

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 804**

51 Int. Cl.:

C07H 1/08 (2006.01)

C07H 15/203 (2006.01)

C12P 19/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2012 E 12700564 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2670762**

54 Título: **Proceso de purificación de dihidrocalconas**

30 Prioridad:

31.01.2011 EP 11152766

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

06.03.2015

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**BOEHLENDORF, BETTINA;
HUG, HUBERT;
KAMMERER, JUDITH;
KILPERT, CLAUS y
CARLE, REINHOLD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 530 804 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 de purificación de dihidrocalconas.

5 La presente invención se refiere a un proceso mejorado para la preparación de un extracto enriquecido en dihidrocalconas, y más específicamente enriquecido en floridzina, a partir de una fracción seca de polifenoles procedente del procesamiento industrial de las manzanas. La invención se refiere también a un extracto de dihidrocalconas obtenible por este proceso.

10 El crecimiento de las industrias de horticultura en todo el mundo ha generado cantidades enormes de residuos de frutas. Estos residuos son generalmente una buena fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales, antioxidantes, y otros metabolitos secundarios bioactivos. Los frutos del manzano se utilizan extensamente en la industria alimentaria para producir diferentes tipos de pasteles de manzana, zumos de manzana y sidras, y generan en paralelo cantidades muy grandes de pulpa de manzana, o corrientes residuales de piel de manzana, que contienen a la vez grandes cantidades de metabolitos nutricionalmente interesantes. La pulpa de manzana adquiere la forma de una mezcla heterogénea de semillas, corazones, tallos, piel, y parénquima. La pulpa de manzana es una de las fuentes principales de pectinas, un agente gelificante alimentario común, y puede utilizarse también para producciones biotecnológicas. En las manzanas existen compuestos fenólicos en diversas partes del fruto y pueden clasificarse en varias clases: derivados de ácido hidroxicinámico, flavan-3-oles monómeros y oligómeros, dihidrocalconas, flavonoles, etc. Un uso eficiente de los subproductos de manzana es un tema de discusión cada vez más frecuente que puede considerarse como un proceso clave para la mejora de la rentabilidad y/o la sostenibilidad en la industria de las manzanas.

20 La florizina (glucosa-1-[2-(beta-D-glucopiranosiloxi)-4,6-dihidroxifenil]-3-(4-hidroxifenil)-1-propanona); CAS No.: 60-81-1 es un miembro de la clase de compuestos orgánicos dihidrocalconas. La misma está constituida por un resto glucosa y dos anillos aromáticos unidos por un espaciador alquilo. La florizina es un producto natural, que se ha encontrado en diversos árboles frutales, y aislado de los mismos, que incluyen la raíz, corteza, brotes, hojas y frutos de los manzanos, y de todas las partes de las plantas de fresa. Además, la florizina es un bloqueador potente conocido de la absorción de glucosa (WO 2001/15706) que se utiliza para tratar formas no patológicas de obesidad (EP 1.338.270).

30 La florizina y/o los extractos naturales enriquecidos en florizina se pueden preparar por pasos de extracción múltiples que requieren usualmente un paso adicional cromatográfico costoso (WO 2007/124102; EP 1.243.586), o un paso enzimático selectivo (Will et al. LWT (2007), 40: 1344-1351). Sin embargo, las tecnologías de purificación descritas hasta la fecha en la técnica anterior son relativamente caras, consumen mucho tiempo, y son difíciles de realizar en escala industrial a partir de una corriente industrial de residuos, dado que todas ellas implican un paso cromatográfico o enzimático.

35 Debido a la demanda continuamente creciente de florizina en el mercado, el objeto de la presente invención fue proporcionar un proceso para la preparación de florizina que es fácil de realizar y proporciona ventajas económicas como resultado de sus altos rendimientos. Adicionalmente, el proceso de la presente invención proporciona un producto más puro que es más estable y contiene cantidades muy bajas de estructuras indeseables de orto-dihidroxi-fenoles, v.g.: quercetina y derivados de la misma, flavonoles, flavanoles, y ácidos hidroxicinámicos. Esto es particularmente importante, dado que cantidades pequeñas de quercetina y derivados de la misma en una preparación de florizina tienden a oxidarse durante el almacenamiento, haciendo con ello que la preparación de florizina adquiera un color pardo que es indeseable para uso en las formulaciones alimentarias.

