporcionar un medio económico para usar un subproducto alimenticio infrautilizado actualmente para desarrollar fitocéuticos con posibles beneficios sanitarios o para desarrollar productos para su uso en la industria de cosméticos y de bioconservantes de alimentos.

En este estudio se indica un método rápido para preparar taninos totales de granada (TTG) con un rendimiento y una pureza sustanciales que pueden usarse para estudios biológicos *in vitro* e *in vivo*. Este método tiene aplicaciones industriales dado que puede perfeccionarse fácilmente y es rentable dado que usa un subproducto asequible de la industria de zumos comerciales, la cáscara de la granada, que después de someterla a presión se usa actualmente como alimento para el ganado. También se indica el uso de métodos espectroscópicos de RMN y LC-ES/MS en tándem en modo negativo, para identificar elagitaninos específicos en TTG. En el presente documento también se indican estudios de cuantificación por HPLC del TTG usando punicalagina pura (aislada de TTG) y ácido elágico (disponible en comercio) para la generación de curvas de calibración convencionales.

Reactivos

Todos los disolventes eran de calidad HPLC y se adquirieron en Fisher Scientific Co. (Tustin, CA). El ácido elágico, fórmico y acético, las resinas Sephadex LH-20 Lipófila y Amberlite XAD-16 se adquirieron en Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO).

Procedimientos Experimentales Generales

Se registraron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) en instrumentos Bruker que funcionaban a 400 MHz para el ^1H y a 150 MHz para el ^{13}C . Los desplazamientos químicos de la punicalagina (1) se registraron en acetona- d_6 y están en δ (ppm) con respecto a los picos de disolvente. Los análisis HPLC-ES/MS se realizaron en un sistema LQC clásico Finnigan LC-MS/MS (ThermoFinnigan, San José, CA), dotado con un sistema de HPLC de la serie HP 1100 que consistía en un automuestreador/inector, una bomba cuaternaria, un calentador de columna y un detector de matriz de diodos (DAD). El tratamiento de datos se realizó usando el programa informático Xcalibur 1,2 (Finnigan Corp). Los análisis HPLC se realizaron en un sistema Waters Alliance 2690 dotado con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) (Waters Corp., Milford, MA) y tratamiento de datos se realizó con el programa informático Waters Millennium v 3.02.

Purificación de taninos Totales de Granada TTG. Los frutos de la granada (Ruby River, Lote Nº 3127, Whole Foods Supermarket, Westwood, LA, CA) se lavaron y se limpiaron para producir su cáscara y arilo, separados de las semillas y zumo. La cáscara (1 kg) se filtró con agua (5 L), se exprimió a mano y después se mezcló instantáneamente (Waring Blender, New Hartford, Conn., USA). El espeso puré de cáscara se filtró a través de una estopilla y se exprimió en seco para producir un extracto acuoso de color marrón oscuro. La columna de resina XAD-16 se preparó para cromatografía mediante un lavado previo en metanol y después se pre equilibró en agua durante 12 h. El extracto acuoso se dividió en partes de 200 ml y se adsorbieron en una columna de resina Amberlite XAD-16 (500 g) aspirada al vacío. Cada columna se eluyó con cantidades copiosas de agua destilada (4 l) hasta que el eluato de color amarillo pálido azucarado tuvo un color transparente. El agua restante se retiró de la resina por aspiración al vacío y los taninos adsorbidos se eluyeron con Me-OH (2 x 400 ml) para producir una solución de color marrón oscuro. El tiempo que se tardaba en completar un ciclo por columna era de < 15 min. El metanol se retiró mediante un Rota-vap (Buchi) al vacío a baja temperatura (37° C) para proporcionar taninos totales de granada (TTG) como un polvo de color marrón oscuro (58-60 g/kg peso en fresco de cáscara).

Purificación de Punicalagina (1) para estudios de cuantificación de TTG. Debido a la no disponibilidad de un estándar comercial de punicalagina, el compuesto puro se aisló del TTG de la siguiente manera. El TTG (300 mg) se adsorbió sobre una columna Sephadex LH-20 Lipófila que se pre-equilibró con H_2O : MeOH (8:2, v/v) y se luyó con cantidades crecientes de MeOH. Los análisis LC-ES/MS revelaron que el 50 % de la fracción de MeOH era rica en dos compuestos, ambos correspondientes al peso molecular de la punicalagina (M-H m/z 1083). Esta fracción (273 mg) se evaporó al vacío y volvió a cromatografiarse, pre-equilibrando en este momento la columna con EtOH. La elución con cantidades crecientes de H_2O y Me_2CO a EtOH: H_2O : Me_2CO (6:3:1, v/v/v) y finalmente a EtOH: Me_2CO (1:1, v/v) produjo una fracción que se evaporó al vacío para obtener un polvo amorfo amarillo (34 mg). Esto se identificó como una mezcla de anómeros α - y β de punicalagina por datos espectrales de RMN ^1H y ^{13}C , que eran coherentes con los informes bibliográficos.

