

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 667**

51 Int. Cl.:

A61K 36/61 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01912225 .8**

96 Fecha de presentación: **09.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1262543**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.12.2002**

54 Título: **Inhibidores de la actividad de la alfa-amilasa**

30 Prioridad:

10.03.2000 JP 2000066896

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73 Titular/es:

**KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)
1-19, HIGASHISHINBASHI 1-CHOME MINATO-KU
TOKYO 105-8660, JP**

72 Inventor/es:

**MAKINO, TAKASHI;
AIYAMA, RITSUO;
DEGUCHI, YORIKO;
WATANUKI, MASAOKI;
NAKAZAWA, MASAKO;
MIZUKOSHI, HARUMI;
NAGAOKA, MASATO;
HARADA, KATSUHISA y
OSADA, KUNIKO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 393 667 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la actividad de la alfa-amilasa

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un inhibidor de la actividad de la α -amilasa que contiene como componentes activos polifenoles procedentes de la guayaba (*Psidium guajava* Linn.) (en lo sucesivo también denominados “polifenoles de guayaba” y a los alimentos y bebidas que contienen el inhibidor.

10

Antecedentes de la técnica

En los últimos tiempos, los consumidores están cada vez más concienciados con la limitación de la ingesta de calorías, ya que la ingesta excesiva de calorías es la causa principal de las enfermedades de los adultos atribuibles a hábitos poco saludables. Sin embargo, si existieran sustancias que pudieran inhibir o suprimir la conversión del alimento ingerido en energía en el cuerpo vivo, tales sustancias serían útiles para las personas en necesidad de hacer dieta, debido a que las sustancias permitirían a las personas evitar el tener que reducir su ingesta de alimentos. En particular, se considera efectivo la inhibición de la digestión de hidratos de carbono a partir del almidón para la prevención y el tratamiento de la obesidad, y por lo tanto, en los últimos años, las sustancias que inhiben la actividad de la α -amilasa, una enzima que digiere el almidón, han adquirido interés.

15

20

La guayaba es un arbusto originario de América Central y su fruto, las raíces y las hojas se han utilizado como remedios caseros para el tratamiento de la diabetes y la diarrea. Según estudios recientes, un extracto obtenido mediante la extracción de hojas de guayaba con agua o un disolvente hidrófilo inhibe la actividad de la α -amilasa. La Publicación de Patente Japonesa (*kokoku*) N° 60-36746 divulga que el extracto se puede utilizar como un ingrediente de bebidas que promueven la salud y la solicitud de patente japonesa abierta a consulta (*kokai*) N° 7-59539 divulga que el extracto se puede utilizar como un ingrediente de alimentos y bebidas dietéticos.

25

Sin embargo, los extractos convencionales de guayaba también contienen sesquiterpenos, taninos y otros componentes, y además, su actividad inhibidora de la α -amilasa no es necesariamente satisfactoria para el propósito de lograr el efecto dietético deseado.

30

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es aislar a partir de un extracto de guayaba un componente que presente una actividad inhibidora considerablemente notable de la α -amilasa y de esta manera lograr proporcionar un efecto dietético más eficaz. Otro objeto de la presente invención es proporcionar alimentos y bebidas que contengan el componente.

35

Breve Descripción de los Dibujos

La figura. 1 es una representación de los espectros de absorción en el infrarrojo de los polifenoles de guayaba. La figura. 2 es una representación de los espectros de polarización cruzada con giro al ángulo mágico (CP-MAS) de los polifenoles de guayaba. La figura. 3 es una representación de la curva de elución de los polifenoles purificados de guayaba. La figura. 4 es una representación de los resultados obtenidos mediante el análisis de cromatografía líquida de los polifenoles de guayaba.

40

45

Divulgación de la invención

En vista de lo anterior, los presentes inventores han realizado extensos estudios sobre los componentes de alto peso molecular de un extracto de guayaba y han encontrado que una clase específica de polifenoles obtenidos mediante un procedimiento tal como se define en la presente invención presenta una elevada actividad inhibidora de la α -amilasa. Brevemente, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, un extracto acuoso de hojas de guayaba o fruta guayaba se somete a ultrafiltración y las fracciones que tienen un peso molecular de 5.000 o más se someten a fraccionamiento mediante cromatografía hidrófoba específica. La presente invención se ha logrado sobre la base de este hallazgo.

50

55

En consecuencia, la presente invención proporciona un inhibidor de la actividad de la α -amilasa que comprende, como componente efectivo, polifenoles obtenidos mediante el procedimiento siguiente: las hojas de guayaba y/o la fruta guayaba se someten a extracción con uno o más disolventes seleccionados entre agua y disolventes hidrófilos; el extracto resultante se somete a ultrafiltración para eliminar de este modo las sustancias que tienen un peso molecular de menos de 5.000; la fracción restante se aplica a la columna de cromatografía hidrófoba con soporte de butilo y la elución se lleva a cabo mediante el uso de una solución acuosa de dihidrógenofosfato de sodio (0,02 mol/l) y una solución acuosa de fosfato de sodio (0,02 mol/l) (velocidad de flujo: 1 ml/minuto) en un gradiente de pH entre las dos soluciones y se recupera una fracción de la sustancia eluida, fracción que corresponde al tercer pico individual de una curva de elución obtenida cuando la absorbancia de la sustancia se mide a 260 nm.

