



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 349 522**

② Número de solicitud: 200901149

⑤ Int. Cl.:  
**C07D 211/78** (2006.01)  
**A61K 31/44** (2006.01)  
**A23L 3/3544** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **05.05.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**04.01.2011**

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Murcia**  
**Avda. Teniente Flomesta, s/n**  
**30003 Murcia, ES**

⑱ Inventor/es: **Escribano Cebrián, Josefa;**  
**García Carmona, Francisco y**  
**Gandía Herrero, Fernando**

⑳ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

⑤④ Título: **Procedimiento de obtención de ácido betalámico y uso del mismo.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento de obtención de ácido betalámico y uso del mismo. El procedimiento de la invención se basa en la hidrólisis alcalina de una o más betalaínas en disolución acuosa, que da lugar a la degradación de las mismas generando ácido betalámico y las diversas aminas y/o aminoácidos que caracterizan a cada betalaína, incluido el *ciclo*-DOPA o *ciclo*-DOPA-glucósido presente en las betacianinas. La posible reversión de la reacción por condensación del ácido betalámico con las aminas y/o aminoácidos generados, se evita llevando a cabo una cromatografía de intercambio aniónico, preferiblemente cargando la disolución al pH de la hidrólisis, quedando el ácido betalámico retenido y eliminándose las aminas y/o aminoácidos. Tras la elución, se obtiene ácido betalámico de gran pureza con alto rendimiento. La invención se refiere también al uso del ácido betalámico como antioxidante y/o molécula capturadora de radicales libres, por la gran actividad antioxidante y antirradicálica del ácido betalámico obtenido.

ES 2 349 522 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de ácido betalámico y uso del mismo.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de ácido betalámico a partir de betalaínas, así como al uso de dicho ácido betalámico como antioxidante.

10 **Antecedentes de la invención**

Los compuestos antioxidantes son importantes y necesarios en distintos ámbitos de la industria: en el ámbito alimentario, para mantener los alimentos protegidos frente a la oxidación a través de radicales libres y por sus efectos beneficiosos sobre la salud de los consumidores, en el ámbito cosmético, para proteger la piel de procesos degenerativos o de envejecimiento que se desarrollan mediante radicales libres, y en el campo farmacéutico por considerarse protectores frente a enfermedades como el cáncer, reumatismo, o las enfermedades cardiovasculares, donde la presencia de radicales libres o el estrés oxidativo son un factor determinante.

Frente al uso tradicional en alimentación de antioxidantes sintéticos, como BHT y BHA, que estén siendo cuestionados en cuanto a su inocuidad (Ito *et al.*, 1986, *Food Chem. Toxicol.*, 24: 1071-1082; Hirobe *et al.*, 1987, *Jpn. J. Canc. Res.*, 78: 317-321), se está estableciendo en nuestro tiempo el uso de antioxidantes naturales, fundamentalmente de tipo fenólico o tetraterpenoide. Por ello, la identificación de compuestos naturales con capacidad antioxidante y la búsqueda de métodos que faciliten su preparación o purificación está adquiriendo gran importancia.

Distintos estudios se han dirigido hacia la familia de las betalaínas, que son pigmentos hidrosolubles presentes en flores y frutas de plantas de la mayoría de familias del orden de las Cariofilales (Strack *et al.*, 2003, *Phytochemistry*, 62: 247-269), el orden al que pertenece el género *Beta*, del que forma parte la remolacha. También están presentes en hongos como *Amanita* (Musso, 1979, *Tetrahedron*, 35: 2843-2853) e *Hygrocybe* (von Arderme *et al.*, 1974, *Naturforsch.*, 29c: 637-639). Hasta la fecha, se han identificado más de 50 moléculas distintas pertenecientes a la familia de las betalaínas en la naturaleza.

Las betalaínas se dividen en dos grupos: las betacianinas, de color violeta (espectro de absorbancia con máximo en torno a  $\lambda_m = 536$  nm), que son las más abundantes en la remolacha roja (*Beta vulgaris*), y las betaxantinas, de color amarillo-naranja ( $\lambda_m = 480$  nm). La estructura básica de las betalaínas fue elucidada por métodos químicos en los años 60. Wyler *et al.* (1963, *Hel. Chim. Acta*, 46: 1745-1748) identificaron la betanidina (betacianina) como un derivado imonio del ácido betalámico con la molécula *ciclo*-DOPA (*ciclo*-3-(3,4-dihidroxifenil-alanina)). Estudios posteriores han revelado la existencia de betaxantinas derivadas de multitud de aminoácidos y aminas, y de betacianinas complejas, que incorporan fundamentalmente azúcares a su estructura. Así, puede decirse que las betacianinas, en general, son glicósidos o acilglicósidos de los aglicones betanidina o isobetamidina (ambas resultantes de la unión del ácido betalámico a un residuo de *ciclo*-DOPA), mientras que las betaxantinas están formadas a partir del ácido betalámico y diversas aminas o aminoácidos. La Fig. 1 muestra la estructura del ácido betalámico y las estructuras tipo de las betalaínas (betaxantinas y betacianinas), así como la fórmula de varias betalaínas: las betaxantinas vulgaxantina I y II e indicaxantina, las betacianinas betanidina y betanina y el isómero de la betanidina conocido como isobetamidina, que representa la estructura básica de las isobetacianinas. Como puede comprobarse en la Fig. 1, el ácido betalámico [ácido 4-(2-oxo-etilidén)-1,2,3,4-tetrahidro-piridín-2,6-dicarboxílico] es, por tanto, la estructura básica común a todas las betalaínas y es el compuesto de partida en la obtención de una gran variedad de los pigmentos betalaínas.

Aunque las betalaínas pueden encontrarse en multitud de especies y tejidos, las fuentes comestibles más destacables de betaxantinas y betacianinas son la raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris*), que es particularmente rica en betanina (betanidin-5-O- $\beta$ -glucósido), y el fruto de cactáceas del género *Opuntia* (principalmente *Opuntia ficus indica*, conocida vulgarmente como chumbera o nopal).

El ácido betalámico, por su parte, es una molécula natural presente en frutos comestibles de plantas del orden de las Cariofilales. Es una molécula poco abundante en la naturaleza, que sin embargo aparece como constituyente natural en los frutos comestibles de *Opuntia* (Stintzing *et al.*, 1999, *Planta Med.*, 65: 632-635). En general, el ácido no se encuentra en la naturaleza como tal, sino que principalmente se encuentra formando parte de la estructura de las betalaínas.

60 **Actividad biológica de los pigmentos betalaínas**

Aunque se está lejos del conocimiento existente sobre otras familias de pigmentos, la actividad biológica de las betalaínas ha sido investigada en la última década.

Las primeras publicaciones que evidenciaron una actividad capturadora de radicales libres (uno de los parámetros indicativos de actividad antioxidante) en betalaínas fueron llevadas a cabo con pigmentos extraídos de raíz de remolacha (Escribano *et al.*, 1998, *Phytochem. Anal.*, 9: 124-127). Subsiguientes trabajos extendieron la información disponible a otras betalaínas y aportaron datos acerca de la importancia de la presencia de grupos hidroxilo en la estructura para la existencia de actividad antioxidante, así como de otros grupos donadores de H tales como los grupos

=NH (Butera *et al.*, 2002, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6895-6901; Pavlov *et al.*, 2002, *Z. Naturforsch.*, 57c: 640-644; Cai *et al.*, 2003, *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2288-2294); en general, parece que las betaxantinas exhiben una mayor capacidad antioxidante que las betacianinas, lo cual parece poder atribuirse a una mayor presencia de grupos donadores de H (2 - 3 grupos imino (=NH) y 1-2 grupos hidroxilo en los restos procedentes de aminas o aminoácidos de las betaxantinas, frente a un único -OH y un único =NH en las betacianinas, pues los grupos -OH de las unidades de azúcares de las betacianinas no tienen actividad donadora de H y no tienen actividad antioxidante).

Así mismo se ha demostrado la capacidad de betanina y betanidina de inhibir la peroxidación *in vitro* del ácido linoleico y la oxidación de las LDL a concentraciones más bajas que otros conocidos antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol o la catequina (Kanner *et al.*, 2001, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 5178-5185).

Las betalaínas también han sido descritas como retiradores de ácido hipocloroso, producto de la enzima mieloperoxidasa implicado en la respuesta inflamatoria (Allegra *et al.*, 2005, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332: 837-844).

Recientemente se ha demostrado que concentraciones muy bajas de betanina en la dieta son capaces de inhibir la formación de tumores de piel e hígado en ratones (Kapadia *et al.*, 2003, *Pharmacol. Res.*, 47: 141-148), y que en humanos las concentraciones en plasma tras la ingesta de estos compuestos son suficientes para promover su incorporación en las LDL y en glóbulos rojos a los que protegen de daño oxidativo y hemólisis (Tesoriere *et al.*, 2003, *Free Radic. Res.*, 37: 689-696; Tesoriere *et al.*, 2004, *Am. J. Clin. Nutr.*, 80: 391-395; Tesoriere *et al.*, 2005, *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1266-1270). La patente WO2006084768A1 recoge la presencia de un compuesto del grupo de las betalaínas y sus agliconas en una composición farmacéutica para prevenir y tratar el cáncer. El uso de algunas betalaínas también se ha reivindicado para otras enfermedades: JP2005336069 (diabetes), JP2006028029 (derivadas de hipercolesterolemia), CN101176775 (hepatitis B).

En cuanto al ácido betalámico, su escasez en la naturaleza como tal y las dificultades que, como se describe más adelante, presenta su obtención y purificación, han dificultado el conocimiento de sus propiedades. En lo que se refiere a una posible actividad antioxidante, la misma no es evidente, en tanto en cuanto no hay una metodología que permita discernir si una estructura determinada es o no antioxidante o en qué grado. Por un lado, el ácido betalámico carece de un número elevado de enlaces dobles conjugados, una de las propiedades que parece influir en gran medida en las propiedades antirradicales de moléculas como los carotenoides, pero incluso en esta familia de pigmentos existen compuestos sin actividad antirradicálica alguna, y hay que considerar grupos adicionales en la estructura para justificar las propiedades de cada miembro de la familia de los carotenoides (Miller *et al.*, 1996, *FEBS Letters*, 384: 240-242). El ácido betalámico, además, carece de grupos hidroxilo de naturaleza fenólica, un elemento común de estructuras que poseen capacidad antirradical o antioxidante, reconocido como tal en la bibliografía (Villano *et al.*, 2005, *Anal. Chim. Acta*, 538: 391-398), cuya ausencia da lugar a carencia de actividad antioxidante en compuestos como *trans*-chalcona, flavona, flavanona e isoflavona (Cai *et al.*, 2006, *Life Sciences*, 78: 2872-2888), todos ellos miembros de la familia de los flavonoides, una familia de moléculas hidrosolubles que, salvo por las excepciones citadas, muestra en general una clara actividad antioxidante. El número de posibles grupo donadores de H (-OH y =NH) presentes en el ácido betalámico también es reducido con respecto al de otros compuestos de la familia de la que es precursor, la de las betalaínas. Todo ello ha propiciado que hasta ahora no haya datos en la bibliografía acerca de una posible actividad antioxidante y/o captora de radicales libres del ácido betalámico.

#### Obtención de betalaínas y de ácido betalámico

La alta solubilidad de las betalaínas en agua hace posible su extracción por disrupción tisular de material vegetal en disoluciones acuosas tamponadas (Escribano *et al.*, 1998, *Phytochem. Anal.*, 9: 124-127) o incluso en agua purificada (Kujala *et al.*, 2002, *Eur. Food Res. Technol.*, 214: 505-510). Sin embargo, es habitual la adición de cantidades variables de disolventes orgánicos miscibles con el agua como etanol (Wybraniec *et al.*, 2001, *Phytochemistry*, 58: 1209-1212), metanol (Cai *et al.*, 2001, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 1971-1978) o acetona (Martínez-Parra y Muñoz, 1997, *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2984-2988). Otras posibilidades de obtención de pigmentos incluyen la extracción sólido-líquido por aplicación de un campo eléctrico pulsante a secciones de tejido fresco (Fincan *et al.*, 2004, *J. Food Eng.*, 64: 381-388).

