

03-030

## PRELIMINARY DESIGN OF D-PINITOL PRODUCTION PROCESS FROM CAROB EXTRACT

Giménez García, Inmaculada; Arnal Arnal, Jose Miguel; Sancho Fernández, María; García Fayos, Beatriz

Universitat Politècnica València

D-pinitol is a cyclic polyalcohol, which has become increasingly important in recent years, especially in pharmacology, due to its interesting properties regarding the treatment of certain diseases, such as diabetes. This, in conjunction with the fact that its synthesis process has been proved to be too costly, means that it is a high value-added substance.

It has been noted that its content in some plant species can be abundant; however, this is a field that has not yet been extensively developed. In this work, it is studied how to obtain it from a vegetal extract obtained from carob, after the removal of other major components such as sugars.

The work proposes an extraction and purification process of D-pinitol obtaining, and describes the start-up of the process at laboratory scale, testing for it several experimental stages, such as biofermentation, liquid-liquid extractions, or thermal operations, among others. The optimal sequence of the different stages is also studied, along with other key parameters like inoculation rates, reaction timing, appropriate temperature range or the solvents' influence, comparing the effects of each parameter on the final product's characteristics.

**Keywords:** *Solid-Liquid Extraction; carob; purification; D-Pinitol*

## DISEÑO PRELIMINAR DE UN PROCESO DE OBTENCIÓN DE D-PINITOL A PARTIR DEL EXTRACTO DE ALGARROBA

El D-pinitol es un polialcohol cíclico que ha ganado interés en los últimos años, especialmente en el sector farmacológico por sus propiedades para el tratamiento de ciertas enfermedades como la diabetes. Esto, junto con su costosa obtención por medio de síntesis, le confieren un elevado valor añadido.

Se ha observado que su presencia en ciertas especies vegetales puede llegar a ser bastante importante, sin embargo, éste todavía es un campo que no ha sido desarrollado ampliamente. En este trabajo se estudia cómo llevar a cabo su obtención a partir de un extracto vegetal obtenido de la algarroba, tras la separación de otros componentes mayoritarios como los azúcares.

En el trabajo se propone un proceso de extracción y purificación de D-pinitol, y se describe su puesta a punto a escala de laboratorio, probando para ello diversas etapas, como una biofermentación, extracciones líquido-líquido o procesos térmicos, entre otras. Se estudia además el orden óptimo de las operaciones, y otros parámetros característicos como tasas de inoculación y tiempos de reacción, rangos de temperatura de operación adecuados, o la influencia del disolvente, comparando el efecto de cada modificación con las características del producto final.

**Palabras clave:** *Extracción sólido-líquido; algarroba; purificación; D-Pinitol*

Correspondencia: María Sancho msanchof@iqn.upv.es



©2019 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introducción

El árbol del algarrobo representa un cultivo tradicional y extendido principalmente a lo largo de toda el área mediterránea. Esto se debe al hecho de que presenta una serie de ventajas muy notables como la adaptación a diversas condiciones de cultivo y ambientales, o resistencia elevada frente a plagas o enfermedades, lo que, junto a unas capacidades de producción muy elevadas, lo convierten en un tipo de plantación con un interés industrial, a la par que botánico-ornamental y ecológico, elevado (Tous Martí, 1984; Tous Martí, 1985).

Este interés industrial sobre la producción de la algarroba se ha visto especialmente reforzado en las últimas décadas ya que a partir de ésta se obtienen productos de alto interés en diferentes sectores, especialmente en el alimentario. Los principales aprovechamientos que se le dan a la algarroba en la actualidad se basan en su alto contenido de azúcares, superior incluso al 50% en base seca y, sobre todo, en el empleo de su semilla (garrofín), que puede alcanzar contenidos de entre un 8 y un 15% (Esbenshade et al., 2016). Este último es el componente que mayor valor añadido le otorga en la actualidad, ya que a partir de él se elaboran la harina y la goma de garrofín, de elevado interés en tecnología alimentaria, ya que constituye una goma galactomanano-vegetal que sirve como agente espesante, emulsionante y estabilizador, y que apenas causa problemas de incompatibilidad alimentaria o problemas de procesado presentes en la mayoría de posibles productos sustitutivos. Por ello, prácticamente la totalidad del cultivo se destina a este fin.

No obstante, al centrar la producción y transformación de la algarroba con estos fines, no se estaría aprovechando todo el potencial del cultivo, es decir, no se obtiene un rendimiento económico óptimo del mismo. Un campo de aplicación relativamente reciente de los componentes de la algarroba consistiría en el sector medicinal, siendo especialmente atractivo ya que permitiría mantener lo que hasta la fecha supone la mayor fuente de ingresos del cultivo del algarrobo (la extracción de goma de garrofín), pero enfocando de manera distinta la explotación de la pulpa del fruto, que contiene compuestos adicionales a los azúcares con numerosos beneficios para la salud (Kim, et al 2005; Turhan, 2014).