60

65

La presente invención también proporciona un inhibidor de la actividad de la α -amilasa que comprende, como un componente efectivo, polifenoles que tienen las siguientes propiedades fisicoquímicas:

(a) contienen carbono (49,6%), hidrógeno (4,6%) y nitrógeno (0,6%);

(b) tienen un peso molecular de 5.000-100.000;

(c) presentan una fuerte absorción en el infrarrojo cercano 3.428 cm^{-1} , 1.705 cm^{-1} , 1.615 cm^{-1} y 1.220 cm^{-1} ;

(d) presentan espectros de resonancia magnética nuclear de carbono sólido que corresponden a una señal de azúcar (en la vecindad de 76 ppm), una señal aromática (en la vecindad de 115,0 ppm), una señal de fenol (en la vecindad de 144 y 156 ppm) y una señal de éster de carbonilo (en la vecindad de 168 ppm) y

(e) presentan un solo pico a alrededor de 10 minutos cuando se somete a cromatografía líquida en las condiciones siguientes:

columna: una columna rellena con un gel de distribución en fase inversa de tipo polímero sintético duro a la que se unen químicamente los grupos butilo (modelo: Shodex Asahipak C4P-50 4D (producto de Showa Denko), diámetro interno: 4,6 mm, longitud: 150 mm) o una columna similar a esta columna);

velocidad de flujo: 1,5 ml/minuto;

temperatura de la columna: una temperatura específica alrededor de 40°C ;

detector: absorciómetro UV (longitud de onda: 260 nm);

fase móvil:

solución A: una mezcla de solución de acetonitrilo que contenía NaH_2PO_4 (0,02 mol/l) y agua (15: 85 (v/v)) (pH = 4,6), y

solución B: una mezcla de solución de acetonitrilo que contenía Na_3PO_4 (0,02 mol/l) y agua (15: 85 (v/v)) (pH = 11,4) y

procedimiento de análisis: un análisis de gradiente escalonado realizado sobre la base de los datos enumerados en la siguiente Tabla.

Tabla 1

Tiempo de análisis (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0 (hasta 4)	100	0
4 (hasta 8)	65	35
8 (hasta 12)	0	100
12 (hasta 20)	100	0

La presente invención también proporciona alimentos y bebidas que contienen el inhibidor de la actividad de la α -amilasa.

La presente invención también proporciona el uso de los polifenoles para la producción de alimentos y bebidas dietéticas.

La presente invención también proporciona un procedimiento dietético que comprende la ingesta de alimentos y bebidas.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Los polifenoles de la presente invención pueden ser producidos mediante los pasos descritos a continuación 1 a 3.

1) Etapa 1

Las hojas de guayaba y/o la fruta guayaba se someten a extracción con uno o más disolventes seleccionados entre agua y disolventes hidrófilos, para obtener de ese modo un extracto de guayaba.

La guayaba empleada en la presente invención es *Psidium guajava* Linn. y la región en la que la guayaba se cultiva no está particularmente limitada. En la presente invención se puede emplear guayaba que se cría de forma natural o que se cultiva en zonas tropicales o subtropicales del sudeste de Asia, Asia del Sur, América del Sur o América del Norte. En la presente invención se utilizan hojas o la fruta guayaba. Se puede utilizar guayaba cruda, guayaba semi-seca o guayaba seca, pero preferiblemente, se utilizan en particular hojas secas de guayaba. Cuando se emplea fruta guayaba, se emplea preferiblemente fruta verde. Estas hojas o la fruta guayaba que sirven como materia prima, se pulveriza preferiblemente antes de su uso. Por ejemplo, cuando se utilizan hojas de guayaba, las hojas se cortan preferiblemente en trozos, de un tamaño de aproximadamente 3-5 mm. Mientras tanto, la guayaba que se seca y se tuesta a continuación, se puede utilizar con el fin de mejorar el sabor.

Como disolvente de extracción se utilizan uno o más disolventes seleccionados entre agua y disolventes hidrófilos. Ejemplos de los disolventes hidrófilos incluyen metanol, etanol, alcohol n-propílico, acetona y propilenglicol. Estos disolventes se pueden utilizar en combinación con dos o más especies. Alternativamente, estos disolventes se pueden mezclar con agua en una proporción arbitraria para su uso en forma de disolvente que contiene agua. Con el

fin de facilitar la operación y mejorar la seguridad, el agua es el disolvente de extracción más preferiblemente utilizado.

