

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 963**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2008 PCT/IL2008/001033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.02.2009 WO09016620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2008 E 08789709 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2190445**

54 Título: **Brotos de granada, preparaciones procedentes de los mismos y composiciones que los comprenden**

30 Prioridad:

27.07.2007 US 935153 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2017

73 Titular/es:

**THE STATE OF ISRAEL-MINISTRY OF
AGRICULTURE & RURAL DEVELOPMENT
(100.0%)
AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION,
VOLCANI CENTER, P.O. BOX 6
50250 BEIT-DAGAN, IL**

72 Inventor/es:

**VINOKUR, YAKOV;
RODOV, VICTOR;
HOREV, BATIA;
GOLDMAN, GENADY y
AHARONI, NEHEMIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 643 963 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

Brotes de granada, preparaciones procedentes de los mismos y composiciones que los comprenden

- 5 La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a brotes de granada y a preparaciones procedentes de los mismos y, más particularmente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos.

La granada (*Punica granatum* L.) se cultiva ampliamente en todo el mundo y sus partes comestibles se han utilizado ampliamente en las medicinas tradicionales así como en la industria alimentaria. Por ejemplo, los chinos han
10 utilizado la granada como un producto tradicional en aplicaciones antibacterianas, antiinflamatorias y homeostáticas.

En la industria alimentaria funcional, la granada está incluida en la nueva categoría de superfrutas, por lo tanto, comprende una riqueza excepcional de nutrientes y de calidad antioxidante, junto con un sabor atractivo.

- 15 La parte comestible de los frutos de granada (aproximadamente el 50 % del peso total del fruto) se compone de semillas jugosas (arilos) que comprenden el 80 % de carne jugosa y el 20 % de semillas verdaderas. El jugo de granada fresco contiene azúcares (es decir fructosa y glucosa), ácidos orgánicos (tales como ácidos cítrico, málico, oxálico y tartárico), calcio, aminoácidos (principalmente ácido glutámico y ácido aspártico), pectina, ácido ascórbico y polifenoles solubles [principalmente antocianinas (tales como cianidin-3-glucósido, cianidin-3,5-diglucósido y delphinidin-3-glucósido), catequinas y otros flavonoides, ácidos gálico y elágico y sus derivados]. De hecho, el jugo
20 obtenido solo de los arilos contiene únicamente trazas de elagitaninos, pero el jugo obtenido de frutos enteros, incluyendo la cáscara, es rico en elagitaninos [Gil *et al.*, J Agric Food Chem (2000) 48: 4581-4589]. Las semillas de granada son una rica fuente de lípidos, proteínas, fibras brutas, pectina y azúcares. Además, las semillas de granada contienen el esteroide estrógeno estrona, fitoestrógenos de isoflavona, genisteína y daidzeína y el coumestrol fitoestrogénico [Kasai *et al.*, J Nutr Sci Vitaminol (2006) 52(5): 383-8; patente de Estados Unidos n.º
25 6.361.807]. Las cáscaras de la granada son una fuente rica de fenólicos, sin embargo, son muy astringentes.

- Los extractos de diferentes partes de la fruta de la granada, incluyendo el jugo [Gil *et al.*, citado anteriormente; Aviram *et al.*, Am J Clin Nutr (2000) 71: 1062-1076], la semilla [Wang *et al.*, J Nat Prod (2004) 67: 2096-2098] y la
30 cáscara [Singh *et al.*, J Agric Food Chem (2002) 50: 81-86] han demostrado previamente mostrar una fuerte actividad antioxidativa. Además, se ha demostrado que la corteza de granada es muy rica en elagitaninos y galotaninos [Tanaka *et al.*, Chem Pharm Bull (1986) 34: 656-663].

- La patente de Estados Unidos n.º 6.977.089 desvela extractos de granada de frutos enteros de granada (incluyendo
35 cáscaras y semillas internas y externas) para el tratamiento de la aterosclerosis, afecciones relacionadas con las arterias y para disminuir la frecuencia de ictus o infarto en pacientes.

- La patente de Estados Unidos n.º 6.800.292 desvela agentes dermatológicos que comprenden un extracto de árbol
40 frutal (por ejemplo, granada) para tratar trastornos dermatológicos. El extracto puede obtenerse de la fruta, la piel o cáscara del fruto, las semillas, la corteza, las hojas, las raíces o el tallo.

- La patente de Estados Unidos n.º 6.818.234 desvela complementos alimentarios que contienen uno o más extractos
45 de fruta (por ejemplo granada) útiles para el alivio del dolor y anti inflamación. De acuerdo con la patente de Estados Unidos n.º 6.818.234, los complementos alimentarios se extraen de las plantas mediante un proceso que incluye pasar una solución (por ejemplo jugo de fruta) a través de una membrana de ultrafiltración y después pasarla a través de una membrana de ósmosis inversa.

La técnica anterior relacionada se detalla en [http://ccne\(dot\)mofcom\(dot\)gov\(dot\)cn/206573/p1270843\(dot\)html](http://ccne(dot)mofcom(dot)gov(dot)cn/206573/p1270843(dot)html).

- 50 El documento US 5725895 se refiere a un método de preparación de un producto alimenticio rico en glucosinolatos en el que se hacen germinar semillas de crucíferas, con la excepción de semillas de repollo, berro, mostaza y rábano, y se recogen los brotes antes de la fase de dos hojas, para formar un producto alimenticio que contiene una pluralidad de brotes.

- 55 El documento CN 101036446 desvela un método de propagación rápido de guayaba que comprende las siguientes etapas: seleccionar una cabina de luz diurna o un invernadero de 70 % de transmitancia, sumergir el esqueje en un agente enraizador e insertarlo en el medio, mantener la humedad relativa interior a 85 %-100 %, la temperatura a 25-40 grados, manteniendo la temperatura interior a 25-35 grados después del enraizamiento, la humedad relativa a 75-85 %, trasplantando el esqueje fuera del invernadero para cultivar después de que se produzca la raíz lateral. La
60 tasa de propagación es rápida, la tasa de enraizamiento y de supervivencia de trasplante son altas en el método.

- El documento CN 101011095 se refiere a un método para preparar té de granada, que comprende a), recoger
65 gérmenes frescos de granada como material; b), eliminar el agua poniendo los gérmenes frescos en el dispositivo de microondas para eliminar el agua a 120-140 °C durante 1-5 min., hasta que el contenido acuoso sea de 55-65 %; c), enrollar y retorcer poniendo los gérmenes frescos y el té general deshidratado en la torsionadora, mientras que los gérmenes frescos tienen una calidad total de 50-100 % y el té general tiene una calidad total de 0-50 %; d), peinar y

secar, de manera que el peinado y secado del producto de la etapa c mediante una máquina especial se encuentre a una temperatura de secado de 150-180 °C hasta que el contenido acuoso sea de 9-15 %; e), cocer a 60-80 ° C hasta que el contenido acuoso sea de 4-6 %. La divulgación utiliza microondas para deshidratar, calentando el té uniformemente a una temperatura controlable. Y la divulgación utiliza solo un proceso de deshidratación.

5 NAIK *ET AL.*, se refieren a "inhibidores de etileno, AgNO₃ y aminoetoxivinilglicina que estimulan la organogénesis directa de brotes adventicios en explantes de cotiledones de un árbol frutal, la granada (*Punica granatum* L. cv. Ganesh)", IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY ANIMAL, (2004), vol. 40, página 61A.

10 NAIK *ET AL.*, se refieren a "la proliferación de brotes axilares de alta frecuencia y regeneración de plantas de nodos de cotiledones de granada" (*Punica granatum* L.), SCIENTIA HORTICULTURAE, (2000), vol. 85, páginas 261 - 270,

MURKUTE *ET AL.*, se refieren a "la exudación y tostado en cultivo tisular de granada", AGRICULTURAL SCIENCE DIGEST, (200303), vol. 23, no. 1, páginas 29-31.

15 Naik *et al.*, se refieren a "nitrato de plata y aminoetoxivinilglicina que promueven la regeneración adventicia *in vitro* de brotes de granada (*Punica granatum* L.)", DATABASE CAPLUS, CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US, registro de base de datos n.º 2003: 447005.

20 Sharon *et al.*, se refieren a "regeneración de plantas de nodos cotiledonares de *Punica granatum* L.", DATABASE CAPLUS, CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US, registro de base de datos n.º 2001: 493467.

25 MARS M, se refiere a "material vegetal de granada: fuentes genéticas y reproducción, una revisión" OPTIONS MEDITERRANEENNES: PRODUCTION, PROCESSING AND MARKETING OF POMEGRANATE IN THE MEDITERRANEAN REGION: ADVANCES IN RESEARCH AND TECHNOLOGY, (20000101), vol. 42, páginas 55 - 62.

