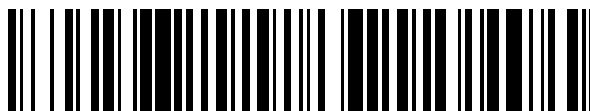


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 636**

51 Int. Cl.:

**C07C 319/22** (2006.01)

**C07C 323/65** (2006.01)

**C12P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2010 E 10707117 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2403827**

54 Título: **Proceso para la preparación del ajoeno**

30 Prioridad:

**05.03.2009 GB 0903869**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.10.2013**

73 Titular/es:

**NEEM BIOTECH LIMITED (100.0%)  
Unit 1 Willowbrook Technical Units Landogo  
Road  
St. Mellons, Cardiff CF3 0EF, GB**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, DAVID MICHAEL;  
SAUNDERS, ROBERT ALUN y  
EVANS, GARETH JAMES STREET**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 424 636 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

Proceso para la preparación del ajoeno

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de ajoeno, y a una composición que contiene ajoeno la cual se puede obtener mediante el proceso. La presente invención también se refiere a los procesos para la preparación de alicina, y a un proceso de crioconcentración de la alicina.

Antecedentes

El ajo se ha utilizado durante miles de años como una hierba para cocinar y como alimentaria. Además, muchas propiedades médicas se han atribuido al ajo y se ha utilizado en la medicina popular desde hace miles de años.

10 El ajoeno es un compuesto químico de origen natural que se deriva del ajo. Más particularmente, el ajoeno se forma durante la degradación de la alicina, que es un aceite inestable químicamente, incoloro a color paja, que se cree que es responsable de gran parte del olor y la actividad biológica del ajo. Un diente de ajo intacto no contiene alicina sino más bien su precursor inodoro aliina [(+) (S-*alil*-L-cisteina sulfóxido)]. Este se convierte a alicina por una C-S-*liasa* presente en la planta del ajo llamada *aliinasa*. La aliina y la *aliinasa* se encuentran en diferentes compartimentos del diente de ajo y el corte o trituración del diente libera la enzima permitiendo que entre en contacto con la aliina, que se convierte en alicina. La alicina es tanto inestable como volátil, y naturalmente degrada principalmente a disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo, vinilditiínas y ajoeno. Un método para la preparación de la alicina en un alto rendimiento y volumen se describe en WO-A-2003/004668.

20 Actualmente, el ajoeno es de interés en un número de campos de la actividad, pero predominantemente en el campo de la medicina, incluyendo los productos farmacéuticos tanto humanos como animales. Sin embargo, el estudio y por lo tanto el uso de ajoeno para tales propósitos se ha reducido, dado que los métodos existentes para la producción de ajoeno tienen baja selectividad al ajoeno. Por lo consiguiente, producir el ajoeno es costoso y además solo en producciones relativamente pequeñas. Por ejemplo, US-A-5612077 describe un método que utiliza aceite comestible para producir un macerado que contiene principalmente Z-ajoeno pero en pequeños volúmenes y bajas concentraciones. US-A-5741932 describe un método de preparación del ajoeno utilizando ciclodextrina que es un método multi etapa complicado y que de nuevo produce pequeños volúmenes a una baja concentración.

25 US-A-4643994 se refiere a óxidos de tritio orgánicos de la fórmula: R<sup>1</sup>-X-R-X<sup>1</sup>-R<sup>1</sup>, en donde R se selecciona de -CH<sub>2</sub>CH=CH-, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)=CH-, -C(CH=CH<sub>2</sub>)H- y (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; X se selecciona de -S(O)- y -S(O<sub>2</sub>)-, X<sup>1</sup> se selecciona de -S-S-, -S-S(O)- y -S-S(O<sub>2</sub>)-, cada R<sup>1</sup> se selecciona independientemente de carboxialquilo, alcoxi, alquiltio, amino, alquilamino y alquilo inferior sustituido y no sustituido por un acilo, alqueno inferior, alquino inferior, fenilo y alquilfenilo inferior; proporcionado cuando R es -CH<sub>2</sub>CH=CH-, X es -S(O)- y X<sup>1</sup> es -S-S-, entonces R<sup>1</sup> no es en ambos casos -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>. Esta referencia también se refiere a un método de preparación de los compuestos identificados anteriormente por calentamiento y además oxidaciones con diversos óxidos de disulfuros orgánicos y a usos antitrombóticos de los compuestos.

35 En E. Block, et al., J. Am. Chem. Soc., 1986, 108 (22), pp 7045-7055, se determinó por métodos espectroscópicos que la estructura del ajoeno era (*E* y *Z*)-4,5,9-tritradodeca-1,6,11-trieno 9-óxido. El ajoeno se sintetizó mediante la descomposición de la alicina en acetona agua. Una intento de síntesis del isómero del ajoeno (*E*)-4,5,9-tritradodeca-1,7,11-trieno 9-óxido condujo en cambio a una sulfina (tial S-óxido) por medio del reordenamiento de sulfóxido tío-Claisen. La descomposición del componente del ajo *Salil* metanotiosulfinato conduce a diversos homólogos de ajoeno. Los datos en la actividad antitrombótica de una variedad de estructuras relacionadas con el ajoeno, se utilizaron para explicar las bases moleculares para actividad antitrombótica de ajoeno, que se distribuyó a su capacidad para alterar membranas de las plaquetas mediante la captura de grupos sulfidrilos.

Además, mucho de la investigación anterior sobre el ajo y sus usos potenciales no se ha especificado sobre el agente activo, que por lo general se denomina como "un extracto de ajo" o "aceite de ajo".

45 Por lo tanto, existe una necesidad de un proceso mejorado para la obtención del ajoeno con un alto rendimiento, en altos volúmenes, y a un costo razonable. También existe la necesidad de un proceso mejorado para la obtención de alicina, un precursor del ajoeno, con un alto rendimiento, en altos volúmenes, y a un costo razonable.

Resumen de la Invención

50 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se dirige a un proceso para la preparación del ajoeno, el proceso que comprende una etapa de calentamiento de una solución ácida que contiene alicina durante un periodo de tiempo suficiente, de manera que al menos una porción de la alicina se convierte en ajoeno.

Se puede obtener una composición que contiene ajoeno en una cantidad de al menos aproximadamente 30 % p/v, basándose en el volumen total de la composición, mediante el proceso del primer aspecto de la invención.

5 En una modalidad la solución que contiene alicina se provee, mediante un proceso que comprende: (i) tratamiento mecánico de una fuente de planta natural de aliinasa y de forma simultánea someter el producto tratado mecánicamente a fuerzas centrífugas, separando así una solución que comprende la aliinasa de la fuente de planta natural de aliinasa; y (ii) poner en contacto la solución que contiene la fuente de aliinasa con una solución acuosa de aliina, por lo que la aliina se convierte enzimáticamente en alicina, mediante la aliinasa en la solución que contiene aliinasa.

En otra modalidad la solución que contiene alicina se provee, mediante un proceso que comprende la oxidación de una solución que contiene disulfuro de dialilo en la presencia de peroxomonosulfato de potasio a una temperatura de 0°C a 30°C, seguido por la extracción de la alicina resultante en un solvente orgánico.

10 En otra modalidad la concentración de alicina en la solución acuosa de alicina se puede incrementar, mediante un proceso que comprende la congelación de la solución acuosa de alicina, aumentando de este modo la concentración de alicina.