La cantidad del disolvente de extracción empleado no está particularmente limitada. Sin embargo, cuando se emplean hojas de guayaba, la relación en peso entre las hojas y el disolvente es preferiblemente 1:20. Cuando se emplea fruta guayaba sin madurar, el peso del disolvente es preferiblemente de aproximadamente 10 veces el de la fruta.

Cuando las hojas de guayaba se someten a extracción, las condiciones de extracción pueden variar de acuerdo con el tipo de disolvente que se emplea. Cuando se usa agua como disolvente, la extracción se lleva a cabo a 50-100°C, preferiblemente 80-100°C, durante 5-60 minutos, preferiblemente 5-25 minutos.

Cuando se usa fruta guayaba sin madurar, la extracción se lleva a cabo preferiblemente a 60-100°C durante 10-60 minutos.

Cuando la extracción se lleva a cabo, se puede añadir al disolvente de extracción un álcali, tal como bicarbonato de sodio para aumentar con ello el pH del disolvente. Alternativamente, se puede añadir al disolvente de extracción un ácido mineral diluido (por ejemplo, ácido clorhídrico diluido) o un ácido orgánico (por ejemplo, ácido succínico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico), con lo que se lleva al disolvente a unas condiciones débilmente ácidas.

Después de la terminación de la etapa de extracción, preferiblemente, el extracto resultante se enfría y después se somete a centrifugación, eliminando las impurezas del extracto. El extracto de guayaba así obtenido puede ser concentrado o diluido con el fin de alcanzar una concentración apropiada.

2) Etapa 2

El extracto de guayaba obtenido en la etapa 1 se somete a ultrafiltración, para eliminar de este modo las sustancias de bajo peso molecular con un peso molecular de menos de 5.000.

Para la ultrafiltración del extracto de guayaba, se puede utilizar un procedimiento que emplea un aparato de filtración de tipo prensa, diálisis, centrifugación, etc. Estos procedimientos y técnicas se pueden usar en combinación.

Cuando se lleva a cabo la diálisis, el extracto de guayaba se coloca en un tubo de diálisis formado por una membrana semipermeable que puede ser atravesada por una sustancia que tiene un peso molecular de menos de 5.000 y la membrana está formada de un material, tal como éster de celulosa o celofán. Posteriormente, el extracto de guayaba se dializa frente a agua o un tampón diluido (en lo sucesivo denominado dializado) durante uno a siete días, preferiblemente de dos a tres días, mientras que el dializado se intercambia periódicamente con un dializado fresco o se hace fluir constantemente agua. Mediante el procedimiento anterior, las sustancias de bajo peso molecular se difunden en el dializado para eliminar las sustancias del extracto de guayaba.

3) Etapa 3

Una fracción que tiene un peso molecular de 5.000 o más obtenida en la etapa 2 se somete a cromatografía hidrófoba con soporte de butilo. El material se aplicó a la columna y la elución (velocidad de flujo: 1 ml/min) de la muestra se llevó a cabo con el gradiente de pH desde solución de dihidrógenofosfato de sodio (0,02 mol/l) hasta una solución de fosfato de sodio (0,02 mol/l).

El material de relleno empleado en la cromatografía hidrófoba como una fase estacionaria no está particularmente limitado, siempre y cuando el material de carga lleve grupos butilo como grupos funcionales y tenga una resistencia mecánica satisfactoria. Ejemplos de la carga incluyen poliestireno, poliestireno carboxilado, acrilato de metilo y derivados de celulosa.

Como fase móvil se emplean una solución acuosa de dihidrógenofosfato de sodio (0,02 mol/l) y una solución acuosa de fosfato de sodio (0,02 mol/l) y la elución se lleva a cabo bajo un gradiente de concentración entre las dos soluciones.

Los disolventes se pasan a través de la columna (velocidad de flujo: 1 ml/min) y el patrón de separación de la sustancia eluida se obtiene midiendo la absorbancia de la sustancia eluida a 260 nm. Posteriormente, se recupera una fracción que corresponde al tercer pico individual del patrón y la fracción así recuperada se seca en vacío o se liofiliza para obtener de ese modo los polifenoles de la presente invención.

A continuación se describirán las propiedades fisicoquímicas de la fracción hidrosoluble obtenida como se ha descrito anteriormente.

Análisis elemental

El análisis elemental se llevó a cabo mediante un procedimiento rutinario. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2

Resultados del análisis elemental	
Elemento	Hallado (%)
Carbono (C)	49,6
Hidrógeno (H)	4,6
Nitrógeno (N)	0,6

En vista del contenido de nitrógeno tan bajo, se considera que la fracción no contiene proteínas.