30 LANSKY E P *ET AL.*, se refieren a "*Punica granatum* (granada) y a su potencial para la prevención y el tratamiento de inflamación y cáncer", JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS LTD, IE, vol. 109, n.º 2.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método de producción de brotes de granada, comprendiendo el método:

- 35 (a) hacer germinar semillas de granada en la oscuridad hasta que aparezcan brotes con cotiledones, en donde dicha germinación se efectúa durante 6 a 21 días;
- (b) exponer dichos cotiledones a la luz durante 30 minutos a ocho horas para obtener brotes expuestos a la luz;
- 40 (c) incubar en la oscuridad durante 24 a 48 horas dichos brotes expuestos a la luz; y
- (d) recoger dichos brotes de granada, produciendo de este modo los brotes de granada.

La presente invención también se refiere a un brote de granada producido de acuerdo con el método anteriormente mencionado.

45 Preferentemente dicho brote de granada comprende una actividad antioxidativa mayor de 30 µM equivalentes Trolox [TE]/g de peso fresco, en el que el brote comprende cotiledones. La presente invención también se refiere a un alimento o producto alimenticio que comprende el brote de granada de la reivindicación 2 o 3.

50 Preferentemente dicha luz se selecciona del grupo que consiste en luz solar, luz ultravioleta de un intervalo de longitud de onda de 280 a 400 nm y luz artificial de un intervalo de longitud de onda de 380 a 750 nm de irradiación de al menos 30 W/m².

Preferentemente, las semillas de los brotes germinan durante 6 a 13 días.

55 Preferentemente, el brote de granada comprende al menos 0,3 mg de vitamina C por g de peso fresco.

Preferentemente, el brote de granada comprende al menos 16 mg de ácido gálico por g de peso seco.

Preferentemente, el brote de granada comprende al menos 4 mg de punicalagina por g de peso seco.

60 Preferentemente, el brote de granada comprende al menos 19 mg de flavonoides por g de peso seco.

Preferentemente, el brote de granada comprende al menos 23 mg de ácido elágico por g de peso seco.

65 Preferentemente, el brote de granada comprende al menos 0,40 mg de vitamina E por g de peso fresco.

Preferentemente, el método comprende homogeneizar o secar dichos brotes de granada después de la etapa (d).

Preferentemente, dicho secado es liofilización o deshidratación osmótica.

- 5 El alimento o producto alimenticio de la reivindicación 4, en el que dicho brote de granada se produce por el método de la reivindicación 13 o 14.

Preferentemente dicho alimento o producto alimenticio comprende además un ácido orgánico de calidad alimentaria en el que los brotes se han homogeneizado.

10 Breve descripción de los dibujos

En la presente memoria descriptiva se describen algunas realizaciones de la invención, como ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que las particularidades mostradas son como ejemplo y con fines de descripción ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo se pueden llevar a cabo las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

20 Las FIGS. 1A-F son flujogramas que ilustran un proceso ejemplar mediante el cual se genera la preparación de alimentos de las presentes enseñanzas a partir de frutos de granada. El proceso comienza con 1 kg de fruta fresca de granada (Figura 1A) del cual se puede extraer jugo fresco (Figura 1B). Se pueden obtener aproximadamente 50 g de semillas (Figura 1C) del residuo de extracción del jugo por separación de las cáscaras y los residuos (Figura 1D). A continuación, se hace germinar estos 50 g de semillas (tal como se describe más adelante en la sección de materiales y métodos de la presente memoria descriptiva) para generar aproximadamente 150 g de brotes de granada (Figura 1E). A continuación se producen preparaciones alimenticias a partir de los brotes de granada, por ejemplo, por liofilización o deshidratación osmótica, o por homogenización de brotes enteros, o solo de cotiledones (Figura 1F). Debe destacarse que, el secado produce aproximadamente 20-30 g de material seco, la deshidratación osmótica produce aproximadamente 30-35 g de material seco, mientras que la homogenización produce aproximadamente 150 g de homogeneizado procedente de granada entera o aproximadamente 50 g de homogeneizado procedente de cotiledón. Es importante destacar que además del jugo de granada obtenido de los mismos frutos se obtienen las preparaciones de brotes (representado por el signo +).

35 Las FIGS. 1G-I son flujogramas que comparan la generación de jugo de granada según métodos tradicionales (por ejemplo, descritos en la sección Antecedentes) en comparación con algunas realizaciones de las presentes enseñanzas. La Figura 1G representa una estrategia tradicional para producir jugo de granada presionando el jugo de la fruta entera o de los arilos. Este jugo de granada es rico en antioxidantes hidrosolubles pero no tiene antioxidantes lipófilos (por ejemplo, vitamina E); la Figura 1H representa otra estrategia tradicional en la que se añade extracto de semilla (aceite de semilla) al jugo de granada. Esta adición enriquece el jugo con antioxidantes lipófilos, pero tiene un efecto menor sobre la actividad antioxidativa total y puede añadir un sabor amargo al jugo; la Figura 1I representa los métodos de acuerdo con algunas realizaciones de las presentes enseñanzas. Por lo tanto, la adición de preparaciones de brotes de granada al jugo de granada enriquece el jugo con antioxidantes lipófilos y duplica la actividad antioxidativa total.

45 Las FIGS. 2A-B son imágenes que representan la aparición de brotes de granada. La Figura 2A representa los brotes de granada que comprenden cotiledones (hojas de semilla), hipocótilos (tallos embrionarios) y radículas (raíces embrionarias). La Figura 2B representa el crecimiento de los brotes de granada sobre un sustrato de perlita porosa.

50 La FIG. 3 es un gráfico de barras que representa la actividad antioxidativa de los brotes de granada en comparación con otros brotes cultivados comercialmente procedentes de brócoli, alfalfa y soja. Todos los brotes se cultivaron en las mismas condiciones de cultivo.

Las FIGS. 4A-C son figuras que representan el efecto de la fase de desarrollo y las condiciones de iluminación en los brotes de granada. La Figura 4A es un gráfico lineal que representa la actividad antioxidativa de los brotes de granada en diferentes fases de desarrollo desde la semilla hasta el brote. Además, el gráfico ilustra el efecto de iluminación sobre la actividad antioxidativa de los brotes. Las Figuras 4B-C son imágenes que representan la aparición de brotes de granada cultivados constantemente en la oscuridad (Figura 4B) o con una exposición de 3 horas a la luz solar seguido de 24 horas más en la oscuridad (Figura 4C).

55 Las FIGS. 5A-J son flujogramas que representan esquemáticamente el proceso que se utiliza para extraer antioxidantes lipófilos e hidrófilos de brotes de granada o de preparaciones de brotes de granada para medir su actividad. Las Figuras 5A-B representan los brotes de granada frescos homogeneizados en tampón acetato a pH 4,3; la Figura 5C representa la extracción/deshidratación del homogeneizado con tres partes sucesivas de acetona, cada etapa seguida de centrifugación y recogida del sobrenadante; la Figura 5D representa la agrupación de las fracciones de sobrenadante acetona-agua de las tres extracciones; la Figura 5E representa la extracción del sedimento deshidratado tres veces con hexano y los sobrenadantes se recogieron y se agruparon; la Figura 5F representa la extracción de las trazas de compuestos lipófilos a partir del extracto de acetona-agua agrupado por separación con hexano; las Figuras 5G-H representan la fracción no polar obtenida de esta

operación sometida a otra separación con agua para extraer las trazas de compuestos hidrófilos; las Figuras 5I-J representan las dos muestras que se obtuvieron, hidrófila (extracto de agua/acetona, Figura 5I) y lipófila (extracto de hexano, Figura 5J).

5 Descripción de formas de realización específicas de la invención

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a brotes de granada y a preparaciones procedentes de los mismos y, más particularmente, pero no exclusivamente al uso de los mismos.

10 Los principios y funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones acompañantes.

Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La invención puede tener otras realizaciones o llevarse a la práctica o realizarse de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología que se emplea en la presente memoria descriptiva tienen fines descriptivos y no debe considerarse como limitativa.

Aunque reduciendo la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto que los brotes de granada y las preparaciones procedentes de los mismos comprenden una fuente excepcionalmente alta de actividad antioxidativa sin ser astringentes ni amargos. Esta actividad antioxidativa comprende antioxidantes tanto hidrófilos como lipófilos y es significativamente más alta que la de la fruta o semilla de la granada, brotes de brócoli, brotes de alfalfa, brotes de soja, futas de fresas y aguacate. De este modo, los brotes de granada y las preparaciones procedentes de los mismos pueden servir como alimentos o productos alimenticios y/o aditivos alimentarios que comprenden altos valores nutricionales.

