

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 975**

51 Int. Cl.:

**C07C 39/21** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**B01D 11/02** (2006.01)  
**C07C 37/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009 E 09842669 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2415743**

54 Título: **Composición que contiene piceatannol y procedimiento para producir la composición que contiene piceatannol**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.09.2015**

73 Titular/es:

**MORINAGA & CO., LTD. (100.0%)**  
**33-1 Shiba 5-Chome Minato-ku**  
**Tokyo 108-8403, JP**

72 Inventor/es:

**MATSUI, YUKO;**  
**KAMEI, MASANORI y**  
**SUGIYAMA, KENKICHI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 545 975 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**

Composición que contiene piceatannol y procedimiento para producir la composición que contiene piceatannol

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición que contiene piceatannol, que contiene piceatannol derivado de una semilla de *Passiflora edulis* Sims, y un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol.

**10 Antecedentes de la técnica**

La Referencia Bibliográfica Distinta de Patentes 1 a continuación describe que el resveratrol y el piceatannol, que son compuestos polifenoles derivados de la uva, tienen efectos inhibiendo la producción de melanina por las células productoras de melanina. Sin embargo, para realizar un ensayo para confirmar los efectos, se usa un reactivo disponible en el mercado y la referencia bibliográfica no describe que se obtenga una composición que contenga piceatannol o similares derivados de un material natural tal como la uva.

Mientras tanto, la Referencia Bibliográfica de Patentes 1 a continuación describe que el resveratrol se concentra y se recoge de manera barata, selectiva y eficazmente a partir de un extracto de raíces de *Reynoutria japonica* Houtt. var. *japnica*. Además, la Referencia Bibliográfica de Patentes 2 a continuación describe un extracto de arándano rojo que contiene resveratrol. Además todavía, las Referencias Bibliográficas de Patentes 3 y 4 a continuación describen un extracto de fruta de la pasión (*Passifloraceae, Passiflora sp.*), en particular, un extracto del pericarpo de la fruta de la pasión y el uso del extracto en alimentos, suplementos dietéticos y campos médicos.

25 Sin embargo, ninguna de las técnicas descritas en las referencias bibliográficas anteriormente mencionadas proporciona una composición, que se obtiene a partir de un material natural y que contiene piceatannol en un alto contenido.

30 Lista de citas

Referencias Bibliográficas de Patentes

- [RBPT 1] JP 2005-281179 A
- [RBPT 2] JP 2009-13159 A
- 35 [RBPT 3] JP 2007-302659 A
- [RBPT 4] JP 2007-531734 A

Referencias Bibliográficas Distintas de Patentes

- 40 [RBDPT 1] Takako Yokozawa y You Jung Kim, Piceatannol Inhibits Melanogenesis by its Antioxidative Actions, Biological & Pharmaceutical Bulletin Vol. 30 (2007) N° 11 p 2007-2011

**Sumario de la invención**

**45 Problema técnico**

Desde un punto de vista general de la seguridad alimentaria, el piceatannol para su mezcla en un alimento o en una bebida, tal como un alimento funcional o un alimento sano se deriva preferentemente de un material natural. Sin embargo, hasta ahora, no se conoce un material natural que contenga piceatannol en un alto contenido. Los materiales naturales, tales como las uvas contienen piceatannol en un contenido muy bajo.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que contenga piceatannol, que se derive de un material natural y que contenga piceatannol en un alto contenido y un procedimiento para producir una composición que contenga piceatannol.

**55 Solución al problema**

Los inventores de la presente invención han realizado estudios intensivos para conseguir el objetivo anteriormente mencionado. Como resultado, los inventores han encontrado que la semilla de *Passiflora edulis* Sims, de la que no se habían encontrado aplicaciones ya que se ha descartado hasta ahora, contiene piceatannol en un alto contenido, de esta manera completando la presente invención.

Esto es, una composición que contiene piceatannol de la presente invención se obtiene de dicha semilla de la fruta de la pasión y contiene piceatannol en un contenido del 0,0001 al 99,9 % en masa.