Peso molecular

10

El peso molecular de la fracción se determinó mediante GPC-HPLC mediante el uso de un detector de dispersión de luz multi-ángulo de acuerdo con un procedimiento habitual. Se determinó que el peso molecular de la fracción era 5.000-100.000 y el peso molecular promedio era 70.000.

Análisis de los componentes

15

20

El contenido de azúcar de la fracción se obtuvo como sigue: se calentó una muestra y se descompuso en ácido trifluoroacético 4 mol/l a 100°C durante dos horas; se formó acetato de nitrilo aldónico siguiendo un procedimiento habitual y a continuación se calculó el contenido de azúcar mediante análisis de cromatografía de gases. Los resultados: glucosa (2,1%), arabinosa (2,0%), galactosa (1,3%), manosa (0,4%), ramnosa (0,3%) y xilosa (0,3%).

Contenido de ácido gálico, contenido de ácido elágico y contenido de proantocianidina

25

30

El contenido de ácido gálico y el contenido de ácido elágico de la muestra se determinaron calentando la muestra en una mezcla de butanol-ácido clorhídrico (95:5 v/v) que contiene amonio y sulfato de hierro (III) a 100°C durante 24 horas y descomponiendo así la muestra y analizando la muestra descompuesta mediante HPLC. El contenido de ácido gálico y el contenido de ácido elágico determinado fue de 0,6% y 5,2%, respectivamente. El contenido de proantocianidina de la muestra se determinó calentando la muestra utilizando el mismo reactivo a 95°C durante 40 minutos para descomponer así la muestra y calcular el contenido de la absorbancia de la solución descompuesta. Se determinó que el contenido de proantocianidina en forma reducida a cianidina era 6,8%.

Espectro de absorción en el infrarrojo

35

La muestra se intercaló entre cristales de BaF₂ y se sometió a presión. La medida se llevó a cabo mediante el procedimiento de transmisión. En el espectro de absorción IR obtenido, los picos de absorción fuertes atribuidos a la fracción se confirmaron en aproximadamente 3428 cm⁻¹, 1705 cm⁻¹, 1615 cm⁻¹ y 1220 cm⁻¹. El espectro de absorción IR se muestra en la figura. 1.

Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono sólido (¹³C sólido-RMN)

40

45

Se utilizó un procedimiento habitual, concretamente, la polarización cruzada con giro al ángulo mágico (CP-MAS). En el espectro CP-MAS obtenido se observaron las señales atribuidas a las sustancias, tales como azúcar, compuestos aromáticos, fenol y éster carbonilo. El espectro confirmó que la fracción estaba formada por polifenoles que contenían fundamentalmente un grupo de elagitaninos. El espectro CP-MAS se muestra en la figura. 2.

50

Los polifenoles de guayaba anteriormente mencionados presentan, como se muestra en los Ejemplos descritos a continuación, una excelente actividad inhibidora de la α -amilasa y también una actividad inhibidora de la α -glucosidasa. En consecuencia, cuando se ingieren alimentos en los que se han incorporado polifenoles, se evita eficazmente la degradación del almidón en dextrinas y maltosa, y además, también se impide la degradación de los disacáridos (maltosa, isomaltosa, sacarosa) en glucosa. Por lo tanto, la incorporación de los polifenoles puede proporcionar alimentos y bebidas que tienen un efecto de prevención de la elevación del azúcar en sangre y un efecto anti-obesidad.

55

Ejemplos de formas de alimentos y bebidas de acuerdo con la presente invención incluyen alimentos sólidos, alimentos semi-líquidos, alimentos en forma de gel y bebidas. Los ejemplos específicos incluyen comprimidos, productos encapsulados y gránulos, productos de confitería, tales como galletas, jaleas y aperitivos, condimentos granulados, pan y fideos y bebidas, tales como refrescos, zumos y bebidas preparadas mediante el uso de bacterias ácido lácticas.

60

Además de los polifenoles de la presente invención, se pueden incorporar en los alimentos y bebidas anteriormente mencionados una variedad de materiales que normalmente se añaden también a los alimentos. Ejemplos específicos de los materiales incluyen alcoholes de azúcares, tales como glucosa, sacarosa, fructosa, sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol y palatinít; emulsionantes, tales como ésteres de ácidos grasos de sacarosa, ésteres de ácidos grasos de poliglicerina y lecitina y estabilizadores, tales como pectina, carboximetilcelulosa, polisacáridos acuosos de soja, goma de gelano, goma arábica, goma xantana, carragenina y goma de guar. Otros ejemplos de materiales que pueden ser incorporados incluyen vitaminas, tales como vitamina A, vitaminas del grupo B, vitamina C y vitamina E, componentes minerales, tales como lactato de calcio, gluconato de calcio, pantotenato de calcio, compuestos de magnesio y compuestos de zinc y extractos herbales.