#### Descripción Detallada de la Invención

##### *Proceso de preparación del ajoeno*

15 De acuerdo con el primer aspecto descrito anteriormente, la presente invención se dirige a un proceso para la preparación del ajoeno, el proceso que comprende una etapa de calentamiento de una solución ácida que contiene alicina durante un periodo de tiempo suficiente, de manera que al menos una porción de la alicina se convierte en ajoeno.

20 La etapa de la conversión de la alicina en ajoeno comprende el calentamiento suave de la solución ácida que contiene alicina durante un periodo de tiempo suficiente, de manera que al menos una porción de la alicina se convierte en ajoeno. La temperatura durante la etapa de calentamiento es suficiente para hacer la conversión de alicina en ajoeno (que es un proceso por el cual se cree que dos moléculas de alicina se condensan para formar una molécula de ajoeno, junto con otros compuestos tales como vinil ditiína). La etapa de calentamiento se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente a 80°C. Por ejemplo, la etapa de calentamiento se puede llevar a cabo a una temperatura de 30°C a 80°C, por ejemplo, aproximadamente 40°C a cerca de 70°C. La etapa de calentamiento se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente 35°C a cerca de 45°C, o de aproximadamente 40°C a cerca de 50°C, o de aproximadamente 45°C a cerca de 55°C, o de aproximadamente 50°C a cerca de 60°C, o de aproximadamente 55°C a cerca de 65°C. En las modalidades, la etapa de calentamiento se realiza a una temperatura de aproximadamente 30°C, o aproximadamente 40°C, o aproximadamente 50°C, o aproximadamente 60°C. Por lo general, la solución que contiene alicina se agita lentamente durante el calentamiento por un periodo de tiempo suficiente hasta que la reacción se completa o se ha obtenido el nivel deseado de conversión. El grado de conversión de alicina en ajoeno se puede monitorear, por ejemplo, por HPLC utilizando los métodos descritos a continuación y mediante el monitoreo del espectro de absorción UV de alicina y/o ajoeno. Por lo general, cuanto mayor sea la temperatura, más corto es el periodo de tiempo necesario para convertir la alicina en ajoeno. La etapa de calentamiento se puede realizar durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 a cerca de 10 horas, por ejemplo, de aproximadamente 3 a 8 horas. En las modalidades, la etapa de calentamiento se realiza durante aproximadamente 4 horas, o durante aproximadamente 4.5 horas, o durante aproximadamente 5 horas, o durante aproximadamente 5.5 horas, o durante aproximadamente 6 horas, o durante aproximadamente 6.5 horas, durante aproximadamente 7 horas.

40 En una modalidad, una mayoría de la alicina se convierte en ajoeno. Por mayoría se entiende al menos 50 % de la alicina en la solución inicial se convierte en ajoeno, como se puede determinar por los métodos de HPLC descritos a continuación. Por ejemplo, la etapa de calentamiento se puede realizar hasta que al menos aproximadamente 60 %, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90% de la alicina en la solución inicial se convierta en ajoeno.

45 Ventajosamente, sustancialmente la totalidad de la alicina se convierte en ajoeno. Por sustancialmente la totalidad, se entiende que la etapa de calentamiento se continúa hasta que no se detecte más alicina utilizando los métodos de HPLC descritos a continuación.

50 La solución durante la etapa de calentamiento se puede agitar suavemente, por ejemplo mediante la agitación lenta, para hacer que los constituyentes se mezclen. El grado de agitación preferiblemente se controla con el fin de prevenir la formación de una emulsión. Por ejemplo, si una emulsión empieza a formarse, el grado de agitación se puede reducir (i.e., a un nivel menos grave de agitación) o incluso detener hasta que cualquier emulsión se ha despejado.

55 El proceso además puede comprender la eliminación del solvente orgánico, por ejemplo con vacío, para obtener una fracción oleosa que contiene ajoeno en una cantidad de al menos 30 % p/v, basándose en el volumen total de la fracción oleosa, (i.e., gramos de ajoeno por litro de líquido en la fracción oleosa). La fracción oleosa se puede extraer con un solvente polar orgánico para eliminar el solvente orgánico residual y secar para eliminar el agua residual.

La solución que contiene ajoeno se puede filtrar antes de eliminar el solvente para eliminar cualquier material sólido residual. Por ejemplo, la solución que contiene ajoeno se puede filtrar a través de un filtro de papel Whatman 113 de 30 cm.

5 En una modalidad, la solución recién convertida que contiene ajoeno se somete a partición utilizando una solución de alcohol acuosa y un solvente alcano no polar, tal como pentano, en una proporción que oscila de (1:1 o 2:1 por volumen). Este tratamiento elimina cualquiera de los metabolitos de alicina no polares tales como los polisulfuros y vinilditiínas.

10 En una modalidad, el solvente se reduce con vacío a una temperatura entre aproximadamente 40 a 80°C, preferiblemente a aproximadamente 50°C. Esto produce una solución acuosa y jarabe insoluble. El ácido utilizado en la etapa de conversión se puede neutralizar mediante la adición gota a gota de una base, por ejemplo, una base fuerte tal como hidróxido de sodio. La solución y el jarabe luego se extraen con un éter tal como metil tert butil éter (TBME) en una proporción de aproximadamente 2:1 a cerca de 1:1 por volumen. La extracción se puede llevar a cabo hasta 3 veces para asegurar una extracción completa.

15 La solución que contiene alicina puede contener al menos aproximadamente 2,000 ppm de alicina, por ejemplo al menos 5,000 ppm de alicina, por ejemplo al menos 7,000 ppm de alicina, por ejemplo al menos 10,000 ppm de alicina. Ventajosamente, la solución que contiene alicina puede contener al menos 15,000 ppm de alicina, por ejemplo al menos 17,000 ppm, o por ejemplo al menos 20,000 ppm. Por lo general, la solución comprende menos de aproximadamente 25,000 ppm de alicina, por ejemplo menos de aproximadamente 22,000 ppm de alicina.

20 Como se señala más adelante, la alicina en la solución que contiene alicina se puede derivar del ajo, que puede ser de cuello duro o de cuello blando. Las variedades de ajo de cuello duro incluyen Rocambole, Porcelain, Purple Stripe (algunas veces denominado como "Purple Streak"), Marbled Purple Stripe, Glazed Purple Stripe, Pure White y Pearl white. Las variedades de ajo de cuello blando incluyen Artichoke, Asiatic, Turban, Silverskin y Silverskin Creole. Ventajosamente, la alicina se deriva del ajo de cuello duro, tal como por ejemplo, Pure White o Pearl White (por ejemplo, ajo Pure White o Pearl White obtenido de la región Tiashan de China). Se ha encontrado que el rendimiento de ajoeno, se mejora significativamente, cuando la alicina en la solución ácida de alicina que se calienta y convierte a ajoeno se deriva de ajo de cuello duro (del orden de 20-25% de incremento en el rendimiento) en comparación con la conversión en una solución no-ácida.

25 La solución que contiene alicina, que se convierte en ajoeno, es una solución ácida. El pH de la solución que contiene alicina puede ser 5 o menos, o menos de 5. Ventajosamente, el pH de la solución que contiene alicina es de 3 a 5, o de 3 a menos de 5, o de aproximadamente 3 a cerca de 4. El pH de la solución puede ser mayor de aproximadamente 2. En las modalidades, el pH de la solución que contiene alicina es aproximadamente 3, o aproximadamente 4, o aproximadamente 5.