65 De acuerdo con la composición que contiene piceatannol de la presente invención, es posible proporcionar una

composición, que se deriva de un material natural y que contiene piceatannol en un alto contenido. La composición se deriva de un material natural y por lo tanto se mezcla adecuadamente en un cosmético, en un fármaco y en un alimento o en una bebida, tal como un alimento funcional o un alimento sano.

- 5 Mientras tanto, un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención incluye: pulverizar la semilla de la fruta de la pasión; añadir al menos una clase de un disolvente acuoso basado en alcohol seleccionado y un disolvente acuoso basado en cetona; y agitar la mezcla para extraer el piceatannol en el disolvente.
- 10 De acuerdo con el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, una composición, que se deriva de un material natural que contiene piceatannol en un alto contenido, puede producirse en un alto rendimiento porque el piceatannol se extrae de la semilla de la fruta de la pasión usando un disolvente acuoso basado en alcohol o un disolvente acuoso basado en cetona.
- 15 El procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención incluye preferentemente: pulverizar dicha semilla de la fruta de la pasión; añadir uno cualquiera de un disolvente acuoso basado en alcohol y de un disolvente acuoso basado en cetona; agitar la mezcla para extraer el piceatannol en el disolvente, obteniendo de esta manera un primer extracto; añadir el otro no seleccionado anteriormente del disolvente acuoso basado en alcohol y del disolvente acuoso basado en cetona al residuo no recogido como el
- 20 extracto; agitar la mezcla para extraer el piceatannol en el disolvente, obteniendo de esta manera un segundo extracto; y mezclar el primer extracto y el segundo extracto. De acuerdo con esta realización, una composición que contiene piceatannol, que contiene piceatannol en un alto contenido, puede producirse con un rendimiento mayor porque la extracción se realiza de manera paso a paso con una pluralidad de disolventes.
- 25 En el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, la semilla de la fruta de la pasión es preferentemente una semilla de fruta de la pasión sin procesar o una semilla de fruta de la pasión seca, que se obtiene secando la semilla de fruta de la pasión sin procesar.
- 30 Además, en el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, el disolvente acuoso basado en alcohol es preferentemente etanol acuoso, o el disolvente acuoso basado en cetona es preferentemente acetona acuosa. Con respecto a los contenidos de agua, el etanol acuoso contiene preferentemente del 20 al 99,9 % en volumen de etanol y la acetona acuosa contiene preferentemente del 20 al 99,9 % en volumen de acetona. De acuerdo con esas realizaciones, se proporciona mayor eficacia de extracción del piceatannol.
- 35 En el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, la agitación en cada uno de los disolventes se realiza preferentemente por vibración ultrasónica o agitación. De acuerdo con esta realización, se proporciona mayor eficacia de extracción del piceatannol.
- 40 Además, el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención incluye además preferentemente destilar el disolvente a presión reducida después de la extracción.
- 45 Puede obtenerse un alimento o una bebida, al que se ha añadido una composición que contiene piceatannol, que se obtiene de dicha semilla de la fruta de la pasión y que contiene piceatannol en un contenido del 0,0001 al 99,9 % en masa.
- Puede obtenerse un cosmético, al que se ha añadido una composición que contiene piceatannol, que se obtiene de la semilla de la fruta de la pasión y que contiene piceatannol en un contenido del 0,0001 al 99,9 % en masa.
- 50 La presente invención es como se define por las reivindicaciones adjuntas.

#### Efectos ventajosos de la invención

- 55 De acuerdo con la composición que contiene piceatannol de la presente invención, es posible proporcionar una composición, que se deriva de un material natural y que contiene piceatannol en un alto contenido. La composición se deriva de un material natural y por lo tanto se mezcla adecuadamente en un cosmético, en un fármaco y en un alimento o en una bebida tal como un alimento funcional o un alimento sano. Mientras tanto, de acuerdo con el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, una
- 60 composición, que se deriva de un material natural y que contiene piceatannol en un alto contenido, puede producirse en un alto rendimiento porque se usa un disolvente acuoso basado en alcohol o un disolvente acuoso basado en cetona como disolvente para extraer piceatannol de la semilla de la fruta de la pasión. Además, la extracción puede realizarse de manera paso a paso con una pluralidad de disolventes cada uno perteneciendo al disolvente acuoso basado en alcohol o al disolvente acuoso basado en cetona, para producir de esta manera la composición en un rendimiento mayor.
- 65

**Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] Diagramas que muestran cromatogramas de HPLC de extractos de semillas (A), pericarpio (B) y sarcocarpo (C).