El ácido betalámico puede ser obtenido por medios químicos (Büchi *et al.*, 1977, *J. Org. Chem.*, 42: 2192-2194), en un proceso complejo que conlleva múltiples pasos y bajos rendimientos. Otros autores han obtenido ácido betalámico procedente de la degradación a pH alto de betanina (hidrólisis alcalina de betalaínas, que pueden considerarse estables entre pH 3 y pH 7) (Wyler *et al.*, 1965, *Helv. Chim. Acta*, 48: 361-366). En este caso aparece en el medio el otro producto de degradación del pigmento, el *ciclo*-DOPA-glucósido, que revierte el proceso y regenera betanina (Huang y von Elbe, 1985, *J. of Food Sci*, 50: 1115-1120), pues la presencia conjunta de ácido betalámico con cualquier aminoácido o amina, incluyendo el *ciclo*-DOPA-glucósido, provoca su condensación a valores de pH moderados. Ello es debido a que se produce una reacción de Schiff de formación de iminas. Evitar tal reacción es la clave para obtener el ácido betalámico.

Una propuesta de solución a la reversión de la reacción se ha encontrado en la extracción del ácido betalámico con acetato de etilo (Schliemann *et al.*, 1999, *Plant Physiol.*, 119: 1217-1232) previa acidificación del medio de hidrólisis. El residuo obtenido tras la evaporación del disolvente orgánico constituye una fuente de ácido betalámico, que puede ser utilizado para realizar una reacción de condensación de Schiff entre el grupo aldehído del ácido y el amino de otro compuesto (aminoácido o amina), para formar betaxantinas semisintéticas estables. Este procedimiento permite

utilizar las betaxantinas obtenidas para la identificación de betaxantinas en extractos naturales; sin embargo, tal y como reconocen los propios autores, los rendimientos en el proceso de obtención del ácido son bastante bajos, lo que condiciona la utilidad y aplicabilidad de proceso de obtención de betaxantinas.

5 La cuantificación de betalaínas y ácido betalámico se lleva a cabo espectrofotométricamente. Para las betaxantinas se considera un coeficiente de absorción molar de  $\varepsilon = 48.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 480 nm (Trezza y Zrýd, 1991, *Phytochemistry*, 30: 1901-1904; Schliemann *et al.*, 1999, *Plant Physiol*, 119: 1217-1232). Para betacianinas, los coeficientes utilizados son  $\varepsilon = 65.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\varepsilon = 54.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 536 nm para betanina y betanidina respectivamente (Schwartz y von Elbe, 1980, *J. Agric. Food Chem.*, 28: 540-543), coeficientes que son válidos también para los correspondientes isómeros estructurales de estos compuestos, isobetanina e isobetanidina. Para el ácido betalámico se considera un coeficiente de absorción molar de  $\varepsilon = 24.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 424 nm (Trezza y Zrýd, 1991, *Phytochemistry*, 30: 1901-1904).

15 Según puede deducirse de lo anteriormente expuesto, las betalaínas constituyen una familia de compuestos de gran interés por sus propiedades, entre ellas la actividad capturadora de radicales libres (betacianinas y betaxantinas). Por ello, sería interesante no sólo incrementar el conocimiento de otros posibles miembros de la familia presentes en la naturaleza sino, incluso, disponer de metodologías que facilitaran la fabricación de betalaínas semisintéticas con sustituyentes de interés. Para ello, sería muy útil disponer de un procedimiento que facilitara la obtención de la molécula precursora que las forma, el ácido betalámico. Ello permitiría, además, estudiar con facilidad la actividad del ácido betalámico y conocer si tiene o no propiedades exhibidas por las betalaínas, tales como la capacidad antioxidante y capturadora de radicales libres, lo que permitiría plantearse su utilidad industrial. La presente invención proporciona una solución a este problema.

### Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona un método para la obtención y purificación de ácido betalámico a partir de fuentes de betalaínas naturales que evita las desventajas de los métodos de preparación de ácido betalámico previamente conocidos, especialmente de los métodos basados en la degradación a pH alto de betanina (hidrólisis alcalina de betalaínas), en los que la aparición en el medio de reacción del otro producto de degradación del pigmento, el *ciclo-DOVA*-glucósido, daba lugar a la reversión del proceso y a la regeneración de betanina. El estudio de las propiedades del ácido betalámico obtenido por el método de la invención ha permitido comprobar su gran actividad como antioxidante y molécula capturadora de radicales libres, demostrando con ello que las propiedades del ácido betalámico lo hacen interesante para su aplicación en formulaciones alimentarias, farmacéuticas o cosméticas.

35 El procedimiento de preparación de ácido betalámico de la invención se basa en la obtención de dicho compuesto por hidrólisis alcalina de disoluciones de los pigmentos betalaínas. Ello provoca la degradación de los pigmentos, y de este modo, a partir de una betalaína se obtiene ácido betalámico y el compuesto con el que éste esté condensado. Sin embargo, tal como se ha comentado previamente, la presencia conjunta de ácido betalámico con cualquier aminoácido o amina, incluyendo el *ciclo-DOPA*-glucósido provoca su condensación a valores de pH moderados. Ello es debido a que se produce una reacción de Schiff de formación de iminas. Evitar la reacción de condensación del ácido betalámico formado con moléculas que contenga uno o más grupos amino es crítico para obtener ácido betalámico purificado con un alto rendimiento y poco contaminado con compuestos de condensación. Para ello, en la presente invención, tras la degradación de betalaínas, se realiza un proceso de purificación del ácido en matrices de intercambio aniónico.

45 Así, un aspecto de la invención se refiere a un método para la preparación de ácido betalámico a partir de al menos una betalaína que comprende las etapas de:

- a) obtener ácido betalámico sometiendo a hidrólisis alcalina al menos una betalaína que se encuentra en disolución;
- 50 b) purificar el ácido betalámico obtenido mediante un proceso de cromatografía a través de una matriz de intercambio aniónico en la que queda retenido;
- c) recuperar el ácido betalámico liberándolo de la matriz de intercambio aniónico;
- 55 d) opcionalmente, comprobar la pureza del ácido betalámico resultante.

60 Se prefiere que la hidrólisis alcalina de la betalaína o betalaínas a partir de las cuales se genera el ácido betalámico se provoque incrementando el pH de la disolución hasta un valor de 11 o superior.

65 El ácido betalámico interactúa con la matriz de carga aniónica incluso a valores de pH cercanos a la neutralidad. En la presente invención se prefiere, pero no excluyentemente, que la adición de la muestra a la matriz de intercambio aniónico se efectúe a pH igual o superior a 11,0. Ello garantiza una interacción más fuerte con la matriz de intercambio aniónico. Además, mantener la disolución que contiene el ácido betalámico a un pH elevado, en lugar de disminuir su pH una vez provocada la hidrólisis alcalina de la betalaína o betalaínas presentes en dicha disolución, disminuye la tasa de reversión de la reacción, contribuyendo a que el rendimiento de ácido betalámico sea mayor, pues se evita la rápida reacción con aminoácidos y aminas que tendría lugar al bajar el pH tras la hidrólisis.

Como resina intercambiadora aniónica válida para llevar a cabo el procedimiento de la invención se puede considerar cualquiera de las resinas habituales, conocidas por los expertos en la técnica, que contienen una alta concentración de grupos polares con carga o densidad de carga positiva, generalmente incorporados a una matriz de un polímero sintético. Son válidas tanto las resinas que llevan unidas grupos funcionales que se consideran “bases fuertes”, tales como las que contienen grupos amino cuaternario (de las que son ejemplos comerciales las resinas ISOLUTE® SAX, de Biotage AB, Uppsala, Suecia, basadas en silano funcionalizado, la HiTrap™ Q Sepharose Fast Flow, de General Electric Healthcare, Milwaukee, USA, en la que la base polimérica es agarosa altamente reticulada), como las que llevan unidos grupos funcionales que pueden considerarse “bases débiles”, tales como las que contienen grupos amino terciarios, secundarios o primarios (de las que son ejemplos comerciales la resina ISOLUTE® NH2, de Biotage AB, Uppsala, Suecia, basada también en silano, en este caso funcionalizado con aminopropilo, así como también las resinas de General Electric Healthcare HiTrap™ DEAE Sepharose Fast Flow y HiTrap™ ANX Sepharose 4 Fast Flow, en las que la base polimérica es agarosa altamente reticulada, funcionalizada con grupos  $-N^+(C_2H_5)_2H$ ). Entre los productos distribuidos por Sigma-Aldrich existen marcas que integran resinas de diversos tipos, tanto de “bases fuertes” como de “bases débiles”, para elegir según las necesidades, tales como las series Lewatit® (marca de Lanxess Deutschland GmbH), Amberlite® y Dowex® (marcas de The Dow Chemical Company, Michigan, USA) o Diaion® (marca de Mitsubishi Chemical Corporation, Japón). En general, se prefieren las resinas intercambiadores de aniones que llevan unidas bases fuertes porque sufren menos variaciones en su capacidad de carga en función del pH y tienen un rango mayor de pH de trabajo. Tanto en uno como en otro caso, la purificación se produce tras una interacción con las cargas negativas del ácido, que da lugar a que el mismo quede retenido en la matriz formada por la resina, mientras que otros compuestos presentes en la disolución tales como, por ejemplo, aquellos que contengan grupos amino (los compuestos cuya interacción con el ácido betalámico se desea evitar), no quedarán retenidos en la matriz, facilitándose la separación del ácido betalámico de los mismos.

El uso de resinas de intercambio aniónico utilizando directamente la muestra procedente del medio de hidrólisis básica contradice las prácticas corrientes de trabajo con las mismas, saliéndose fuera del rango habitual de uso de este tipo de matrices, pues no es habitual el uso de muestras con valores de pH tan elevados. Así, por ejemplo, en el caso de la resina utilizada en el Ejemplo 1 de la presente memoria, la Q Sepharose Fast Flow de General Electric Healthcare, Milwaukee, USA, el rango de pH de trabajo considerado por el fabricante está entre 2 y 12 unidades de pH (véase el manual de instrucciones para “Sepharose Fast Flow ion exchangers” accesible en la página web de la empresa, <http://www.gelifesciences.com>), por lo que la aplicación de una muestra a un pH de 11 o superior supone situarse en la zona extrema de trabajo con la resina y puede considerarse desaconsejada. En el caso descrito en el Ejemplo 1, el uso fuera de los parámetros establecidos de las matrices da lugar a un oscurecimiento de las mismas, pero presenta la ventaja de simplificar el procedimiento de purificación del ácido betalámico y da lugar a un aumento en los rendimientos obtenidos. Además, no impide la reutilización posterior de las matrices.

Por otro lado, trabajar en un rango de pH superior a 7 contradice también las prácticas habituales en los protocolos de purificación de los compuestos más próximos al ácido betalámico, las betalainas, para las cuales se recomienda trabajar preferiblemente a un pH ligeramente ácido, que ayuda a su estabilización y, preferiblemente, el presencia de ácido ascórbico, para evitar su oxidación. Los protocolos de cromatografía de intercambio aniónico convencionales llevados a cabo con ellas, tales como el recomendado para la purificación de extractos de betacianina altamente concentrados (Strack *et al.*, 1993, Betalains, in: Dey, P.M. and Harborne, J.B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 8, Alkaloids and Sulphur Compounds (Waterman, P.G., Ed.), Academic Press, Londres, pp. 421-450), han recurrido al uso de columnas de Dowex 1X8 (The Dow Chemical Company) utilizando un medio ácido, concretamente un gradiente de ácido fórmico acuoso. Por tanto, los procedimientos habituales de trabajo con los compuestos que podrían considerarse más próximos desde el punto de vista de su estructura química tampoco sugerían recurrir a un pH de trabajo tal elevado durante el procedimiento de purificación.