Condiciones de HPLC para análisis y cuantificación. Todas las muestras (50 μl de volumen de inyección) se filtraron (0,22 μm) y se analizaron en una columna C-18 Novapak (Waters Corp.), 150 x 3,9 mm i.d., 5 μm . La fase móvil,

disolvente A (CH_3COOH al 2 %/ H_2O) y disolvente B (CH_3COOH acuoso al 2 %/ MeOH) se usó en condiciones de gradiente lineal comenzando con el 99 % de A durante 5 min hasta el 40 % de A más de 40 min, tiempo de mantenimiento, 5 min con un caudal de 1,0 ml/min. Todos los compuestos se detectaron a 254 nm, y a 378 nm (punicalaginas) y a 366 nm (ácido elágico) para la cuantificación. La punicalagina aislada pura (1) (2 mg) se pesó de manera precisa y se disolvió en $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) después se diluyó en serie para obtener concentraciones de 0,20, 0,10, 0,05 y 0,025 mg/ml, respectivamente. El ácido elágico (4) (1 mg) se disolvió en DMSO y se diluyó en serie para obtener concentraciones de 0,02, 0,01, 0,005 y 0,0025 mg/ml, respectivamente. Cada muestra se inyectó por duplicado y se obtuvieron curvas de calibración usando sus factores de respuesta (área de pico/concentración) El TTG (1mg) se disolvió en $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1, v/v), y los porcentajes de área media de la punicalagina (dos picos individuales correspondientes a los anómeros α - y β) y los picos del ácido elágico se usaron para la cuantificación.

Análisis LC-ES/MS. Las condiciones para la detección de taninos fueron las siguientes: Columna, Symmetry C-18, 100 mm x 2.1 i.d., 3,5 μm , (Waters Corp., Milford, MA); Disolvente A) HCOOH al 2 %/ H_2O , B) HCOOH al 2 %/ MeOH ; % de gradiente A: inicial: 99 %, 30 min: 80 %, 45 min: 60 %, 60 min: 5 %; tiempo de ejecución 60 min; caudal de 0,15 ml/min; volumen de inyección 20 μl ; parámetros MS: modo de ionización, electropulverización (ES) en modo negativo; rango de barrido: 120-1.500 uma; velocidad de barrido: 1 barrido/s; voltaje de cono: 17 eV, temperatura de fuente: 275 °C. Se obtuvieron identidades de picos emparejando sus iones moleculares (M-H^+) obtenidos por ES/MS y MS en tándem con los pesos moleculares teóricos esperados procedentes de los datos bibliográficos como: punicalagina (1) (m/z 1083); punicalina (2) (m/z 781; resto de M-hexahidroxifenóilo); ácido galágico (3) (m/z 601) y ácido elágico (4) (m/z 301) [1,2,9]. Los derivados del ácido elágico se correlacionaron con los de la bibliografía y se identificaron como hexósido de ácido elágico (m/z 463), ramnósido de ácido elágico (m/z 447) y pentósido de ácido elágico (m/z 433).

Resultados y análisis

Nuestro método cromatográfico que utiliza la columna de resina XAD-16 puede realizarse rápidamente y produce un alto rendimiento de taninos purificados (tiempo <1 h; 55-60g de TTG/kg de cáscaras) de cáscaras de fruta, un subproducto de la industria comercial. El uso de cáscaras como un material de partida para producir TTG es relevante dado que en las fases de procesamiento de la industria de zumo comercial, se extraen cantidades significativas de estos taninos solubles en agua de las cáscaras de fruta debido a sus propiedades hidrófilas cuando las frutas se presionan hidrostáticamente. Este método es rentable dado que utiliza agua y metanol como eluyentes lo que permite recoger el metanol y reciclarlo en columnas de resina posteriores para obtener el producto TTG. Métodos publicados anteriores usaban fases estacionarias alternativas (por ejemplo, Sephadex LH 20 Lipófila, poliamidas, celulosa microcristalina, C-18 y Diaion HP20) para purificar taninos de granada que eran lentas y laboriosas. Estos métodos usan múltiples sistemas disolventes como eluyentes para dar bajos rendimientos de taninos y algunas veces era necesario el uso de instrumental especializado tal como HPLC a escala preparativa acoplada a detectores UV sensibles.

El TTG purificado de cáscara de fruta se evaluó mediante HPLC analítica (Fig. 1) y LC-ES/MS en tándem (Figs. 2 y 3). Las identidades del compuesto se confirmaron por análisis LC-ES/MS en los que dos iones a M-H m/z 1083 representaban los anómeros α y β de la punicalagina (1) como se ha indicado anteriormente. Los componentes minoritarios en el TTG eran ácido elágico (4) (M-H m/z 301), punicalina (2) (M-H m/z 781) y glucósidos de ácido elágico (hexósido, M-H m/z 463; ramnósido, M-H m/z 447 y pentósido, M-H m/z 433) que se correspondían con informes previos (Fig. 2).

Se realizaron estudios de cuantificación sobre el TTG usando anómeros aislados de punicalagina (1) (Fig. 1 B) cuyos análisis espectrales de RMN y MS-MS confirmaron su identidad y una muestra disponible en el comercio de ácido elágico (4) (Fig. 1C). El TTG contiene el 85 % p/p de los anómeros de punicalagina y el 1,3 % p/p de ácido elágico. El espectro de RMN del ^{13}C de la punicalagina aislada de TTG, reveló los dos carbonos anoméricos a δ 90,2 y a δ 94,4 correspondientes a la α - y β - punicalagina, respectivamente. La punicalagina [2,3-(S)-hexahidroxidifenoíl-4,6-(S,S)-galagil-D-glucosa] puede considerarse que tiene un resto de hexahidroxidifenoilo unido a la galagilglucosa (punicalina). Estudios MS-MS de la punicalagina (1) a M-H m/z 1083 mostraron iones correspondientes a la punicalina (2) a M-H m/z 781, al ácido galágico (3) a M-H m/z 601 y al ácido elágico (4) a M-H m/z 301, como se muestra en las Figs. 3A y B.