[Figura 2] Diagramas que muestran un espectro de masas (A) y un espectro UV (B) de un componente eluido en aproximadamente 41 minutos en el análisis de HPLC de la Figura 1.

[Figura 3] Diagramas que muestran un espectro de masas (A) y un espectro UV (B) del resveratrol (peso molecular: 228).

[Figura 4] Diagramas que muestran un espectro de masas (A) y un espectro UV (B) del piceatannol (peso molecular: 244).

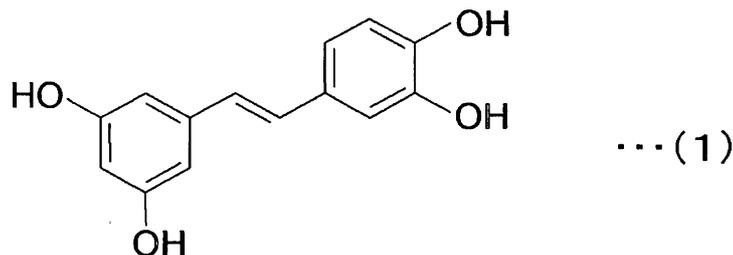
[Figura 5]. Diagramas que muestran cada uno un efecto del contenido de agua del etanol (A) o de la acetona (B) como un disolvente en la eficacia de extracción del piceatannol.

**Descripción de las realizaciones**

La composición que contiene piceatannol de la presente invención es una composición, que se obtiene de las semillas de la fruta de la pasión y que contiene piceatannol en un contenido del 0,0001 al 99,9 % en masa. La composición puede tener una forma líquida, sólida, semisólida o gel, por ejemplo, y pueden ser semillas de la fruta de la pasión en sí o un producto de la semilla procesado, tal como una pasta obtenida pulverizando las semillas o un polvo obtenido pulverizando un producto secado por congelación de las semillas. El contenido de piceatannol en términos de contenido sólido es preferentemente del 0,0001 al 99,9 % en masa, más preferentemente del 0,01 al 50 % en masa, más preferentemente del 0,1 al 10 % en masa.

El piceatannol se representa por la siguiente fórmula química (1).

[Quím. 1]



El piceatannol representado por la fórmula química anteriormente mencionada es trans-piceatannol que tiene una estructura en la que dos grupos fenilo se enlazan a través de un grupo trans-alqueno, pero en la presente invención, el piceatannol también incluye cis-piceatannol que tiene una estructura en la que dos grupos fenilo se enlazan a través de un grupo cis-alqueno en la fórmula química anteriormente mencionada.

La fruta de la pasión (*Passiflora edulis* Sims) es una planta que pertenece a la familia *Passifloraceae* del género *Passiflora* y también se llama Kudamonotokeisou, y la fruta tiene un sabor agrisado y se come como un fruto sin tratamientos, se bebe como un zumo o se usa como una harina para mezclar en un alimento o en una bebida, tal como gelatina o tarta. Las semillas de la fruta de la pasión son duras y se retiran de la fruta cuando se procesa a zumo o similares, e incluso si la fruta se come o se bebe con las semillas, las semillas se excretan porque las semillas tienen cáscaras duras y son difíciles de digerir. La presente invención está basada en el descubrimiento de que las semillas de la fruta de la pasión, a las que no se habían encontrado aplicaciones y por lo tanto se habían descartado hasta ahora, contienen un alto contenido de piceatannol. Obsérvese que si las semillas de fruta de la pasión usadas en la presente invención se mezclan en un alimento o en una bebida tal como un alimento funcional o un alimento sano, no hay problema en la seguridad, como demuestran experiencias previas comiendo la fruta de la pasión.