30 La solución que contiene alicina se puede acidificar a un pH deseado, mediante la adición de una cantidad adecuada de un ácido apropiado. La alicina en solución por lo general tiene un pH ligeramente ácido. Por lo tanto, una cantidad apropiada de ácido es una cantidad que ocasiona que el pH de la solución que contiene alicina, caiga al pH deseado.

35 El ácido puede ser cualquier ácido orgánico o un ácido inorgánico apropiado. En una modalidad, el ácido es un ácido fuerte que tiene un pKa inferior a 5. El ácido puede ser uno o más ácidos seleccionados del grupo que consiste de ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico. La cantidad de ácido en la solución puede ser de 0.1 a 5 % (v/v). En una modalidad, la cantidad de ácido en la solución es aproximadamente 1 % (v/v), por ejemplo, de 0.1 a 1% (v/v). Ventajosamente, el ácido es el ácido acético, por ejemplo, ácido acético glacial. Este ácido es relativamente volátil y por lo tanto se puede retirar fácilmente de la solución después de que la etapa de conversión se ha completado.

40 En una modalidad particularmente ventajosa, la solución de alicina comprende ácido acético, preferiblemente ácido acético glacial, en cantidad de 1 parte de ácido acético glacial por 100 partes de solución y tiene un pH de aproximadamente 4. La solución además comprende acetona y agua.

45 Si bien no se desea que esté ligado a la teoría, se cree que el ácido facilita la conversión de alicina en ajoeno como un donante de protón. Las condiciones ácidas, ventajosamente a un pH de 3 a 5, o de 3 a menos de 5, conducen a un producto de ajoeno mucho más limpio que contiene menos impurezas tales como disulfuro de dialilo y polisulfuros superiores.

50 La solución que contiene alicina ventajosamente comprende un solvente que es apropiado para solvatar el ajoeno. Los solventes apropiados son alcoholes, éteres y cetonas. Los alcoholes preferidos incluyen metanol, etanol y propanol. En una modalidad, el solvente es acetona. En otra modalidad, el solvente es butanol. En otra modalidad, el solvente es butanona. En otra modalidad, el solvente orgánico tiene un punto de ebullición menor de aproximadamente 100°C, por ejemplo menor de aproximadamente 90°C, por ejemplo menor de aproximadamente 80°C, por ejemplo menor de aproximadamente 70°C, por ejemplo menor de aproximadamente 60°C. La cantidad de solvente orgánico puede ser de aproximadamente 40 a 70 % (v/v), por ejemplo, 50 a 70% (v/v), siendo el resto agua

y ácido. En una modalidad el ácido es el ácido acético y el solvente orgánico es la acetona, el resto de la solución es agua.

5 El ajoeno existe en dos formas de isómero (cis (*Z*) y trans (*E*)), y por lo general serán aislados como una mezcla de ambos isómeros. Sin embargo, el solvente se puede seleccionar dependiendo de la necesaria proporción *Z:E* del ajoeno. Por lo general, la acetona resulta en un producto que comprende los isómeros *Z* y *E*, en una proporción de aproximadamente 1:3, mientras que el butanol se puede utilizar como solvente para obtener un producto que tiene una proporción *Z:E* mayor de aproximadamente 4:1.

La solución que contiene alicina y ácido puede comprender, consistir de o consistir esencialmente de alicina, ácido, solvente orgánico y agua.

10 En una modalidad, la etapa de calentamiento del proceso del primer aspecto de la invención se realiza en la ausencia de aceite tal como, por ejemplo, aceite comestible.

15 El proceso del primer aspecto de la invención permite la producción y el aislamiento de ajoeno con un alto rendimiento, y en cantidades hasta casi ocho veces la cantidad que se puede producir a partir de ajo utilizando solo los métodos de producción existentes. La producción teórica máxima es una molécula de ajoeno por dos moléculas de alicina. Los rendimientos típicos obtenidos mediante el actual proceso son aproximadamente una molécula de ajoeno por cada cuatro moléculas de alicina.

El presente proceso también permite la producción y el aislamiento de ajoeno en volúmenes relativamente altos. Además, el presente proceso permite la producción y el aislamiento de ajoeno con una pureza y concentraciones relativamente altas.

20 Por alta pureza, queremos decir que la fracción oleosa producida después de que el solvente se elimina, comprende ajoeno en una cantidad de al menos 30 % en peso por volumen (p/v) de líquido en la fracción oleosa. En las modalidades, la fracción oleosa comprende 35 % p/v de ajoeno, por ejemplo al menos aproximadamente 40 % p/v de ajoeno, por ejemplo al menos aproximadamente 45 % p/v de ajoeno, por ejemplo al menos aproximadamente 50 % p/v de ajoeno.

25 El proceso además puede comprender el secado, por ejemplo utilizando sulfato de magnesio, la fracción oleosa que contiene ajoeno y la suspensión del residuo oleoso seco en aceite comestible para formar un macerado de aceite comestible que contiene hasta cerca de 5% de ajoeno en p/v basándose en el volumen total del macerado de aceite. En una modalidad, el macerado de aceite contiene hasta cerca de 4 % en p/v de ajoeno. En otra modalidad el macerado de aceite contiene 4-5% p/v de ajoeno. El aceite comestible puede ser aceite vegetal, aceite animal o  
30 grasa, aceite vegetal hidrogenado o grasa animal o aceite o grasa sintético. Se utiliza preferiblemente un aceite líquido, por ejemplo, el aceite de oliva. En una modalidad, el aceite comestible es el de oliva y el macerado contiene hasta cerca de 4% de ajoeno (p/v).

35 El macerado de aceite comestible además se puede diluir con un aceite apropiado para utilizar entre 100 ppm y 500 ppm de ajoeno dependiendo de la aplicación y el usuario final. Este producto puede ser estable durante un mínimo de 2 años, cuando se encapsula y utiliza adecuadamente, por ejemplo, como un suplemento alimenticio de la salud u otra aplicación.

Además la purificación del ajoeno obtenido se puede lograr por una etapa adicional de la suspensión del residuo del aceite en un solvente polar orgánico, por ejemplo éter dietílico, y la partición contra agua que resulta en la eliminación de los compuestos no-polares, por lo general en la forma de polisulfuros.

40 Cualquier ácido residual se puede neutralizar mediante la adición (por ejemplo, gota a gota) de una cantidad de base apropiada tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio.

En cualquier etapa durante el proceso las diferentes soluciones se pueden filtrar y/o centrifugar para eliminar los depósitos sólidos, tal como restos de plantas contenidos en la solución de alicina original.