Cuando los polifenoles de la presente invención se incorporan en alimentos y bebidas, la cantidad total de los polifenoles, que puede variar dependiendo de la forma de los alimentos y las bebidas, es preferiblemente de 0,005 hasta 0,5% en peso. La cantidad de dichos alimentos y bebidas a ingerir por día es preferiblemente 5-500 mg en forma reducida a los polifenoles, en particular preferiblemente 10-100 mg.

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación en más detalle por medio de ejemplos, que no se deben interpretar como limitativos de la invención.

Ejemplo 1 Preparación de extracto de guayaba

(1) se secaron hojas de guayaba (producidas en la República Popular de China, Kuanhsi), se tostaron a 121°C durante 15 minutos y se cortaron minuciosamente en trozos de aproximadamente 5 mm. Las hojas troceadas así obtenidas (100 kg) se sumergieron en agua caliente (80°C, 2000 kg), para efectuar con ello la extracción durante 25 minutos. El extracto resultante se enfrió a 30°C o menos y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos para aclarar la solución, obteniéndose de ese modo extracto de hoja de guayaba.

(2) el extracto de fruta guayaba inmadura se preparó sometiendo la fruta guayaba inmadura (1 parte en peso) a la extracción mediante el uso de un disolvente (aproximadamente 10 partes en peso) a 90°C durante 25 minutos.

(3) El extracto de fruta guayaba inmadura se añadió al extracto de hoja de guayaba así obtenido en una cantidad de aproximadamente 0,1-0,2%, preparando de este modo extracto de guayaba.

Ejemplo 2 Preparación de polifenoles de guayaba

El extracto de guayaba que se había preparado en el Ejemplo 1 se filtró a través de un ultrafiltro (para el fraccionamiento por peso molecular de 5000), para obtener de ese modo una fracción de peso molecular de 5000 o más. La fracción así obtenida se dializó frente a una membrana de diálisis (para el fraccionamiento por peso molecular de 6000-8000) y el líquido interior separado se liofilizó para preparar así los polifenoles en bruto. Los polifenoles en bruto se disolvieron en una solución acuosa 0,02 mol/l de dihidrógenofosfato de sodio y la solución resultante se purificó por medio de cromatografía hidrófoba (columna macro-prep que contiene un agente de relleno unido por grupos butilo). Específicamente, después de que el relleno se lavase con una solución acuosa 0,02 mol/l de dihidrógenofosfato de sodio en un volumen dos veces el volumen de la columna, la elución se llevó a cabo mediante el uso de una mezcla, en un volumen dos veces el volumen de la columna, que contiene una solución acuosa 0,02 mol/l de dihidrógenofosfato de sodio y una solución acuosa 0,02 mol/l de fosfato trisódico en un gradiente de concentración (es decir, el cambio proporcional en la concentración) entre las dos soluciones. Posteriormente, se aplicó a la columna una solución acuosa 0,02 mol/l de fosfato trisódico. La absorbancia de la fracción restante se midió a 260 nm, para dibujar así una curva de elución y se analizó la actividad inhibidora de la amilasa (Fig. 3). Como se desprende de las curvas de la fig. 3, el pico de elución individual final solapaba con el pico de la actividad inhibidora. Se recogió una fracción correspondiente al pico individual y se sometió a electrodiálisis, seguido de liofilización, para obtener de ese modo un producto que sirve como polifenos purificados de guayaba.

Los polifenoles purificados de guayaba así obtenidos se analizaron cromatográficamente en las condiciones de medición (e) antes mencionadas. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Como se desprende de la Fig. 4, los polifenoles purificados de guayaba de la presente invención muestran un único pico en el cromatograma medido en las condiciones anteriores.

Ejemplo de la actividad inhibidora de la 3 α -amilasa

Se analizaron los efectos sobre la α -amilasa del extracto de guayaba y los polifenoles purificados de guayaba obtenidos en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente.

La actividad inhibidora de la α -amilasa se midió mediante un procedimiento rutinario. Específicamente, se mezcló α -amilasa derivada de jugo pancreático porcino con un tampón de fosfato de sodio 0,02 M (pH 6,5), para preparar de este modo una solución de amilasa. Se preparó una solución de sustrato a partir de almidón soluble al 8% y un tampón fosfato de sodio 0,08 M (pH 6,5). Las mezclas de la enzima, solución de sustrato y una solución de ensayo,

o una mezcla de la enzima, solución de sustrato y agua que sirve como un control se dejaron reaccionar a 37°C durante siete minutos. La reacción se terminó a 100°C. La maltosa formada se determinó por medio de HPLC usando arabinosa como una sustancia patrón interno. La actividad inhibidora se calculó mediante la siguiente ecuación. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Actividad inhibidora (%) =

{1 – (cantidad de maltosa formada en la muestra de ensayo) / (cantidad de maltosa formada en la muestra control)} x 100

Tabla 3

Muestras de ensayo	Concentración (mg/ml)	Inhibición de la amilasa (%)
Extracto de guayaba	0,80	46
Polifenoles purificados de guayaba	0,79	74

Como se muestra en la Tabla 3, los polifenoles purificados de guayaba de la presente invención mostraron una actividad inhibidora más alta (aproximadamente 30% mayor) en comparación con el inhibidor de extracto de guayaba.