Como se muestra a continuación en la presente memoria y en la siguiente sección de Ejemplos, los presentes inventores han mostrado que los brotes de granada de la presente invención (Figuras 2A-B), que se cultivan en un ciclo de oscuridad, luz, oscuridad (Figura 4A), comprenden una actividad antioxidativa total de aproximadamente 75 $\mu\text{M TE/g}$ de peso fresco. Esta actividad antioxidativa es diez veces mayor que la de los brotes de brócoli, soja y alfalfa (Figura 3), 3-4 veces mayor que la de la fruta de la fresa (Tabla 2, más adelante) y significativamente mayor que la de la fruta del aguacate (Tabla 2, más adelante). La actividad antioxidativa de los brotes de granada comprende componentes hidrófilos (por ejemplo vitamina C, compuestos fenólicos) y componentes lipófilos (por ejemplo vitamina E, carotenoides) y las preparaciones obtenidas a partir de estos brotes de granada proporcionan una rica fuente de antioxidantes. Se demostró que las preparaciones de brotes de granada comprendían antioxidantes tanto hidrófilos como lipófilos, incluyendo las vitaminas C y E, compuestos fenólicos, incluyendo ácido gálico, ácido elágico, punicalaginas, flavonoides (véanse las Tablas 1-3, más adelante y las Figuras 1A-I). Todos estos hallazgos confirman el uso de brotes de granada y preparaciones procedentes de los mismos para su uso como alimentos o productos alimenticios y/o complementos dietéticos.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para producir una preparación de brotes de granada, comprendiendo el método: proporcionar brotes de granada y procesar los brotes de granada, produciendo de este modo la preparación de brotes de granada.

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "granada" se utiliza indistintamente con *Punica granatum*.

La expresión "brote de granada" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una fase de desarrollo de una planta de granada que varía desde una semilla germinadora hasta una plántula que tiene al menos dos hojas, es decir, los cotiledones. El brote de granada según las presentes enseñanzas, comprende al menos un par de cotiledones (hojas de semilla), hipocótilos (tallos embrionarios) y radículas (raíces embrionarias) o un brote entero.

La frase "preparación de brotes de granada" como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición que procede de un brote de granada en el que hay al menos alguna rotura de membranas vegetales.

Los brotes de granada pueden producirse de la siguiente manera. El método comprende: hacer germinar semillas de granada en la oscuridad hasta la aparición del brote, exponer los brotes a la luz para obtener brotes expuestos a la luz; incubar en la oscuridad los brotes expuestos a la luz y recoger los brotes de granada, produciendo así los brotes de granada.

Las semillas de granada se encuentran disponibles en el comercio, por ejemplo, en [http://www\(dot\)thompson-morgan\(dot\)com](http://www(dot)thompson-morgan(dot)com), [http://seedrack\(dot\)com](http://seedrack(dot)com).

Como alternativa, las semillas de granada pueden obtenerse de los arilos solo o de la fruta entera de la granada. Los arilos se obtienen de granadas después de la separación de la cáscara, los arilos se extraen para obtener el jugo y las semillas se separan de la carne residual restante (como se describe en detalle más adelante y en las Figuras 1A-

D). Si las semillas se obtienen de la fruta entera de la granada, la fruta entera (incluyendo las cáscaras) se presiona típicamente primero para extraer el jugo y después las semillas se separan de todos los residuos de la granada, incluyendo la carne residual restante.

A continuación, se limpian las semillas separándolas de la materia de carne jugosa residual y se diluyen los recubrimientos de semillas utilizando, por ejemplo, digestión alcalina (por ejemplo, solución alcalina al 20 % tal como NaOH o KOH) y separando mecánicamente las semillas de la carne parcialmente digerida por abrasión contra la superficie rugosa. Es aconsejable que dicho proceso se realice en condiciones de frío (por ejemplo en hielo) para evitar el calentamiento de las semillas por encima de 40 °C (lo cual puede afectar a la capacidad de germinación de las semillas). Para neutralizar y obtener semillas para la germinación, se puede utilizar ácido sulfúrico seguido de un lavado con agua. Las semillas se pueden secar al aire a aproximadamente 22-28 °C hasta que no se observe ningún cambio adicional de peso (precisión de pesado $\pm 0,1$ g por muestras de semillas de 50 g), típicamente durante 2 a 3 días. Estas semillas, listas para la germinación, pueden almacenarse a aproximadamente 4 °C durante un máximo de 1-2 años.

A continuación, se siembran las semillas (a una densidad, por ejemplo, DE 4-5 semillas/cm²) sobre un soporte sólido empapado en medio de crecimiento (como se describe con detalle a continuación), permitiendo el acceso de aire, a una temperatura y humedad controladas (como se describe con detalle en el Ejemplo 1 de la sección Ejemplos a continuación), en la oscuridad hasta que aparezcan brotes con cotiledones. Típicamente, los brotes con cotiledones aparecen a un intervalo de 6-21 días o 6-18 días o 6-13 días. En una realización ejemplar, el intervalo comprende 6-18 días.

Un medio de crecimiento adecuado para germinar los brotes de granada típicamente contiene agua (por ejemplo, agua corriente). Dependiendo de la calidad del agua corriente local puede ser necesaria una purificación adicional del agua para desmineralizar el agua y/o para eliminar el cloro, los residuos orgánicos u otros contaminantes. En realizaciones ejemplares, el agua carece de contaminantes microbianos.

Típicamente, los brotes de granada germinan sobre un soporte sólido no nutritivo que proporciona acceso al aire, tal como una esponja, un material similar a una esponja, agar, una red, una toalla de papel, papel secante, vermiculita, perlita, etc., con agua suministrada. Además, el soporte sólido no nutritivo puede comprender celulosa que puede aplicarse en forma de almohadillas, láminas o partículas, tales como las descritas, por ejemplo, en la patente holandesa n.º 1001570.

La germinación de los brotes de granada se realiza típicamente a una temperatura que varía entre 15-55 °C, variando entre 20-30 °C o entre 22-27 °C. Además, las semillas de granada germinan a una humedad elevada de al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 100 %. En una realización ejemplar, la humedad es de al menos 90 %. La germinación se puede realizar adecuadamente en una celda o sala de germinación con temperatura y humedad controladas como se describe en la presente memoria. La germinación se realiza hasta la fase de un brote con los cotiledones enrollados que emergen del recubrimiento de la semilla, típicamente el recubrimiento de la semilla cae del brote.

Después de la germinación, los brotes de granada se exponen a la luz para obtener brotes expuestos a la luz. Un ejemplo de intervalo de luz nm que puede emplearse incluye de 280 a 750 nm, que corresponde a luz solar, luz artificial o luz ultravioleta. Por ejemplo, los brotes de granada pueden colocarse en cualquier lugar que sea visible a la luz solar (es decir, al interior o al exterior), a cualquier hora del día y en cualquier condición climática. Del mismo modo, los brotes de granada pueden exponerse a luz artificial, incluyendo, por ejemplo, luz interior débil o luz tenue, tal como una longitud de onda que varía de 380 a 750 nm e irradiación de al menos 20 W/m², al menos 30 W/m², al menos 40 W/m² o al menos 50 W/m². Además, los brotes de granada pueden exponerse a luz ultravioleta de longitud de onda comprendida entre 280 y 400 nm, comprendida entre 280-315 nm (es decir, UV-B) o 315-400 nm (es decir, UV-A). De acuerdo con una realización ejemplar, los brotes se exponen a la luz a una temperatura por encima de aproximadamente 10 °C.

De acuerdo con las presentes enseñanzas, los brotes de granada se exponen a la luz durante un periodo de al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 7 horas o al menos 8 horas.

Después de la exposición a la luz, los brotes de granada se incuban adicionalmente en la oscuridad para obtener brotes de granada con actividad antioxidativa máxima (descrita en detalle más adelante). Dicha incubación puede realizarse durante un periodo de al menos 6 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas o al menos 48 horas.

Una vez que los brotes de granada han germinado y crecido, los brotes de granada se recogen. La recogida de los brotes de granada se efectúa por separación del sustrato recogiendo los brotes enteros (incluyendo cotiledones, hipocótilos y radículas). Como alternativa, las partes de los brotes de granada pueden separarse (por ejemplo, cotiledones, cotiledones más hipocótilos, etc.). La recogida de los brotes de granada puede efectuarse utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, corte, tracción, recorte o rasgado. Se

apreciará que antes de la recogida de los brotes de granada, el crecimiento de los brotes puede detenerse, por ejemplo, enfriando los brotes de granada a aproximadamente 4 °C, durante aproximadamente 7 días. Además, después de la recogida de los brotes de granada, el material recogido puede mantenerse en un entorno enfriado antes del consumo o procesamiento (como se describe en mayor detalle en la presente memoria descriptiva más adelante).

Como se ha indicado anteriormente, después de que los brotes de granada estén disponibles, pueden utilizarse tal cual o pueden procesarse adicionalmente para producir preparaciones ricas en antioxidantes.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "antioxidante" se refiere a un grupo de sustancias que pueden inhibir, prevenir, reducir o mejorar reacciones oxidativas. Como ejemplos de antioxidantes se incluyen vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E, vitaminas A, B (por ejemplo vitamina B₆), flavonoides, selenio y carotenoides (por ejemplo beta-caroteno).

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la frase "actividad antioxidativa" se refiere al acto de neutralizar radicales libres tales como los encontrados en un entorno fisiológico.

El brote de granada puede procesarse en su totalidad, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, las partes ricas en antioxidantes del brote de granada pueden procesarse, tales como, por ejemplo, los cotiledones. Los brotes se procesan típicamente, por ejemplo, mediante secado, homogeneización, trituración o extracción. Los métodos para procesar brotes son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.686.517, la patente de Estados Unidos n.º 5.725.895 y el documento WO 2004/043886) y pueden aplicarse asimismo a los brotes de granada de la divulgación.