40 Sorprendentemente, se ha encontrado que el proceso de la presente invención proporciona rendimientos mayores de dihidrocalconas y menos estructuras de orto-dihidroxi-fenoles con un coste de procesamiento muy bajo comparado con el uso de otras tecnologías. Adicionalmente, el proceso de la presente invención implica únicamente extracción y precipitación selectiva de productos secundarios indeseables, haciendo este proceso significativamente más eficaz en costes comparado con cualquier proceso de la técnica anterior.

45 Así pues, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de un extracto enriquecido en dihidrocalconas y derivados de las mismas, en donde dicho proceso comprende los pasos de:

- (a) extraer un extracto seco de polifenoles con un disolvente de grado alimentario,
- (b) alcalinizar el extracto de (a),
- (c) oxidar la solución resultante de (b),
- (d) filtrar o centrifugar la mezcla de (c),
- (e) opcionalmente, evaporar la solución resultante de (d) para eliminar el disolvente residual, y solubilizar el material seco en agua
- (f) secar el extracto resultante.

55 Dihidrocalconas y derivados de las mismas, significa cualquier compuesto seleccionado de: floridzina, fletina, fletin-2'-O-β-D-xilopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosido, y otros glicosidos de fletina.

En una realización particular, la materia prima utilizada como material de partida es un extracto seco de polifenoles derivado del procesamiento industrial de las manzanas. Por el término manzana debe entenderse tanto el manzano cultivado como el silvestre. La materia prima puede ser pulpa de manzana como residuo de la producción de zumo de manzana o de sidra, o un extracto polifenólico ulteriormente purificado derivado de la pulpa de manzana, o piel de manzana. Más preferiblemente, la materia prima utilizada como material de partida es un extracto seco de polifenoles derivado del proceso de producción de la pectina de manzana. De modo aún más preferido, es un extracto seco de polifenoles resultante del proceso de producción de la pectina como se describe en WO 2001/78859. Adicionalmente, cuando el extracto seco de polifenoles se deriva del procesamiento industrial de la manzana, el mismo comprende preferiblemente al menos 1, preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 8% en peso de florizina. El mismo puede comprender también hasta 5% de quercetina y derivados de la misma.

En otra realización, el paso de extracción (paso (a)) del proceso conforme a la presente invención se realiza con un disolvente puro de grado alimentario, con agua o con una mezcla agua-disolvente. La mezcla agua-disolvente comprende desde 1 hasta 99% en volumen de agua, preferiblemente hasta 50, más preferiblemente hasta 30, aún más preferiblemente hasta 10% en volumen de agua. El disolvente de grado alimentario preferido conforme a la presente invención se selecciona de: propano, butano, pentano, hexano, ciclohexano, heptano, metanol, etanol, butan-1-ol, butan-2-ol, 3-metil-1-butanol, propan-1-ol, 2-metil-1-propanol, isopropanol, 1-pentanol, acetato de metilo, acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetona, etilmetilcetona, metilisobutil-cetona, diclorometano, éter etílico, éter dietílico, éter terc-butilmetílico, 1,1,1,2-tetrafluoroetano, anisol, y cumeno.

En una realización adicional, el disolvente de extracción del paso (a) se selecciona de: metanol, etanol, e isopropanol. Un disolvente de extracción de grado alimentario aún más preferido es isopropanol 100% teniendo en cuenta su eficiencia en la extracción de florizina y su selectividad contra la extracción de quercetina y derivados de la misma.

Para asegurar un rendimiento elevado, y un proceso de extracción rápido, es crítico que el paso de extracción conforme a la presente invención (paso (a)) sea lo más eficiente posible. Por tanto, en otra realización, el extracto seco de polifenoles que sigue a la adición del disolvente se trata con ultrasonidos hasta solubilización o dispersión completa de las partículas. En una realización preferida, se aplica una cantidad de 100 a 1000 vatios de ultrasonidos en un baño de agua de 10 litros. A continuación, la extracción se realiza óptimamente conforme a procedimientos estándar conocidos por las personas expertas en la técnica. La misma puede realizarse por cualquier medio convencional a fin de introducir fuerzas de cizalladura en la mezcla extracto-disolvente y ajustando el tiempo de extracción en función de la temperatura y la presión aplicadas. En una realización preferida, la extracción se efectúa por mezcladura durante al menos 10 minutos a la temperatura ambiente (entre 18°C y 25°C).