Ejemplo de la actividad inhibidora de la 4 α-glucosidasa

Se analizaron los efectos, sobre la maltasa, un tipo de α-glucosidasa, del extracto de guayaba y los polifenoles purificados de guayaba obtenidos en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente.

La actividad inhibidora de la maltasa se midió mediante un procedimiento rutinario. Específicamente, se preparó una solución de maltasa en bruto por homogeneización del polvo de acetona intestinal de rata.

(SIGMA) con un tampón de maleato 56 mM (pH 6,0) en una cantidad de nueve veces el polvo y se recogió el sobrenadante centrifugado. Se preparó una solución de sustrato usando un tampón de maleato 224 mM (pH 6,0), de tal forma que la concentración final de maltosa alcanzó el 1%. Las mezclas de la enzima, solución de sustrato y una solución de ensayo, o una mezcla de la enzima, solución de sustrato y agua que sirve como un control se dejaron reaccionar a 37°C durante cinco minutos. La reacción se terminó a 100°C. La glucosa formada se determinó mediante HPLC usando arabinosa como una sustancia patrón interno. La actividad inhibidora se calculó mediante la siguiente ecuación. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Actividad inhibidora (%) =

{1 – (cantidad de glucosa formada en la muestra de ensayo) / (cantidad de glucosa formada en la muestra control)} x 100

Tabla 4

Muestras de ensayo	Concentración (mg/ml)	Inhibición de la amilasa (%)
Extracto de guayaba	1,5	78,0
Polifenoles purificados de guayaba	1,5	84,9

Ejemplo 5

Mediante el uso de los polifenoles purificados de guayaba que se habían preparado en el Ejemplo 2, se elaboró pan tomando como base la siguiente formulación.

(partes en peso)		
Formulación	harina de trigo	52
	azúcar refinado	3
	leche condensada	4
	mantequilla sin sal	3
	huevo	3
	sal refinada	1
	levadura fresca	1,5
	agua	31,5
	polifenoles de guayaba	1

Después del horneado, el pan tenía un sabor herbal característico y buen gusto y fue comparable con el sabor de los productos de pan convencionalmente disponibles en el mercado.

Aplicabilidad industrial

El inhibidor de la actividad de la α -amilasa de la presente invención presenta una actividad inhibidora de la α -amilasa excelente en comparación con el extracto de guayaba y también presenta una actividad inhibidora de la α -glucosidasa. En consecuencia, mediante la incorporación de los polifenoles en alimentos y bebidas, se puede proporcionar un efecto de supresión del azúcar en sangre y un efecto anti-obesidad. Más concretamente, mediante la incorporación de los polifenoles en alimentos que contienen mucho almidón, tales como la harina de condimentos, fideos, pan y galletas, se pueden proporcionar alimentos y bebidas dietéticas adecuadas para las personas con un alto nivel de azúcar en la sangre o hiperlipidemia.

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la actividad de la α -amilasa que comprende, como un componente efectivo, polifenoles obtenidos mediante el procedimiento siguiente: las hojas de guayaba y/o la fruta guayaba se someten a extracción con uno o más disolventes seleccionados entre agua y disolventes hidrófilos; el extracto resultante se somete a ultrafiltración para eliminar de este modo las sustancias que tienen un peso molecular de menos de 5.000; la fracción restante se aplica a la columna de cromatografía hidrófoba con soporte de butilo y la elución se lleva a cabo mediante el uso de una solución acuosa de dihidrógenofosfato de sodio (0,02 mol/l) y una solución acuosa de fosfato de sodio (0,02 mol/l) (velocidad de flujo: 1 ml/minuto) en un gradiente de pH entre las dos soluciones y se recupera una fracción de la sustancia eluida, fracción que corresponde al tercer pico individual de una curva de elución obtenida cuando la absorbancia de la sustancia se mide a 260 nm

2. El inhibidor de la actividad de la α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los polifenoles poseen las siguientes propiedades fisicoquímicas:

- (a) contienen carbono (49,6%), hidrógeno (4,6%) y nitrógeno (0,6%);
- (b) tienen un peso molecular de 5.000-100.000;
- (c) presentan una fuerte absorción en el infrarrojo cercano 3.428 cm^{-1} , 1.705 cm^{-1} , 1.615 cm^{-1} y 1.220 cm^{-1} ;
- (d) presentan espectros de resonancia magnética nuclear de carbono sólido que corresponden a una señal de azúcar (en la vecindad de 76 ppm), una señal aromática (en la vecindad de 115,0 ppm), una señal de fenol (en la vecindad de 144 y 156 ppm) y una señal de éster de carbonilo (en la vecindad de 168 ppm) y
- (e) presentan un solo pico a alrededor de 10 minutos cuando se somete a cromatografía líquida en las condiciones siguientes:

columna: una columna rellena con un gel de distribución en fase inversa de tipo polímero sintético duro a la que se unen químicamente los grupos butilo (modelo: Shodex Asahipak C4P-50 4D (producto de Showa Denko), diámetro interno: 4,6 mm, longitud: 150 mm) o una columna similar a esta columna);
velocidad de flujo: 1,5 ml/minuto;
temperatura de la columna: una temperatura específica alrededor de 40°C ;
detector: absorciómetro UV (longitud de onda: 260 nm);
fase móvil:

solución A: una mezcla de solución de acetonitrilo que contenía NaH_2PO_4 0,02 mol/l y agua, 15: 85 (v/v), pH = 4,6 y

solución B: una mezcla de solución de acetonitrilo que contenía Na_3PO_4 0,02 mol/l y agua 15: 85 (v/v) (pH = 11,4) y

procedimiento de análisis: un análisis de gradiente escalonado realizado sobre la base de los datos enumerados en la siguiente Tabla.

Tabla 1

Tiempo de análisis (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0 (hasta 4)	100	0
4 (hasta 8)	65	35
8 (hasta 12)	0	100
12 (hasta 20)	100	0

3. Un inhibidor de la actividad de la α -amilasa que comprende, como un componente efectivo, polifenoles que poseen las siguientes propiedades fisicoquímicas:

- (a) contienen carbono (49,6%), hidrógeno (4,6%) y nitrógeno (0,6%);
- (b) tienen un peso molecular de 5.000-100.000;
- (c) presentan una fuerte absorción en el infrarrojo cercano 3.428 cm^{-1} , 1.705 cm^{-1} , 1.615 cm^{-1} y 1.220 cm^{-1} ;
- (d) presentan espectros de resonancia magnética nuclear de carbono sólido que corresponden a una señal de azúcar (en la vecindad de 76 ppm), una señal aromática (en la vecindad de 115,0 ppm), una señal de fenol (en la vecindad de 144 y 156 ppm) y una señal de éster de carbonilo (en la vecindad de 168 ppm) y
- (e) presentan un solo pico a alrededor de 10 minutos cuando se somete a cromatografía líquida en las condiciones siguientes:

columna: una columna rellena con un gel de distribución en fase inversa de tipo polímero sintético duro a la que se unen químicamente los grupos butilo (modelo: Shodex Asahipak C4P-50 4D (producto de Showa Denko), diámetro interno: 4,6 mm, longitud: 150 mm) o una columna similar a esta columna); 0,02 mol/l
velocidad de flujo: 1,5 ml/minuto;
temperatura de la columna: una temperatura específica alrededor de 40°C ;
detector: absorciómetro UV (longitud de onda: 260 nm);
fase móvil:

solución A: una mezcla de solución de acetonitrilo que contenía NaH_2PO_4 0,02 mol/l y agua, 15: 85 (v/v), pH = 4,6 y

solución B: una mezcla de solución de acetonitrilo que contenía Na_3PO_4 0,02 mol/l y agua 15: 85 (v/v) (pH = 11,4) y

5

procedimiento de análisis: un análisis de gradiente escalonado realizado sobre la base de los datos enumerados en la siguiente Tabla.

Tabla 1

Tiempo de análisis (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0 (hasta 4)	100	0
4 (hasta 8)	65	35
8 (hasta 12)	0	100
12 (hasta 20)	100	0

10

4. El inhibidor de la actividad de la α -amilasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además posee una actividad inhibidora de la α -glucosidasa.

15

5. Alimentos y bebidas que contienen un inhibidor de la actividad de la α -amilasa como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. El uso de los polifenoles como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la producción de alimentos y bebidas dietéticos.