Las resinas de intercambio iónico comercialmente disponibles (y, entre ellas, las resinas de intercambio aniónico en particular), se presentan generalmente en forma de esferas o perlas de 0,3 a 1,2 mm de tamaño efectivo, aunque también las hay en forma de polvo. Dichas resinas de intercambio aniónico se pueden utilizar de cualquier modo que posibilite la interacción y posterior purificación del ácido: tanto en forma de partículas añadidas a la disolución que contenga el ácido betalámico, como empaquetadas en una columna. Se prefiere su uso empaquetadas en una columna, en la cual se carga la disolución que contiene el ácido betalámico.

Como fase móvil se utilizan tampones acuosos de baja fuerza iónica, para promover el lavado de contaminantes y evitar la interferencia de otros aniones en la unión de la forma aniónica del ácido betalámico a los grupos con carga de la resina. La fuerza iónica ( $I_c$ ) viene dada por la fórmula

$$I_c = \frac{1}{2} \sum_{B=1}^n c_B z_B^2$$

donde  $c_B$  es la concentración molar de un ion B ( $\text{mol/dm}^3$ ),  $z_B$  es el número de cargas de ese ion y el sumatorio se extiende a todos los iones de la disolución. Orientativamente, puede considerarse que valores inferiores a 50 mM serían valores adecuados de fuerza iónica, siempre teniendo en cuenta que, por lo general, la mayor parte de los compuestos

## ES 2 349 522 A1

con capacidad tamponante deben estar presentes a una concentración de al menos 10 mM para asegurar que exhiben una capacidad tamponante adecuada.

Por otro lado, dado que, por lo general, la conductividad (la capacidad de un material para conducir la corriente eléctrica) de las disoluciones diluidas depende, como la fuerza iónica, de su concentración de iones, otro valor orientativo para decidir si una disolución acuosa tamponante es adecuada o no como fase móvil para el procedimiento de la invención puede ser la conductividad específica de dicha disolución tamponante, es decir, el valor de conductividad que exhibe por unidad de longitud. Así puede considerarse que valores de conductividad específica menores de 5 mS/cm (miliSiemens por centímetro) podrían ser adecuados para los tampones acuosos útiles como fase móvil en el procedimiento de la invención.

En cuanto al compuesto a utilizar como sustancia tamponante en la fase móvil inicial, debe elegirse según el pH de trabajo teniendo en cuenta las recomendaciones habituales: debería tener un  $pK_a$  cercano al pH utilizado, distando del mismo preferiblemente no más de 0,5 unidades de pH; además, suele ser una recomendación general, aunque no imprescindible, que el ion tamponante presente la misma carga que el grupo intercambiador de iones. Para la elección del mismo puede recurrirse, por ejemplo, a tablas orientativas, tales como la que aparece en el *Handbook of Chemistry and Physics*, 83<sup>th</sup> edition, CRC-2002-2003, que se refleja a continuación:

TABLA 1

*Sustancias tamponantes para cromatografía de intercambio aniónico*

Intervalo de pH	Sustancia	Conc. (mM)	Contraión	pKa (25°C)
4,3-5,3	M-metilpiperazina	20	Cl <sup>-</sup>	4,75
4,8-5,8	Piperazina	20	Cl <sup>-</sup> o HCOO <sup>-</sup>	5,33
5,5-6,5	L-histidina	20	Cl <sup>-</sup>	6,04
6,0-7,0	Bis-Tris	20	Cl <sup>-</sup>	6,48
6,2-7,2; 8,6-9,6	Bis-Tris propano	20	Cl <sup>-</sup>	6,65; 9,10
7,3-8,3	Trietanolamina	20	Cl <sup>-</sup> o CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	7,76
7,6-8,6	Tris	20	Cl <sup>-</sup>	8,07
8,0-9,0	N-metil-dietanolamina	20	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	8,52
8,0-9,0	N-metil-dietanolamina	20	Cl <sup>-</sup> o CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	8,52
8,4-9,4	Dietanolamina	20 a pH 8,4 50 a pH 8,8	Cl <sup>-</sup>	8,88
8,4-9,4	Propano-1,3-diamino	20	Cl <sup>-</sup>	8,88
9,0-10,0	Etanolamina	20	Cl <sup>-</sup>	9,50
9,2-10,2	Piperazina	20	Cl <sup>-</sup>	9,73
10,0-11,0	Propano-1,3-diamino	20	Cl <sup>-</sup>	10,55
10,6-11,6	Piperidina	20	Cl <sup>-</sup>	11,12

Dicha Tabla es sólo orientativa, siendo posible la utilización de otros diversos compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos. Así, en el Ejemplo 2 de la presente solicitud se utiliza tampón fosfato de pH 6,0, por ser el fosfato, a diferencia del Bis-Tris, un compuesto inorgánico que presenta la ventaja de ser más estable frente a la contaminación y más barato que el Bis-Tris, característica relevante cuando se piensa en utilizar el procedimiento a gran escala.

La liberación del ácido betalámico de la matriz se realiza por métodos convencionales de cromatografía de intercambio iónico, prefiriéndose en el procedimiento de la invención el incremento de la fuerza iónica de las disoluciones de trabajo. Para incrementar la fuerza iónica del tampón de elución puede utilizarse un incremento en la concentración de una sal inerte tal como el cloruro sódico, sal cuyos iones no reaccionan ni con el compuesto a eluir ni con los grupos cargados unidos a la resina, exceptuando las interacciones de atracción y repulsión de cargas. El incremento en la fuerza iónica aumenta la competencia de los grupos cargados por los iones de intercambiador. Ello reduce la

interacción entre los iones del intercambiador y las moléculas de la muestra, provocando su elución. El uso de un gradiente de concentración de sal con una resina dispuesta en columna cromatográfica aporta la ventaja de una mejor resolución, con picos más estrechos, además de su alta reproducibilidad.

5 En cuanto al compuesto o compuestos de partida, para provocar la hidrólisis previa a la purificación del ácido betalámico puede ser utilizada cualquier betalaína (betacianina o betaxantina), obtenida por cualquier medio. Dado que, como se ha comentado previamente, según su composición, la hidrólisis de las betaxantinas da lugar a aminoácidos y/o aminas y la hidrólisis de la mayor parte de las betacianinas da lugar a la aparición de ciclo-DOPA, la aplicación del método de la invención resulta ventajosa en cualquiera de los casos, pues se disminuye la tasa de reversión de reinteracción del ácido betalámico con la molécula de *ciclo-DOPA* y la de condensación de dicho ácido betalámico con otras posibles aminas y/o aminoácidos generados en el medio de reacción, procedentes de la hidrólisis de betaxantinas.

10 Se prefiere que la muestra de partida que contiene al menos una betalaína sea una muestra procedente de la extracción de betalaínas a partir de una fuente natural de las mismas: una planta, un hongo o una parte de una planta o un hongo que contenga betalaínas de forma natural. Por ello, están comprendidos dentro del alcance de la invención aquellos procedimientos que incorporan una etapa previa a la hidrólisis de las betalaínas en la que se extraen las betalaínas de una planta, de un hongo, o de una parte de una planta o un hongo en los que están moléculas estén presentes de forma natural. Se prefiere particularmente que la fuente de betalaínas sea una de las fuentes comestibles de betalaínas conocidas: los frutos de plantas del género *Opuntia* (con particular preferencia por los frutos de *Opuntia ficus indica*), o las raíces de plantas del género *Beta* (con particular preferencia por las raíces de *Beta vulgaris*).

15 El método de extracción de las betalaínas puede ser cualquier de los métodos conocidos utilizados hasta ahora para tal fin, con particular preferencia por los métodos en los que no se emplean disolventes de tipo orgánico, sino que la extracción se produce en agua o en disoluciones tamponadas acuosas, generalmente con un paso previo en el que se lleva a cabo el pelado de la raíz o fruto de partida y el troceado del mismo e incluso, como sucede en el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 de la presente memoria, la homogeneización del material de partida previamente a la extracción. En dicho Ejemplo 1, la extracción se realizó en agua, a temperatura ambiente (20°C), sin realizar ningún período de incubación; aunque el experto en la técnica puede considerar conveniente optimizar estas variables (temperatura y tiempo de extracción) para aumentar el rendimiento de extracción en función del material de partida, hay que tener en cuenta que el tanto el incremento de la temperatura como el del tiempo de incubación influyen negativamente en la estabilidad de los pigmentos. Otros métodos de extracción compatibles con el procedimiento de la invención, accesibles en la bibliografía, incorporan tratamientos enzimáticos para conseguir una disminución de los restos de pulpa y un aumento del rendimiento en betalaínas, como es el caso del procedimiento de producción de jugo de remolacha roja enriquecido en betanina y betanidina tras tratamiento enzimático descrito por Kanner *et al.* (Kanner *et al.*, 2001, *J. Agric. Food Chem.*, 49: 5178-5185), que se incorpora a la presente memoria por referencia.

20 Para eliminar proteínas y alargar así la vida útil de las matrices, las betalaínas obtenidas de muestras naturales pueden ser ultrafiltradas. Estos pasos de pre-purificación de la muestra de betalaínas pueden obviarse (o incrementarse) en función del peso concedido al cuidado de las matrices y de las necesidades del producto final. La intención del protocolo descrito es la separación del ácido betalámico de los aminoácidos y aminas libres que comprometen su estabilidad por una reacción de condensación de Schiff.

25 Una ventaja de la presente invención es que no es necesario utilizar disolventes de tipo orgánico para obtener una disolución de ácido betalámico purificado y los rendimientos que pueden obtenerse desde betalaínas son muy altos. Así, en la práctica de la invención, el ácido obtenido puede corresponder al 86% del total de betalaínas de partida. Dicho porcentaje se calcula como la relación molar entre la cantidad de ácido betalámico obtenido desde el material de partida y la cantidad de pigmento del material de partida, el cual se evalúa considerando las concentraciones de las betalaínas mayoritarias de la muestra, que en el caso de la remolacha son betanina e isobetanina. Ambos valores se calculan espectrofotométricamente, a partir de los correspondientes coeficientes de absorción molar citados anteriormente en la sección de "Antecedentes de la invención".

30 El ácido betalámico obtenido se puede analizar por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Utilizando un detector de fotodiodos (PDA) con un amplio barrido de longitudes de onda se puede comprobar la no presencia de contaminantes de los pigmentos de partida. A través de análisis de espectrometría de masas con ionización por electrospray (HPLC-ESI-MS) se obtiene una relación carga masa de  $m/z$  212, correspondiente a la forma  $[M-H]^+$ , coincidente con la masa esperada, y confirmando así la presencia de la molécula del ácido betalámico.

35 El ácido betalámico obtenido por una realización del procedimiento de la invención, tal como se describe en los Ejemplos que aparecen más adelante en la presente memoria, ha servido para comprobar su alta actividad como antioxidante y molécula capturadora de radicales libres. Merece destacarse que el ácido betalámico presenta estas propiedades a pesar de no contener hidroxilos fenólicos (los cuales, como se ha comentado previamente, han sido descritos como muy relevantes a la hora de conferir actividad antirradical) y ni tan siquiera un sistema aromático; la ausencia de estas características no parecía hacer previsible que el ácido betalámico presentara las propiedades antioxidantes y de captura de radicales libres observadas.

65 Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del ácido betalámico como antioxidante y/o molécula capturadora de radicales libres. Se prefiere que la muestra a la que se añade el ácido betalámico para que actúe como antioxidante y/o molécula capturadora de radicales libres sea una formulación alimentaria, farmacéutica o cosmética.