#### *Proceso de preparación de la alicina*

45 En una modalidad del primer aspecto de la presente invención, la solución que contiene alicina se provee por un método que comprende i) tratamiento mecánico de una fuente de planta natural de aliinasa y de forma simultánea someter el producto tratado mecánicamente a fuerzas centrífugas, separando así una solución que comprende la aliinasa de la fuente de planta natural de aliinasa; y ii) poner en contacto la solución que contiene la fuente de aliinasa con una solución acuosa de aliina, por lo que la aliina se convierte enzimáticamente a alicina mediante la aliinasa en la solución que comprende aliinasa.  
50

En una modalidad la etapa (i) se realiza en un exprimidor centrífugo, y la etapa (ii) se puede llevar a cabo de forma simultánea con al menos una parte de la etapa (i). Los exprimidores centrífugos, también conocidos como extractores de jugo centrífugos, por lo general comprenden una cesta que se puede girar a una velocidad alta. La cesta tiene dientes que muelen la fuente de planta natural de aliinasa (por ejemplo, dientes de ajo, que pueden ser

pelados o sin pelar) en una papilla suave o pulpa. Dado que la cesta se gira a una velocidad alta, la pulpa se lanza contra el lado de la cesta. El lado de la cesta es poroso, lo que permite que el líquido en la pulpa se separe de la pulpa utilizando la fuerza centrífuga. La solución líquida (que comprende la aliinasa) se recolecta y luego se puede poner en contacto con la solución de aliina. Un ejemplo de un exprimidor centrífugo apropiado es un Exprimidor Doméstico JE700 Proline (RTM). Será apreciado por los expertos en la técnica que algo del material sólido puede pasar a través de los poros durante la separación. Cualquier material sólido se puede eliminar de la solución de aliinasa mediante cualquier método apropiado, tal como filtración y/o centrifugación. Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de un exprimidor centrífugo ofrece ventajas sobre los métodos existentes. En primer lugar, la rápida separación del material sólido de la planta del líquido constituyente de la fuente de planta natural de aliinasa permite un mayor control de la temperatura de la aliinasa antes y durante su conversión en alicina, y también significa que la aliinasa en el constituyente líquido es capaz de ponerse en contacto con la solución de aliina acuosa muy rápidamente, por lo general dentro de aproximadamente 5-30 segundos del tratamiento mecánico, por ejemplo entre aproximadamente 10-20 segundos, o en aproximadamente 10 segundos del tratamiento mecánico. En el método de mezcla de la técnica anterior en WO-A-2003/004668, si bien es capaz de producir alicina en este tiempo a niveles no logrados previamente, la materia prima que se mezcla (i.e., ajo) se mezcló durante periodos relativamente mucho más largos (i.e., en el orden de minutos) lo que resulta en un aumento de la temperatura (por lo general aumentando la temperatura de la solución que contiene aliinasa a aproximadamente de 35°C). En contraste, el tratamiento mucho más rápido de la materia prima utilizando un exprimidor centrífugo significa que hay poco o ningún aumento en temperatura. Por lo consiguiente, la aliinasa en la solución resultante es menos propensa a la degradación, y también la adición de la solución de aliinasa a la solución de aliina por lo general no dará ningún aumento significativo en la temperatura, lo que también significará que la alicina formada también será menos propensa a la degradación. Además, la disminución en el tiempo entre la producción de la solución de aliinasa y poner en contacto con la solución de aliina significa que hay menos tiempo para que la aliinasa haga la conversión de aliina producida naturalmente durante la etapa de tratamiento. El resultado es un proceso mucho más eficiente que conduce a la producción de alicina en volumen y pureza como mínimo tan buena como y preferiblemente mayor de los métodos descritos en WO-A-2003/004668, con la ventaja adicional de tiempos de reacción mucho más reducidos debido a la rápida separación de la solución de aliinasa de la fuente de planta natural de aliinasa.

En una modalidad preferida, la fuente de planta natural de aliinasa se trata de acuerdo con las etapas (i) y (ii) y de forma simultánea se pone en contacto con la solución acuosa de aliina. De esta manera, el proceso se lleva a cabo de forma continua con una fuente de planta natural fresca de aliinasa que se exprimió como la solución que comprende aliinasa, se alimenta a un reactor que contiene la solución acuosa de aliina.

La fuente de planta natural de aliinasa utilizada en los procesos de la presente invención se puede obtener de una planta del género *Allium*, por lo general la porción bulbosa de esta. Más preferiblemente esta es el ajo, el *Allium Sativum* que es disponible fácilmente y económico y que tiene una concentración de aliinasa relativamente alta. El ajo puede ser de cuello duro o de cuello blando. Las variedades de ajo de cuello duro incluyen Rocambole, Porcelain, Purple Stripe (algunas veces denominado como "Purple Streak"), Marbled Purple Stripe, Glazed Purple Stripe, Pure White y Pearl white. Las variedades de ajo de cuello blando incluyen Artichoke, Asiatic, Turban, Silverskin y Silverskin Creole. Ventajosamente, la alicina se deriva de ajo de cuello duro, tal como por ejemplo, Pure White o Pearl White (por ejemplo, ajo Pure White o Pearl White obtenido de la región Tiashan de China). Se ha encontrado que cuando la alicina en la solución ácida de alicina la cual se calienta y convierte en ajoeno, se deriva de ajo de cuello duro la producción de ajoeno se mejora significativamente (del orden de 20-25% de incremento de la producción) en comparación con la conversión en una solución no-ácida.

Como se entenderá por un experto en la técnica, la calidad del ajo en términos de aliinasa puede variar con la época del año y el medio ambiente local en el cual el ajo se produce. El experto será capaz de llevar a cabo pruebas preliminares sencillas para establecer la calidad de cualquier fuente dada de ajo y determinar su idoneidad para el procesamiento de acuerdo con la presente invención para producir alicina y ajoeno.

El ajo crudo por lo general está en la forma de bulbos y/o dientes que se pueden tratar en estado pelado y sin pelar. Preferiblemente el ajo crudo se pela y limpia antes de que sea tratado mecánicamente en el exprimidor centrífugo.

Después de la etapa de poner en contacto la solución que contiene la aliinasa y la aliina se agita durante aproximadamente 1 a 6 horas, por ejemplo, durante 1 a 4 horas o, por ejemplo, durante aproximadamente 2-4 horas, o hasta que se ha logrado el nivel deseado de conversión de aliinasa y aliina en alicina. La temperatura durante la agitación preferiblemente se mantiene a 30°C. El grado de conversión en alicina se puede monitorear, por ejemplo, por HPLC utilizando los métodos descritos a continuación y mediante el monitoreo del espectro de absorción UV de la alicina. Como será apreciado por los expertos en la técnica, la concentración final de alicina puede variar dependiendo de la cantidad y el tipo de ajo crudo. La solución final puede comprender al menos aproximadamente 2,000 ppm de alicina, por ejemplo al menos 5000 ppm de alicina, por ejemplo al menos 10,000 ppm de alicina, o al menos 12,000 ppm de alicina, o al menos 15,000 ppm de alicina, o al menos 17,000 ppm, o al menos 20,000 ppm de alicina.

La solución acuosa rica en alicina resultante, por lo general que comprende entre aproximadamente 10,000 y 22,000 ppm, preferiblemente se clarifica antes de la conversión en ajoeno. El proceso de clarificación puede involucrar la sedimentación a baja temperatura, centrifugación, filtración, y/o adición de sal, o una combinación de estos, para

precipitar y retirar cualquier proteína, fibra y otros residuos de la planta de la solución. Este proceso de clarificación generalmente mejora el proceso global de la conversión de la alicina en ajoeno y cualquiera de las posteriores etapas de purificación.

5 Por ejemplo, la solución rica en alicina se puede dejar sedimentar a baja temperatura, por ejemplo por debajo de 5°C, durante un periodo de tiempo suficiente, por ejemplo, aproximadamente 1-3 días, o por ejemplo aproximadamente 2 días. Tras lo cual, se elimina el líquido sobrenadante claro, por ejemplo, por decantación. Cualquier líquido residual se puede eliminar del sedimento por centrifugación y luego combinar con el sobrenadante líquido. La temperatura preferiblemente se mantiene por debajo de 5°C durante todo el proceso. La solución de sobrenadante clarificada que contiene alicina se puede filtrar.