En conclusión, los autores de la invención han desarrollado un nuevo método rápido para aislar grandes cantidades de taninos totales de granada (TTG) de cáscaras de fruta que contienen altos niveles de punicalagina, el principal tanino de la granada consumido por los seres humanos. Dadas las propiedades biológicas de los taninos de la granada como fuertes oxidantes y sus efectos sobre enfermedades tales como aterosclerosis y cáncer, este método permitiría a los investigadores acceder a grandes cantidades de TTG para su uso potencial en modelos apropiados *in vivo* para estudios relacionados con la salud. Además, sería factible perfeccionar este método, que puede ser práctico para aplicaciones industriales. Esto proporcionaría un medio rentable para usar un subproducto alimenticio actualmente infrautilizado para desarrollar productos comerciales incluyendo nuevos productos nutricionales con posibles beneficios para la salud.

Referencias

- M.I.Gil, F.A. Tomas-Barberan, B. Hess-Pierce, D.M. Holcroft, A.A. Kader, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 4581.
 B. Cerda, J.J. Ceron, F.A.Tomas-Barberan, J.C. Es-pin, J. Agric. Food Chem. 51(2003) 3493.
 5 B. Cerda, R. Llorach, J.J. Ceron, J.C. Espin, F.A.To-mas-Barberan, Eur. J. Nutr. 42, (2003) 18.
 T. Okuda, en: O. Hajime (Ed.) International Conference on Food Factors: Chemistry and Cancer Prevention, Springer Publishers, Japón, 1995, p. 280.
 M. Aviram, L. Dornfield, Atheroclerosis (2001) 195.
 P.S. Negi, G.K. Jayaprakasha, B.S. Jena, Food Chemistry, 80 (2003) 393.
 10 A.Vidal, A. Fallarero, B. Pena, A. Medina, B. Gra, F. Rivera, Y. Gutierrez, P. Vuorela, J. Ethnopharm. 89 (2003) 295.
 A. Calbert, C. Morand, C. Manach, C. Cemesy, Biomed Pharmacother. 56 (2002) 276.
 A.J. Doig, D.H. Williams, P.B. Oelrichs, L. Baczyn-skyj, J. Chem. Soc., Perkin Trans.1 1 (1990) 2317.
 L.J. Filippich, J. Zhu, M.T. Asalami, Res. Vet. Sci. 50 (1991) 170.
 15 S.A.A. El-Toumy, H.W.Rauwald, Phytochemistry 61 (2002) 971.
 T. Tanaka, G-I. Nonaka, I. Nishioka, Chem Pharm. Bull. 34 (1986) 650.
 T. Tanaka, G-I. Nonaka, I. Nishioka, Chem Pharm. Bull. 34 (1986) 656.

Ejemplo 2

- 20 Los taninos son polifenoles vegetales divididos en dos grupos química y biológicamente distintos: taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos). A las proantocianidinas también se las denomina taninos catéquicos y son comunes en el té y en frutos que incluyen arándanos, mirtilos, moras y uvas. Los elagitaninos constan de polímeros de glucosa y de ácido elágico, ácido gálico y/o ácidos hexahidroxifenólicos habituales en frutas que incluyen frambuesas, fresas y granadas.

- Los compuestos presentes en la cáscara de la granada incluyen el elagitanino principal, la punicalagina y sus isómeros [2,3-hexahidroxidifenol-4,6-galagilglucosa] (1), así como menores cantidades de punicalina [4,6-galagilglucosa] (2), ácido galágico (3) y ácido elágico (4) y sus glucósidos (hexóxido, pentósido, ramnósido de ácido elágico, etc.). Los zumos de granada comerciales presentan fuertes propiedades antioxidantes atribuidas a su alto contenido de taninos hidrolizables que incluyen los isómeros de punicalagina que pueden alcanzar niveles de > 2 g/l de zumo, dependiendo de la variedad de cultivo de la fruta y de los métodos de procesamiento. La actividad antioxidante superior de las punicalaginas se ha correlacionado con su resto de hexahidroxidifenol y con una gran cantidad de grupos hidroxilo (OH) en su estructura altamente oxidada (1). Los taninos también se han identificado como los compuestos activos en el zumo de granada responsables de la capacidad de este zumo para proteger al colesterol de lipoproteína de baja densidad humano de la oxidación *in vivo*, que es una etapa clave en la patogénesis de la aterosclerosis (5).

MATERIALES Y MÉTODOS

- 40 Reactivos. Todos los disolventes eran de calidad HPLC y se adquirieron en Fisher Scientific Co. (Tustin, CA). Los ácidos elágico, fórmico y acético, las resinas Sephadex LH-20 Lipófila y Amberlite XAD-16 se adquirieron en Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO).
- 45 *Procedimientos experimentales generales.* Se registraron espectros de RMN en instrumental Bruker que funcionaba a 400 MHz para el ^1H y a 150 MHz para el ^{13}C . Los desplazamientos químicos de la punicalagina (1) se registran en acetone- d_6 y eran en δ (ppm) con respecto a los picos del disolvente. Los análisis de HPLC-ESIMS se realizaron en un sistema de LC-MS/MS de LCQ Classic Finnigan (ThermoFinnigan, San José, CA), dotado con un sistema de HPLC de la serie HP 1100 que consistía en un automuestreador/injector, una bomba cuaternaria, un calentador de columna y un detector de matriz de diodos (DAD)). El tratamiento de datos se realizó usando el programa informático Xcalibur 1,2 (Finnigan Corp). Los análisis de HPLC se realizaron en el sistema Waters Alliance 2690 dotado con un detector de matriz de fotodiodos (PDA) (Waters Corp., Milford, MA) y el tratamiento de datos se realizó con el programa informático Waters Millenium v 3,02.
- 50
- 55 Purificación de taninos totales de granada (TTG). Se adquirieron diecisiete frutas frescas de granada (Ruby River, Lot # 3127), se lavaron y se limpiaron para obtener sus cáscaras y arilos separados de las semillas y del zumo. La cáscara (1 kg) se filtró con agua (5 l), se exprimió a mano y después instantáneamente se mezcló (Waring laboratory heavy duty blender, New Hartford, Conn., USA). El espeso puré de cáscara se filtró a través de una estopilla y se exprimió en seco para producir un extracto acuoso amarillo oscuro y un resto que se desechó. Una alícuota de 2 l del extracto acuoso se dividió en porciones de 200 ml y se adsorbió sobre una columna de gravedad de resina Amberlite XAD-16 (500 g) que se equilibró previamente en agua. Cada columna se eluyó con cantidades copiosas de agua destilada (4 l) hasta que el color del eluato amarillo pálido azucarado se volvió transparente. La columna continuó su ejecución en seco y el agua restante se retiró de la resina mediante aspiración al vacío. Los taninos adsorbidos se eluyeron con MeOH (o EtOH; 2 x 400 ml) para producir una solución de color amarillo oscuro. Los disolventes se retiraron al vacío para dar taninos totales de granada (TTG) como un polvo de color marrón oscuro (16,5 g).
- 60
- 65