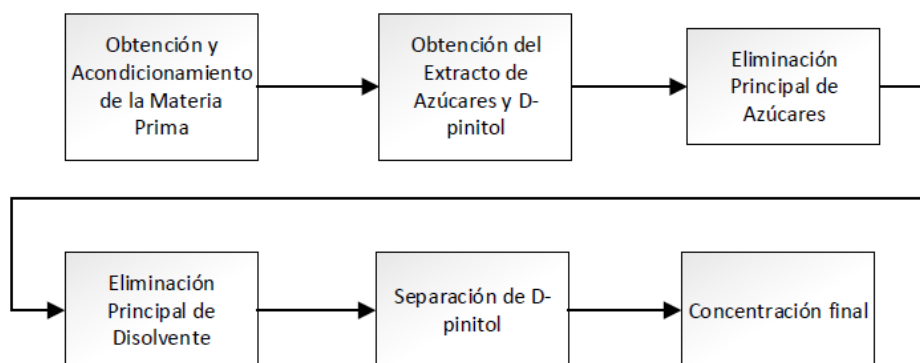
Uno de estos compuestos activos beneficiosos sería el D-pinitol, una molécula de quiro-inositol (un subgrupo de polialcoholes cíclicos de base pentagonal), que puede llegar a encontrarse entre un 4 y un 9% en base seca del fruto, lo cual lo convierte en el producto vegetal conocido con mayor contenido en esta sustancia (Baumgartner et al., 1986; Kim et al., 2005). Este compuesto se encuentra en estado de investigación desarrollado en áreas como el tratamiento de la diabetes mellitus, principalmente, y de forma emergente como agente anticarcinógeno, ralentizando la proliferación de ciertos tipos de cáncer. Sin embargo, esta molécula no se puede generar de forma natural por el organismo y su síntesis orgánica presenta un proceso complejo y costoso, lo que se traduce en la obtención de muy pequeñas cantidades de este producto a precios muy elevados que impiden su extensión comercial e implantación como tratamiento en estas enfermedades (Hudlicky, et al., 1990; López-Sánchez, Moreno, & García-Viguera, 2018; Zhan & Lou, 2007).

Es por ello que en el presente trabajo se plantea, como alternativa, la definición y puesta a punto de un proceso de obtención del D-pinitol presente en la algarroba, el cual se extraerá de forma conjunta a otras sustancias químicamente afines como son los azúcares, de los que habrá que separarlos posteriormente. Este procedimiento seguirá, por tanto, unas etapas de forma genérica recogidas en la Figura 1, que se muestra a continuación.

En primer lugar, se habrá de adquirir la materia prima sobre la que se vaya a operar, lo que se podría realizar mediante su compra a proveedores o con recolección directa del lugar de cultivo para, seguidamente, realizar operaciones de acondicionamiento. Éstas consisten, entre otras, en la eliminación de otros elementos que puedan haberse recogido junto al fruto,

procesos de lavado para eliminar productos fitosanitarios o microorganismos, y un secado que permita, eliminar el exceso de humedad y conseguir una desactivación enzimática. Seguidamente se realizará una extracción de las sustancias contenidas en la pulpa del fruto, mediante una extracción sólido-líquido, cuyo método específico y condiciones de operación deberán ser determinadas.

**Figura 1: Proceso general para la obtención de D-pinitol (Fuente: elaboración propia)**



Tras esto se obtendrá un extracto que posee principalmente sustancias azucaradas y un porcentaje reducido en D-pinitol, los cuales se encontrarán ligados entre sí con fuerzas de carácter moderado (Sanjuan Díaz, 1994), por lo que es crítico seleccionar unas operaciones y parámetros de operación que permitan una separación máxima, pero sin dañar o perder la sustancia de interés. Para ello se habrá de eliminar el componente mayoritario, los distintos azúcares, de la mezcla; tras esto se habrá de reducir el contenido de disolvente restante, lo cual implica una adecuación de las concentraciones necesarias para la siguiente etapa del proceso. En ésta, ya que existen otras sustancias minoritarias en la mezcla junto al D-pinitol, se tendrá que realizar una extracción selectiva del mismo, lo que permitiría obtener una mezcla binaria sustancia extractora-D-pinitol. Sobre dicha mezcla se realizará una operación de separación final a partir de la que se obtendrá el producto de interés.

En el proceso de puesta a punto de la operación, será necesario escoger la metodología específica para cada una de las fases de purificación anteriores e incluso operaciones auxiliares y su secuencia óptima, así como las sustancias a emplear, los grados de riqueza de las mismas, los tiempos de operación, o condiciones de temperatura y presión.

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo consiste en el diseño preliminar del proceso de obtención de D-pinitol a partir de extracto de algarroba. Para ello se plantearán diversas propuestas de etapas que abarcarán una primera fase de extracción, seguida de otra de purificación que permita obtener el compuesto de interés con elevados grados de riqueza.

Dado que esta última fase es la crítica en la obtención de D-pinitol, el estudio de las variables de operación a determinar se centrará principalmente en ella, analizando el nivel de influencia de ciertos parámetros, como tiempo de operación, tipo y concentración de disolventes, concentraciones alcanzadas, u otras operaciones auxiliares intermedias.

Puesto que la primera de las fases nombradas anteriormente se encuentra bien estudiada por numerosos autores, y que puede asumirse como asentada en procesos industriales ya implantados, su desarrollo se llevará a cabo basándose en la información disponible en diversas fuentes bibliográficas.