Preferentemente, la composición que contiene piceatannol de la presente invención puede obtenerse por, por ejemplo, un procedimiento que incluye pulverizar semillas de fruta de la pasión sin procesar o secas y realizar la extracción usando un disolvente de diversos disolventes. Para aumentar la eficiencia de la extracción, las semillas de la fruta de la pasión pueden someterse apropiadamente a un tratamiento químico tal como descomposición ácida o alcalina o descomposición enzimática antes de la extracción. Además, de acuerdo con el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención como se describe a continuación, puede obtenerse una composición que contiene piceatannol en un alto contenido en un rendimiento particularmente alto, y por lo tanto la composición se obtiene más preferentemente por el procedimiento.

A continuación se describe el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención.

En el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, primero, las semillas de la fruta de la pasión se pulverizan. Las semillas de la fruta de la pasión a usarse pueden ser semillas de la fruta de la pasión sin procesar o secas, y para aumentar la eficacia de extracción, puede realizarse el tratamiento químico tal como la descomposición ácida o alcalina o la descomposición enzimática apropiadamente antes de la extracción. La pulverización puede realizarse usando un pulverizador conocido. Obsérvese que las semillas de la fruta de la pasión tienen un alto contenido de aceite y por lo tanto las semillas pueden convertirse similares a una pasta después de la pulverización.

Posteriormente, al menos una clase seleccionada de un disolvente acuoso basado en alcohol y un disolvente acuoso basado en cetona se añade a las semillas de la fruta de la pasión pulverizadas y la mezcla se agitó para extraer el piceatannol en el disolvente.

El disolvente acuoso basado en alcohol que puede usarse incluye disolventes acuosos tales como etanol acuoso, metanol acuoso y propanol acuoso y se prefiere particularmente el etanol acuoso. Mientras tanto, el disolvente acuoso basado en cetona que puede usarse incluye disolventes acuosos tales como acetona acuosa, cetona de metil etilo acuosa, cetona de dietilo acuosa y cloroacetona acuosa y se prefiere particularmente la acetona acuosa.

Con respecto a los contenidos en agua, el etanol acuoso contiene preferentemente del 20 al 99,9 % en volumen de etanol, más preferentemente del 40 al 99,9 % en volumen de etanol, más preferentemente del 60 al 80 % en volumen de etanol y la acetona acuosa contiene preferentemente del 20 al 99,9 % en volumen de acetona, más preferentemente del 40 al 99,9 % en volumen de acetona, más preferentemente del 60 al 80 % en volumen de acetona. Si los contenidos no caen dentro de los anteriormente mencionados intervalos, la eficacia de extracción del piceatannol puede deteriorarse, que no se prefiere. Obsérvese que, para simplificar las notaciones de los contenidos de agua de los disolventes acuosos, por ejemplo, 80 % en volumen de etanol que contiene un 20 % en volumen de agua se denomina "etanol acuoso al 80 %". Además, por ejemplo, 70 % en volumen de etanol que contiene un 30 % en volumen de agua se denomina "etanol acuoso al 70 %". Además, por ejemplo, 70 % en volumen de acetona que contiene un 30 % en volumen de agua se denomina "acetona acuosa al 70 %".

En el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, la agitación en cada uno de los disolventes anteriormente mencionados se realiza preferentemente por vibración ultrasónica o agitación. Esto puede dar vibraciones eficazmente a las semillas de la fruta de la pasión pulverizadas y hacerlas contactar con cada uno de los disolventes anteriormente mencionados, y por lo tanto es posible aumentar la eficacia de extracción del piceatannol de las semillas de la fruta de la pasión en cada uno de los disolventes anteriormente mencionados. La vibración ultrasónica puede darse por un dispositivo ultrasónico conocido. La agitación puede darse por un dispositivo de agitación conocido.

Adicionalmente, en el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, los disolventes anteriormente mencionados se destilan preferentemente a presión reducida después de la extracción. Esto puede producir una composición que no contiene disolvente orgánico, que puede cumplir con las normativas de seguridad y similares de un material alimenticio para mezclarse en un alimento o en una bebida tal como un alimento funcional o un alimento sano.