La actividad capturadora de radicales libres del ácido betalámico se puede evidenciar a través de distintos métodos. En los Ejemplos de la presente memoria descriptiva se evalúa de manera preferida siguiendo su efecto sobre soluciones estables del radical libre ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (Escribano *et al.*, 1998, *Phytochem. Anal.*, 9: 124-127). La actividad exhibida por el ácido betalámico se compara con la del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, (compuesto al que se alude por lo general por la denominación Trolox, que es una marca registrada de Hoffman-LaRoche Ltd.), que es un potente antirradical hidrosoluble derivado de la vitamina E y una referencia estándar en medidas de dicha actividad. A concentraciones crecientes de ambas moléculas en el medio la cantidad de radical disminuye. En el caso del ácido betalámico la respuesta es más pronunciada que para el Trolox, produciéndose el mismo efecto con la mitad de concentración de ácido en la práctica de la invención.

El efecto del estado de protonación del ácido betalámico obtenido se evalúa 1 utilizando disoluciones de distinto pH en la caracterización de la actividad antirradical anterior. Valores de pH por encima de pH 5,5 suponen un considerable incremento de la actividad capturadora de radicales libres del ácido betalámico. A valores por debajo de pH 5,5 existe una actividad antirradical basal del ácido betalámico. En cualquier caso, dicha actividad a valores de pH ácido es superior a la exhibida por la molécula Trolox, usada como referencia. En la práctica de la invención, a valores de pH por encima de pH 5,5 su comparación arroja una actividad capturadora de radicales libres del ácido betalámico hasta un 240% superior a la de Trolox. Por ello, se prefiere el uso del ácido betalámico como molécula capturadora de radicales libres y/o antioxidante en muestras cuyo pH sea superior a 5,5.

La dependencia de la actividad medida sugiere la existencia de un equilibrio de protonación/desprotonación en la molécula purificada, que debe corresponder al grupo -NH, conjugado por resonancia electrónica con el hidroxilo del equilibrio ceto/enol del grupo aldehído. La desprotonación origina una forma con capacidad nucleófila que facilitaría su ataque a moléculas tales como las quinonas para formar aductos (Valero *et al.*, 1988, *Phytochemistry*, 27: 2055-2061). En función del pH la capacidad del ácido de atacar nucleófilamente a una quinona se ve modificada, atendiendo a su pKa. En los Ejemplos mostrados más adelante en la presente memoria, se observa el ataque del ácido betalámico sobre quinonas estables mediante espectrofotometría. La capacidad del ácido betalámico de llevar a cabo un ataque nucleófilo sobre las quinonas se ve afectada por el pH del medio y hay una baja capacidad para producirse la reacción nucleófila a valores de pH ácido, mientras que la reacción de adición se produce sin retardo a valores de pH elevados. Ello confirma que el efecto de pH observado para la capacidad antirradical es función de la protonación del grupo -NH conjugado con el hidroxilo, y que ésta está asociada al sistema resonante.

La capacidad antioxidante del ácido betalámico purificado se puede manifestar por medio de diversos métodos. En los Ejemplos de la presente memoria, de manera preferida se evidencia a través de la reducción directa de iones de hierro Fe (III), a hierro Fe (II), según el método propuesto por Benzie y Strain (Benzie y Strain, 1996, *Anal. Biochem.*, 239: 70-76). Dicha reducción se produce y se determina que el número de electrones involucrados en la reducción de hierro por ácido betalámico a pH ácido es de 2 electrones.

Esta invención se explica a continuación más detalladamente, mediante los ejemplos y figuras que aparecen seguidamente, que en ningún caso limitan el alcance de la misma, sino que los ejemplos están particularmente relacionados con realizaciones preferidas de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Obtención de ácido betalámico*

En el presente Ejemplo se describe la obtención de ácido betalámico a partir de betalaínas extraídas de la raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris*), fuente natural comestible de betalaínas en la que la betalaína mayoritaria es la betanina, compuesto cuya hidrólisis alcalina, además de ácido betalámico, rinde *ciclo*-DOPA-glucósido. Previamente a la etapa de hidrólisis alcalina de las betalaínas, las mismas se extrajeron a partir de la raíz de *Beta vulgaris* pelada, troceada y homogeneizada en agua, medio en el que se produce la extracción; el homogenado se sometió a centrifugación y el sobrenadante se ultrafiltró para eliminar proteínas. Las betalaínas extraídas fueron tratadas siguiendo el procedimiento de la invención: mediante hidrólisis alcalina de betalaínas en disolución acuosa, que da lugar a la formación de ácido betalámico y la presencia conjunta en el medio de diversos aminoácidos y aminas procedentes de las distintas betalaínas presentes, incluido el *ciclo*-DOPA-glucósido. Para evitar la condensación del ácido betalámico formado con los aminoácidos o aminas presentes, incluido el *ciclo*-DOPA-glucósido, se llevó a cabo una purificación cromatográfica utilizando resinas de intercambio aniónico, consiguiendo así la separación del ácido betalámico de los aminoácidos y aminas libres que comprometen su estabilidad por una reacción de condensación de Schiff.

La remolacha roja comestible utilizada fue adquirida en el supermercado de El Corte Inglés de Murcia (España). Las raíces fueron peladas y troceadas de manera manual con un cuchillo convencional antes de proceder a su homogeneización en una batidora doméstica Osterizer (Jarden Corporation, Rye, USA), con la adición de 1 mL de agua destilada por cada gramo de materia vegetal, cantidad que se consideró adecuada para extraer el contenido de pigmentos sin diluir en exceso la muestra. La temperatura de extracción fue de 20°C, sin realizar ningún período de incubación. El homogenado obtenido se filtró a través de una capa de gasa de nylon y se centrifugó a 120.000 g durante 40 minutos a 4°C, temperatura que se mantuvo durante el resto de pasos previos a la reacción de hidrólisis. El



## ES 2 349 522 A1

precipitado fue desechado y el sobrenadante se ultrafiltró a través de membranas YM-10 de Millipore (Bedford, USA) montadas en una célula con agitación Amicon 8050 (Millipore) con presión por nitrógeno (Air Liquide, París, Francia) para eliminar proteínas y alargar así la vida útil de las columnas.

5 A continuación, la muestra se dejó atemperar durante 30' a 20°C, temperatura a la cual se llevó a cabo la reacción, aunque en el rango de temperaturas próximo a temperatura ambiente en el que se llevó a cabo el ensayo (4°C-20°C), que no requieren calentamiento, la temperatura no se considera un factor relevante. Para provocar la hidrólisis, el pH de la disolución obtenida tras la ultrafiltración se elevó hasta valores por encima de pH 11,0 con amoníaco. El pH final de la reacción se midió con un pH-metro "Crison Micro pH 2002" (Crison Instruments, Barcelona, España),  
10 equipado con un electrodo Crison 5208, encontrando que el valor de pH medio tras la reacción fue de 11,5. La certeza de que el pH buscado se ha conseguido y que la reacción de hidrólisis se ha producido se obtiene de la observación de un cambio de color drástico entre el material de partida y el producto de reacción, pues el proceso de degradación implica un cambio de color desde violeta (betanina,  $\lambda_m = 536$  nm) hacia amarillo (ácido betalámico,  $\lambda_m = 424$  nm). Con ello, a partir de una betalaína se obtiene ácido betalámico y el compuesto con el que éste se encuentra  
15 condensado.

Tras la degradación de betalaínas se realizó un proceso de purificación del ácido en matrices de intercambio aniónico. En el presente caso se utilizaron columnas de Q Sepharose Fast Flow (General Electric Healthcare, Milwaukee, USA) de intercambio aniónico formadas por una matriz de agarosa entrecruzada (90  $\mu$ m de tamaño de partícula), derivatizada con grupos trimetilamonio. Para controlar y registrar las condiciones del experimento, se utilizó el equipo de purificación automático Äkta purifier (General Electric Healthcare), aunque el proceso puede llevarse a cabo sin el concurso obligado de tal equipo. La inyección de la mezcla de degradación conteniendo el ácido betalámico se realizó al pH resultante de la hidrólisis, mayor de pH 11,0. No es habitual el uso de muestras con valores de pH tan elevados. En particular, el rango de pH de trabajo considerado por el fabricante de la resina utilizada está entre 2 y 12 unidades de pH (Manual 71-5017-51 AF, "HiTrap ion exchange columns", de General Electric Healthcare), por lo que el valor de pH utilizado está en el límite de los valores recomendados. El uso de una disolución a este pH dio lugar a un oscurecimiento de la matriz, pero se justifica en la simplicidad del procedimiento de purificación y los rendimientos obtenidos. Además, no impide la reutilización posterior de las matrices.

30 La carga de la muestra efectuada a pH mayor de 11,0 garantiza la formación de una banda de muestra bien definida que empieza a resolverse al paso de la disolución tampón. Como fase móvil se utilizaron tampones acuosos de baja fuerza iónica para promover el lavado de contaminantes. Los datos para la fase móvil son los siguientes: Tampón fosfato 20 mM, pH 6,0, como disolvente A, y tampón fosfato 20 mM, pH 6,0 con cloruro sódico 2 M, como disolvente B. Se utilizaron dos volúmenes de columna distintos, 1 y 5 mL, con la misma longitud, utilizando un protocolo de  
35 elución distinto para cada una de las columnas:

- Protocolo de elución A (columna de 1 mL): 100% A desde la inyección de la muestra hasta 7 mL, seguido de un gradiente lineal desde 0% B hasta 35% B en 20 mL, recogiendo fracciones de 1 mL. El volumen de inyección fue de 100  $\mu$ L de medio de hidrólisis (la concentración de pigmento de partida fue 250  $\mu$ M, concentración que se calculó espectrofotométricamente, teniendo en cuenta los coeficientes de absorción molar de las betalaínas mayoritarias en la muestra, betanina e isobetanina, y determinando la concentración de pigmento de partida como la suma de la concentración de ambas betalaínas.

- Protocolo de elución B (columna de 5 mL): el lavado inicial se realizó con 65 mL de disolvente A y el gradiente se desarrolló desde 0% B a 35% B en 100 mL. El volumen de inyección fue 10 mL de medio de hidrólisis (concentración de pigmento de partida 250  $\mu$ M) y en este caso las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

La Fig. 2 muestra el cromatograma obtenido con el protocolo de elución A (panel A) y con el protocolo de elución B (panel B). En ambos casos se muestra el cromatograma a las longitudes de onda  $\lambda = 424$  nm (-),  $\lambda = 280$  nm (---), y el porcentaje de disolvente B (···). El panel A (protocolo de elución A) representa el proceso de purificación a pequeña escala y da lugar a un pico bien definido para el ácido betalámico, con un volumen de elución de 15,9 mL. En el panel B (protocolo de elución B) se observa el mismo proceso a escala mayor, donde el pico de betalámico aparece truncado por la gran absorbancia de las fracciones purificadas; el volumen de elución para el ácido betalámico es en este caso de 114,5 mL. El protocolo B demuestra que es posible escalar el proceso y obtener disoluciones de concentraciones  
55 elevadas.

El protocolo B dio lugar a rendimientos de hasta 86%, mientras que en la versión más reducida (protocolo A, columna de 1 mL) el rendimiento fue del 90%. El rendimiento se calculó en función del ácido betalámico obtenido de las fracciones purificadas finales y del pigmento de partida, evaluando espectrofotométricamente la concentración en  
60 ambos casos.