### **3. Metodología**

#### **3.1. Definición de la secuencia de operaciones**

Inicialmente, es necesario realizar un análisis del estado del arte con el fin de recopilar la información disponible sobre la obtención del extracto, que resultó abundante y de las operaciones de purificación, notablemente más escasa. En relación a la extracción inicial se plantean diversas posibilidades, de gran variabilidad en el coste de implantación y operación, pero también en rendimiento (Karkacier et al., 2003; Petit & Pinilla, 1995; Turhan et al., 2006). Al no estar centrado el objetivo principal en la extracción, sino en la definición de etapas posteriores, se decide optar por un método de extracción sólido-líquido (ESL) convencional en *batch* frente a otros como extracción ultrasónica o supercrítica por su mayor facilidad de adaptación a escala de laboratorio.

La eliminación principal de azúcares podría llevarse a cabo con métodos basados en reacciones biológicas, inversiones enzimáticas e iónicas de los compuestos o separaciones cromatográficas (Baumgartner et al, 1986; Macías Camero & Sanjuan Merino, 2003; Tetik et al., 2011). El método escogido se basa en una fermentación alcohólica aerobia ya que presentaba ventajas como bajos costes de inversión y operación, así como un fácil control y seguimiento de las variables de operación y de las características de la disolución a tratar.

La eliminación de disolvente se decide llevar a cabo mediante una evaporación a vacío, lo que permitirá emplear temperaturas moderadas e impedir una posible degradación no deseada de los compuestos de la mezcla.

Con respecto a la separación de D-pinitol, los métodos considerados fueron separación cromatográfica, por intercambio iónico, o extracción líquido-líquido (Baumgartner et al, 1986; Macías Camero & Sanjuan Merino, 2004; Oziyci et al., 2015). Puesto que la información disponible más detallada correspondía a esta última, y su implantación y control resultaban más sencillas, se escogió ésta frente al resto de alternativas.

La última etapa principal correspondiente al proceso de purificación del D-pinitol. La concentración final del mismo se decide realizar mediante una evaporación total del disolvente mediante aplicación de calor convectivo.

#### **3.2. Obtención del extracto de algarroba**

Tras haber seleccionado el tipo de extracción a realizar en la primera etapa, es necesario establecer e implementar las condiciones óptimas de operación para conseguir un extracto de algarroba que se pudiera adaptar de forma adecuada a las etapas críticas posteriores. De la información relativa a la extracción se establecieron parámetros de operación como: disolvente extractor, tiempo de extracción, condiciones de presión, temperatura, pH e hidrodinámica del reactor de extracción, etc. Con ello se determinó el empleo de agua como fluido extractor, operación a temperatura y presión ambientales, y pH 7. Adicionalmente, se decide emplear agitación forzada para promover la transferencia de materia entre fases aumentando así el rendimiento de la operación. El tamaño óptimo de partícula para maximizar la extracción se escoge como 2 mm o inferior (Marquino Fernández, 2017).

Seguidamente, se hubo de determinar la ratio de materias que condicionarán la concentración alcanzada en el extracto de cara a las etapas de purificación de D-pinitol. En función de la secuencia de purificación escogida, se decide operar con relaciones de 40 gramos en base seca de sólido y 160 mL de agua osmotizada, realizando esta operación en un vaso de precipitados de 500 mL colocado sobre una base magnética agitadora (a 80 rpm), durante un total de tres horas. Sin embargo, durante el desarrollo experimental se observó de manera reiterada para los distintos ensayos, la evolución de la composición del

extracto no sufría variaciones significativas a partir de aproximadamente 60 minutos de operación, por lo que se valora reducir el tiempo de extracción hasta este valor.

Estas operaciones se realizaron sobre pulpa de algarroba madura adquirida, de la variedad Matalafera, cultivada en la Comunidad Valenciana, previamente acondicionada, mediante limpieza de la misma, tratamiento de secado para asegurar la homogeneidad de las materias primas de distinto origen, y trituración para lograr el tamaño de partícula adecuado.

Durante la extracción sólido-líquido, se tomaron muestras de la disolución cada 5 minutos mediante pipetas Pasteur, analizando la composición con un equipo de refractometría (Atago Rx-5000). Éste permite determinar la cantidad total de azúcares en la muestra (como g sacarosa/100 mL ó % de °Brix) mediante el cambio del índice de refracción del agua, ocasionado por el cambio de densidad por la presencia de sustancias en disolución.

### **3.3. Acondicionamiento y almacenamiento del extracto**

Esta operación, si bien no se encuentra especificada en la secuencia general de etapas, se hizo necesaria para su correcto desarrollo: tras la obtención del extracto, se ha de llevar a cabo una separación del bagazo y de la disolución que continúa el proceso. Ésta se realizó mediante un filtrado sucesivo en filtros de tela de luz de malla gradualmente más reducida y sometiendo al bagazo a operaciones mecánicas de presión con el fin de recuperar la disolución retenida, con el fin de optimizar las materias primas empleadas.

Adicionalmente, durante el desarrollo de las operaciones, se planteó la posibilidad de llevar a cabo un almacenamiento intermedio antes de la fermentación. Con ello se pretende comprobar si este tipo de operación se podría introducir en un proceso industrial, con el fin de contrastar si esto era posible sin alterar las características del extracto. El método de conservación escogido se basa en la congelación del extracto (a -21°C) y por intervalos de tiempo iguales o superiores a 48 horas, frente a otros la refrigeración, ya que se minimiza el riesgo de proliferación de microorganismos.