Purificación de Punicalagina (1). El TTG (300 mg) se absorbió en una columna Sephadex-Lipófila LH-20 previamente equilibrada con H₂O: MeOH (8:2, v/v) y se luyó con cantidades crecientes de MeOH. Los análisis de LC-ES/MS revelaron que la fracción de MeOH al 50 % era rica en dos compuestos, ambos correspondientes al peso molecular de la punicalagina (M-H m/z 1083). Esta fracción (273 mg) se evaporó al vacío y volvió a cromatografiarse, pre-equilibrando en este momento la columna con EtOH. La elución con cantidades crecientes de H₂O y Me₂CO a EtOH: H₂O: Me₂CO (6:3:1, v/v/v) y finalmente a EtOH: Me₂CO (1:1, v/v) produjo un polvo amorfo amarillo (34 mg). Esto se identificó con una mezcla de anómeros α - y β -de punicalagina mediante datos espectrales de RMN ¹H y ¹³C que eran coherentes con los de la bibliografía (7,12)

Condiciones de HPLC para análisis y cuantificación. Todas las muestras (volumen de inyección de 50 μ l) se filtraron (0,22 μ m) y analizaron en una columna C-18 Novapak (Waters Corp.), 150 x 3,9 mm i.d., 5 μ m. La fase móvil, disolvente A (CH₃COOH al 2 %/H₂O) y disolvente B (CH₃COOH acuoso al 2 %/MeOH) se usó en condiciones de gradiente lineal comenzando con el 99 % de A durante 5 min hasta el 40 % de A más de 40 min, tiempo de mantenimiento, 5 min con un caudal de 1,0 ml/min. Todos los compuestos se detectaron a 254 nm, y a 378 nm (punicalaginas) y a 366 nm (ácido elágico) para la cuantificación. La punicalagina aislada pura (1) (2 mg) se pesó de manera precisa y se disolvió en H₂O:MeOH (1:1, v/v) después se diluyó en serie para obtener concentraciones de 0,20, 0,10, 0,05 y 0,025 mg/ml, respectivamente. El ácido elágico (4) (1 mg) se disolvió en DMSO y se diluyó en serie para obtener concentraciones de 0,02, 0,01, 0,005 y 0,0025 mg/ml, respectivamente. Cada muestra se inyectó por duplicado y se obtuvieron curvas de calibración usando sus factores de respuesta (área de pico/concentración) El TTG (1mg) se disolvió en H₂O: MeOH (1:1, v/v), y los porcentajes de área media de la punicalagina (dos picos individuales correspondientes a los anómeros α - y β) y los picos del ácido elágico se usaron para la cuantificación.

Análisis LC-ES/MS. Las condiciones para la detección de taninos fueron las siguientes: Columna, Symmetry C-18, 100 mm x 2.1 i.d., 3,5 μ m, (Waters Corp., Milford, MA); Disolvente A) HCOOH al 2 %/ H₂O, B) HCOOH al 2 %/ MeOH; % de gradiente A: inicial: 99 %, 30 min: 80 %, 45 min: 60 %, 60 min: 5 %; tiempo de ejecución 60 min; caudal de 0,15 ml/min; volumen de inyección 20 μ l; parámetros MS: modo de ionización, electropulverización (ES) en modo negativo; rango de barrido: 120-1.500 uma; velocidad de barrido: 1 barrido/s; voltaje de cono: 17 eV, temperatura de fuente: 275 °C. Se obtuvieron identidades de picos emparejando sus iones moleculares (M-H⁺) obtenidos por ES/MS y MS en tándem con los pesos moleculares teóricos esperados procedentes de los datos bibliográficos como: punicalagina (1) (m/z 1083); punicalina (2) (m/z 781; resto de M-hexahidroxifenóilo); ácido galágico (3) (m/z 601) y ácido elágico (4) (m/z 301) (1,2,7). Los derivados del ácido elágico se correlacionaron con los de la bibliografía (1,2) y se identificaron como hexósido de ácido elágico (m/z 463), ramnósido de ácido elágico (m/z 447) y pentósido de ácido elágico (m/z 433).