20

7. Un procedimiento de dieta que comprende la ingesta de alimentos y bebidas como se describe en la reivindicación 5.

Fig. 1

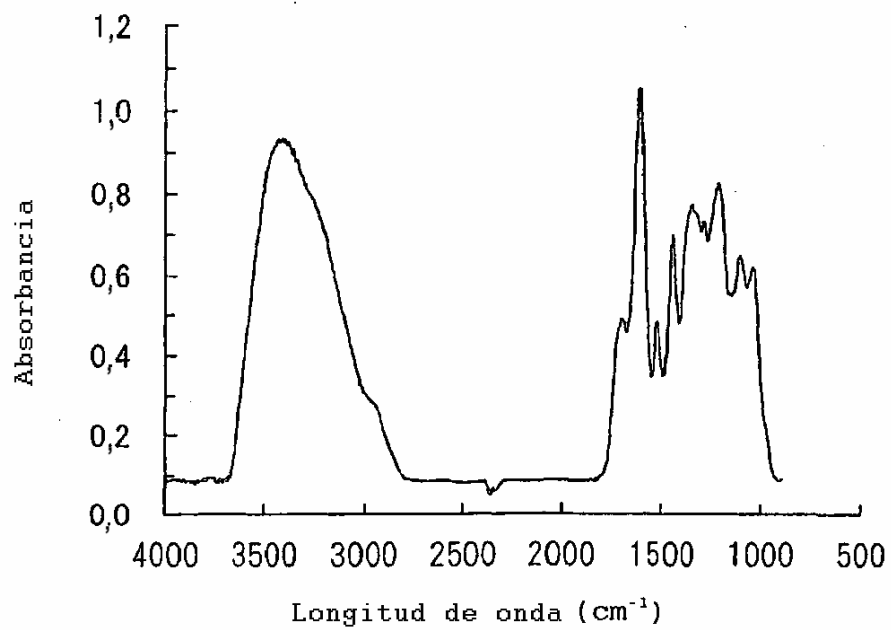


Fig. 2

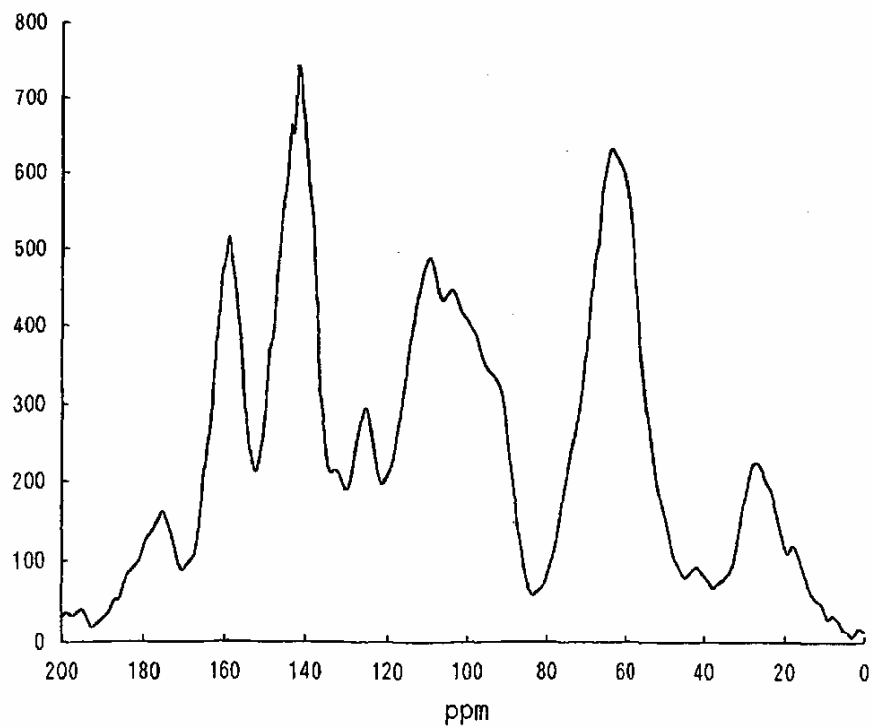


Fig. 3

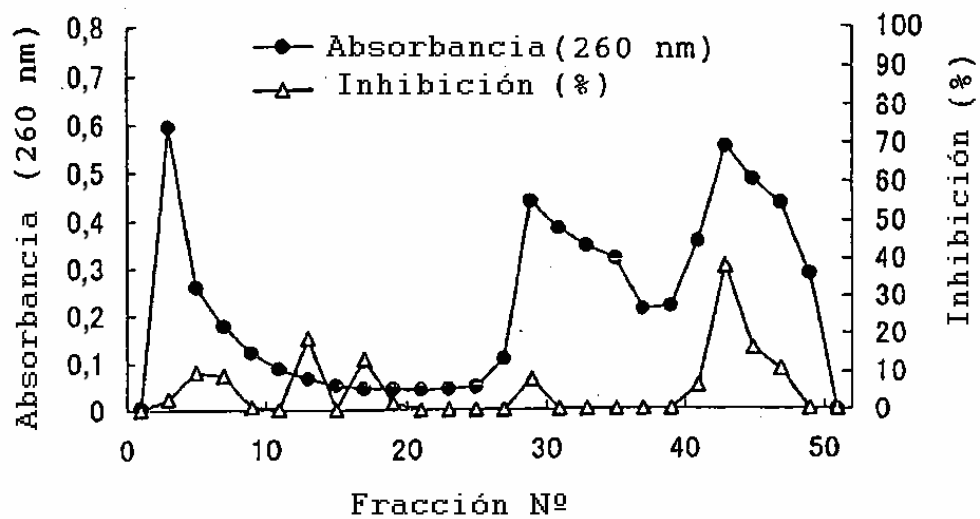


Fig. 4