10 Antes de la conversión en ajoeno, la solución de alicina clarificada preferiblemente se extrae en un solvente orgánico, tal como acetona. El solvente orgánico se puede seleccionar de alcoholes, éteres y cetonas, por ejemplo, acetona, butanol o butanona. El solvente orgánico preferiblemente se enfría a una temperatura de menos de 0°C. Los dos líquidos se agitan durante un periodo de tiempo para asegurar la homogenización. La temperatura preferiblemente se mantiene a o por debajo de 5°C en todo momento. A continuación, la solución de acetona acuosa se puede dejar sedimentar por otro periodo de tiempo, por ejemplo, 24 horas, a una temperatura por debajo de 5°C, por ejemplo, por debajo de 0°C, o por debajo de -5°C, o por debajo de aproximadamente -10°C, y el sedimento se elimina. La solución luego puede ser salada mediante la adición de sal apropiada, por ejemplo, cloruro de sodio, seguido por la agitación de la mezcla, después de lo cual las soluciones se dejan reposar, a una temperatura de menos de 10°C, durante un tiempo suficiente para que la capa del solvente orgánico que contiene la alicina se separe de la capa de salmuera. El grado de agitación preferiblemente se controla con el fin de prevenir la formación de una emulsión. Por ejemplo, si una emulsión empieza a formarse, el grado de agitación se puede reducir (i.e., a un nivel menos grave de agitación) o incluso detener hasta que cualquier emulsión se ha despejado. Alternativamente, la emulsión se puede eliminar y centrifugar para hacer que las dos fases se separen en dos capas que luego se decantan y regresan a la solución madre.

25 Las etapas de extracción se pueden repetir dos o tres veces. Para extraer la alicina de la fase acuosa en una fase de solvente, es apropiada una proporción de fase acuosa con el solvente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente de 2:1 (v/v). Es la capa orgánica que contiene alicina que se puede utilizar en la etapa de calentamiento del proceso del primer aspecto de la invención.

30 La sal puede ser una sal inorgánica, tal como cloruro de sodio, cloruro de amonio o sulfato de amonio. En una modalidad, la sal es el cloruro de sodio.

En una modalidad preferida, la sal es cloruro de sodio y el solvente orgánico es acetona.

En cualquier etapa durante el proceso, la capa de solvente rica en alicina además se puede purificar mediante el secado, sedimentación, filtración y/o tratamiento criogénico para eliminar cualquier materia vegetal remanente, antes de una etapa de calentamiento para convertir la alicina en ajoeno.

35 Por ejemplo, la capa de solvente orgánico que contiene alicina, antes del calentamiento para convertir la alicina en ajoeno, se puede secar, por ejemplo con sulfato de magnesio, y filtrar, por ejemplo, a través de celite.

40 La composición del extracto del solvente de alicina luego se puede modificar con la adición de otro solvente o solventes para optimizar las condiciones de la conversión de alicina en ajoeno. Los solventes apropiados son aquellos descritos anteriormente. El extracto de alicina luego se mezcla con ácido y opcionalmente agua de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, y luego someter a calentamiento para convertir la alicina en ajoeno.

Como se señaló anteriormente, el o los solventes se pueden seleccionar dependiendo de la proporción *Z:E* necesaria del ajoeno. Por lo general, la acetona resulta en un producto que comprende los isómeros *Z* y *E* en una proporción de aproximadamente 1:3, mientras que se puede utilizar el butanol como solvente para obtener un producto que tiene una proporción *Z:E* mayor de aproximadamente 4:1.

45 De esta manera, el alto volumen y la pureza de ajoeno producido de acuerdo con la presente invención se basan, al menos en parte, en el método mejorado de producción de alicina descrito anteriormente.

Alternativamente, la alicina se puede almacenar para otros propósitos. La alicina es extremadamente inestable en agua a concentraciones superiores a unas 5000 ppm. Sin embargo, la alicina es estable a una concentración de hasta aproximadamente de 5000 ppm a -40°C, siempre que la solución se haya filtrado para eliminar las impurezas.

50 Además, la estabilidad de la alicina se puede aumentar en la presencia de una solución ligeramente ácida. Después de la extracción con un solvente tal como éter dietílico, y sin dilución, la alicina se debe mantener a o por debajo de -70°C, dado que la descomposición de la alicina producto comienza inmediatamente. Por lo tanto, dependiendo de la concentración de la solución final de alicina, las etapas se pueden tomar para diluir la solución de alicina para almacenamiento. Por lo tanto, es preferible diluir la alicina, con el fin de aumentar su estabilidad, lo más rápidamente posible. Por ejemplo, la solución se puede diluir a menos de aproximadamente 500 ppm, por ejemplo menos de aproximadamente 150 ppm. La solución diluida además se puede estabilizar ajustando el pH utilizando una solución reguladora apropiada, tal como ácido cítrico.

La estabilidad de alicina se puede incrementar aún más eliminando sustancialmente la totalidad de la proteína, los restos de ajo y los otros materiales sólidos. En esta forma la alicina se puede almacenar a niveles de concentración relativamente altos durante periodos prolongados a temperaturas bajas de aproximadamente 0°C o por debajo de. Por lo tanto, se proporciona un método para tratar y almacenar alicina a una concentración de al menos 5000 ppm, el método que comprende el tratamiento de una solución acuosa de alicina que tiene una concentración de al menos aproximadamente 5000 ppm, para eliminar sustancialmente la totalidad de la proteína, los restos de ajo y cualquier otro material sólido, y almacenar la solución acuosa de alicina a una temperatura de aproximadamente 0°C o por debajo. La solución acuosa de alicina tratada se puede almacenar por un periodo de hasta aproximadamente de 2 meses a -10°C sin la degradación de la alicina. La solución acuosa de alicina se puede preparar de acuerdo con el tercer aspecto de la invención descrito anteriormente.

En otra modalidad la concentración de alicina en una solución acuosa de alicina se puede incrementar por un proceso que comprende la congelación de la solución acuosa de alicina, aumentando de este modo la concentración de alicina. La solución acuosa de alicina se puede preparar de acuerdo con el método descrito anteriormente. La solución acuosa de alicina preferiblemente se clarifica de acuerdo con los métodos descritos anteriormente antes de la congelación. Por ejemplo, la solución acuosa de solución rica en alicina se puede dejar sedimentar a baja temperatura, por ejemplo por debajo de 5°C, durante un periodo de tiempo suficiente, por ejemplo, aproximadamente 1-3 días, o por ejemplo aproximadamente 2 días. Tras lo cual el líquido sobrenadante claro se elimina, por ejemplo, por decantación. Cualquier líquido residual se puede eliminar del sedimento por centrifugación y luego combinar con el sobrenadante líquido. La temperatura preferiblemente se mantiene por debajo de 5°C durante todo el proceso. La solución de sobrenadante clarificada que contiene alicina se puede filtrar.

La congelación se puede realizar por el enfriamiento lento de la solución acuosa de alicina a una temperatura de -10°C o inferior durante un periodo de tiempo de 1 a 3 días, por ejemplo, durante aproximadamente 2 días. El enfriamiento lento significa que la solución se congela gradualmente del exterior de la solución hacia el centro. La congelación del proceso se continúa ventajosamente hasta que aproximadamente 50% por volumen de la solución de alicina se congela. Esta tiene el efecto de aumentar la concentración de alicina en la porción líquida remanente.