### **3.4. Eliminación principal de azúcares: fermentación alcohólica**

El extracto de azúcares y D-pinitol se somete a un proceso de fermentación alcohólica aerobia, empleando levaduras *Sacc. Cerevisae*. La reacción se llevó a cabo en un reactor cilíndrico de 500 mL, evaluando las posibles condiciones de operación. Se consideró emplear, en base a la bibliografía, unas tasas de inoculación de un 0.01% (v/v) durante 7 días (Baumgartner et al., 1986) o de un 1% (v/v) durante 30 horas (Tetik et al., 2011). Finalmente se optó por ésta última, ya que, a pesar de emplear una mayor cantidad de reactivos, no suponía sobre coste frente a la drástica reducción del tiempo de operación. Los tiempos de reacción se variaron por tanto entre este valor escogido de 30 horas para estudiar su influencia sobre el rendimiento de eliminación de azúcares frente a la posible degradación de los inosítoles; concretamente se realizaron ensayos durante 26 y 28 horas.

Con el fin de asegurar el correcto desarrollo de la reacción, se estabilizó la temperatura a 30°C mediante una resistencia de inmersión en un baño termostatzado, y con una agitación mecánica para la homogeneización de la mezcla. Para asegurar un régimen aerobio, la operación se desarrolla con una renovación de la atmósfera del reactor, eliminando el CO<sub>2</sub> y los vapores generados, evitando que desplacen el oxígeno del aire. El seguimiento del avance de la reacción se llevó a cabo mediante la medición de °Brix de la mezcla de forma periódica, empleando para ello un refractómetro portátil Atago PAL-3.

### **3.5. Eliminación principal de disolvente: evaporación a vacío**

El extracto fermentado obtenido ha de ser sometido a una reducción de volumen con el fin de ajustar su concentración. Sin embargo, a lo largo del desarrollo experimental, se observa

que presenta una cantidad importante de sólidos en suspensión, principalmente las levaduras inoculadas inicialmente. Con el fin de evitar que estas partículas obstaculizaran el sistema de transmisión de calor para la eliminación de disolvente, se realiza una filtración mediante una placa porosa y un filtro de celulosa en un matraz kitasatos sometido a vacío (-720 mmHg), de forma sucesiva hasta la eliminación de los sólidos observados.

Seguidamente, se continúa con la eliminación del disolvente, empleando para ello un sistema de matraces conectados a una bomba de vacío para llevar a cabo la evaporación a una temperatura inferior. Con ello se pretende acelerar el proceso de evaporación y, adicionalmente, se evita el empleo de temperaturas excesivas que pudiesen degradar el D-pinitol o generar interacciones indeseadas entre éste y algún compuesto minoritario.

De forma análoga a la etapa anterior, se realizó un análisis de la composición mediante un refractómetro portátil, continuando la operación hasta alcanzar un grado de concentración de 50 °Brix, valor escogido como óptimo en base a bibliografía. Puesto que en dicha bibliografía no se incluían datos del comportamiento de la mezcla con grados de concentración distintos a éste, durante el seguimiento de la composición se decidió extraer alícuotas a valores de unos 25 °Brix, para analizar la influencia del grado de concentración.

### **3.6. Separación de D-pinitol: extracción líquido-líquido**

Con el fin de llevar a cabo la separación final de los componentes en disolución, se escogió un disolvente que presentase la mayor afinidad por la sustancia de interés, el D-pinitol, y con una capacidad de interacción mínima tanto con el resto de sólidos residuales como con el disolvente de etapas anteriores. El disolvente escogido es el etanol analítico, para evitar la presencia de sustancias desnaturalizantes que provocasen interacciones no controladas, y con grados de pureza que oscilaban entre un 96% (Baumgartner et al., 1986) y absoluta.

Las cantidades añadidas de alcohol fueron de aproximadamente 3:1 frente al extracto concentrado, poniendo ambas sustancias en íntimo contacto mediante agitación vigorosa, pero limitando la aparición de vórtices en el recipiente, un reactor cilíndrico de 500 mL. Esto se realizó sobre las alícuotas concentradas a 25 y 50 °Brix.

### **3.7. Separación de fases**

Etapas sobre las que no se incluía información en la bibliografía, se hace necesaria en el desarrollo experimental al formarse dos fases claramente diferenciadas: una sólida y otra líquida, en el recipiente en el que se lleva a cabo la extracción líquido-líquido.

Esta separación se consigue mediante una sedimentación natural de los sólidos formados, filtrando el líquido restante sucesivamente mediante un filtro de celulosa de 1000 g/m<sup>2</sup>, hasta la eliminación de las partículas de tamaño más reducido.

De forma adicional, para comprobar si el método de filtrado era adecuado como proceso de separación o si no elimina la totalidad de los sólidos suspendidos, se extrajo una alícuota correspondiente a la mitad del volumen filtrado para someterlo a un ultracentrifugado a 10000 rpm durante 15 minutos en un equipo Eppendorf 5415D.