En el procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la presente invención, la extracción puede realizarse de manera paso a paso con una pluralidad de disolventes. Esto puede producir una composición que contiene piceatannol que contiene piceatannol en un alto contenido en un rendimiento mayor.

Específicamente, por ejemplo, las semillas de la fruta de la pasión se pulverizan, uno cualquiera del disolvente acuoso basado en alcohol anteriormente mencionado y del disolvente acuoso basado en cetona anteriormente mencionado se añade a las mismas y la mezcla se agita para extraer el piceatannol en el disolvente, para obtener de esta manera el primer extracto. La centrifugación o similar se realiza para separar el extracto y el residuo no recogido como el extracto y el otro no seleccionado de los disolventes anteriormente mencionados se añade al residuo y la mezcla se agita para extraer el piceatannol en el disolvente, para obtener de esta manera el segundo extracto. Después, el primer extracto y el segundo extracto se mezclan. Obsérvese que, no hace falta decirlo, el segundo extracto puede utilizarse solo como el extracto de semilla de la fruta de la pasión.

Además, si las semillas de la fruta de la pasión se someten al primer tratamiento de extracción con el disolvente acuoso basado en alcohol anteriormente mencionado o el disolvente acuoso basado en cetona anteriormente mencionado, la propiedad tal como la textura se considera que cambia en una preferida para la extracción. Por lo tanto, el posterior segundo tratamiento de extracción puede esperarse que mejore la eficiencia de extracción no solo en el caso de usar el disolvente basado en alcohol anteriormente mencionado o el disolvente acuoso basado en cetona anteriormente mencionado sino también en el caso de usar otro disolvente. Además, como se muestra en los Ejemplos a continuación, la alta eficacia de extracción en el caso de usar el disolvente acuoso basado en alcohol anteriormente mencionado o el disolvente acuoso basado en cetona anteriormente mencionado se considera que se proporcióna por el agua contenida en el disolvente. En consecuencia, si las semillas de la fruta de la pasión se someten al primer tratamiento de extracción con agua o un disolvente acuoso, el posterior segundo tratamiento de extracción puede esperarse que mejore la eficacia de extracción no solo en el caso de usar el disolvente acuoso

basado en alcohol anteriormente mencionado o el disolvente acuoso basado en cetona anteriormente mencionado sino también en el caso de usar otro disolvente.

El extracto de semilla de fruta de la pasión obtenido por el procedimiento anteriormente mencionado puede usarse para preparar una composición que contiene piceatannol en una forma líquida sin tratamientos adicionales o después de la concentración. El extracto puede pulverizarse adicionalmente por secado por congelación o por secado por pulverización para preparar una composición que contiene piceatannol en una forma en polvo. La forma del extracto no se limita a estas formas. La materia insoluble contenida en el extracto puede retirarse apropiadamente por filtración o similares. La materia insoluble puede pulverizarse adicionalmente en finas partículas.

Además, el extracto primario de las semillas de la fruta de la pasión obtenido como se describe anteriormente puede fraccionarse y purificarse basándose en el piceatannol como un índice por intercambio iónico, cromatografía en columna de exclusión por tamaño, HPLC, filtración en gel, separación por membranas o similares para preparar la composición que contiene piceatannol.

Específicamente, por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos a continuación, cuando la composición extraída de las semillas de la fruta de la pasión se somete a HPLC en las siguientes condiciones, el piceatannol se eluye en aproximadamente 41 minutos. Mientras tanto, cuando la fracción eluida se somete a espectrometría de masas usando un espectrómetro de masas, se muestra una señal de modo ion negativo en m/z 243.

[Condiciones de HPLC]

- Columna: Mightysil RP-18 GP 150-4,6, diámetro: 4,6 mm, longitud: 150 mm (fabricado por KANTO CHEMICAL CO., INC.)
- Temperatura de la columna: 40 °C
- Condiciones de la elución: velocidad del caudal: 1 ml/min, metanol al 0 %, metanol al 30 % (60 min)
- Detección UV: 280 nm

Por lo tanto, en la presente invención, es posible preparar una composición que contiene piceatannol, que se deriva de semillas de la fruta de la pasión y tiene un contenido de piceatannol aumentado, realizando apropiadamente un fraccionamiento y una purificación basados en las propiedades físicas del piceatannol ilustradas anteriormente como índices.