65

## Ejemplo 2

*Análisis del ácido betalámico obtenido*

## 5 2.1.- HPLC

El ácido betalámico obtenido de acuerdo con la metodología recogida en el Ejemplo 1, fue analizado por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los análisis se llevaron a cabo en un equipo Shimadzu LC-10A (Shimadzu, Kyoto, Japón), usando una columna Kromasil 100 C-18 (250 × 4,6 mm) con partículas de 5 μm de tamaño, suministrada por Teknokroma (Barcelona, España). La elución de los compuestos se llevó a cabo mediante la aplicación de un gradiente lineal entre dos disolventes desgasificados con helio. El disolvente A (condiciones iniciales) fue agua acidificada con 0,05% TFA (ácido trifluoroacético) y el disolvente B estaba compuesto por acetonitrilo con 0,05% TFA. El gradiente se desarrolló durante 25 min desde 0% B hasta 35% B a 25°C con un flujo aplicado de 1 mL/min. El detector de fotodiodos en serie SPD-M10A (Shimadzu) fue utilizado para seguir las eluciones cromatográficas por absorbancia. Se registraron las longitudes de onda comprendidas entre 250 y 700 nm.

En la Fig. 3 se muestra un cromatograma tipo resultante del análisis del ácido betalámico tras la purificación por intercambio aniónico, obtenido inyectando un volumen de 20 μL de una disolución 80 μM. El pico del compuesto purificado aparece con un tiempo de retención de  $R_t = 14,59$  min en las condiciones de análisis utilizadas. Se trata de un único pico detectado con un detector de fotodiodos, mostrando la purificación obtenida en el proceso descrito en el Ejemplo 1. La longitud de onda máxima obtenida en el detector fue de 407 nm, en el gradiente de acetonitrilo de la elución cromatográfica. La ausencia de otros picos, a pesar del amplio barrido de longitudes de onda realizado, confirma la ausencia como contaminantes de los pigmentos de partida, las betalainas a partir de las cuales se ha generado de ácido betalámico.

## 25 2.2. Espectrometría de masas

También se realizó un análisis de espectrometría de masas con ionización por electroespray (HPLC-ESI-MS) con un equipo Agilent VL 1100 equipado con un detector LC/MSD Trap (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Las condiciones de separación cromatográfica fueron las descritas en el punto 2.1., aunque se modificaron la columna y el flujo: se utilizó una columna Zorbax SB-C18 (30 × 2.1 mm) de 3.5 μm de tamaño de partícula (Agilent Technologies) y con un flujo de 0,3 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura de vaporización utilizada fue 350°C, manteniendo un voltaje constante de 3,5 kV. Se usó nitrógeno como gas protector, operado a una presión de 35 psi. La ionización de las muestras se realizó en modo positivo y se detectaron masas en el rango  $m/z$  60-600. El voltaje del multiplicador electrónico del detector fue 1.350 V. De este modo se obtuvo una masa de  $m/z$  212, correspondiente a la forma  $[M-H]^+$ , coincidente con la masa esperada de ácido betalámico, confirmando así que ése es el compuesto obtenido.

## 2.3. Absorbancia en la región UV-visible

La Fig. 4 muestra el espectro de UV-visible obtenido para el ácido betalámico (concentración 25 μM) en agua a 25°C, en un espectrofotómetro Uvikon 940 (Kontron Instruments, Zurich, Suiza).

## Ejemplo 3

45 *Actividad capturadora de radicales libres del ácido betalámico*

La actividad capturadora de radicales libres del ácido betalámico fue evaluada siguiendo su efecto sobre soluciones estables del radical libre ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). Se utilizó el ensayo de decoloración de ABTS<sup>+</sup>, siguiendo la disminución de color a la longitud de onda de  $\lambda = 414$  nm (Escribano *et al.*, 1998, *Phytochem. Anal.*, 9: 124-127). El radical fue preparado a partir de ABTS (2 mM) a través de la actividad de peroxidasa (88 UI/L de peroxidasa comercial de rábano tipo VI (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), en presencia de peróxido de hidrógeno (45 μM), en tampón acetato sódico 12 mM, pH 5,0. El reactivo se diluyó a 2/3 para añadir las muestras y realizar las medidas en tampón fosfato sódico 53 mM, pH 7,0. Las medidas se llevaron a cabo por duplicado tras 24 horas de incubación a 20°C, en un lector de placas Synergy HT (Bio-Tek Instruments, Winooski, USA). La linealidad de la respuesta del detector fue investigada en las condiciones del ensayo, obteniéndose un coeficiente de correlación lineal de  $r = 0,9993$ .

La actividad exhibida por el ácido betalámico se comparó con la exhibida por el derivado hidrosoluble de la vitamina E, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), en las mismas condiciones. La Fig. 5 muestra una comparativa entre los efectos de la presencia de ácido betalámico y Trolox en una disolución de ABTS radical a pH 7,0, a seis concentraciones distintas. Como puede verse, a concentraciones crecientes de ambas moléculas disminuyen los valores de absorbancia obtenidos a 414 nm (valor de longitud de onda a la que hay absorción de luz por parte del radical ABTS<sup>+</sup>), lo cual es una indicación de que la cantidad de radical presente en la disolución disminuye. En el caso del ácido betalámico se produce la total desaparición del radical a una concentración de 600 μM, mientras que para el Trolox es necesaria una concentración mayor, de 1000 μM, datos que indican que la actividad capturadora de radicales libres del ácido betalámico es superior a la de Trolox.

## Ejemplo 4

*Efecto del pH sobre la actividad antirradical del ácido betalámico*5 4.1. *Comparación con Trolox*

Para evaluar el efecto del estado de protonación del ácido betalámico obtenido sobre la actividad antirradical mostrada por el mismo, se procedió a realizar un nuevo ensayo de la actividad antirradical, con concentraciones de ácido betalámico o Trolox de 400  $\mu\text{M}$ , a distintos valores de pH, que oscilaban entre 3,5 y 8,5, con variaciones de media unidad de pH entre cada una de ellas. Para lograr estos valores de pH en las disoluciones, se utilizaron los tampones: acetato sódico en el rango de pH desde 3,5 a 5,5, y fosfato sódico en el rango pH 5,5 a 8,5. El resto de condiciones se mantuvo como en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Fig. 6, en la que aparece un único valor para las disoluciones de pH 5,5 tanto para el control como para Trolox o ácido betalámico, debido a que no hubo diferencia en la actividad exhibida a pH 5,5 independientemente de cuál fuera el tampón presente.

En la mencionada Fig. 6 se puede observar como valores de pH por encima de pH 5,5 suponen un considerable incremento de la actividad capturadora de radicales libres medida para el ácido betalámico, reduciendo la cantidad de radical ABTS<sup>+</sup> en el medio (medido a  $\lambda = 414 \text{ nm}$ ). A valores por debajo de pH 5,5 existe una actividad antirradical basal del ácido betalámico. Dicha actividad a valores de pH ácido es superior a la exhibida por la molécula Trolox. A valores de pH por encima de pH 5,5 esta comparación arroja una actividad capturadora de radicales libres del ácido betalámico hasta un 240% superior a la de Trolox. Así, por ejemplo, la diferencia en la absorbancia a 414 nm a pH 8,0 entre el control y la disolución de Trolox es 0,5635, mientras que la diferencia entre el control y la disolución de ácido betalámico es 1,3435 (238,4% mayor). A pH 8,5, la diferencia en la absorbancia a 414 nm entre el control y la disolución de Trolox es 0,5755 y la diferencia entre el control y el ácido betalámico es 1,3865 (240,9% mayor).

25 4.2. *Capacidad para atacar quinonas en función del pH*

La dependencia del pH de la actividad antirradical medida sugiere la existencia de un equilibrio de protonación/desprotonación en la molécula purificada, que debe corresponder al grupo -NH, conjugado por resonancia electrónica con el hidroxilo del equilibrio ceto/enol del grupo aldehído. Debido a este equilibrio, en función del pH la capacidad del ácido de atacar nucleófilamente a una quinona estable se ve modificada, atendiendo a su pKa. El ataque nucleófilo a quinonas ha sido descrito previamente para otras moléculas (Valero *et al.*, 1988, *Phytochemistry*, 27: 2055-2061).

Para observar el fenómeno se utilizaron quinonas estables de 4-metil-catecol, formadas en agua desde 4-metil-catecol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) y la enzima comercial tirosinasa de hongo (EC 1.14.18.1) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) como catalizador. Tras completarse la reacción, las quinonas fueron ultrafiltradas (Filtros Biomax-10, Millipore) para eliminar la presencia de tirosinasa. La Fig. 7A muestra la evolución con el tiempo de los espectros, que se tomaron con una periodicidad de 1 minuto durante 10 minutos, de estas quinonas ultrafiltradas, en una concentración final 200  $\mu\text{M}$ , en un ensayo con ácido betalámico 45  $\mu\text{M}$ , en disolución acuosa conteniendo tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0. La evolución espectrofotométrica muestra la reacción del ácido betalámico con la quinona para formar un aducto. Las flechas indican la tendencia de los espectros de absorbancia en función del tiempo.

La capacidad de atacar a la quinona en función del pH se evaluó a 530 nm en un medio que contenía 4-metilcatecol 200  $\mu\text{M}$ , ácido betalámico 100  $\mu\text{M}$  y tampón 50 mM del pH indicado en la Fig. 7B. La enzima tirosinasa (13 UI/mL) se añadió al medio para iniciar la reacción, observándose un retardo en la formación de los aductos en función del pH. La capacidad del ácido betalámico de llevar a cabo un ataque nucleófilo sobre las quinonas se ve afectada por el pH del medio. Se determinaron los valores de los períodos de retardo asociados al ataque del ácido betalámico para cada valor de pH, observándose una baja capacidad para producirse la reacción nucleófila a valores de pH ácido, mientras que la reacción de adición se produce sin retardo a valores de pH elevados.

La tendencia de este efecto, recogida en la Fig. 7B, se corresponde con los datos obtenidos para la capacidad capturadora de radicales libres (Fig. 6), confirmando así que el efecto de pH observado para la capacidad antirradical es función de la protonación del grupo -NH conjugado con el hidroxilo, y que ésta está asociada al sistema resonante. A través de la Fig. 6, se puede determinar el valor pKa para el protón referido, siendo éste de pKa = 6,5.

## Ejemplo 5

60 *Capacidad antioxidante del ácido betalámico*

La capacidad antioxidante del ácido betalámico purificado fue caracterizada a través de la reducción directa de iones de hierro Fe (III), a hierro Fe (II), utilizando la misma técnica usada para evaluar la capacidad reductora de hierro del plasma (FRAP, por sus siglas en inglés) (Benzie y Strain, 1996, *Anal. Biochem.*, 239: 70-76). Se utilizó la sal FeCl<sub>3</sub> a una concentración final 1,48 mM, en tampón acetato sódico 223 mM, pH 3,6. La reducción del Fe (III) a Fe (II) se observó mediante la adición del agente complejante tripiridiltriazina (TPTZ) a una concentración final 741  $\mu\text{M}$ , que es capaz de formar un complejo coloreado con Fe (II). La reacción de reducción del Fe (III) por parte del ácido betalámico se observó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Uvikon 940) a una longitud de onda de  $\lambda$

## ES 2 349 522 A1

= 593 nm. Con disoluciones estándar de Fe (II) ( $\text{FeSO}_4$ ) se estableció una recta de calibrado para calcular el número de electrones involucrados en el fenómeno de reducción.