El proceso además puede comprender el tratamiento mecánico de la alicina acuosa congelada para producir un líquido/lodo, y la filtración del líquido/lodo con vacío a una temperatura de menos de aproximadamente 15°C, para producir una solución de alicina relativamente viscosa (en relación con la viscosidad de la solución acuosa de alicina antes de la congelación) que tiene un incremento de la concentración de la alicina. El líquido/lodo se puede agitar durante la filtración para ayudar el proceso de filtración. La concentración de alicina en la solución viscosa se puede incrementar por hasta aproximadamente de 50%, en comparación con la concentración de alicina en la solución acuosa de alicina antes de la congelación. La concentración de alicina en la solución viscosa se puede incrementar por al menos aproximadamente 10% en comparación con la concentración de alicina en la solución acuosa de alicina antes de la congelación.

La solución viscosa de alicina, o al menos una porción de esta, se puede tratar de acuerdo con el primer aspecto de la invención y convertir en ajoeno.

De acuerdo con una modalidad alternativa del primer aspecto de la presente invención, la solución que contiene alicina se provee por un método que comprende la oxidación de una solución que comprende disulfuro de dialilo en la presencia de peroxomonosulfato de potasio a una temperatura de entre 0°C 30°C, seguido por la extracción de la alicina resultante en un solvente orgánico. En una modalidad, la temperatura es igual a o menos de 10°C, por ejemplo aproximadamente 5°C.

La cantidad de disulfuro de dialilo y peroxomonosulfato de potasio puede ser suficiente para producir una solución acuosa de alicina que tiene una concentración de aproximadamente 2000 a aproximadamente de 22,000 ppm. Por ejemplo, la cantidad de disulfuro de dialilo y peroxomonosulfato de potasio puede ser suficiente para producir una solución acuosa de alicina que tiene una concentración de 5,000 ppm, o 7,000 ppm, o 10,000 ppm, o 12,000 ppm, o 15,000 ppm o 17, 000 ppm, o aproximadamente 20,000 ppm.

La cantidad total de peroxomonosulfato de potasio se adiciona ventajosamente poco a poco a la solución de disulfuro de dialilo durante un periodo de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 2 horas con agitación.

Se conocen los métodos para preparar la alicina sintéticamente a partir del disulfuro de dialilo [por ejemplo, Cavallito. C. J., Bailey, J. H., J. Am. Chem. Soc. 66, (1944). 1950-1951; Small, L. V. D., Bailey, J. H., Cavallito C. J., J. Am. Chem. Soc. 69, (1947), 1710-1713]. En estos métodos, el peróxido de hidrógeno es el agente oxidante. Estos métodos también necesitan el uso de solventes volátiles y de bajo punto de ebullición, tal como éter, y existen problemas de seguridad con el uso de grandes volúmenes de tales solventes, que invalidan el presente método.

#### *Ajoeno*

Una composición que contiene ajoeno en una cantidad de al menos 30 % en peso por volumen (p/v) de líquido en la composición se puede obtener por un proceso de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En las modalidades, la composición comprende 35 % p/v de ajoeno, por ejemplo al menos aproximadamente 40 % p/v de



ajoeno, por ejemplo al menos aproximadamente 45 % p/v de ajoeno, por ejemplo al menos aproximadamente 50 % p/v de ajoeno.

5 La presente invención permite la producción de un macerado de aceite comestible que contiene hasta aproximadamente de 5% de ajoeno por p/v, basándose en el volumen total del macerado de aceite producido. El macerado se puede obtener por la suspensión suficiente concentrado de ajoeno en aceite para producir la concentración necesaria. El macerado de aceite puede contener hasta aproximadamente de 4% por v/v de ajoeno. El aceite comestible puede ser cualquier aceite vegetal apropiado. El aceite comestible puede ser aceite vegetal, aceite animal o grasa, aceite vegetal hidrogenado o grasa animal o grasa o aceite sintético. Preferiblemente se utiliza aceite líquido, por ejemplo, el aceite de oliva. En una modalidad, el aceite comestible es el aceite de oliva.

10 La presente invención permite así la producción de ajoeno en cantidades a granel a través de un proceso disponible comercialmente. Por ejemplo, el proceso permite la producción de ajoeno en cantidades de kilogramo. Como tal, la presente invención también se dirige a ajoeno preparado en una escala de kilogramo.

El proceso de acuerdo con la invención provee la sustancia activa farmacológicamente ajoeno en cantidades que hacen posible preparar un producto comercial que contiene una cantidad de ajoeno estandarizada.

15 El ajoeno preparado de acuerdo con la invención es apropiado para cualquiera de los usos conocidos y propuestos. Esta estabilidad permite que sea utilizado para la preparación de productos farmacéuticos estandarizados, nutracéuticos, aditivos para piensos de animales y en aplicaciones cosméticas. Particularmente para trastornos cardiovasculares tal como, por ejemplo arteriosclerosis, eventos trombóticos, hipertensión interalia, y para diversas infecciones bacterianas, infecciones fúngicas y un remedio para algunos problemas orgánicos y metabólicos. Como remedio preventivo de la salud también se puede utilizar en el sector de aditivos para alimentos.

20 La invención se describirá solo a manera de ejemplo y sin limitación con referencia a los siguientes ejemplos.

**Ejemplos**

*Métodos de HPLC de Fase Reversa*

- *determinación de la concentración de la alicina (calibración vía una solución de alicina estándar)*

25 Identificación del Pico: alicina @ 9.5 minutos

Columna: Ace 5 C18; Dimensiones: 250 x 4.6 mm

Guarda Columna: Ace 5 C18

Fase móvil: 50 % metanol - 50 % agua

Temperatura: 30°C

30 Longitud de onda de detección: 210 nm (UV)

Volumen de muestra: 20 µL

Solvente de muestra: agua

Velocidad de flujo: 1.0 ml/min

- *determinación de concentración de ajoeno (calibración vía una solución de ajoeno estándar)*

35 Identificación del Pico: ajoeno (ambos E/Z eluyeron juntos) @ 11.1 minutos

Columna utilizada: ACE 5 C18; Dimensiones: 250 x 4.6 mm

Guarda Columna: Ace 5 C18)

Fase móvil: Solvente A agua - Solvente B metanol

Velocidad de flujo: 1.0 ml/min

40 Gradiente:

Min	% Solvente B
0	50
15	100

20	100
20.0	150
25	50

Temperatura: 30°C

Longitud de onda de detección: 254 nm \*UV)

Volumen de muestra: 20 µL

5 Solvente de muestra: Metanol

- *Método de Fase Normal para la determinación de los isómeros E y Z del ajoeno (calibración vía una solución de ajoeno estándar)*

Identificación del Pico: ajoeno Z @ 14 minutos; ajoeno E @ 17 minutos

Columna utilizada: Silica; Dimensiones: 250 x 4.6 mm, fabricado por NN Scientific Ltd.

10 Fase móvil: 92 % de Hexano - 8 % de 2-Propanol

Temperatura: 30°C

Longitud de onda de detección: 240 nm (UV)

Volumen de muestra: 20 µL

Solvente de muestra: 2-Propanol

15 Velocidad de flujo: 1.0 ml/min

### Ejemplo 1

5 litros de extracto de jugo de ajo rico en aliinasa preparado utilizando un exprimidor centrífugo (extractor Exprimidor Doméstico JE700 Proline (RTM)), se mezclaron con 35 litros de 10% de la solución de aliina en un reactor y se agitaron durante 3 horas. El ajo fue de una variedad Spanish white pelado previamente, obtenido del mercado local.