Por lo tanto, de acuerdo con las presentes enseñanzas, los brotes de granada pueden secarse. Cualquier proceso de secado conocido en la técnica puede utilizarse para secar los brotes, tales como, por ejemplo, deshidratación osmótica, liofilización, secado con gas inerte, secado al aire o secado al vacío.

Por ejemplo, los brotes de granada pueden secarse al aire colocándolos en un secador de aire comercial aproximadamente a 50 °C hasta que la biomasa contenga menos del 5 % de humedad en peso. Como alternativa, se puede utilizar liofilización para brotes que sean sensibles al secado al aire, por ejemplo, debido al enranciamiento del aceite. Los brotes se pueden liofilizar colocándolos en un secador de vacío y se secan congelados al vacío hasta que la biomasa contenga menos de aproximadamente 5 % de humedad en peso.

Los brotes secos se almacenan para procesamiento adicional como sólidos a granel o se procesan adicionalmente en forma granulada o en forma de polvo por molienda a un polvo de tamaño de malla deseado.

Como alternativa, los brotes de granada pueden homogeneizarse. Pueden emplearse cualquier método conocido en la técnica para homogeneizar los brotes de granada. Por ejemplo, los brotes pueden homogeneizarse tal como están (sin adición de tampón líquido) o complementarse con un tampón de homogeneización que puede comprender, por ejemplo, inhibidores de proteasa (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/043886), o añadiendo volúmenes iguales de etanol para formar tintura. Puede utilizarse cualquier tipo de homogeneizador, por ejemplo, homogeneizador de Brinkman Polytron (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos n.º 5968567).

Ejemplos de realizaciones de las presentes enseñanzas aplican ácido orgánico de calidad alimentaria, por ejemplo ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 0,5 % a 3 % o de aproximadamente 1 % a 2 %, para lograr la homogeneización de los brotes de granada. Las presentes enseñanzas también aplican homogeneización en tampón acetato a pH 4,3 a una concentración de 50 mM. También se pueden aplicar otros ácidos orgánicos de calidad alimentaria, tales como ácido acético, láctico, málico, fosfórico, clorhídrico, ascórbico, según las presentes enseñanzas.

El material homogeneizado obtenido, típicamente en forma líquida o pastosa, puede utilizarse adicionalmente para extraer y/o purificar proteínas y/o fracciones específicas, por ejemplo, antioxidantes lipófilos o hidrófilos de las mismas. Se puede aplicar cualquier método conocido en la técnica para extraer fracciones hidrófilas y lipófilas. Por ejemplo se puede utilizar un método que emplea extracciones escalonadas utilizando acetona y hexano y separación repetida de partes solubles en agua e insolubles en agua (descritas en detalle en la sección de Ejemplos a continuación en la presente memoria). Del mismo modo, puede aplicarse cualquier condición y técnicas convencionales conocidas en la técnica para extraer proteínas (por ejemplo extracción y precipitación).

La extracción también puede realizarse tal como utilizando disolventes orgánicos polares o no polares.

Como se ha mencionado anteriormente, y como se describe en detalle en la sección de Ejemplos a continuación, los brotes de granada y sus preparaciones proporcionan altos valores nutricionales y son especialmente una rica fuente de actividad antioxidativa.

- Se apreciará que los brotes de granada comprenden una actividad antioxidativa a un nivel de menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70 o al menos 80 μM de equivalentes Trolox (TE) por gramo de material de brotes en peso fresco. Igualmente, las preparaciones de brotes de granada comprenden una actividad antioxidativa a un nivel de al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70 o al menos 80 μM de TE por gramo de material de brotes en peso fresco.
- De acuerdo con realizaciones específicas de la presente divulgación, los brotes de granada y las preparaciones de brotes de granada comprenden antioxidantes tanto hidrófilos como lipófilos.
- Como se utiliza en la presente memoria descriptiva, la expresión "antioxidantes hidrófilos" se refiere a compuestos antioxidantes que tienen mayor solubilidad en medio acuoso que en aceite. Como ejemplos de antioxidantes hidrófilos se incluyen vitamina C y compuestos fenólicos, incluyendo ácido gálico, ácido elágico, punicalaginas y flavonoides.
- Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "antioxidantes lipófilos" se refiere a compuestos antioxidantes que tienen mayor solubilidad en aceite que en medio acuoso. Como ejemplos de antioxidantes lipófilos se incluyen la familia de la vitamina E y los carotenoides.
- De acuerdo con realizaciones específicas, la actividad de los antioxidantes hidrófilos en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 30, al menos 50, al menos 70, al menos 90, al menos 110, al menos 130, al menos 150 o al menos 200 μM de TE por gramo de peso fresco.
- Los antioxidantes hidrófilos de la presente divulgación comprenden vitamina C (ácido ascórbico). De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el contenido de vitamina C en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 0,1, al menos 0,2, al menos 0,3, al menos 0,4 o al menos 0,5 mg por gramo de peso fresco.
- Los antioxidantes hidrófilos de la presente divulgación comprenden además compuestos fenólicos que incluyen ácido gálico, ácido elágico, punicalaginas A y B (elagitaninos) y flavonoides (libres y unidos).
- De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el contenido de los compuestos fenólicos totales en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 60 equivalentes de ácido gálico (GAE, *gallic acid equivalents*) por gramo de peso fresco.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el contenido de ácido gálico en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o al menos 20 mg por gramo de peso seco.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el contenido de punicalaginas en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 mg por gramo de peso seco.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el contenido de flavonoides en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 15, al menos 17, al menos 19, al menos 21 o al menos 23 mg por gramo de peso seco.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el contenido de ácido elágico en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 17, al menos 19, al menos 21, al menos 23, al menos 25, o al menos 27 mg por gramo de peso seco.
- De acuerdo con una realización adicional, los brotes y preparaciones de granada comprenden antioxidantes lipófilos. La actividad de los antioxidantes lipófilos en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 0,1, al menos 0,2, al menos 0,4, al menos 0,6, al menos 0,8 o al menos 2,0 μM de TE por gramo de peso fresco.
- Los antioxidantes lipófilos de la presente divulgación comprenden vitamina E. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación, el contenido de vitamina E en brotes o preparaciones de granada comprende al menos 0,1, al menos 0,2, al menos 0,3, al menos 0,4 o al menos 0,5 mg por gramo de peso fresco.
- Los antioxidantes lipófilos de la presente divulgación comprenden además carotenoides.
- De acuerdo con las presentes enseñanzas, pero sin querer ligarse a la teoría, se apreciará que diferentes niveles y actividades de antioxidantes están presentes en diferentes preparaciones de brotes de granada. De este modo, los niveles más altos de actividades antioxidantes hidrófilas y lipófilas se muestran en preparaciones secas, especialmente en preparaciones liofilizadas. Además, los homogeneizados de cotiledón presentan mayores niveles de actividades antioxidantes hidrófilas y lipófilas en comparación con homogeneizados de brotes enteros.

Los niveles antioxidantes pueden determinarse utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*, capacidad antioxidante equivalente de Trolox) como se describe en el Ejemplo 1 a continuación en la presente memoria, TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*, parámetro antioxidante total de atrapamiento de radicales) y FRAP (*ferric reducing-antioxidant power*, poder antioxidante reductor férrico), véase, por ejemplo, Pellegrini *et al.* J Nutr. (2003) 133: 2812-2819. Estos niveles antioxidativos se refieren al nivel total de antioxidantes presentes en los brotes de granada y sus preparaciones. Los métodos para determinar los niveles antioxidantes para los compuestos hidrófilos y lipófilos incluyen el método TEAC y ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*, capacidad de absorción de radicales de oxígeno), véase, por ejemplo [Huang *et al.*, J. Agric. Food Chem. (2002) 50:1815-1821].

Se apreciará que los brotes y preparaciones de granada comprenden además aceite, al menos 3 %, al menos 5 %, al menos 7 %, al menos 9 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 % o al menos 30 % p/p, y comprenden además fibras alimenticias.

En un aspecto adicional de la divulgación, los brotes de granada o sus preparaciones están comprendidos en un producto alimenticio o alimento (por ejemplo, seco, líquido, pasta). Un alimento o producto alimenticio es cualquier preparación ingerible que contenga los brotes de granada, o partes de los mismos, de la presente divulgación, o preparaciones hechas a partir de estos brotes. Por lo tanto, los brotes o preparaciones son adecuados para consumo humano (o animal), es decir, los brotes o preparaciones son comestibles. Los productos alimenticios de la presente divulgación incluyen además una bebida adaptada para el consumo animal.

Para el consumo humano, los brotes carecer típicamente de tierra. Como se ha descrito anteriormente, los brotes de granada no se cultivan típicamente en el suelo, sino en un soporte sólido (por ejemplo, una esponja) complementado con agua. Por lo tanto, normalmente no hay necesidad de que los brotes se tengan que lavar para eliminar suelo no comestible. Si los brotes se desarrollan en un soporte sólido particulado, tal como tierra, vermiculita, perlita o celulosa, puede ser necesario el lavado para obtener brotes adecuados para el consumo humano.