Los taninos totales de granada (TTG) purificados de la cascara de frutos se evaluaron por HPLC analítica (Fig. 1A) y LC-ES/MS en tándem (Figs. 2 y 3). El cromatograma HPLC reveló picos predominantes correspondientes a los tiempos de retención de los anómeros aislados puros de punicalagina (1) (Fig. 1B) y a una muestra de ácido elágico disponible en el comercio (4) (Fig. 1C). Las identidades del compuesto se confirmaron por análisis LC-ES/MS con anómeros de punicalagina a m/z 1083 y de ácido elágico a m/z 301, que se corresponden a los de la bibliografía (1,2) (Fig. 2). Los compuestos minoritarios en TTG se identificaron mediante LC-ES/MS como punicalina (2) a m/z 781 y como glucósidos de ácido elágico: hexósido, m/z 463; ramnósido, m/z 447 y pentósido, m/z 433, correspondientes al informe previo (1) (Fig. 2).

Estudios de cuantificación sobre TTG mostraron que contenía el 80 % p/p de anómeros de punicalagina y el 1,3 % p/p de ácido elágico. Para estudios de cuantificación, la punicalagina pura se aisló de TTG y los análisis espectrales de RMN y MS-MS confirmaron su identidad, como se ha indicado anteriormente (2, 7,12). La punicalagina [2,3-(S)-hexahidroxidifenóilo-4,6-(S,S)-galagil-D-glucosa] puede considerarse que tiene un resto de hexahidroxidifenóilo unido a la galilglucosa (punicalina). Estudios de MS-MS de punicalagina (1) a m/z 1083 mostraron iones correspondientes a la punicalina (2) a m/z 781 (punicalagina menos el fragmento hexahidroxidifenóilo), ácido galágico (3) a m/z 601 y ácido elágico (4) a m/z 301 como se muestra en la Figura 3. Como se ha indicado anteriormente, la punicalagina en solución se interconvierte rápidamente a los anómeros α - y β . El espectro de RMN ¹³C de la punicalagina, aislada de TPT, reveló los dos átomos anoméricos a δ 90.2 y δ 894.4 correspondientes a la punicalagina α - y β , respectivamente.

(1) Gil, M.I.; Tomas-Barberan, F.A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D.M.; Kader, A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing J-Agric. Food Chem. 2000, 48, 4581-4589.

(2) Cerda, B.; Ceron, J.J.; Tomas-Barberan, F.A.; Espin, J.C. Repeated oral administration of high doses of pomegranate elagitanina punicalagina to rats for 37 days is not toxic J. Agric-Food Chem. 2003, 51, 3493-3501.

(3) Cerda, B.; Llorach, R.; Ceron, J.J.; Espin, J.C; Tomas-Barberan, F.A. Evaluation of then bioavailability and metabolism in the rat of punicalagina, an antioxidant polifenol from pomegranate juice. Eur. J. Nutr. 2003. 42, 18-28.

(4) Okuda, T. Structure-activity relationship of antioxidant and antitumor polyphenols, Food Factors for Cancer Prevention In: International Conference on Food Factors: Chemistry and Cancer Prevention, Springer Publishers, Ed: Hajime, O.; Japan, 1995, 280-285.

(5) Aviram, M.; Dornfield, L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme

activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 2001, 195-198.

(6) Scalbert, A.; Morand, C; Manach, C; Cemesy, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 2002, 56, 276-282.

(7) Doig, A.J.; Williams, D.H.; Oelrichs, P.B.; Bac-zynskyj, L. Isolation and structure elucidation of punicalagina, a toxic hydrolysable tannin from *Terminalia oblongata*. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1* 1990, 2317-2322.

(8) Filippich, L.J.; Zhu, J.; Asalami, M.T. Hepatotoxic and nephrotoxic principles in *Terminalia oblongata*. *Res. Vet. Sci.* 1991, 50, 170-177.

(9) Negi, P.S.; Jayaprakasha, G.K.; Jena, B.S. Anti-oxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 2003, 80, 393-397.

(10) Vidal, A.; Fallarero, A.; Pena, B.; Medina, A.; Gra, B.; Rivera, F.; Gutierrez, Y.; Vuorela, P. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L.(Punicaceae) whole fruit extracts. *J. Ethnopharm.* 2003, 89, 295-300.

(11) El-Toumy, S.A.A.; Rauwald, H.W. Two ellagi-tannins from *Punica granatum* heartwood. *Phyto-chemistry* 2002, 61, 971-974.