20 La temperatura de reacción fue mantenida a 30°C con una chaqueta de agua. La finalización de la reacción se determinó por HPLC utilizando el método descrito anteriormente. Se determinó que la solución de 40 litros resultante tiene una concentración de alicina de 15,000 ppm. Los 40 litros de solución de alicina se dejaron sedimentar a 4°C, durante 48 horas. El sobrenadante claro se decantó completamente. El líquido del sedimento remanente se eliminó por centrifugación a 3000 rpm, durante 30 minutos a 0°C y se combinó con el sobrenadante. La solución clarificada se filtró a través de un papel de filtro Whatman 113, luego se colocó en un reactor de 100 litros. 40 litros de Acetona congelada se adicionaron al reactor y los dos líquidos se agitaron durante 2 horas para asegurar la homogenización total. La temperatura se mantuvo por debajo de 5°C en todo momento. La solución de acetona acuosa luego se dejó sedimentar durante 24 horas a -10°C. Cualquier sedimento se decantó completamente. 15 kg de cloruro de sodio se adicionaron a la solución clarificada y la mezcla se agitó durante 3 horas en un reactor con deflector. La solución se dejó reposar, durante 12 horas y se enfrió a menos de 10°C, lo cual fue tiempo suficiente para que la capa de acetona inmiscible se separara de la capa de salmuera. Se determinó que la concentración de alicina de la capa de acetona superior y de la capa de salmuera inferior era 3 % (p/v) y 0.1 % (p/v) respectivamente.

La capa de acetona se secó con sulfato de magnesio y se filtró a través de celite. Esto dejó 25 litros de acetona. La capa de acetona luego se mezcló con una solución de 25 litros de acetona/agua/ácido acético (65/34/1 (v/v)) en un reactor de 100 litros. La solución luego se calentó a 60 grados, durante 5 horas. La reacción se controló mediante el método de ajoeno por HPLC descrito anteriormente. La mezcla de reacción entonces se filtró a través de un filtro de papel Whatman 113 de 30 cm. El filtrado luego fue reducido con vacío a 50°C para eliminar el solvente. El residuo se centrifugó a 2000 ppm, durante 5 minutos. El sedimento líquido se colocó en un embudo de separación y el aceite de la parte inferior se eliminó. El aceite fue reducido con vacío a 80°C grados para eliminar cualquier solvente residual. Fue obtenido un total de 275g de aceite, se determinó que el contenido de ajoeno era 35 % (p/v) y se determinó que la proporción E/Z era 3:1 por HPLC (como se describe anteriormente).

### Ejemplo 2

Se utilizó el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, para producir 30 litros de una solución de alicina de 15,000 ppm. El líquido se dejó sedimentar, durante 48 horas luego se filtró a través de celite con vacío. La solución clarificada luego se mezcló con 11 Kg de cloruro de sodio en un reactor de 100 litros. El reactor se enfrió a -10°C, durante 24

horas. El líquido luego se filtró a través de papel para eliminar la proteína, la fibra y el exceso de sal. El líquido se transfirió a un reactor de 100 litros. Se adicionaron 30 litros de acetona congelada al reactor, los líquidos se agitaron lentamente con un impulsor diseñado para asegurar una turbulencia suficiente para permitir la transferencia de la alicina de la capa acuosa a la capa orgánica sin generar el exceso de emulsión. La solución se dejó reposar, durante 5 12 horas y se enfrió a menos de 10°C; este fue tiempo suficiente para que la capa de acetona inmiscible se separe de la capa de salmuera. Aproximadamente 10 litros de emulsión se generaron en la interfase de la bi-capa. Esta emulsión se rompió en una centrifuga a 3000 rpm, durante 5 minutos. Se determinó que la concentración de la alicina de la capa de acetona superior y la capa de salmuera inferior era 2% (p/v) y 0.08% (p/v), respectivamente.

La capa de acetona luego se mezcló con una solución de 25 litros de Acetona/agua/ácido acético (65/34/1) en un reactor de 100 litros. La solución luego se calentó a 40 grados, durante 6.5 horas. La reacción se controló mediante el método de ajoeno por HPLC descrito anteriormente. A continuación, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de papel Whatman 113 de 30 cm. El líquido luego se sometió a partición contra 2 x 10 litros de pentano para eliminar los metabolitos de alicina no-polares, tales como los polisulfuros y las vinilditiínas. El filtrado luego fue reducido con vacío a 50°C, para eliminar el solvente. El residuo y el aceite se homogenizaron con agitación. El residuo de ácido acético en el líquido fue neutralizado con la adición gota a gota de una solución concentrada de hidróxido de sodio.

El líquido acuoso luego fue extraído con 2 x 5 litros de metil tert butil éter. Los extractos de metil tert butil éter fueron combinados, luego se secaron con sulfato de magnesio. El metil tert butil éter secado luego fue reducido con vacío a 50°C. Un total de 210 g de aceite fue obtenido y se determinó que el contenido de ajoeno era 50 % (p/v) y se determinó que la proporción E/Z era 3.1

### Ejemplo 3

El procedimiento descrito en el Ejemplo 2, se utilizó para producir 30 litros de solución de alicina de 15,000 ppm. El líquido fue clarificado a través de la centrifuga a 3000 rpm, durante 45 minutos. La solución luego se saturó con 13 Kg de sulfato de amonio. La solución se agitó para asegurar la saturación; cualquier sal no disuelta se eliminó por filtración. La solución luego fue extraída con 15 litros de acetona congelada. La solución de acetona se transfirió a un recipiente aislado; la temperatura del reactor se redujo a -70°C con la adición de hielo seco. La solución fría luego se filtró con vacío a través de celite sobre un filtro de papel. El filtrado luego se secó con sulfato de magnesio y se filtró de nuevo a través de celite.

La capa de acetona luego se mezcló con una solución de 15 litros de acetona/agua/ácido acético (65/34/1) en un reactor de 100 litros. La solución luego se calentó a 50°C, durante 4 horas. La reacción se controló mediante el método de ajoeno por HPLC. A continuación, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de papel Whatman 113 de 30 cm. El filtrado luego fue reducido con vacío a 60°C, para eliminar solvente. El residuo se disolvió en 10 litros de 50 % de solución de metanol. Esta solución luego se lavó contra 2 x 5 litros de hexano. La capa acuosa luego fue extraída con 2.5 litros de diclorometano. El DCM se secó con sulfato de magnesio, después se redujo.

Se produjeron 258 ml de líquido con un contenido de ajoeno de 40% p/v.

### Ejemplo 4

Se utilizó el procedimiento descrito en el ejemplo 1, para producir 15 litros de una solución de alicina de 15,000 ppm. La solución de alicina fue clarificada por sedimentación a 4°C, durante 24 horas. La solución luego se congeló a -10°C, durante 48 horas. A continuación, el bloque congelado se rompió con un martillo, luego se pulverizó a un lodo fino con una batidora doméstica. El lodo lavado se filtró a través de un tamiz de grado grueso para eliminar las partículas grandes de hielo. El lodo se filtró con vacío durante 3 horas. El líquido/lodo se agitó en todo momento para ayudar a la filtración. La temperatura se mantuvo por debajo de 10°C. 6 litros de filtrado se recolectaron y se determinó que tiene un contenido de alicina de 30,000 ppm utilizando el método de HPLC para alicina descrito anteriormente. El filtrado fue una solución pegajosa viscosa. El lodo/hielo sólido remanente se dejó descongelar a temperatura ambiente, durante 12 horas produciendo 9 litros de líquido con un contenido de alicina de 5000ppm.