Dichos brotes de granada se pueden envasar en recipientes adecuados para su transporte y comercialización.

Típicamente, dichos recipientes son cajas de plástico o frascos que contienen una almohadilla humedecida en el fondo y a veces conservantes. Para el transporte, pueden utilizarse recipientes que limitan la exposición a la luz mientras que proporcionan una barrera de protección mecánica. Para la comercialización, pueden utilizarse recipientes que permitan la penetración de la luz y proporcionen una barrera de protección mecánica. Los envases típicamente contienen una pluralidad de dichos brotes en los que los brotes están preferentemente listos para el consumo. El recipiente puede contener al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 8 o al menos 10 brotes de granada por cm². Los productos alimenticios que contienen los brotes de granada de la presente divulgación pueden almacenarse y transportarse en diversos tipos de recipientes tales como frascos, bolsas y cajas, entre muchos otros.

Se apreciará que los brotes de granada pueden consumirse tal cual. Estos brotes tienen un sabor atractivo y se pueden comer directamente o como alternativa se pueden utilizar para preparar ensaladas frescas, bebidas o sándwiches. Como alternativa, los brotes pueden secarse, cocerse, hervirse, congelarse, hornearse, guisarse, freírse, extruirse, triturarse, marinarse, liofilizarse o adobarse antes del consumo.

Del mismo modo, las preparaciones de brotes de granada pueden consumirse tal como son (por ejemplo, como una pasta para untar) o, como alternativa, pueden añadirse a productos alimenticios existentes o nuevos. Los productos alimenticios ejemplares que comprenden los productos alimenticios de granada incluyen, pero sin limitación, panes, jaleas, salsas, jarabes, condimentos, vinos, té, sopas, cereales, copos, barras, aperitivos, pastas para untar, pastas, salsas para mojar, harinas, gachas, bebidas, cócteles, infusiones, decocciones, tinturas, extractos, chicles, chocolates, dulces, helados y jugos. Los expertos en la técnica conocen diversos métodos para la adición o incorporación de dichos productos en los alimentos, véase, por ejemplo, [http://www\(dot\)palvelu\(dot\)fi/evi/files/55_519_470.pdf](http://www(dot)palvelu(dot)fi/evi/files/55_519_470.pdf).

Se apreciará que los brotes de granada de la presente divulgación se pueden utilizar directamente como productos alimenticios o como alternativa se pueden incorporar o mezclar con productos alimenticios para el consumo. Los productos alimenticios ejemplares que comprenden los brotes o preparaciones de granada incluyen, pero sin limitación, granos, cereales tales como avena, por ejemplo, avena negra, cebada, trigo, centeno, sorgo, maíz, verduras, leguminosas, especialmente soja, tubérculos y repollo, o forraje verde, tal como pasto o heno.

Como se ha indicado anteriormente, los brotes y preparaciones de granada de la presente divulgación son insípidos o tienen un sabor no distintivo y pueden utilizarse ventajosamente como un complemento inerte al sabor a platos o recetas o a veces utilizarse para añadir un nuevo sabor a las recetas y platos. Además, las preparaciones de brotes de granada pueden utilizarse como aditivos alimentarios para enriquecer los alimentos con antioxidantes hidrófilos y lipófilos combinados.

El alimento o producto alimentario de la presente divulgación también puede incluir aditivos adicionales, tales como, por ejemplo, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, conservantes, aditivos nutritivos tales como vitaminas y minerales, condimentos, aminoácidos (es decir, aminoácidos esenciales), emulsionantes, agentes de control de pH tales como acidulantes, hidrocoloides, antiespumantes y agentes de liberación, agentes mejoradores o reforzadores de la harina, agentes elevadores o leudantes, agentes cohesivos, gases y agentes quelantes, cuya utilidad y efectos son muy conocidos en la técnica. Véase Merriani-Webster's Collegiate Dictionary, 10ª Edición, 1993.

Las composiciones que comprenden los extractos o compuestos de la presente divulgación pueden formularse adicionalmente para su administración como complementos dietéticos utilizando uno o más vehículos consumibles. Un "vehículo consumible" se define en la presente memoria descriptiva como cualquier alimento, ingrediente alimenticio o aditivo alimentario, o cualquier excipiente utilizado para comprimir, encapsular o realizar otra formulación de un agente activo para la administración oral, ya sea para uso humano o animal. Los aditivos específicos son muy conocidos por los expertos y se indican en lugares tales como en la farmacopea de Estados Unidos. Para los complementos dietéticos, el extracto se puede mezclar de acuerdo con métodos habituales en la técnica. Los complementos dietéticos se pueden preparar en una variedad de formas incluyendo, pero sin limitación, formas líquidas, en polvo o píldora sólida.

Los brotes y preparaciones de granada pueden consumirse para la salud general, pero pueden ser especialmente ventajosos para sujetos susceptibles a afecciones asociadas al estrés oxidativo, tales como arterioesclerosis, diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades hepáticas e individuos en riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas, tal como enfermedad de Alzheimer.

Se espera que durante la vida de maduración de la patente de esta solicitud se desarrollen muchos antioxidantes importantes y el alcance del término antioxidantes pretende incluir todas estas nuevas tecnologías *a priori*.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "comprendiendo", "incluye", "incluyendo", "teniendo" y sus conjugados, significan "incluyendo pero sin limitación".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, método o estructura reivindicados.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las formas en singular "uno(a)", "un", "el" y "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo sus mezclas.

A lo largo de esta solicitud, se pueden presentar diversas realizaciones de esta divulgación en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la divulgación. Por consiguiente, se debe tener en cuenta que la descripción de un intervalo ha desvelado específicamente todos los subintervalos posibles, así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, debe considerarse que se han desvelado específicamente subconjuntos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que en la presente memoria descriptiva se indique un intervalo numérico, se entiende que incluye cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado, se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva y pretenden incluir el primer y segundo número indicados y todos los números fraccionales e integrales entre ellos.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada, incluyendo, pero sin limitación, las maneras, medios, técnicas y procedimientos bien conocidos, o desarrollados fácilmente, de maneras, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se apreciará que determinadas características de la invención, que por razones de claridad, se describen en el contexto de realizaciones distintas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, también se pueden proporcionar varias características de la invención, que se describen por brevedad en el contexto de una sola realización, por separado o en cualquier subcombinación adecuada o, si fuese adecuado, en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas

realizaciones no deben considerarse características esenciales de dichas realizaciones, a menos que la realización sea inoperativa sin esos elementos.

5 Varias realizaciones y aspectos de la presente invención, tal como se esboza en líneas anteriores y como se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

10 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitativa.

Ejemplo 1

15 Brotos de granada y sus preparaciones como una fuente excepcional de antioxidantes

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

20 Métodos para obtener brotes de granada y preparar preparaciones alimenticias antioxidantes a partir de los mismos

Se llevaron a cabo las siguientes etapas para producir preparaciones antioxidantes a partir de brotes de granada:

Aproximadamente 50 g de semillas de granada se obtuvieron a partir de 1 kg de frutas frescas de granada.

25 Las semillas de granada se limpiaron por separación de la materia carnosa jugosa residual utilizando digestión alcalina. En concreto, se añadieron 10 ml de la solución alcalina al 20 % (NaOH o KOH) a aproximadamente 70 g del residuo después de exprimir el jugo, que comprendía materia carnosa y semillas. La masa se mezcló a fondo en condiciones enfriadas (en un recipiente mantenido en un baño con hielo) para impedir su calentamiento por encima de 40 °C que pudiera afectar a la capacidad de germinación de las semillas y las semillas se separaron mecánicamente de la carne parcialmente digerida por abrasión contra la superficie áspera. Se añadió ácido sulfúrico (5 N) a la masa para la neutralización y las semillas obtenidas se lavaron en agua. Todo junto, la digestión alcalina y la abrasión mecánica, produjo el adelgazamiento de los recubrimientos de las semillas.

35 Las semillas se conservaron a una temperatura de aproximadamente 4 °C hasta su uso, hasta 1-2 años.

Las semillas se hicieron germinar en un sustrato poroso esponjoso, empapado con agua corriente en la oscuridad a una temperatura de 22 a 27 °C hasta la fase de un brote con cotiledones enrollados emergiendo del recubrimiento de la semilla; típicamente el recubrimiento de la semilla cayó del brote.

40 A continuación, los brotes se expusieron a luz solar intensa, a luz débil de la habitación o irradiación ultravioleta de onda larga, durante un periodo de 3 a 5 horas.

Los brotes se incubaron en la oscuridad a una temperatura de 18 a 21 °C, durante un periodo adicional de aproximadamente 24-48 horas.

45 La recogida de los cotiledones (por separado, junto con la parte superior del hipocótilo, o incluidos en el brote entero), para producir el material de preparación antioxidante, se llevó a cabo separándolos del sustrato y/o desprendiéndolos del brote empleando además uno de los siguientes métodos:

50 Homogeneización de toda la materia recogida con la adición de ácido orgánico de calidad alimentaria (ácido cítrico) a una concentración de 0,2 % p/p para obtener un homogeneizado pastoso semilíquido.