La Fig. 8 muestra la señal obtenida para la reducción de hierro por parte del ácido betalámico, comparado con la señal obtenida por la recta de calibrado. A partir de ambas pendientes, se determina que el número de electrones involucrados, de la siguiente manera: Para la misma concentración de Fe(II) y ácido betalámico, la señal obtenida para la reducción por parte del ácido (pendiente =  $0,0551327398 \mu\text{M}^{-1}$ ) es mayor que la obtenida para el estándar de Fe (II) (pendiente =  $0,0276258333 \mu\text{M}^{-1}$ ). De la relación entre ambas señales (1,996) se obtiene el número de iones Fe (III) reducidos a Fe (II) por cada molécula de ácido betalámico, y por tanto el número de electrones implicados. Así resulta que el número de electrones involucrados en la reducción de hierro por ácido betalámico a pH ácido es de 2 electrones.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra la estructura química de varias betalaínas y del ácido betalámico. La primera fórmula de la izquierda muestra la estructura general de las betacianinas, que resultan de sustituir el grupo R1 de la primera fórmula bien por H (dando lugar a la betanidina, tercera fórmula de la columna situada más a la izquierda) o por un resto glicídico de diversa complejidad (la sustitución por un grupo glucosilo da lugar a la betanina, última fórmula de la Figura de la columna situada más a la izquierda). Bajo la estructura general de las betacianinas derivadas de la betanidina se muestra también la estructura de su isómero, la isobetanidina, de la cual derivan también betalaínas análogas a las derivadas de la betanidina y que conforman la llamada "serie de la isobetanidina". En la columna intermedia se muestra, en primer lugar, la estructura general de las betaxantinas (que resultan de sustituir el resto R de la segunda fórmula por distintos grupos amino y/o aminoácidos), así como las fórmulas químicas de varias betaxantinas específicas: vulgaxantina I, vulgaxantina II e indicaxantina. Por último, la fórmula situada más a la izquierda corresponde al ácido betalámico.

La Fig. 2 muestra los cromatogramas obtenidos a las longitudes de onda  $\lambda = 424 \text{ nm}$  (curva continua: -) y  $\lambda = 280 \text{ nm}$  (curva discontinua: ---), en dos protocolos de elución distintos, A (panel A) y B (panel B), correspondientes ambos a un lavado con un disolvente A y una elución con un gradiente de un disolvente B. La variación en el porcentaje de disolvente B presente en el volumen al cual se observan los diferentes valores de absorbancia se indica mediante una línea punteada (---); el valor del porcentaje de disolvente B al que corresponde cada punto de dicha línea se indica en el eje de ordenadas suplementario situado a la derecha de cada gráfico. El valor de volumen en el que la línea punteada corta al eje de abscisas corresponde al volumen de lavado con disolvente A (tampón fosfato 20 mM, pH 6,0) previo a la adición del disolvente B (tampón fosfato 20 mM, pH 6,0 con cloruro sódico 2 M). La diferencia entre el valor de volumen en el cual la línea punteada deja de ser inclinada (correspondiente a un 35% de disolvente B en ambos casos) y el valor de volumen en el que dicha línea corta al eje de abscisas corresponde al volumen total de gradiente de disolvente B añadido (20 mL en el caso del panel A y 100 mL en el caso del panel B).

La Fig. 3 muestra el cromatograma resultante del análisis del ácido betalámico mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), tras la purificación por intercambio aniónico. Se muestran los valores de unidades de absorbancia (eje vertical) obtenidos con un detector de fotodiodos para longitudes de onda ( $\lambda$ , expresadas en el eje izquierdo del plano basal) comprendidas entre 250 y 700 nm, en función del tiempo de desarrollo del gradiente (expresado en minutos en el eje derecho del plano basal). Se observa que el pico del compuesto purificado aparece con un tiempo de retención de 14,59 minutos.

La Fig. 4 muestra el espectro de UV-visible (valores de absorbancia obtenidos en el rango de longitudes de onda,  $\lambda$ , entre 200 y 700 nm) obtenido para el ácido betalámico (concentración  $25 \mu\text{M}$ ) en agua a  $25^\circ\text{C}$ , en un espectrofotómetro Uvikon 940 (Kontron Instruments, Zurich, Suiza).

La Fig. 5 muestra los valores de absorbancia, obtenidos a una longitud de onda de 414 nm (longitud de onda a la que absorbe el radical ABTS+), en soluciones estables de ABTS+ a las que se les añadió ácido betalámico (valores indicados con circunferencias sin relleno, ○) o Trolox (valores indicados con círculos con relleno oscuro, ●) a las concentraciones indicadas en el eje de abscisas (micromoles por litro).

La Fig. 6 muestra los valores de absorbancia, obtenidos a una longitud de onda de 414 nm (longitud de onda a la que absorbe el radical ABTS+), en soluciones estables de ABTS+ a las que se les añadió ácido betalámico (valores indicados con barras con relleno gris oscuro, ■) o Trolox (valores indicados con barras con relleno gris claro, ▨) o ninguna de estas moléculas (valores control, indicados con barras con relleno negro, ■), en las que el valor de pH era el indicado en el eje de abscisas.

La Fig. 7 se refiere a la evolución de la reacción del ácido betalámico con una quinona para formar un aducto:

- El panel A muestra la evolución con el tiempo de la absorbancia debida a quinonas ultrafiltradas, en una concentración final  $200 \mu\text{M}$ , en un ensayo con ácido betalámico  $45 \mu\text{M}$ , en disolución acuosa conteniendo tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0. Los espectros se tomaron con una periodicidad de 1 minuto durante 10 minutos. Las flechas indican la tendencia de los espectros de absorbancia en función del tiempo.

## ES 2 349 522 A1

- El panel B se refiere a la influencia del pH en la capacidad del ácido betalámico para llevar a cabo un ataque nucleófilo sobre las quinonas, representada por un gráfico en el que se muestran los valores de los períodos de retardo, expresados en minutos, asociados al ataque nucleófilo del ácido betalámico sobre quinonas que se observan a 530 nm en un medio que contenía 4-metilcatecol  $200 \mu\text{M}$ , ácido betalámico  $100 \mu\text{M}$ , enzima tirosina ( $13 \text{ UI/mL}$ ) y tampón  $50 \text{ mM}$  del pH del valor indicado en el eje de abscisas.

La Fig. 8 muestra un gráfico en el que se representa la absorbancia obtenida, a  $593 \text{ nm}$ , tras añadir tripiridiltriazina  $741 \mu\text{M}$  para formar complejo coloreado con el  $\text{Fe(II)}$  presente en dos tipos de disoluciones diferentes: las obtenidas tras reducir el  $\text{Fe(III)}$  presente en una disolución de  $\text{FeCl}_3$   $1,48 \text{ mM}$ , a pH  $3,6$ , con distintas concentraciones de ácido betalámico, según se indica en el eje de abscisas (recta con los valores indicados por circunferencias sin relleno,  $\circ$ ), o las resultantes de la disolución de distintas concentraciones de  $\text{FeSO}_4$  para obtener una recta patrón (recta con los valores indicados por círculos con relleno oscuro,  $\bullet$ ). La comparación de las pendientes de ambas rectas indica que el número de electrones involucrados en la reducción de hierro por ácido betalámico a pH ácido es de 2 electrones.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

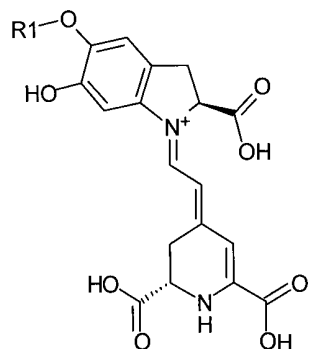
65

# ES 2 349 522 A1

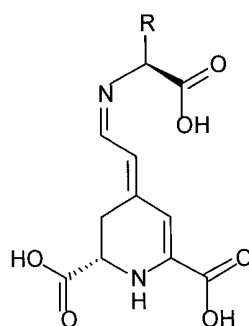
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la preparación de ácido betalámico a partir de al menos una betalaína que comprende las etapas de:
- 10 a) obtener ácido betalámico provocando la hidrólisis alcalina de al menos una betalaína que se encuentra en disolución;
  - 15 b) purificar el ácido betalámico obtenido mediante un proceso de cromatografía a través de una matriz de intercambio aniónico en la que queda retenido;
  - c) recuperar el ácido betalámico liberándolo de la matriz de intercambio aniónico;
  - d) opcionalmente, comprobar la pureza del ácido betalámico obtenido.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la hidrólisis alcalina se provoca incrementando el pH de la disolución hasta un valor de 11 o superior.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el pH de la disolución que contiene el ácido betalámico y que se somete a cromatografía a través de una matriz de intercambio aniónico es un pH igual a 11 o superior.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, en el que la matriz de intercambio aniónico está constituida por una resina polimérica que lleva unidos grupos amonio cuaternarios.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la resina polimérica a la que están unidos los grupos amonio cuaternarios está formada por agarosa reticulada.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, el que el ácido betalámico se libera de la matriz de intercambio aniónico utilizando un gradiente de tampón fosfato 20 mM y cloruro sódico 2 M.
- 30 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que incluye una etapa previa en la que las betalaínas sometidas a hidrólisis alcalina son extraídas de un planta, un hongo o una parte de una parte de una planta o un hongo que contiene betalaínas de forma natural.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que las betalaínas se extraen del fruto de una planta del género *Opuntia* o de la raíz de una planta del género *Beta*.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que las betalaínas se extraen del fruto de *Opuntia ficus indica*.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que las betalaínas se extraen de la raíz de *Beta vulgaris*.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la extracción se produce en agua o en una disolución acuosa tamponada.
- 45 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la extracción se produce tras el pelado y troceado de la planta, el hongo o parte de la planta u hongo.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el extracto de betalaínas obtenido se somete a ultrafiltración previamente a la etapa de hidrólisis alcalina de las betalaínas.
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la raíz de *Beta vulgaris* se pela, se trocea y se homogeniza previamente a la extracción, la extracción se produce en agua, el homogenado se somete a centrifugación y el sobrenadante se ultrafiltra para eliminar proteínas, todo ello previamente a la etapa de hidrólisis alcalina de las betalaínas obtenidas.
- 55 15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se comprueba la pureza de la muestra de ácido betalámico obtenida de la matriz de intercambio aniónico mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- 60 16. Uso del ácido betalámico como antioxidante o molécula capturadora de radicales libres.
17. Uso según la reivindicación 16, en el que el ácido betalámico se añade a una formulación alimentaria, farmacéutica o cosmética.
- 65 18. Uso según la reivindicación 16 ó 17, en el que la muestra a la que se añade el ácido betalámico tiene un pH de 5,5 o superior.