En una realización adicional, el proceso de extracción del paso (a) se lleva a cabo con una ratio de disolvente a extracto seco de polifenoles comprendida entre 500/1 y 10/1 litros/kilogramo, preferiblemente entre 500/1 y 50/1 litros/kilogramo, y más preferiblemente entre 300/1 y 80/1 litros/kilogramo.

En una realización adicional, el paso de alcalinización (b) se realiza por adición de una base hasta que el pH está comprendido entre pH 7 y pH 14, preferiblemente comprendido entre pH 8 y pH 14, y aún más preferiblemente comprendido entre pH 9 y pH 14. Para este paso de alcalinización puede utilizarse cualquier base fuerte que tenga un pK_b menor que 4,5, preferiblemente menor que 2. Con preferencia, se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) en una concentración lo más alta posible a fin de evitar la adición de grandes cantidades de solución acuosa alcalina al disolvente de extracción. Opcionalmente, el paso de alcalinización puede llevarse a cabo en las mismas condiciones al comienzo del proceso de extracción.

En una realización adicional, el paso de oxidación (paso (c)) se lleva a cabo por borboteo de aire atmosférico en el extracto alcalinizado del paso (b). El alcance de la oxidación se ajusta dependiendo del volumen de disolvente y la cantidad de polifenoles. En una realización preferida, se borbotean 10 a 80 litros de aire por cada 100 mililitros de disolvente que contiene 1 g de extracto seco de polifenoles. La extensión de la oxidación se controla óptimamente por HPLC por medida de la oxidación completa de las estructuras orto-dihidroxifenólicas.

En una realización adicional, al final del proceso de oxidación del paso (c), se añade una proteína a la solución de oxidación, en donde la proteína está cargada positivamente al pH de la solución de oxidación. La proteína cargada positivamente actúa como agente potente de clarificación. Puede utilizarse cualquier proteína cargada positivamente, pero en una realización preferida se utiliza gelatina. La concentración de la proteína cargada positivamente debe optimizarse dependiendo de la composición de la solución de oxidación conforme a procedimientos estándar de clarificación.

En una realización adicional, se añade una proteína rica en lisina y/o cisteína a la solución de oxidación. Proteínas preferidas ricas en lisina y/o cisteína son proteínas de origen vegetal. En realizaciones particulares, la proteína rica en lisina y/o cisteína contiene al menos 8% de aminoácidos representados por lisina y cisteína, preferiblemente al menos 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, o al menos 22%.

En otra realización adicional, cuando se añaden proteínas, el pH de la solución oxidada se ajusta al final de la reacción hasta el punto isoeléctrico de la proteína arriba mencionada utilizando un ácido o una base.

5 El paso de filtración o centrifugación (d) se lleva a cabo conforme a procedimientos estándar a fin de eliminar cualesquiera partículas no solubilizadas. El sobrenadante resultante se somete luego opcionalmente a evaporación del disolvente. Esto puede realizarse por cualquier tecnología de evaporación estándar. El paso de secado (f) puede realizarse por liofilización o secado por pulverización conforme a procedimientos estándar.

10 La presente invención proporciona también un extracto de dihidrocalconas obtenible por el proceso de la invención. En una realización preferida, el extracto de dihidrocalconas comprende menos de 1% en peso de estructuras de orto-dihidroxi-fenoles. Más preferiblemente, aquél comprende menos de 0,5% en peso de quercetina y/o derivados de la misma.

En una realización preferida, el extracto de dihidrocalconas conforme a la presente invención comprende más de 10% de dihidrocalconas y menos de 1% en peso de quercetina y/o derivados de la misma, más preferiblemente menos de 0,5% en peso de quercetina y/o derivados de la misma.

15 La invención proporciona también un alimento o un producto nutracéutico que comprende un extracto de dihidrocalconas conforme a la presente invención.

La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen.