El secado se efectuó sin ningún contacto directo del aire con el tejido de brote recogido por secado al vacío, liofilización o deshidratación osmótica hasta obtener una materia seca granulada, que posteriormente se molió hasta obtener un polvo o se dejó en forma de gránulos.

55

Medición de la actividad antioxidante total

Ensayo TEAC (capacidad antioxidante equivalente Trolox)

60 El método se realizó como se ha descrito anteriormente [Vinokur, Y. y Rodov, V. (2006). Acta Horticulturae 709:53-60] y se basó en la capacidad de las moléculas antioxidantes para desactivar $\text{A}b\text{u}t\text{s}^{\cdot+}$ longevo, un cromóforo verdeazul con absorción característica a 734 nm, en comparación con el de Trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E. La adición de antioxidantes al catión radical preformado lo reduce a ABTS, determinando una decoloración. La mezcla de reacción para la generación del catión radical $\text{A}b\text{t}\text{s}^{\cdot+}$ contenía ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 0,15 mM, sal de diamonio (ABTS) y 0,075 mM de iniciador de radicales diclorhidrato de

65

2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) en etanol acidificado con ácido sulfúrico al 0,1 %. El ensayo de decoloración se realizó en cubetas de plástico añadiendo 10 µl de muestra de ensayo a 1 ml de solución etanólica acidificada de ABTS⁺ y se midió como densidad óptica a 734 nm después de 15 min de incubación a temperatura ambiente en comparación con una muestra control. Como patrón se utilizó solución de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox, un derivado hidrosoluble de la vitamina E) 1mM y la actividad de eliminación de radicales de las muestras se expresó como la capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC, *Trolox equivalent antioxidant capacity*) en µM de Trolox por g de peso fresco.

Medición de la actividad antioxidativa lipófila o hidrófila

El procedimiento se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente [Vinokur, Y. y Rodov, V. (2006). *Acta Horticulturae* 709:53-60]. En resumen, antes del ensayo TEAC, se extrajeron fracciones hidrófilas y lipófilas de brotes de granada (como se representa en detalle en las Figuras 5A-J) sin secado preliminar. El procedimiento se basó en la extracción gradual de los brotes con tampón acetato, acetona y hexano y separación repetida de las porciones solubles en agua e insolubles en agua. En un primer momento, los brotes de granada frescos se homogeneizaron en tampón acetato a pH 4,3 y el homogeneizado se extrajo/deshidrató con tres partes sucesivas de acetona, cada etapa seguida de centrifugación y recogida del sobrenadante. Las fracciones sobrenadantes de acetona-agua de las tres extracciones se agruparon. Después de la extracción con acetona, el sedimento deshidratado se extrajo tres veces con hexano y los sobrenadantes se recogieron y se agruparon. Las trazas de compuestos lipófilos se extrajeron del extracto de acetona-agua agrupado por separación con hexano. La fracción no polar obtenida de esta operación se sometió a otra separación con agua para extraer las trazas de compuestos hidrófilos. Después de agrupar las fracciones, se obtuvieron dos muestras, hidrófila (extracto de agua/acetona) y lipófila (extracto de hexano). Hasta la fase de separación, todas las etapas de extracción para una muestra de brote se realizaron en un solo tubo de ensayo de centrifugación, la separación requería dos tubos de ensayo por muestra.

Resultados

Utilizando las enseñanzas de la presente invención, cada kilogramo de fruta de granada produjo aproximadamente 50 g de semillas que se utilizaron para generar aproximadamente 150 g de brotes de granada que, después de recoger, dieron como resultado aproximadamente 150 g de preparación de alimentos homogeneizados o de 20 a 30 gramos de preparación de alimentos secos (véanse las Figuras 1A-F). Como se muestra en la Tabla 1 (a continuación), las preparaciones resultantes (homogeneizado o tipos secos) se enriquecieron hasta 50 veces con antioxidantes hidrófilos y compuestos fenólicos en comparación con la parte comestible de fruta de granada fresca o de semillas de granada. Estas preparaciones también enriquecieron la actividad antioxidativa total del jugo de granada por lo menos 2 veces (véanse las Figuras 1G-I) y tenían niveles significativamente más altos de antioxidantes hidrófilos, antioxidantes lipófilos y compuestos fenólicos en comparación con el jugo de granada.

Tabla 1: Contenido de antioxidantes hidrófilos y lipófilos, aceite de granada y compuestos fenólicos totales en diferentes sustancias de granada

Objeto	Antioxidantes hidrófilos µM TE*/g	Antioxidantes lipófilos µM TE*/g	Aceite, % *** p/p	Total de compuestos fenólicos mg GAE**/g
Fruta fresca, parte comestible	7,8 ± 0,3	0,12 ± 0,01	1,6	2,7
Semillas, no germinadas (incluyendo los recubrimientos de semilla)	4,5 ± 0,6	1,5 ± 0,1	18,4	1,3 ± 0,2
Jugo de granada	8-15	traza	traza	aprox 3
Preparación de alimento-homogeneizado de cotiledón	110,7 ± 1,8	0,6 ± 0,1	9,8	27,9 ± 4,2
Preparación de alimento-homogeneizado de brote entero	36,9 ± 0,6	0,2 ± 0,02	3,3	9,3 ± 1,4
Preparación de alimento después de deshidratación osmótica del brote	135,4 ± 5,1	0,7 ± 0,1	18,6	32,2
Preparación de alimento después de liofilización del brote	233,4 ± 13,9	2,0 ± 0,1	29,7	63,4 ± 4,4
* TE – equivalentes Trolox; ** GAE – equivalentes de ácido gálico, *** - extraíble en hexano				

También se encontró que los brotes de granada (Figuras 2A-B) generados de acuerdo con las presentes enseñanzas, eran muy ricos en actividad antioxidante. La actividad antioxidante total de los brotes frescos de granada fue de aproximadamente 75 µM TE/g de fruta fresca, que fue 10-30 veces mayor que la de los brotes de brócoli, soja y alfalfa (Figura 3). Además, la actividad antioxidante de los brotes frescos de granada fue 3-4 mayor que la de la fruta de fresa (Tabla 2, más adelante), una de las fuentes antioxidantes ricas en la dieta humana. La actividad antioxidante total de los brotes de granada fue significativamente mayor que la de otros productos nutricionales tal como el cereal para desayuno de avena (3,1 µM TE/g), la tableta de salvado de trigo (4,7 µM TE/g), la tableta de trigo (9,0 µM TE/g), la salsa de tomate (1,4 µM TE/g), el sésamo blanco (descascarillado, 4,4 µM TE/g) y el garbanzo (2,3 µM TE/g). Tomados en su conjunto, los brotes de granada y sus preparaciones comprenden una actividad antioxidante muy alta.

Tabla 2: Contenido de antioxidantes hidrófilos y lipófilos, vitaminas C y E en brotes de granada en comparación con frutas de fresa y aguacate

Objeto	Actividad antioxidante, $\mu\text{M TE/g}$ de peso fresco		Vitamina C, mg/100 g de peso fresco	Vitamina E, mg/100 g de peso fresco
	Hidrófilo	Lipófilo		
Fresa	14	<0,01	57	traza
Aguacate	0,6	0,8	8	3,5
Brotes de granada	74	de 0,6 a 1,1	39	47

Ejemplo 2

El nivel de antioxidantes en brotes de granada se efectúa por la fase de desarrollo e iluminación

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Métodos para obtener brotes de granada y preparar preparaciones alimenticias antioxidantes a partir de los mismos

Como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

Medición de la actividad antioxidante

Como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

Resultados

La actividad antioxidante de los brotes de granada cambia a lo largo del desarrollo de una semilla a un brote. Las semillas de granada no germinadas comprendían una actividad antioxidante de aproximadamente $10 \mu\text{M TE/g}$ de peso fresco (Figura 4A). El nivel de antioxidantes disminuyó en una fase temprana de la germinación de las semillas (enraizamiento), pero posteriormente aumentó hasta aproximadamente $30 \mu\text{M TE/g}$ de peso fresco, en particular con la expansión de los cotiledones. Una acumulación adicional de antioxidantes se ralentizaba si el brote permanecía en la oscuridad, pero con iluminación el nivel de antioxidantes continuó aumentando (Figura 4A) y fue seguido por el cambio de color de amarillo verdoso a rojo después de una exposición a la luz corta seguido de incubación en la oscuridad (Figuras 4B-C), o a verde después de una exposición continua a la luz (datos no mostrados).

La tasa de acumulación de antioxidantes dependía de la intensidad de la luz (Figura 4A). Cinco horas de iluminación solar fueron suficientes para inducir un aumento importante de la actividad antioxidante (aproximadamente $75 \mu\text{M TE/g}$ de peso fresco, Figura 4A) en brotes de granada. De manera similar, la exposición a luz ultravioleta de longitud de onda de 365 nm (UV-A) o 312 nm (UV-B) durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 3 horas (dependiendo de la intensidad de la luz) aumentó la acumulación de antioxidantes en brotes de granada (datos no mostrados). La exposición a una luz interior tenue también fue suficiente para inducir un aumento de la actividad antioxidante (aproximadamente $45 \mu\text{M TE/g}$ de peso fresco, Figura 4A).