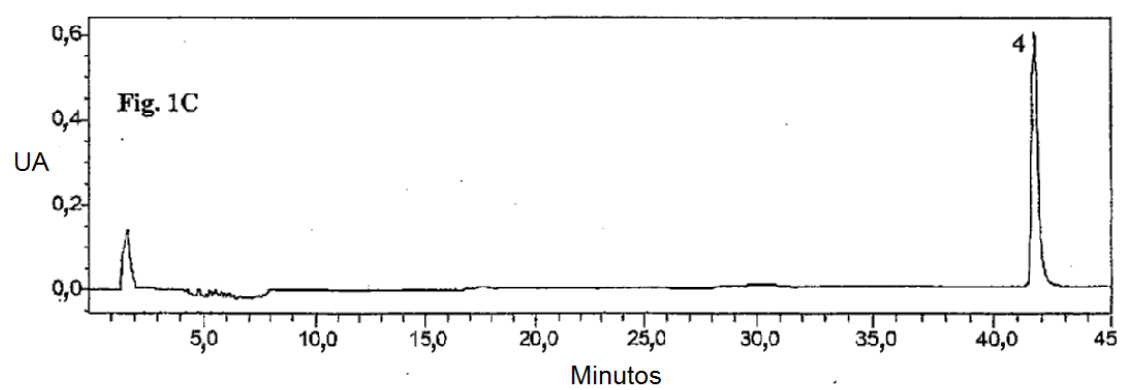
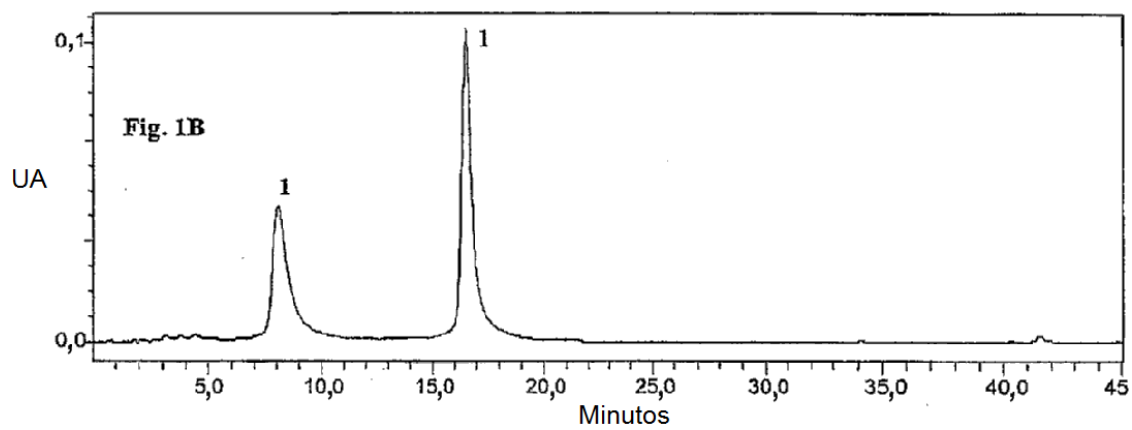
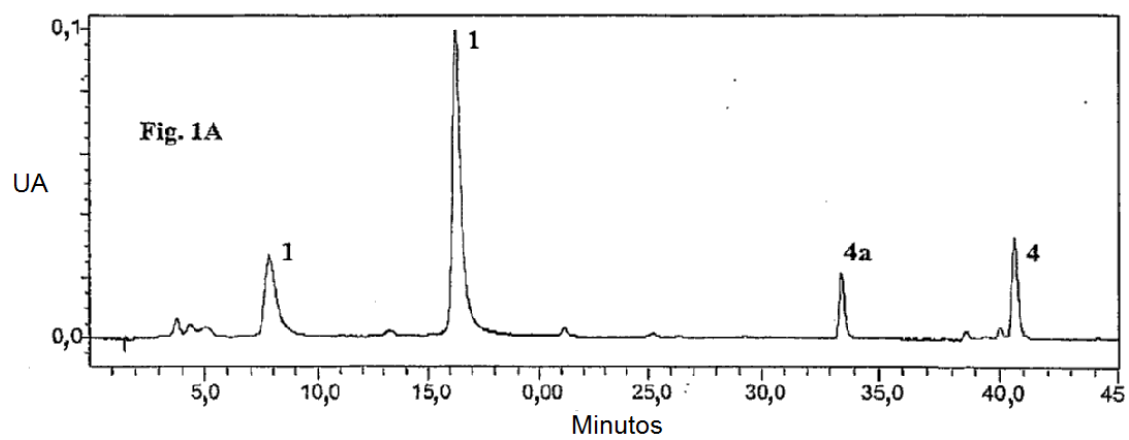
(12) Tanaka, T.; Nonaka, G-I.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagina, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chem Pharm. Bull.* 1986, 34, 650-655.

(13) Tanaka, T.; Nonaka, G-I.; Nishioka, I. Tannins and related compounds. XLI. Isolation and characterization of novel ellagitannins, punicacortins A, B, C, D and punigluconin - from the bark of *Punica granatum* L. *Chem Pharm. Bull.* 1986, 34, 656-663.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción de una composición de elagitaninos, comprendiendo el método:

- 5 preparar una solución acuosa que contenga elagitaninos de cáscaras y arilos de granada;
transferir los elagitaninos de la solución acuosa sobre una superficie de un material de resina adsorbente de
estireno-divinil-benceno reticulado polimérico;
eluir los elagitaninos de la superficie de la resina con un eluyente que es un alcohol que contiene de 1 a 4
átomos de carbono en una solución de elagitaninos eluyente; y
10 separar el eluyente de la solución de elagitaninos eluyente para producir la composición de elagitaninos, en donde la
composición de elagitaninos comprende punicalagina a una concentración de al menos el 10 % en una base de
peso/peso.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la superficie de la resina es una estructura macrorreticular
con una fase polimérica continua y una fase porosa continua.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que la superficie de la resina es de partículas que
tienen un tamaño entre 100 a 200 micras.
20 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha solución acuosa contiene los
elagitaninos y se obtiene por el método de:
25 romper las cáscaras de la granada y separar la pulpa; y
extraer los elagitaninos de la pulpa en una solución acuosa.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el alcohol es etanol.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las partículas de resina están en
30 forma de una columna.
7. El método de acuerdo con una cualquiera reivindicaciones 1 a 6, que comprende adicionalmente la etapa de lavar
los elagitaninos con un tampón acuoso, después de transferirlos y antes de la elución de la superficie de la resina.
- 35 8. Una composición que comprende una composición de elagitaninos de granada preparada de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición incluye elagitaninos a una concentración de al
menos aproximadamente el 30 %.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende un extracto de taninos totales de granada
40 (TTG).
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende punicalagina a una concentración de al
menos 20 % en peso del peso total de la composición.
- 45 11. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9 o 10, en la que dichos elagitaninos se seleccionan del
grupo que consiste en ácido elágico, glucósidos de ácido elágico, punicalina, punicalagina.
12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende ácido elágico y
glucósidos de ácido elágico a una concentración de al menos aproximadamente el 5 % en peso del peso total de la
50 composición.
13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 que comprende adicionalmente
antocianinas y antocianidinas a una concentración de al menos aproximadamente el 5 % en peso del peso total de la
composición.
55 14. Uso de cualquiera de las composiciones de las reivindicaciones 8 a 13 en una formulación farmacéutica,
fitocéutica, nutracéutica o cosmética.