A continuación, los 6 litros de solución de alicina se trataron utilizando las mismas etapas de conversión y extracción como se describe en el Ejemplo 1. Un total de 250g de aceite fueron obtenidos, se determinó que el contenido de ajoeno era 30 % y se determinó que la proporción E/Z era 3:1, mediante el método HPLC descrito anteriormente.

### Ejemplo 5

El ajoeno fue producido como se describe en el Ejemplo 1. El ajoeno producido adicionalmente se secó sobre sulfato de magnesio y se suspendió en aceite de oliva para proporcionar un macerado de aceite que contiene aproximadamente 4% de ajoeno. Este concentrado además se puede diluir con cualquier aceite comestible apropiado para utilizar entre 100ppm y 500ppm dependiendo de la aplicación y el uso final. Este producto es estable durante un mínimo de 2 años cuando se encapsula y utiliza adecuadamente, como un suplemento alimenticio para la salud u otras aplicaciones conocidas.

**Ejemplo 6**

- 5 10ml de disulfuro de dialilo (DADS) se agitaron en 100 ml de etanol/agua (1:1). Se adicionaron 20 gramos de peroximonosulfato de potasio (Oxone RTM), lentamente durante 2 horas, y se agitó por debajo de 10°C hasta que no se observó más reacción. La solución resultante luego se filtró, y luego se extrajo con éter dietílico (2 x 50 ml). Las capas de éter dietílico fueron combinados y lavadas con 10 % de solución de salmuera 2 x 50 ml. La capa de éter se secó con sulfato de magnesio, después se redujo con vacío. La eliminación del solvente produjo un aceite de color amarillo de alicina puro mejor del 90% (expresado como un % de material puro). A continuación, la alicina pura se puede tratar como en el Ejemplo 1, para la conversión en ajoeno.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de ajoeno, proceso que comprende una etapa de calentamiento de una solución ácida que contiene alicina, durante un periodo de tiempo suficiente, de manera que al menos una porción de la alicina se convierte a ajoeno.
- 5 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, dónde la solución comprende un solvente orgánico y agua, opcionalmente en donde el solvente orgánico se selecciona de alcoholes, éteres y cetonas, u opcionalmente en donde el solvente orgánico es acetona, butanol o butanona.
- 10 3. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la solución ácida comprende un ácido orgánico o un ácido inorgánico, opcionalmente en donde el ácido tiene un  $pK_a$  inferior a 5, u opcionalmente en donde el ácido es uno o más ácidos seleccionados del grupo que consiste de ácido acético, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y clorhídrico.
- 15 4. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la cantidad de ácido en la solución es de 0.1 a 5 % (v/v), o en donde la cantidad de ácido en la solución es de 0.1 a 1 % (v/v).
- 5 5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la cantidad de solvente orgánico es de 50 a 70 % (v/v) siendo el resto agua, opcionalmente en donde el ácido es el ácido acético y el solvente orgánico es la acetona, el resto de la solución es agua.
6. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la etapa de calentamiento se realiza a una temperatura de 30°C a 80°C, por ejemplo, en donde la temperatura es 40°C o 50°C o 60°C.
- 20 7. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde una mayoría de la alicina se convierte a ajoeno, o en donde prácticamente la totalidad de la alicina se convierte a ajoeno.
8. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la solución ácida de la alicina tiene un pH de 3 a 5, o un pH de 3 a menos de 5.
- 25 9. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que además comprende la eliminación del solvente orgánico para obtener una fracción oleosa que contiene ajoeno en una cantidad de al menos 30 % p/v basándose en el volumen total de la fracción oleosa, opcionalmente en donde la fracción oleosa se extrae con un solvente polar orgánico para eliminar el solvente orgánico residual y se seca para eliminar el agua residual, y opcionalmente que además comprende la suspensión de la fracción oleosa en aceite comestible para formar un macerado de aceite que contiene 4-5% p/v de ajoeno, basándose en el volumen total del macerado de aceite, en donde el aceite comestible opcionalmente es el aceite de oliva.
- 30 10. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la solución que contiene alicina se prepara, mediante un proceso que comprende:
- i) tratamiento mecánico de una fuente de planta natural de aliinasa y al mismo tiempo someter el producto tratado mecánicamente a fuerzas centrífugas, separando así una solución que comprende aliinasa de la fuente de planta natural de aliinasa, opcionalmente en donde la etapa (i) se realiza en un exprimidor centrífugo; y
- 35 ii) poner en contacto la solución que contiene la fuente de aliinasa con una solución acuosa de aliina, por lo que la aliina se convierte enzimáticamente a alicina mediante dicha aliinasa, produciendo de este modo una solución acuosa que contiene alicina, opcionalmente en donde se realiza la etapa (ii) de forma simultánea con al menos parte de la etapa (i).
- 40 11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde después de la etapa de poner en contacto la solución que comprende aliina, aliinasa y alicina se agita durante 1 a 4 horas, en donde opcionalmente la temperatura durante la agitación se mantiene a 30°C, opcionalmente en donde la alicina se extrae en un solvente orgánico después de la conversión, opcionalmente en donde el solvente orgánico se selecciona de alcoholes, éteres y cetonas, u opcionalmente en donde el solvente orgánico es la acetona, el butanol o la butanona.
- 45 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la extracción se realiza en la presencia de sal, por ejemplo, cloruro de sodio, opcionalmente en donde la sal y el solvente orgánico se adicionan a la solución que contiene alicina con agitación, y en donde la formación de una emulsión durante la adición de la sal y solvente orgánico se evita o al menos se minimiza.
- 50 13. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde la fuente de planta natural de aliinasa es el ajo crudo, opcionalmente en donde el ajo crudo está en la forma de bulbos o dientes que preferiblemente han sido pelados y limpiados.
14. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la solución que contiene alicina contiene al menos 5000 ppm de alicina, o en donde la solución que contiene alicina contiene al menos 10,000 ppm de alicina, o en donde la solución que contiene alicina contiene al menos 15,000 ppm de alicina, o en donde la

solución que contiene alicina contiene al menos 20,000 ppm de alicina, o en donde la solución que contiene alicina contiene al menos 22,000 ppm de alicina.

- 5 **15.** Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la solución que contiene alicina se prepara, mediante un proceso que comprende la oxidación de una solución que comprende disulfuro de dialilo en la presencia de peroxomonosulfato de potasio a una temperatura de 0°C a 30°C, por ejemplo, igual a o menos de 10°C, seguido por la extracción de la alicina resultante en un solvente orgánico, opcionalmente en donde la cantidad de disulfuro de dialilo y peroxomonosulfato de potasio es suficiente, para producir una solución acuosa de alicina que tiene una concentración de 5000 ppm a 22,000 ppm.
- 10 **16.** Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-14, que además comprende el aumento de la concentración de alicina en la solución acuosa de alicina, mediante la congelación de la solución acuosa de alicina, aumentando de este modo la concentración de alicina, opcionalmente en donde la congelación se realiza por el enfriamiento de la solución acuosa de alicina a una temperatura de -10°C o inferior, durante un periodo de 1 a 3 días.