La alta actividad antioxidante de los brotes de granada se debió predominantemente a los cotiledones de los brotes. La fase de desarrollo óptimo para el uso del brote de granada fue un brote con cotiledones jóvenes, sin embargo, el nivel de actividad antioxidante no disminuyó en fases más avanzadas de desarrollo de brotes (formación de hojas reales, datos no mostrados). No obstante, en las fases más avanzadas de desarrollo, el brote se volvió menos adecuado para el procesamiento debido a los cambios de textura (rugosidad de los tejidos relacionada en particular con su lignificación, datos no mostrados).

Ejemplo 3

Ingredientes activos en brotes de granada y sus extractos

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Métodos para obtener brotes de granada y preparar preparaciones alimenticias antioxidantes a partir de los mismos

Como se describe anteriormente en el Ejemplo 1.

Análisis con HPLC

Instrumento HPLC: HPLC Agilent 1100 con un detector de matriz de fotodiodos (DAD) y una columna Phenomenex Synergy Hydro-RP de 250 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 4 µm. Caudal 1,0 ml/min. Fase móvil A ácido fórmico al 1 % en agua Milli-Q; fase móvil B acetonitrilo. Programa de la fase móvil: 5 % de B a 15 % de B durante 18 min., después aumentando a 65 % de B durante 2 minutos; volver a 5 % de B durante 5 minutos y volver a equilibrar durante 5 minutos. Temperatura a 30 °C, volumen de inyección 10 µl, detección UV a 260 nm.

Resultados

Como se describe con detalle en la Tabla 2 (anteriormente en la presente memoria), se encontró que los antioxidantes presentes en los brotes de granada eran predominantemente antioxidantes hidrófilos (HAOX). Los compuestos hidrófilos comprendían ácido ascórbico (vitamina C) y compuestos fenólicos (tales como ácido gálico, ácido elágico, glucósidos flavonoides y punicalaginas, véase la Tabla 3, más adelante). El análisis con HPLC mostró que una parte significativa de la fracción fenólica estaba representada por ácido elágico (aproximadamente 23 mg/g de peso seco, véase la Tabla 3, más adelante). Estos compuestos fenólicos son muy conocidos por su alta biodisponibilidad y también comprenden actividad antimicrobiana.

Tabla 3: Contenido de los grupos principales de compuestos fenólicos en cotiledones de granada

Grupo de compuestos	Contenido, mg / g de peso seco
Ácido gálico y otros ácidos fenólicos monoméricos	16,0
Ácido elágico	23,2
Punicalaginas A y B (elagitaninos)	4,2
Flavonoides (libres y unidos)	19,6
Total	63,0

Además de los antioxidantes hidrófilos, también se encontró que los brotes de granada eran ricos en antioxidantes lipófilos (LAOX, véase la Tabla 2, anteriormente en la presente memoria descriptiva). Se encontró que el contenido de antioxidantes lipófilos en los brotes de granada era parecido o superior al de la fruta de aguacate y se encontró que comprendía vitamina E (tocoferoles) y carotenoides.

El procesamiento de los brotes de granada por homogeneización o por secado dio lugar a preparaciones que eran ricas en fuentes de antioxidantes. La fuente más alta de antioxidantes hidrófilos, antioxidantes lipófilos, aceite de granada y fenoles se registró mediante el proceso de liofilización de los brotes de granada (véase la Tabla 1, anteriormente en la presente memoria descriptiva). Sin embargo, la deshidratación osmótica, la homogeneización (de los cotiledones solos o del brote entero), también produjo altos niveles de antioxidantes y aceite en comparación con el fruto de granada fresco o con las semillas no germinadas (véase la Tabla 1, anteriormente en la presente memoria descriptiva). De este modo, los brotes de granada o los cotiledones solos pueden servir para que las preparaciones alimenticias sean ricas en antioxidantes naturales hidrófilos y lipófilos.

En su conjunto, el valor sanitario de los brotes de granada y sus preparaciones, está relacionado en particular con la presencia de vitamina C (ácido ascórbico), compuestos fenólicos (por ejemplo, ácido gálico, ácido elágico, punicalaginas y flavonoides), vitamina E (tocoferoles), carotenoides y fibra nutricional.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de brotes de granada, comprendiendo el método:
 - 5 (a) hacer germinar semillas de granada en la oscuridad hasta que aparezcan brotes con cotiledones, en el que dicha germinación se efectúa durante 6 a 21 días;
 - (b) exponer dichos cotiledones a la luz durante 30 minutos a ocho horas para obtener brotes expuestos a la luz;
 - (c) incubar en la oscuridad durante 24 a 48 horas dichos brotes expuestos a la luz; y
 - 10 (d) recoger dichos brotes de granada, produciendo de este modo los brotes de granada.
2. Un brote de granada producido de acuerdo con el método de la reivindicación 1 y que comprende al menos 0,40 mg de vitamina E por g de peso fresco.
3. Un brote de granada producido de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en el que dicho brote de granada comprende una actividad antioxidativa superior a 30 μM equivalentes Trolox [TE]/g de peso fresco, en el que el brote comprende cotiledones.
- 15 4. Un alimento o producto alimenticio que comprende el brote de granada de la reivindicación 2 o 3.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha luz se selecciona del grupo que consiste en luz solar, luz ultravioleta de un intervalo de longitud de onda de 280 a 400 nm y luz artificial de un intervalo de longitud de onda de 380 a 750 nm de irradiación de al menos 30 W/m^2 .
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en que las semillas de los brotes germinan durante 6 a 13 días.
7. El método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende homogeneizar o secar dichos brotes de granada después de la etapa (d).
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho secado es liofilización o deshidratación osmótica.
9. El alimento o producto alimenticio de la reivindicación 4, en el que dicho brote de granada se produce por el método de la reivindicación 7 u 8.
- 30 10. El alimento o producto alimenticio de la reivindicación 9, que adicionalmente comprende un ácido orgánico de calidad alimentaria, en el que dicho brote de granada se produce por el método de la reivindicación 7, que comprende homogeneización.
- 35

Complementos Alimentarios

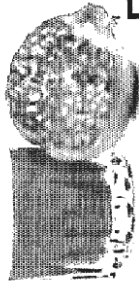
FIG. 1B

Jugo 450 g

con

Azúcar 70 g

HAOX 4700 $\mu\text{M TE}$

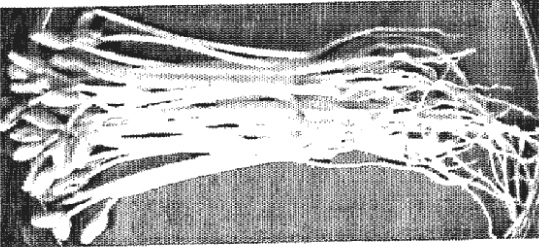


+

FIG. 1E

con

Hipocotilos y raíces 100 g
cotiledones 50 g



Brotes 150 g

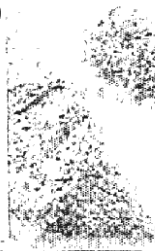
FIG. 1A



Fruta entera
1 kg

FIG. 1C

Semillas 50 g



Germi-
nación

con

recubrimiento de semillas 25 g
aceite 9 g

HAOX 225 $\mu\text{M TE}$

LAOX 75 $\mu\text{M TE}$

Vitamina E 30 mg

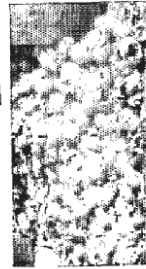


FIG. 1D

Cáscaras y residuos 550 g

con

Aceite 5 g

HAOX 4000-5000 $\mu\text{M TE}$

LAOX 30-35 $\mu\text{M TE}$

Vitamina E 40-45 mg

tales como... FIG. 1F

Homogeneizado de brote
entero 150 g

O

Homogeneizado de
cotiledón 50 g

O

Material de brotes seco
20-30 g

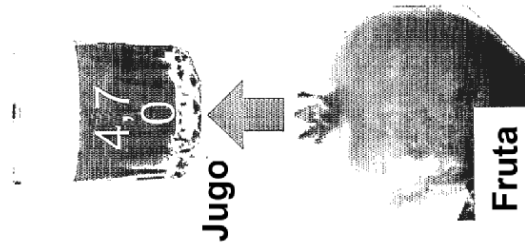
O

Material deshidratado
mediante osmosis
30-35 g

u otros

FIG. 1G

Estrategia tradicional 1

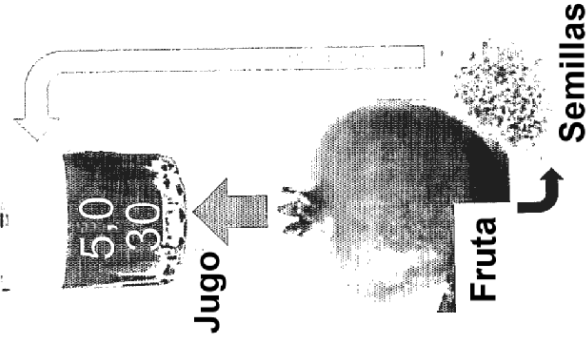


5,0
30

- Actividad antioxidante total, mM equivalentes Trolox
- Contenido de vitamina E, mg