TR: 0,00 - 65,00 SM: 15G

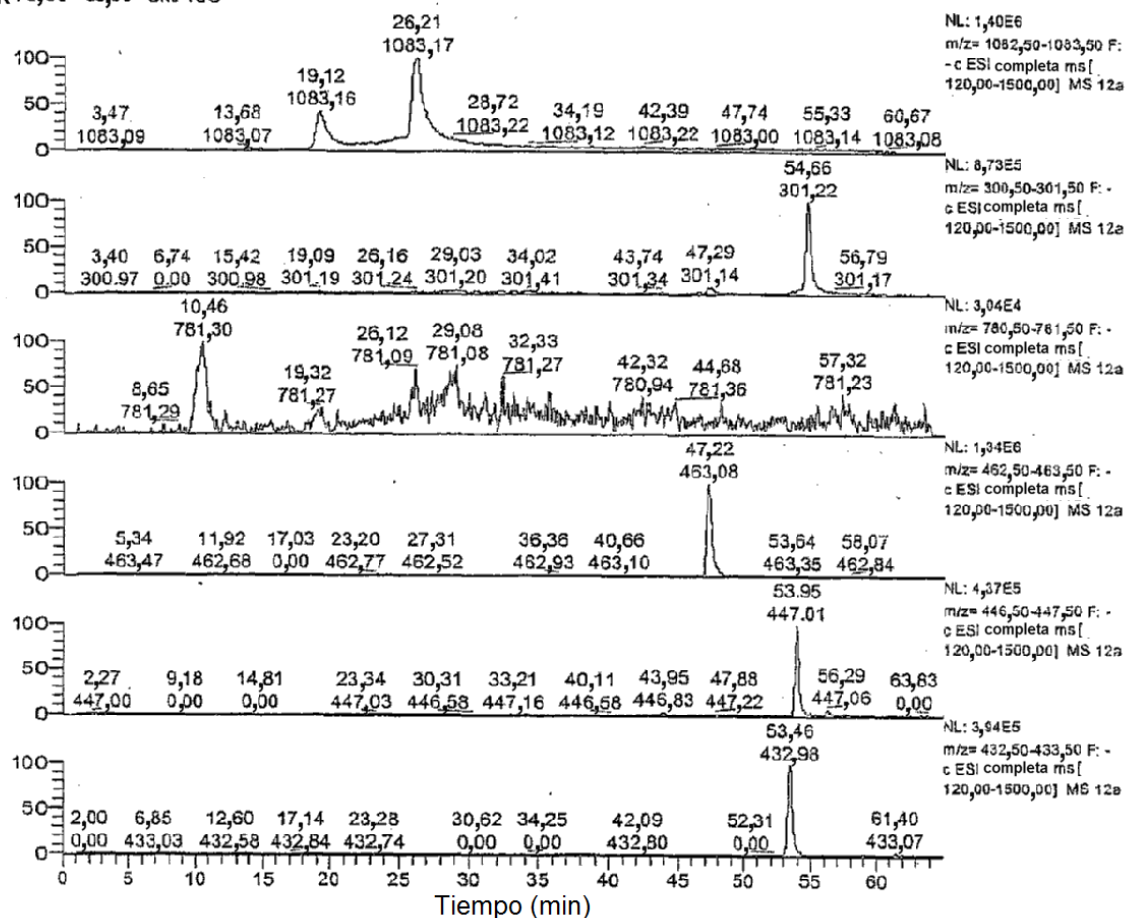


Figura 2