Si es necesario, la composición que contiene piceatannol de la presente invención puede suplementarse con una base o un vehículo farmacéuticamente aceptable y usarse como un fármaco en la forma de un comprimido, un fármaco granulado, un fármaco en polvo, un líquido, un polvo, un gránulo, una cápsula, una gelatina o similares, o puede usarse como un cosmético en la forma de un ungüento, una crema, un gel, un envase, una loción, una preparación cosmética o similares.

Mientras tanto, la composición que contiene piceatannol de la presente invención puede mezclarse en un alimento para uso de la salud especificado, un suplemento dietético, un alimento funcional o similares antes de la ingestión. Los ejemplos de los alimentos incluyen: repostería tal como un chocolate, una galleta, un chicle, un caramelo, una galleta dulce, un caramelo de chicle o repostería en tabletas; un cereal, una bebida, tal como una bebida en polvo, una bebida suave, una bebida de leche, una bebida nutricional, una bebida carbonatada y una bebida de gelatina; y un postre congelado tal como un helado o un sorbete. Además, los ejemplos preferidos de los mismos incluyen un fideo tal como soba, pasta, udon y somen. En los casos de los alimentos para uso de la salud especificado, suplementos dietéticos y similares, la composición puede tener la forma de un polvo, un gránulo, una cápsula, un jarabe, un comprimido recubierto de azúcar.

## Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describe específicamente por medio de ejemplos, pero el alcance de la presente invención no está limitado por los ejemplos.

<Ejemplo de ensayo 1> [Detección e identificación del piceatannol de la fruta de la pasión]

La fruta de la pasión se dividió en tres partes de pericarpo, sarcocarpo y semillas y las partes se secaron por congelación y se pulverizaron por un pulverizador (nombre del producto "Sample mil type SK-M", fabricado por KYORITSU RIKO K.K.), seguido de la extracción de las partes respectivas con etanol acuoso al 80 %. Los productos resultantes se centrifugaron, después los sobrenadantes se separaron y se concentraron por evaporación, y los concentrados se secaron por congelación para obtener polvos. Los polvos se disolvieron en agua para obtener extractos. Después, el extracto de semilla, el extracto de pericarpo y el extracto de sarcocarpo se diluyeron de tal manera que las concentraciones en términos de contenido sólido fueron 0,01 g/ml, 0,1 g/ml y 0,1 g/ml respectivamente, y 5 µl de los extractos se sometieron a HPLC.

Las condiciones de análisis para HPLC fueron como se describe a continuación.

·Columna: Mightysil RP-18 GP 150-4,6, diámetro: 4,6 mm, longitud: 150 mm (fabricado por KANTO CHEMICAL CO., INC.)

·Temperatura de la columna: 40 °C

5 ·Condiciones de la elución: velocidad del caudal: 1 ml/min, metanol al 0 % -> 300 metanol (60 min)

· Detección UV: 280 nm

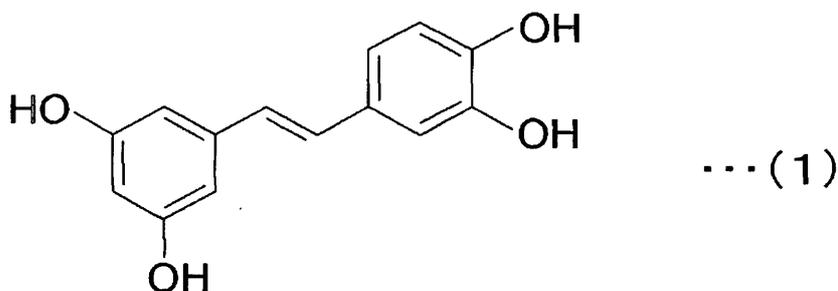
Las Figuras 1A a 1C muestran cromatogramas de HPLC de los respectivos extractos anteriormente mencionados. Como resultado, como se muestra en la Figura 1A, en el caso del extracto de semilla, se detectó un pico en aproximadamente 41 minutos. Por otro lado, en los casos del extracto de pericarpo y del extracto de sarcocarpo, el pico en aproximadamente 41 minutos no era capaz de detectarse aunque la concentración en términos de contenido sólido de acuerdo con la inyección era 10 veces mayor que el del extracto de semilla.