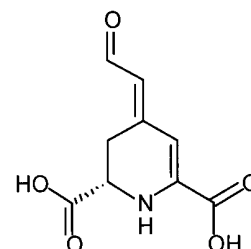
**Fig. 1**



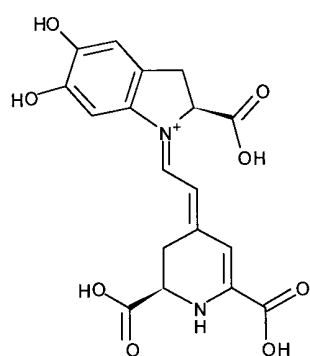
**betacianina (serie de la betanidina)**



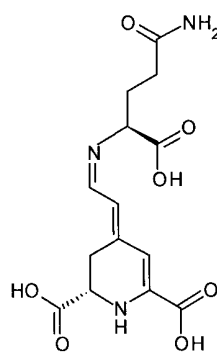
**betaxantina**



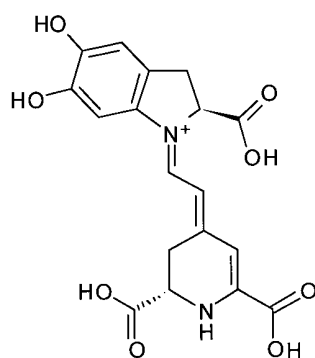
**ácido betalámico**



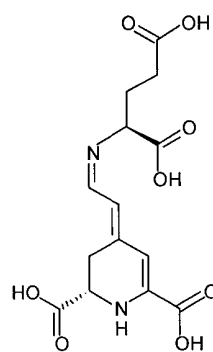
**isobetanidina**



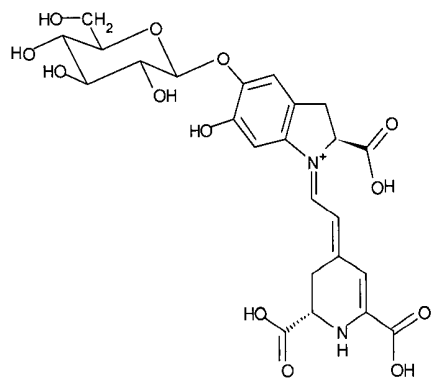
**vulgaxantina I**



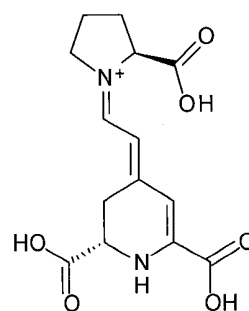
**betanidina**



**vulgaxantina II**



**betanina**



**indicaxantina**

Fig. 2

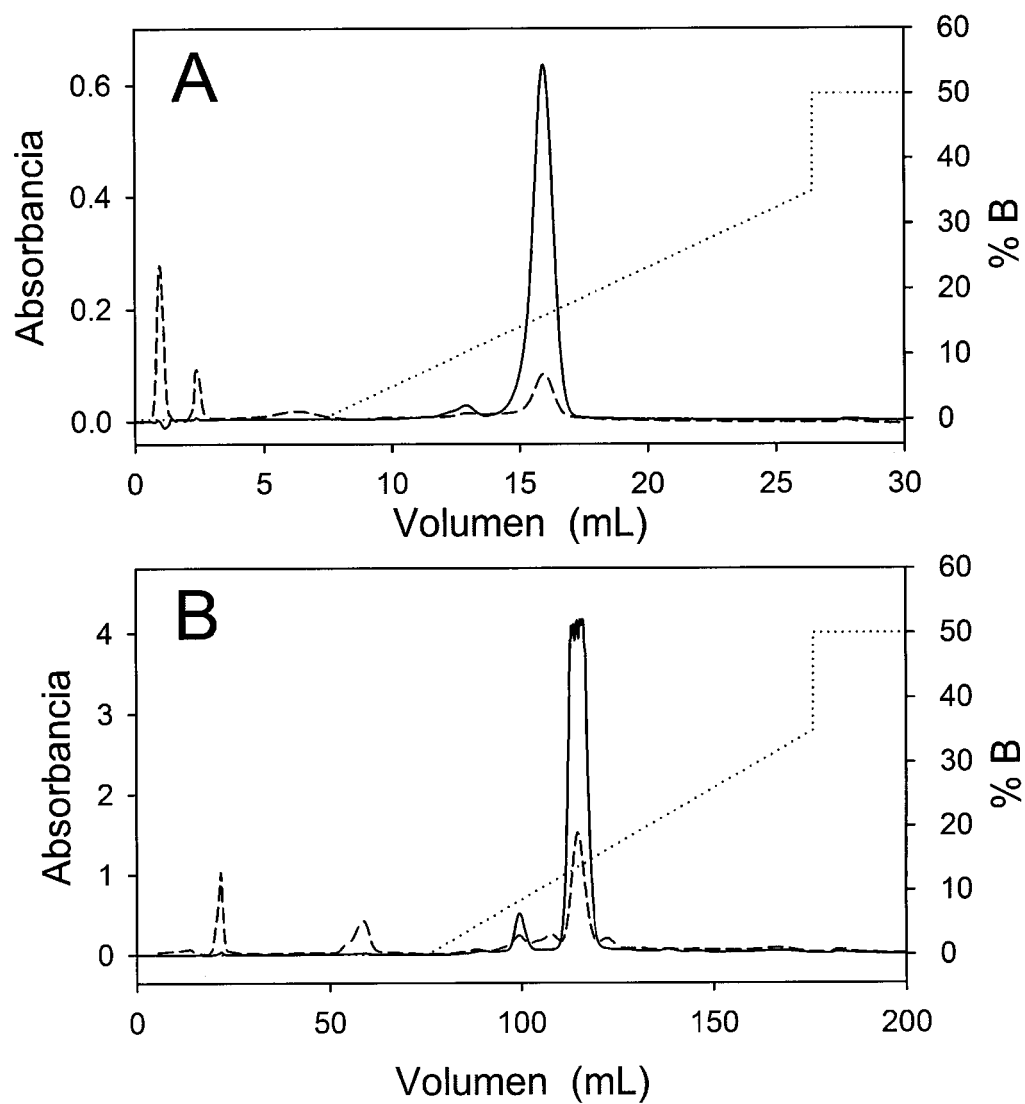
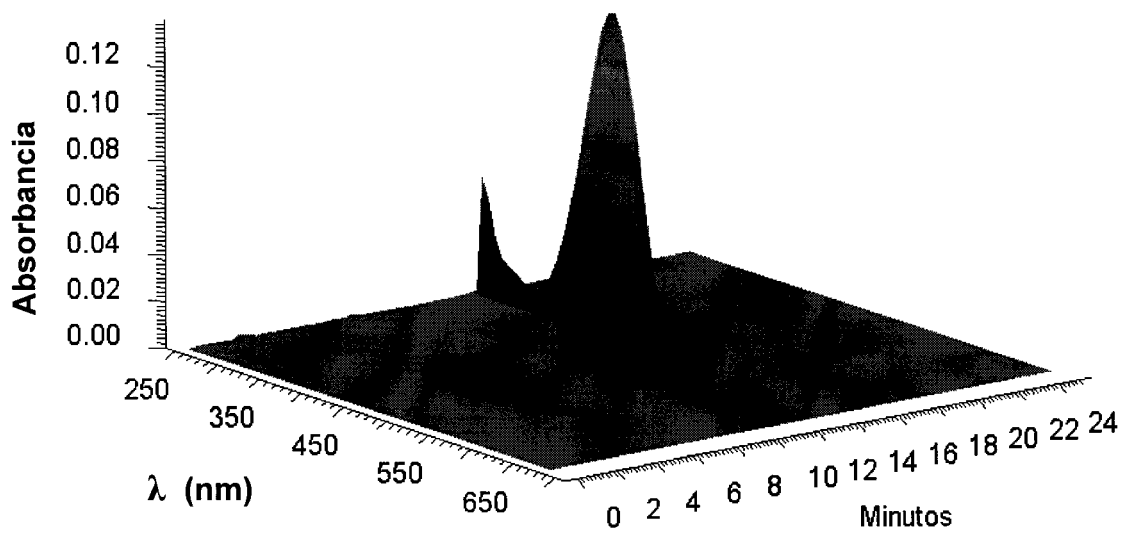