Ejemplos

Ejemplo 1: Enriquecimiento de dihidrocalconas, especialmente de florizina, a partir de un extracto de polifenoles

20 En este experimento, cantidades de 0,5 g ($\pm 0,0025$ g) de extracto de polifenoles (Herbstreith & Fox; Neuenbürg, DE) se agitaron con 50 ml de etanol en matraces de vidrio con tapón roscado de 100 ml durante 30 minutos a 300 rpm en un baño de agua, y las muestras se expusieron a ultrasonidos dentro de los 30 segundos iniciales. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

25 Para análisis UPLC-DAD/MS, se centrifugaron partes alícuotas de 2 ml (3 minutos a 13.200 rpm) y se diluyeron subsiguientemente en ratio 1:6 (v:v) con metanol/agua (1:1, v:v). El resto se ajustó a un valor de pH de 11 por adición de NaOH, y subsiguientemente se retiraron partes alícuotas de 2 ml para análisis UPLC-DAD/MS. Después de ello, los extractos básicos se oxidaron durante 15 minutos por borboteo de aire a un caudal de 1,3 litros/minuto, y los precipitados se separaron por centrifugación (3220 rcf, durante 15 minutos). Los sobrenadantes se transfirieron en matraces aforados de 50 ml y se completaron con etanol. Partes alícuotas de 200 μ l de estas soluciones se retiraron para análisis UPLC-DAD/MS. Adicionalmente, se eliminó el etanol utilizando un evaporador rotativo a 30°C, y el residuo se cuantificó gravimétricamente.

Adicionalmente, se liofilizaron todas las muestras. Para este propósito, se añadieron 5 ml de agua a las muestras secadas por evaporación rotativa para disolución de las mismas antes de su congelación en una mezcla isopropanol-hielo seco, seguido por liofilización.

35 Basándose en los contenidos de florizina de los extractos etanólicos antes y después de la oxidación cuantificada por UPLC-DAD/MS a $\lambda_{\max} = 285$ nm, se calcularon las cantidades de florizina del liofilizado así como su proporción en el liofilizado (Tabla 1). Adicionalmente, la disminución de los contenidos de quercetina y de sus derivados durante el proceso se ha monitorizado por UPLC-DAD/MS a $\lambda_{\max} = 370$ nm.

Tabla 1: Enriquecimiento de florizina durante el proceso (valores medios de cuadruplicados)

Descripción de la Muestra	Cantidad de extracto inicial (g)	Concentración de florizina en el extracto (g/l)	mg florizina/ 50 ml de extracto	Contenido de florizina del extracto (%)
Después de la extracción	0,5011	0,93	46,6	9,3
Después de la adición de NaOH	0,5011	0,86	43,3	8,6
Después de la oxidación	0,5011	0,76	38,0	7,6

40 Después de la liofilización, el peso del extracto (valor medio de 4 experimentos) era 256 mg. El liofilizado contenía 14,9% en peso florizina, y 203 mg de compuestos distintos de florizina.

Ejemplo 2: Enriquecimiento de dihidrocalconas, especialmente florizina, a partir de un extracto de polifenoles

En este experimento, cantidades de 0,5 g ($\pm 0,0025$ g) de extracto de polifenoles (Herbstreith & Fox; Neuenbürg, DE) se agitaron con 50 ml de isopropano en matraces de vidrio con tampón roscado de 100 ml durante 30 minutos a 300 rpm en un baño de agua, y las muestras se expusieron a ultrasonidos dentro de los 30 segundos iniciales. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

- 5 Para los análisis UPLC-DAD/MS, se centrifugaron partes alícuotas de 2 ml (3 minutos a 13200 rpm) y se diluyeron subsiguientemente en ratio 1:6 (v:v) con metanol/agua (1:1, v:v). El resto se ajustó a un valor de pH comprendido entre 10,50 y 10,98 por adición de 1,1 ml de NaOH 1 M, y subsiguientemente se retiraron partes alícuotas de 2 ml para análisis UPLC-DAD/MS. Después de ello, los extractos básicos se oxidaron durante 15 minutos por borboteo de aire a un caudal de 1,3 litros/minuto, y los precipitados se separaron por centrifugación (3220 rcf, durante 15 minutos). Los sobrenadantes se transfirieron a matraces aforados de 50 ml y se completaron con isopropanol. Se retiraron partes alícuotas de 200 μ L de estas soluciones para los análisis UPLC-DAD/MS. Adicionalmente, se eliminó el isopropanol utilizando un evaporador rotativo a 30°C, y el residuo se cuantificó gravimétricamente.

- 15 Adicionalmente, se liofilizaron todas las muestras. Para este propósito, se añadieron 5 ml de agua a las muestras secadas por evaporación rotativa para disolución de las mismas antes de su congelación en una mezcla isopropanol-hielo seco, seguido por liofilización.