### **3.8. Concentración final de D-pinitol**

La eliminación final del disolvente de la mezcla en la que se espera que el D-pinitol sea el componente disuelto principal se realizó mediante la introducción de un recipiente refractario que contenga dicha mezcla en una estufa de precisión Digitronic 2005162 JP Selecta. Ésta se programará a temperaturas superiores a las de ebullición del disolvente, principalmente a 82°C para la eliminación del etanol, (de temperatura de ebullición de 78.4°C), incrementando finalmente hasta 105°C para eliminar el pequeño porcentaje de agua que pudiese haber permanecido asociada. No se estableció un tiempo fijo para la duración de esta etapa, sino

que se prolongó hasta asegurar la formación de sustancia sólida en el fondo o las paredes del recipiente

### 3.9. Análisis de la composición de D-pinitol

La cantidad de D-pinitol en el producto final se estudió mediante la técnica del punto de fusión, concretamente mediante una adaptación del “método del bloque metálico”. Éste consiste en una comprobación cualitativa de la presencia de una sustancia o la pureza de una mezcla, conociendo de antemano la temperatura de fusión del compuesto de interés.

La sustancia se depositó sobre una placa metálica calefactada modelo VMR/VMS-C7 Advanced, que permite un control preciso de la temperatura, habiéndola precalentado hasta 20-15°C por debajo de la temperatura de fusión a comprobar, momento a partir del cual se reduce el aporte de energía hasta lograr incrementos de temperaturas inferiores a 1°C/min. Se realizó un registro de las temperaturas, tanto con el propio equipo como de manera paralela con un termopar HACCO TTX 100-Ebro hasta la comprobación de manera visual del cambio de fase de la sustancia. Idealmente, si los cristales fueran únicamente de D-pinitol, o admitiendo hasta un 5% de impurezas (w/w), la temperatura de fusión se daría entre 178 y 185°C, en función del tamaño del cristal, la homogeneización en la aplicación del calor o la pureza real en el cristal de D-pinitol.

Durante esta etapa es importante considerar la posibilidad de una mayor proporción de impurezas, pudiendo ser principalmente azúcares, componentes mayoritarios inicialmente. En este caso, el punto de fusión resultante se desviará hacia valores intermedios, pudiendo estimar las proporciones en función del punto real de fusión y los de las sustancias puras, recogidos en la Tabla 1:

**Tabla 1. Temperaturas de fusión de azúcares frente a D-pinitol**

Sustancia	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	D-Pinitol
Tª fusión (°C)	110-127	148-150	188-192	178-185

Nota: La existencia de rangos en las temperaturas de fusión de los azúcares se debe a la presencia de distintos isómeros

Fuente: (Baumgartner et al, 1986; Hurtt, Pitkänen, y Knuutinen, 2004)

Por ello, con el fin de monitorizar la presencia de D-pinitol, pero teniendo en cuenta que los azúcares de punto de fusión más bajo pueden encontrarse todavía presentes, se realizaron pruebas sobre la placa calefactada a 115, 130, 145, 160, 175, 180 y 185°C.

## 4. Resultados

### 4.1. Influencia de los parámetros de operación de las distintas etapas de obtención de D-pinitol

Debido a que en los distintos ensayos de este estudio se había empleado equipos distintos o se habían modificado condiciones de operación (tiempo de reacción, riqueza de disolvente, etc.), se ha de analizar la influencia de estos factores, empleando para ello como indicador los resultados de las técnicas analíticas de D-pinitol. Con esto se medirá la presencia del mismo en el producto final, es decir, el rendimiento de extracción y separación frente a otros compuestos

#### ***a) Influencia del tiempo de reacción en la etapa de fermentación etanólica***

Al comparar los resultados de la técnica analítica para los productos finales de las fermentaciones a 26 y 28 horas de duración, se podía determinar la influencia del tiempo de

reacción mediante la apariencia del sólido y su temperatura de fusión. Para el primer caso el sólido fundía entre 108-110°C, mientras que al aumentar el hasta las 28 horas, el sólido resultante fundía a 145°C.

Por ello se podría afirmar que tiempos de reacción más próximos a 30 horas, sin superarlas, son beneficiosos para el proceso, puesto que permiten reducir los niveles de azúcares en la disolución (según los valores de la Tabla 1, principalmente se habrá eliminado casi con totalidad el contenido en fructosa, segundo tipo de azúcar más abundante tras la sacarosa).

### ***b) Influencia grado de concentración en la eliminación primaria de disolvente***

Tras estudiar el comportamiento del producto final procedente de alícuotas a distintos niveles de concentración, unos 25 y 50 °Brix, aproximadamente, se observó un aumento significativo de la temperatura de fusión en función de la concentración.

Para las fracciones menos concentradas se producía una fusión del sólido a la temperatura de 130°C. En el caso de la fracción que había sido concentrada a vacío a un nivel mayor, se empezó a detectar este cambio de fase a los 145°C, es decir, valores de °Brix más cercanos a 50 implican mayores temperaturas de fusión, con lo que se puede pensar que se favorecen las operaciones de separación posteriores.

### ***c) Influencia del grado de riqueza del disolvente***

Con el análisis de los primeros ensayos realizados con etanol de riqueza 96%, se observó que, al someter los distintos sólidos al efecto de las altas temperaturas, se tiene que los provenientes de la fracción menos concentrada fundían entre 130-135°C. Esto podría deberse a que el pequeño porcentaje de agua presente en el etanol 96%, el cual presenta una muy alta afinidad por los azúcares, podría estar suponiendo un impedimento para una correcta separación.