Fig. 3



**Fig. 4**

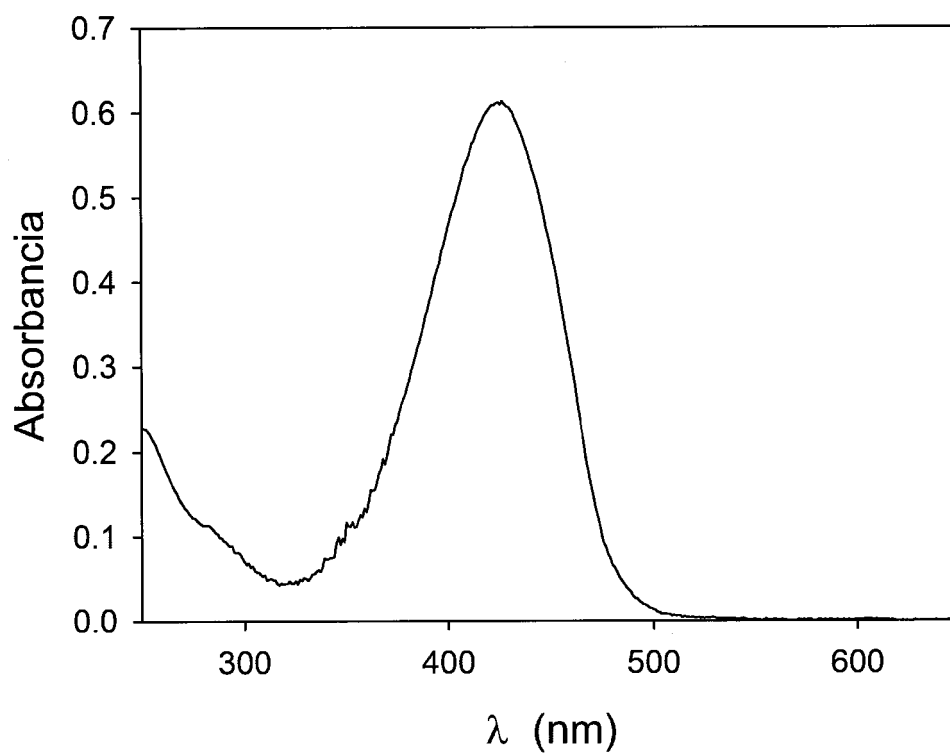


Fig. 5

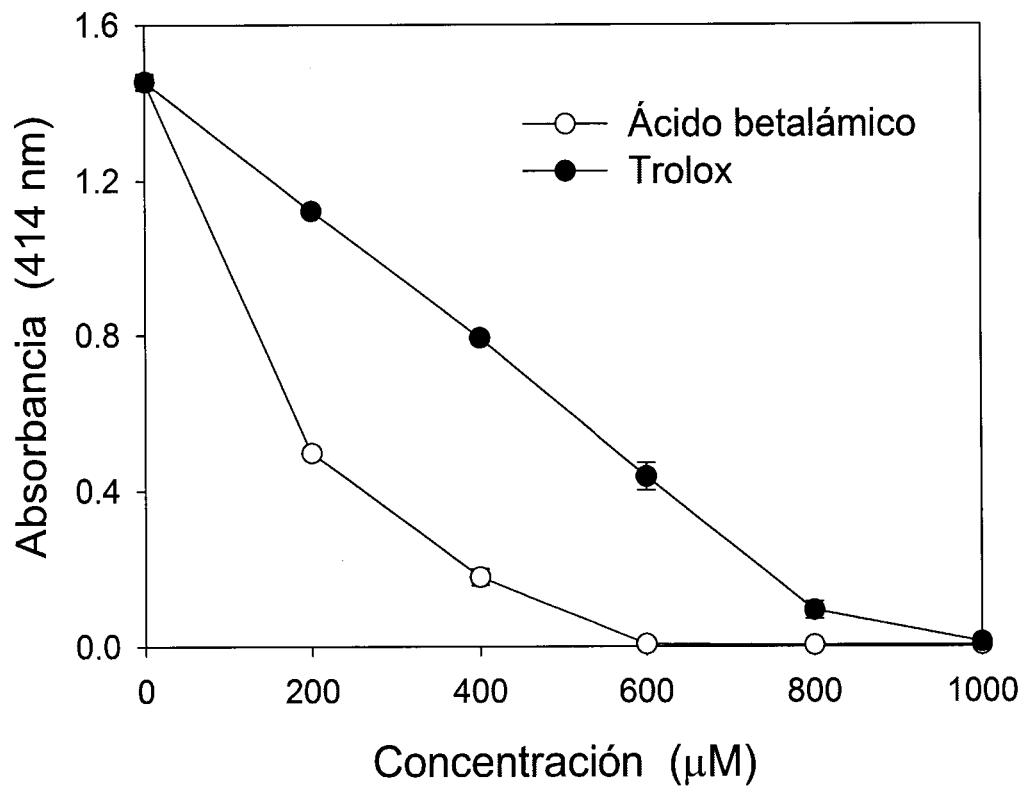


Fig. 6

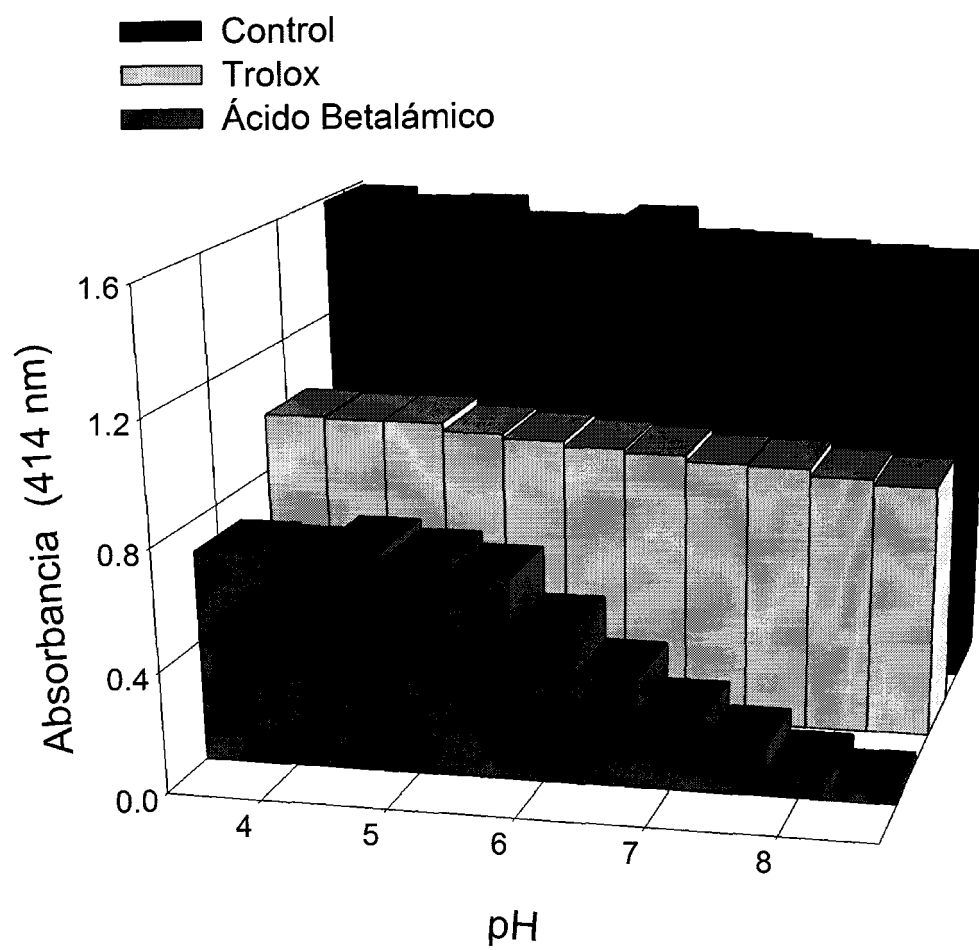


Fig. 7

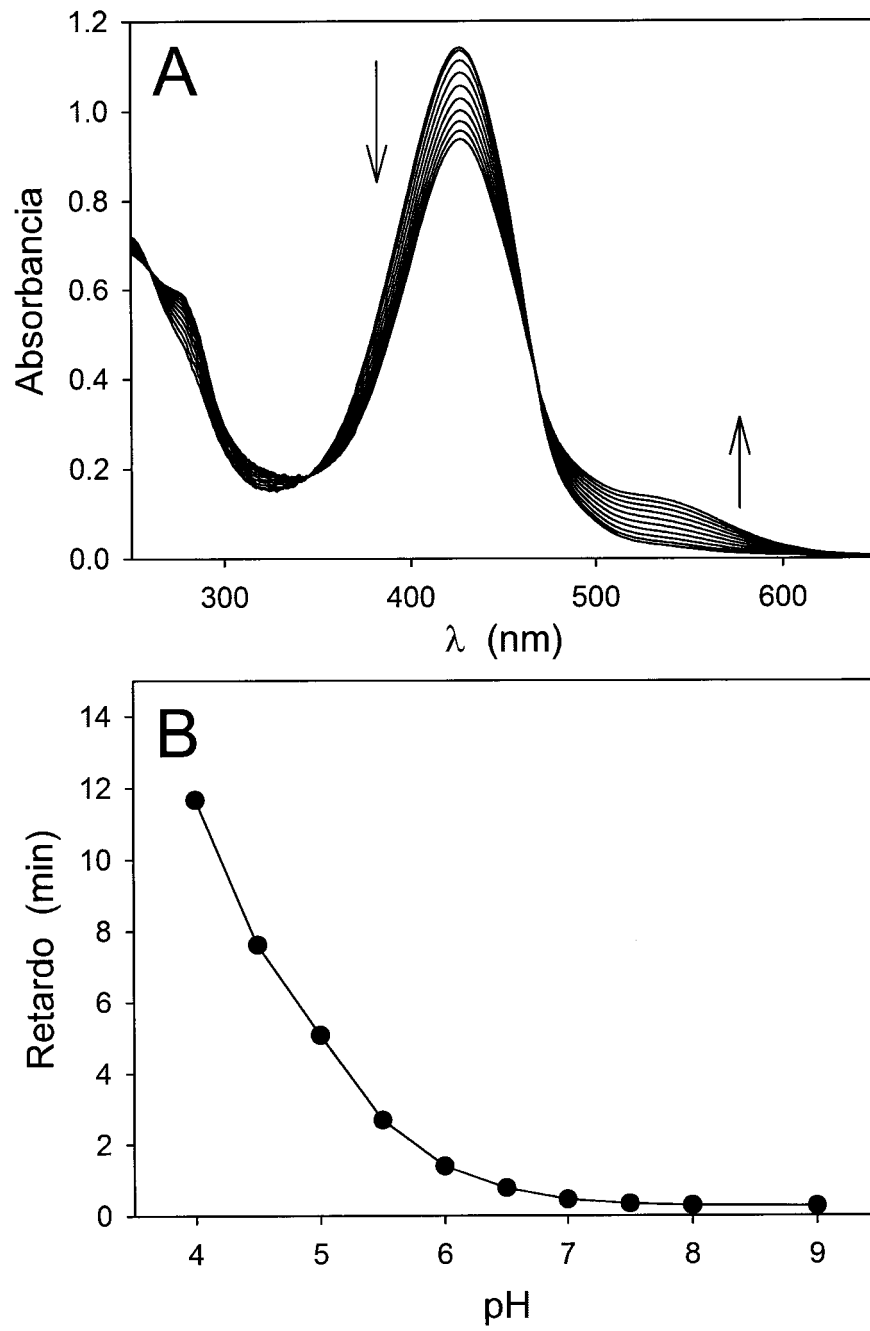
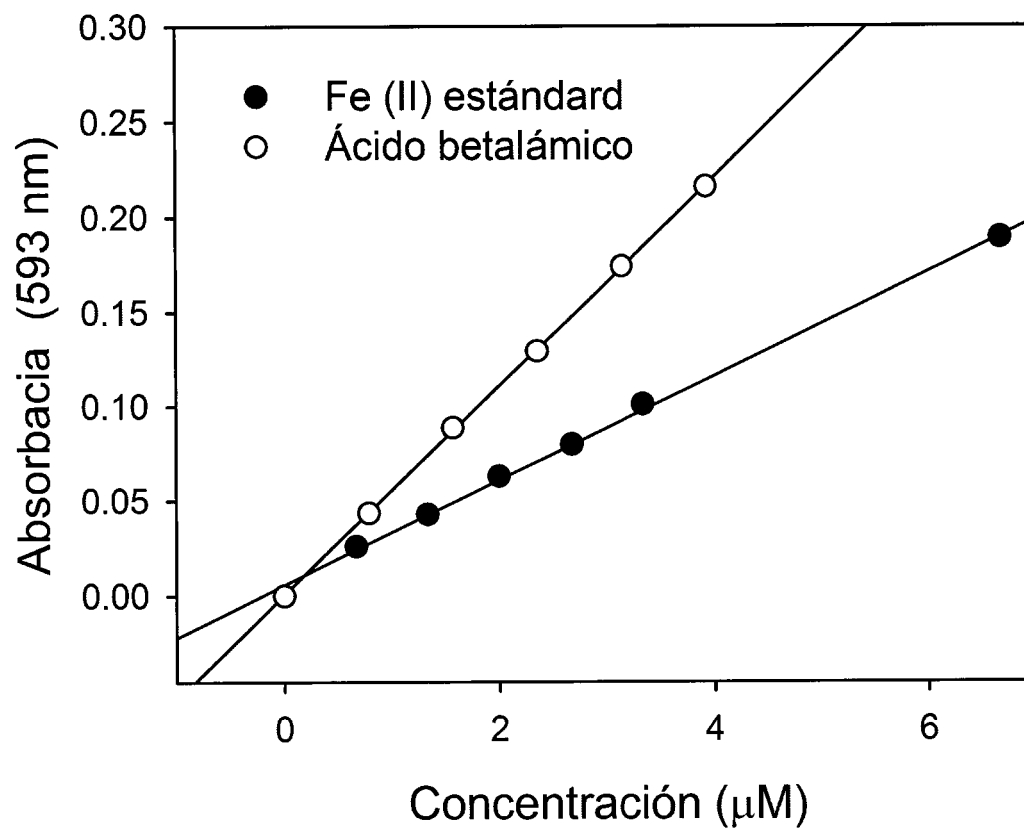


Fig. 8





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º solicitud: 200901149

② Fecha de presentación de la solicitud: **05.05.2009**

③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**  
**00-00-0000**  
**00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja Adicional

Ecla: C07D211/78,A61K31/44,A23L3/3544

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DD 264012 A1 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR), 18-01-1989 & resumen en inglés en CA (via STN), número de acceso 1990:53781. "Manufacture of betalains with plant cell cultures" resumen	1-15
A	ES 2320380 T3 (TREUSCH GERNOT), 14-11-2007 reivindicaciones	15-18
A	US 2003036565 A1 (WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION), 20-02-2003 reivindicaciones	15-18

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
25.06.2010

Examinador  
P. Fernández Fernández

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D 211/78** (2006.01)

**A61K 31/44** (2006.01)

**A23L 3/3544** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61K, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,CAS



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.06.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SÍ</b> <b>NO</b>
	Reivindicaciones _____	
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SÍ</b> <b>NO</b>
	Reivindicaciones _____	

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Chem Abs on line (via STN), nº de acceso 1990:53781	1990
D02	ES 2320380	14.11.2007
D03	US 2003036565	20.02.2003

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere a un procedimiento para obtener ácido betalámico por hidrólisis alcalina de una betalaína y posterior purificación por cromatografía de intercambio aniónico (reivindicaciones 1-15). También se reivindica el uso del ácido betalámico obtenido por este proceso como antioxidante y molécula capturadora de radicales libres en composiciones alimentarias, farmacéuticas y cosméticas (reivindicaciones 16-18).

El documento D1 divulga el aislamiento de betaxantina y ácido betalaminico de un cultivo de Portulaca Grandiflora por cromatografía en columna DEAE-Sephadex y HPLC. En la solicitud se utilizan columnas de intercambio aniónico de agarosa entrecruzada derivatizada con grupos trimetilamonio, tal como columnas Q Sepharose Fast Flow, que mejoran sustancialmente la eficacia del proceso y la pureza del ácido betalámico obtenido, por lo que se considera que el procedimiento de las reivindicaciones 1-15 es nuevo e inventivo.

El documento D2 divulga una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer que contiene betanina y/o betanidina como compuesto del grupo de las betalaínas. El documento D3 divulga un suplemento nutricional (reivindicaciones 18-20) que comprende betalaína; sin embargo no se ha encontrado divulgada la actividad antioxidante del ácido betalámico ni composiciones para los fines citados en la solicitud que lo comprendan, por lo que las reivindicaciones 16-18 son asimismo nuevas e inventivas.

Por tanto, se considera que las reivindicaciones de la solicitud cumplen los requerimientos de novedad y actividad inventiva establecidos en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.