FIG. 1H

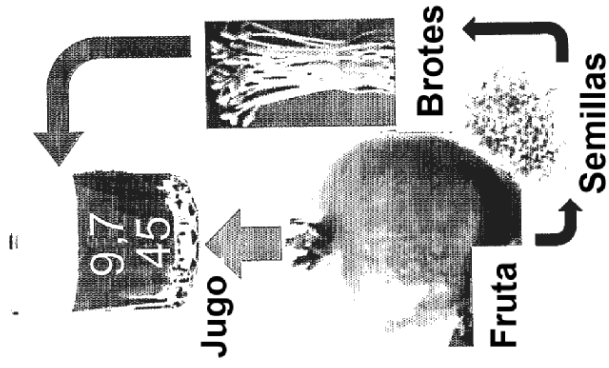
Estrategia tradicional 2



Todos los cálculos son por 1 kg de fruta procesada

FIG. 1I

Realizaciones de la presente invención



Figuras 2A-B

2B



2A

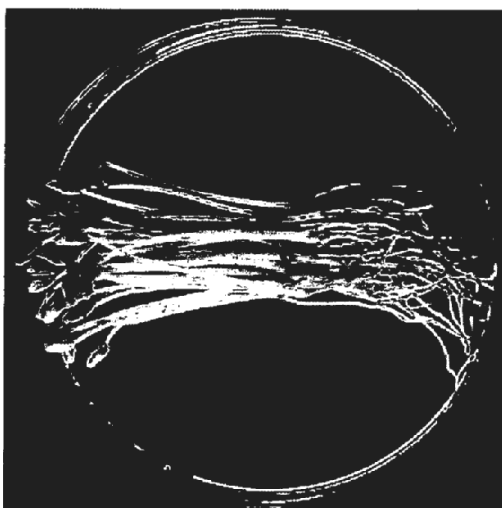
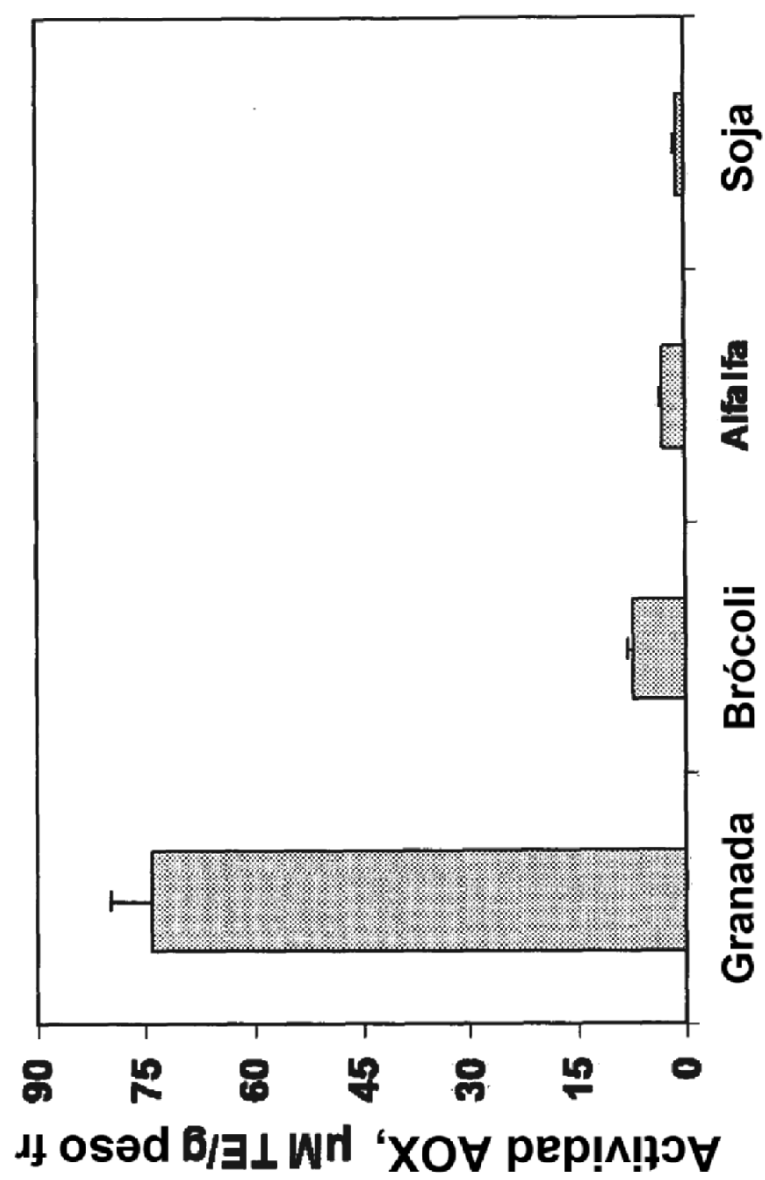
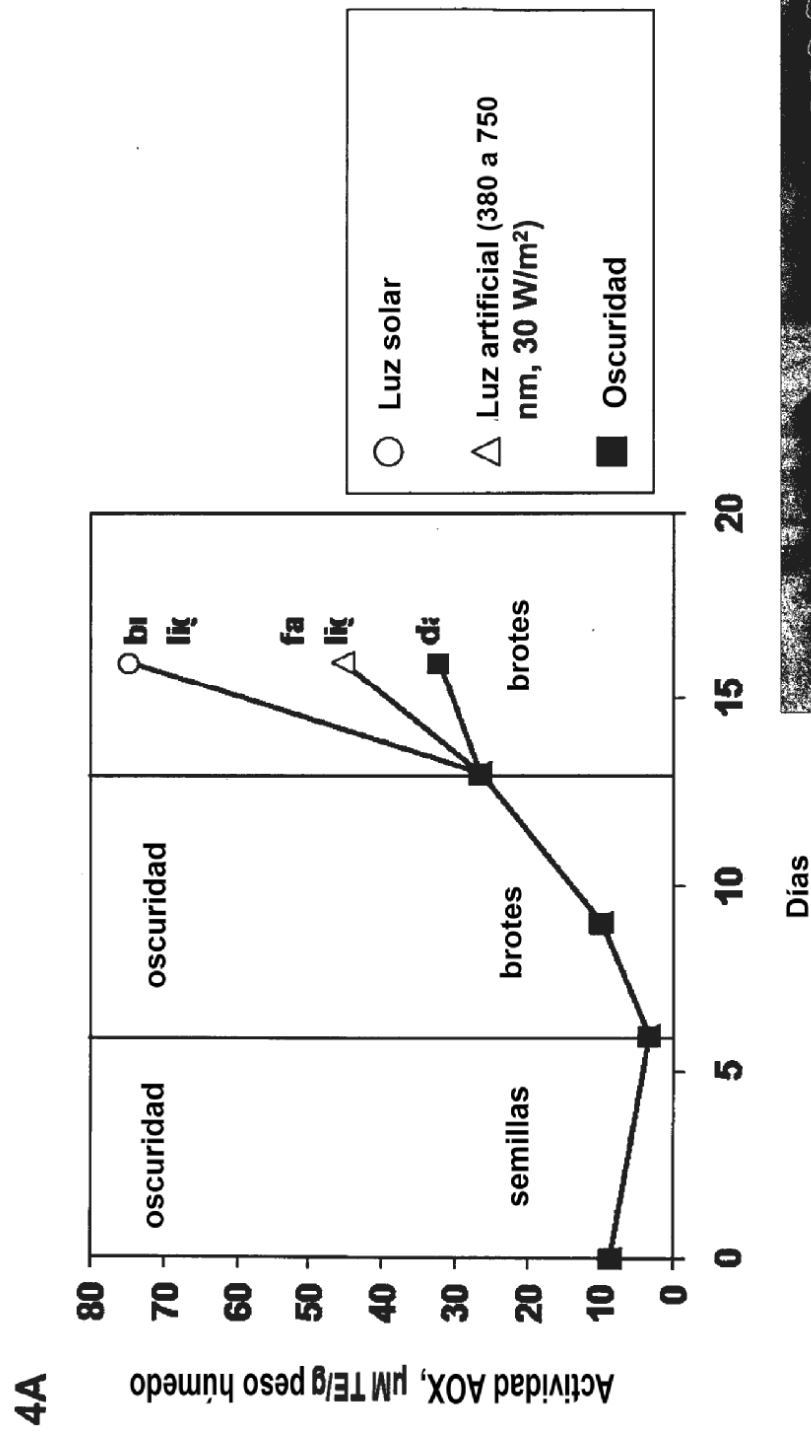


Figura 3



Figuras 4A-C



*Luz solar que comprende luz ultravioleta (280 a 400 nm) y luz visible (400 a 750 nm), total 100 W/m²

Figuras 5A-J