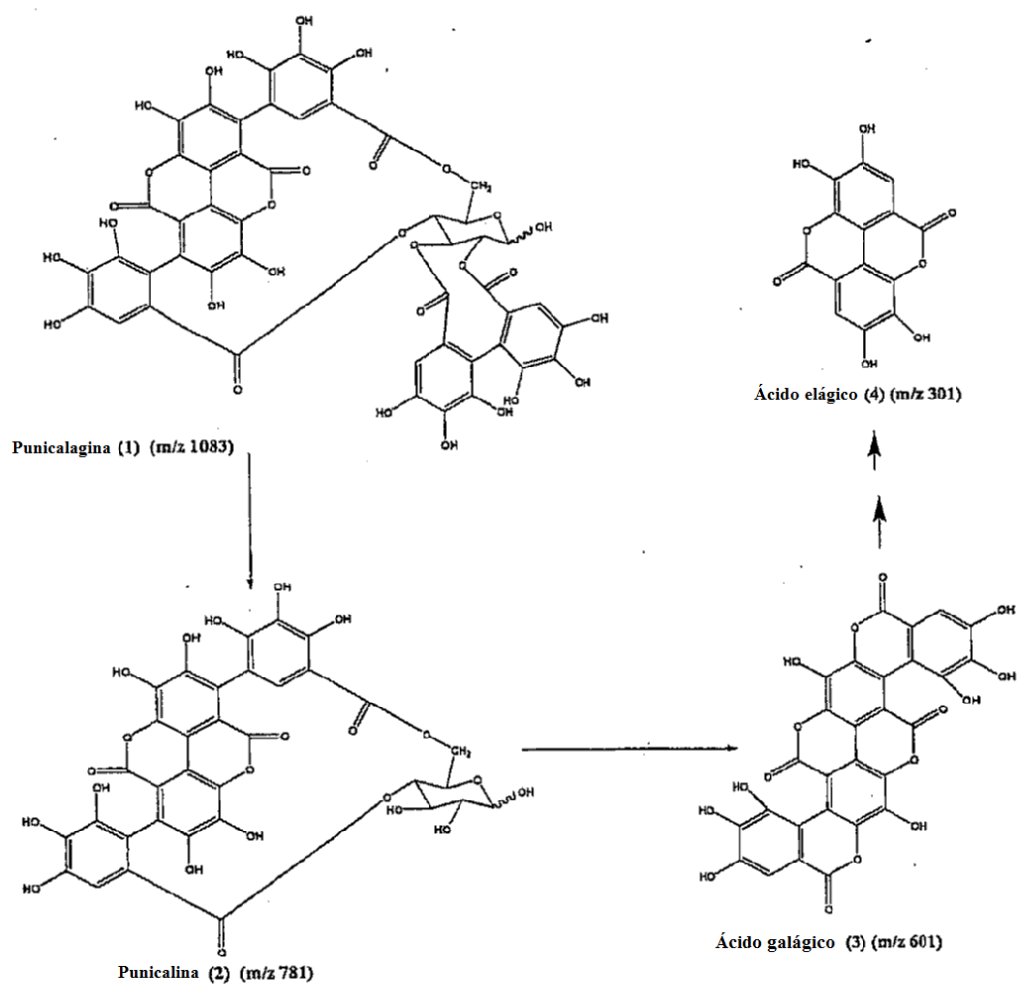


Figura 3A

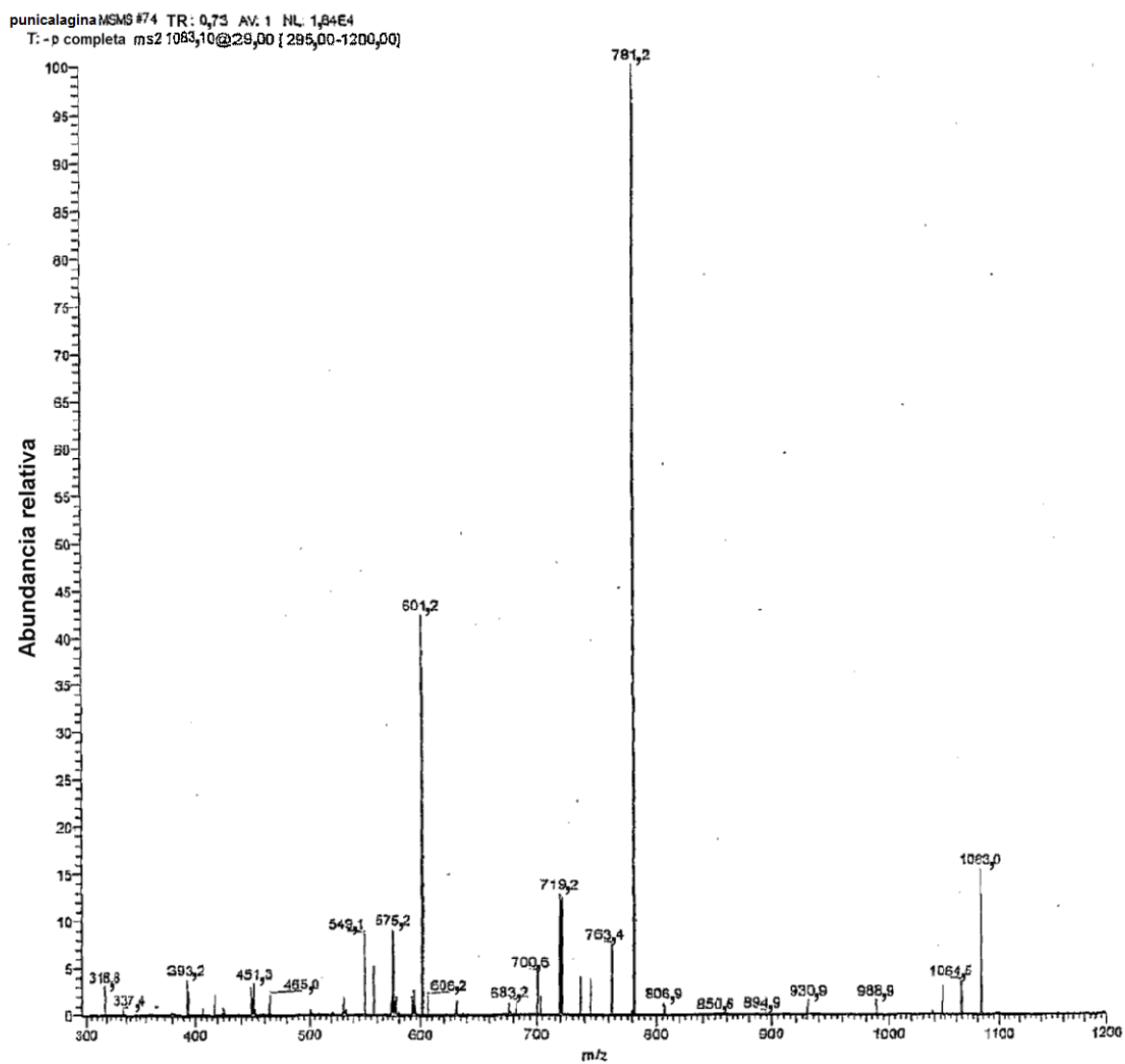


Figura 3B