Tras el empleo de etanol de grado absoluto para la extracción, se observó un cambio de comportamiento de los sólidos obtenidos: existía una diferencia de apariencia entre los sólidos de la pared del crisol y los depositados en el fondo: los primeros fundían a 145°C, lo que puede indicar una cantidad considerable de azúcares, como la glucosa. Los que se encontraban en el fondo del crisol experimentaban un reblandecimiento a temperatura de 160°C, fundiéndose de rápidamente a los 175°C, valor bastante alejado de las temperaturas de fusión de los de los azúcares mayoritarios, acercándose a la de fusión del D-pinitol, por lo que podría estar reduciéndose la cantidad relativa de azúcares en favor de este último.

Por tanto, a la vista de los resultados, cabe establecer que el hecho de emplear disolventes de distinta pureza en etanol condiciona la eficiencia de separación en la extracción líquido-líquido y con ello, composición del producto final.

### ***d) Influencia de etapas auxiliares: ultracentrifugación***

Para todos los ensayos sobre los que se realizó la operación de ultracentrifugación, se observó, en relación a los resultados numéricos de temperaturas de fusión que, el comportamiento del sólido era muy similar al extracto análogo sin centrifugar en cada ensayo. Por ello podría pensarse que con esta etapa no se introducen mejoras.

Sin embargo, en el fondo del vial resultante del centrifugado sí se llegó a ver una cantidad apreciable de sólidos precipitados que no se habían podido eliminar mediante filtración. Adicionalmente, al tener en cuenta que los valores de temperatura de fusión no representan un indicador de alta precisión, especialmente si estas especies precipitadas suponen un porcentaje reducido del sólido final, se puede establecer por la anterior comprobación visual que la etapa adicional introducida tras la filtración sí supone una mejora en el desarrollo del proceso de separación del D-pinitol de otras sustancias.



### e) Influencia de etapas auxiliares: congelación

Al analizar el comportamiento del producto procedente del extracto congelado de manera previa a la fermentación frente al extracto no almacenado se observó que el comportamiento tanto del extracto en las etapas intermedias como del producto resultante ante la etapa de análisis no se veían alterados.

Por ello, dado que no se aprecian variaciones significativas, se piensa que esto no altera de manera considerable la composición o el comportamiento de las corrientes intermedias del proceso o del producto final. Esto puede resultar ventajoso a nivel técnico, por permitir almacenamientos intermedios en el proceso, lo que se puede derivar en una mejor planificación de los tiempos de operación.

### 4.2. Definición del proceso final. Condiciones de operación.

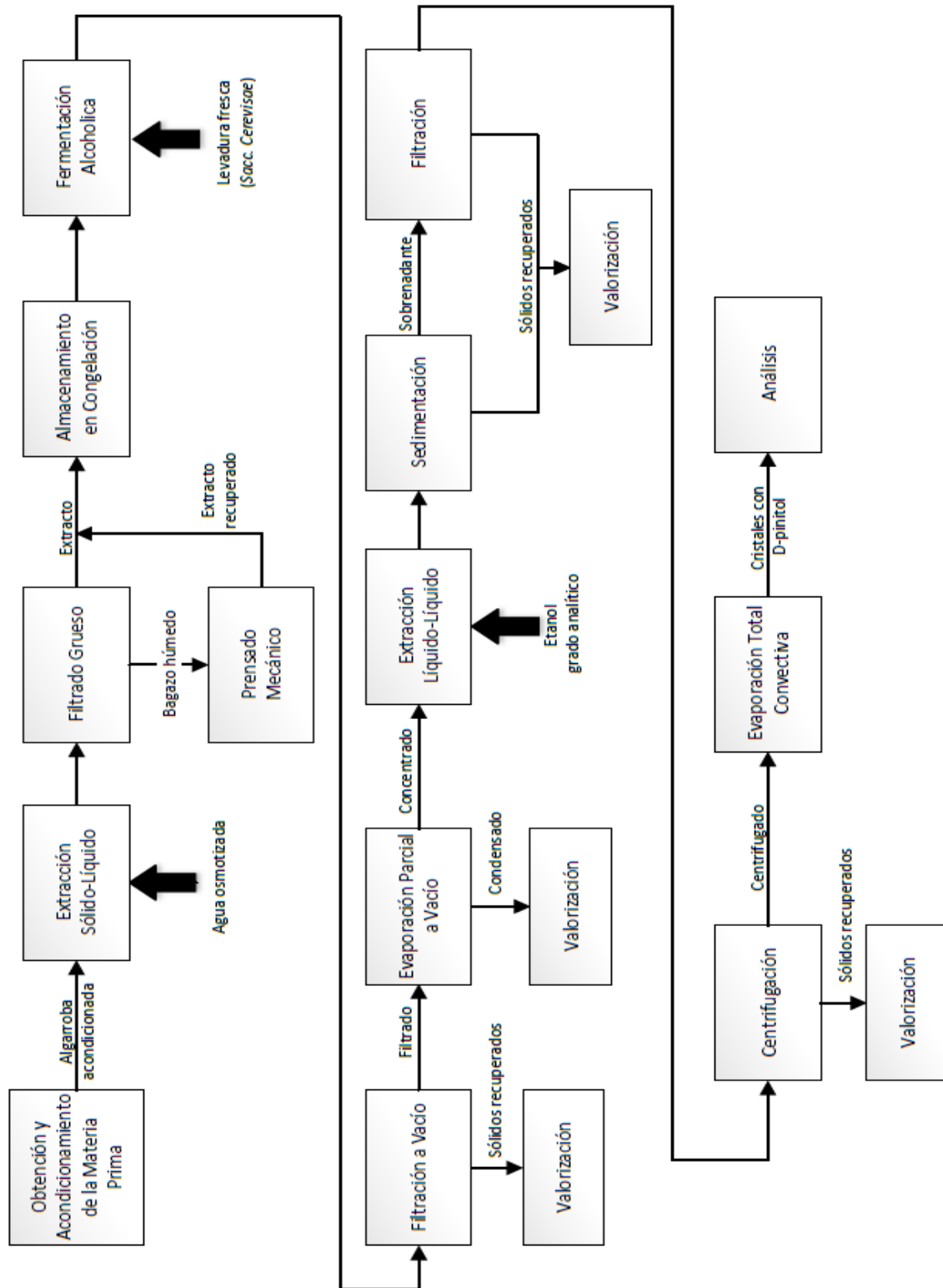
Tras el estudio de la influencia de todas las variables de proceso consideradas, y la comparación de rendimientos aparentes de extracción y purificación del D-pinitol, se puede definir las condiciones que se consideran óptimas, dentro de los rangos estudiados. Estos parámetros, junto al resto de condiciones operativas necesarias (incluyendo las obtenidas de la bibliografía) para un correcto desarrollo del proceso vienen recogidos en la Tabla 2, mostrada a continuación:

**Tabla 2. Resumen de las condiciones de operación seleccionadas (Fuente: elaboración propia)**

Obtención del Extracto		Purificación de D-Pinitol		
Variable de Operación	Selección	Operación	Parámetro	Selección
Método	ESL Convencional	Fermentación	Tasa inoculación (v/v)	1%
Disolvente	Agua osmotizada		Tiempo de reacción (h)	28
Tamaño partícula (mm)	≤ 2		Temperatura (°C)	30
			Agitación (rpm)	130
Ratio Sólido- Disolvente (w:v)	40:160 (1:4)	Evaporación Parcial	Concentración objetivo (°Brix)	50
Temperatura	Ambiental	Extracción Líquido-Líquido	Disolvente	Etanol
pH	7		Pureza disolvente	Absoluta
Agitación (rpm)	80		Ratio Disolvente- Disolución (v:v)	3:1
Tiempo operación (min)	60	Evaporación Final	Temperatura (°C)	82-105

Los parámetros anteriores se aplicarán sobre la secuencia de operaciones explicada anteriormente e incluyendo las operaciones que se han introducido adicionalmente durante el desarrollo de la experiencia. Con ello, se construye el diagrama de bloques en el que se recoge el diseño preliminar del proceso objetivo del estudio, mostrado en la Figura 2:

Figura 2: Diagrama de proceso de la obtención y análisis del D-pinitol contenido en la algarroba (Fuente: elaboración propia)



## 5. Conclusiones

Tras el presente estudio se ha realizado el diseño preliminar de un proceso de extracción de D-pinitol a partir del extracto de la algarroba, permitiendo plantear un procedimiento alternativo potencialmente más viable desde el punto de vista técnico y económico que un proceso de síntesis de dicha sustancia. A partir de los resultados experimentales de este trabajo, se pueden establecer las siguientes condiciones para las etapas del proceso de obtención de D-pinitol, a escala de laboratorio:

Para la fase de purificación del D-pinitol contenido en el extracto en conjunto a otras sustancias, es necesario una sucesión definida de etapas que presentan ciertos parámetros de operación que presentan gran influencia sobre el resultado final. Las más relevantes son una fermentación alcohólica, en la que se empleó levadura fresca del género *Saccharomyces Cerevisae*, con tasas del 1% v/v, a 30°C y 28 horas y en agitación continua. Tras su finalización, se recomienda la eliminación de sólidos suspendidos en la disolución, mediante operaciones de filtrado.

Para la etapa de ajuste de concentración, se plantea el uso de una evaporación a vacío, aplicando temperaturas de 65°C y presiones de -720 mmHg, hasta alcanzar valores de 50 °Brix.

Para la eliminación final de solutos se emplea una extracción selectiva líquido-líquido mediante etanol analítico de grado absoluto, e implementando una agitación vigorosa, a la cual le debería suceder operaciones de separación de los sólidos formados, como filtraciones o centrifugaciones.

Finalmente, para la obtención de cristales con contenido en D-pinitol, se propone el uso de una evaporación total del disolvente por aplicación de calor de forma convectiva (a temperaturas entre 82 y 105°C).

El proceso estudiado es, sin embargo, susceptible de verse sometido a diversas modificaciones o mejoras, siendo un ejemplo de ello un cambio en la manera de realizar los análisis de la composición del producto. El método empleado sirve únicamente como indicativo de la presencia de D-pinitol, y resulta bastante inexacto, por lo que para poder comparar resultados con una precisión adecuada se debería estudiar la implementación de otros más precisos, como por ejemplo métodos espectrométricos, cromatográficos HPLC o con señales de diodo o de polarimetría.

Del mismo modo, se plantea la posibilidad de incluir modificaciones que afecten a la etapa de extracción inicial, realizándola por ejemplo con un fluido supercrítico, o asistida por ultrasonidos o microondas, con el fin de contrastar si, como se recoge en la bibliografía, se pueden obtener mejoras de hasta un 600% en el rendimiento de extracción con respecto al proceso convencional empleado.