Basándose en los contenidos de florizina de los extractos de isopropanol antes y después de la oxidación cuantificados por UPLC-DAD/MS a $\lambda_{max} = 285$ nm, se calcularon las cantidades de florizina del liofilizado así como su proporción en el mismo (Tabla 1). Adicionalmente, se ha monitorizado por UPLC-DAD/MS a $\lambda_{max} = 370$ nm la disminución de los contenidos de quercetina y de sus derivados durante el proceso.

- 20 Cantidad de quercetina y derivados de la misma en el extracto seco de polifenoles: 10 mg

Cantidad de quercetina y derivados de la misma en el producto purificado: menos de 0,2 mg

Tabla 2: Enriquecimiento de florizina durante el proceso (valores medios de cuadruplicados)

Descripción de la Muestra	Cantidad de extracto de partida (g)	Concentración de florizina en el extracto (g/L)	mg florizina/50 ml extracto	Contenido de florizina del extracto (%)
Después de la extracción	0,5012	1,05	52,4	10,5
Después de la adición de NaOH	0,5012	0,63	31,4	6,3
Después de la oxidación	0,5012	0,55	27,4	5,5

- 25 Después de la oxidación y liofilización, el peso del extracto (valor medio de 4 experimentos) era 111,7 mg. El liofilizado contenía 24,5% en peso de floridzina.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la preparación de un extracto enriquecido en dihidrocalconas y derivados de las mismas, en donde los derivados se seleccionan de: flordizina, floretina, floretin-2'-O-β-D-xilopiranosil-(1-6)-β-D-glucopiranosido, y otros glicosidos de floretina, en donde dicho proceso comprende los pasos de:
- 5 (a) extraer un extracto seco de polifenoles con un disolvente de grado alimentario,
 (b) alcalinizar el extracto de (a),
 (c) oxidar la solución resultante de (b),
 (d) filtrar o centrifugar la mezcla de (c),
 10 (e) opcionalmente, evaporar la solución resultante de (d) para eliminar el disolvente residual, y solubilizar el material seco en agua,
 (f) secar el extracto resultante.
2. Un proceso conforme a la reivindicación 1, en donde el extracto seco de polifenoles se deriva del procesamiento industrial de las manzanas.
3. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el extracto seco de polifenoles se deriva del proceso de producción de pectina de manzana.
- 15 4. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 a 3, en donde el paso (a) se realiza con un disolvente puro de grado alimentario, con agua, o con una mezcla agua-disolvente.
5. Un proceso conforme a la reivindicación 4, en donde el disolvente se selecciona de: propano, butano, pentano, hexano, ciclohexano, heptano, metanol, etanol, butan-1-ol, butan-2-ol, 3-metil-1-butanol, propan-1-ol, 2-metil-1-propanol, isopropanol, 1-pentanol, acetato de metilo, acetato de etilo, formiato de etilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetona, etilmetilcetona, metilisobutil-cetona, dicloro-
 20 metano, éter etílico, éter dietílico, éter terc-butilmetílico, 1,1,1,2-tetrafluoroetano, anisol, y cumeno.
6. Un proceso conforme a las reivindicaciones 4 a 5, en donde el disolvente utilizado en el paso (a) se selecciona de: metanol, etanol e isopropanol.
- 25 7. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 a 6, en donde en el paso (a) la ratio de disolvente a extracto seco de polifenoles está comprendida entre 500/1 y 10/1 litros/kg.
8. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 a 7, en donde la alcalinización del paso (b) se lleva a cabo por adición de una base hasta que el pH está comprendido entre pH 7 y pH 14.
9. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 a 8, en donde el paso de oxidación (c) se realiza por borbotado de aire atmosférico en la solución.
- 30 10. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 a 9, en donde en el paso (c) se añade una proteína a la solución de oxidación como agente de clarificación, en donde la proteína está cargada positivamente al pH de la solución de oxidación.
11. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 a 10, en donde en el paso (c) se añade a la solución de oxidación una proteína rica en lisina y/o cisteína.
- 35 12. Un proceso conforme a las reivindicaciones 10 a 11, en donde en el paso (c) el pH de la solución oxidada se ajusta al punto isoeléctrico de la proteína.
13. Un proceso conforme a las reivindicaciones 1 a 12, en donde el paso de secado (f) se efectúa por secado mediante pulverización.

40