También se propone como línea de investigación futura, continuar con el desarrollo del proceso de purificación, más costos en tiempo y recursos. Para ello, se podría continuar estudiando las variables propuestas en este trabajo, como la realización de la reacción biológica durante tiempos de operación más elevados a los empleados, con el fin de maximizar la eliminación de azúcares, o la utilización de otros disolventes en la etapa de extracción líquido-líquido que posean mayor selectividad relativa entre los componentes a separar. Finalmente, también se ha de considerar la introducción de otras etapas distintas a las consideradas para el proceso de purificación, como, por ejemplo, la sustitución de la etapa de eliminación de azúcares por un método enzimático, de inversión mediante resinas iónicas o con cromatografías de diversas características, empleando también técnicas de

separación con membranas o con columnas de resinas que permitan separar los compuestos que no fuesen de interés.

Algunas de estas últimas alternativas podrían resultar de especial interés, ya que permitiría la separación de las corrientes de azúcares y D-pinitol sin destruir la primera de ellas, con posibilidad de darles salida comercial para intentar incrementar los beneficios. Todas estas alternativas habrían de ser ensayadas en primera instancia a escala laboratorio y potencialmente en una planta piloto con el fin de establecer qué proceso ofrece mayor eficiencia y rentabilidad global frente a su coste de implantación y desarrollo.

## 6. Referencias

- Baumgartner, S., Genner-Ritzmann, R., Haas, J., Amadó, R., & Neukom, H. (1986). Isolation and Identification of Cyclitols in Carob Pods (*Ceratonia Siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 827-829.
- Esbenshade, H., Huma, Z., Nassar-Abbas, S. M., Khan, M., Jayasena, V., & Vu, T. (2016). Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 15, 63-73.
- Hudlicky, T., Price, J., Rulin, F., & Tsunoda, T. (1990). Efficient and enantiodivergent synthesis of (+)- and (-)-pinitol. *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (25), 9439-9440.
- Hurtta, M., Pitkänen, I., & Knuutinen, J. (2004). Melting Behaviour of D-Sucrose, D-Glucose and D-Fructose. *Carbohydrate Research*, 339, 2267-2273.
- Karkacier, M., Erbas, M., Uslu, M., & Aksu, M. (2003). Comparison of Different Extraction and Detection Methods for Sugars Using Amino-Bonded Phase HPC. *Journal of Chromatographic Science*, 41, 331-333.
- Kim, J., Kim, J., Joo, H., Jung, S., & Kim, J. (2005). Determination of Total Chiro-inositol Content in Selected Natural Materials and Evaluation of the Antihyperglycemic Effect of Pinitol Isolated from Soybean and Carob. *Food Science and Biotechnology*, vol. 14, núm 4, 441-445.
- López-Sánchez, J., Moreno, D., & García-Viguera, C. (2018). D-Pinitol, a highly valuable product from carob pods: Health-promoting effects and metabolic pathways of this natural super-food ingredient and its derivatives. *AIMS Agriculture and Food*, 41-63.
- Macías Camero, B., & Sanjuan Merino, C. (2003). *España Patente nº ES2179767*.
- Macías Camero, B., & Sanjuan Merino, C. (2004). *EEUU Patente nº US6699511*.
- Marquino Fernández, L. (2017). Diseño de una Planta Piloto para la Obtención de Sirope a partir de la Algarroba (*Ceratonia Siliqua*) de la Variedad Matalafera, mediante Extracción Sólido-Líquido. *Trabajo Fin de Máster en Ingeniería Química*. Valencia, Valencia, España: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales, Universidad Politécnica de Valencia.
- Oziyci, H., Turhan, I., Tetik, N., Kulcan, A., Akkoyun, T., Yatmaz, E., . . . Karhan, M. (2015). Concentration of D-pinitol in Carob Extract by Using Multi-Stage Enrichment Processes. *GIDA Food Journal*, 40(3), 125-131.
- Petit, M., & Pinilla, J. (1995). Production and Purification of a Sugar Syrup from Carob Pods. *Food Science and Technology (former Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie)*, 28, 145-152.
- Sanjuan Díaz, J. (1994). *España Patente nº ES2060544*.

- Tetik, N., Turhan, I., Oziyi, H., & Karhan, M. (2011). Determination of D-pinitol un Carob Syrup. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(6), 572-576.
- Tous Martí, J. (1984). Cultivo del Algarrobo. *Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Núm 10/84 HD*. Madrid, España: Publicaciones de Extensión agraria.
- Tous Martí, J. (1985). Comercialización y Variedades del Algarrobo. *Hojas Divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Núm 1/85 HD*. Madrid, España: Publicaciones de Extensión agraria.
- Turhan, I. (2014). Relationship between Sugar Profile and D-Pinitol Content of Pods of Wild and Cultivated Types of Carob Bean (*Ceratonia Siliqua* L.). *International Journal of Food Properties*, 17, 363-370.
- Turhan, I., Tetik, N., Mehmet, A., Karhan, M., & Certel, M. (2006). Liquid-Solid Extraction of Soluble Solids and Total Phenolic Compounds of Carob Bean (*Ceratonia Siliqua* L.). *Journal of Food Processing* 29, 498-507.
- Zhan, T., & Lou, H. (2007). Synthesis of azeole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. *Carbohydrate Research*, 865-80.