Posteriormente, las características del componente contenido del extracto de semilla y eluido en el tiempo de retención de aproximadamente 41 minutos descrito anteriormente se identificaron como se describe a continuación.

Primero, se midió un espectro de masas del componente usando un HPLC/espectrómetro de masas (fabricado por THERMO ELECTRON Co., Ltd., nombre del dispositivo "Thermo-LCQ-MS/MS") (Figura 2A). Aunque la medida se realizó tanto en modos iónicos positivo y negativo, se encontró un ión preferido en el modo negativo, y por lo tanto se usaron los datos. Como resultado, una señal principal en m/z 243 era  $(M-H)^-$ , y los otros picos en m/z 279 y m/z 487 era posible atribuirlos a  $(M+2H_2O-H)^-$  y  $(M \times 2-H)^-$ , respectivamente. Por lo tanto, el peso molecular era posible determinarse como 244. Además, cuando un espectro UV del componente se medía, se observaron 220 nm, 304 nm y 322 nm como  $\lambda_{\text{máx}}$  (Figura 2B).

Los resultados de la espectrometría de masas y de la espectrometría UV se encontró que eran similares a aquellos del resveratrol (peso molecular: 228), que es un polifenol contenido en el pericarpo del cacahuete (véase Figuras 3A y 3B). Además, la adsorción a la polivinilpolipirrolidona (PVPP), que es una resina capaz de adsorber un polifenol, también confirmó separadamente. Además, el pico en aproximadamente 41 minutos se encontró que tenía un corto tiempo de retención en una columna en fase reversa comparado con el tiempo de retención del resveratrol en las mismas condiciones de HPLC. Todos los resultados sugieren que el componente contenido en el extracto de semillas anteriormente mencionado y eluido en el tiempo de retención de 41 minutos es el piceatannol (peso molecular: 244), que se representa por la siguiente fórmula (1) y tiene un peso molecular mayor que el del resveratrol por un grupo hidroxilo.

35 [Quím. 2]



Después, un compuesto puro de piceatannol (fabricado por Sigma-Aldrich Corporation) se analizó por HPLC en las mismas condiciones como se ha descrito anteriormente para proporcionar adicionalmente un espectro de masas y un espectro UV (Figuras 4A y 4B). Los resultados muestran que todos los tiempos de retención de HPLC y las atribuciones del espectro de masas y del espectro UV corresponden con los unos anteriormente mencionados.

Esto revela que el pico en aproximadamente 41 minutos en el análisis de HPLC anteriormente mencionado para el extracto de semillas anteriormente mencionado es un pico de piceatannol, y la semilla de la fruta de la pasión contiene una gran cantidad de piceatannol. Por otro lado, el piceatannol no se detectó de ninguno del pericarpo y del sarcocarpo de la fruta de la pasión.

<Ejemplo de ensayo 2> [Extracción de piceatannol de semillas de fruta de la pasión (1)]

Se examinó un procedimiento para extraer piceatannol de las semillas de la fruta de la pasión. Específicamente, las eficacias de extracción de dos clases de semillas de fruta de la pasión (doméstica y crecida extranjera) se determinaron usando diferentes disolventes.

55 (1) Extracción con etanol acuoso al 80 %

A 5 g de semillas pulverizadas se añadieron 50 ml de etanol acuoso al 80 % y la extracción se realizó por sometimiento a ultrasonidos durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió y la extracción se realizó adicionalmente dos veces (tres veces en total) por los mismos procedimientos. Los extractos recogidos se combinaron y el volumen del extracto resultante se ajustó a 200 ml con etanol acuoso al 80 %, y 10 µl de la solución se sometieron a HPLC. Después, de acuerdo con un procedimiento convencional, el piceatannol contenido en el extracto se cuantificó asignando un área bajo el pico del análisis de HPLC en una curva de calibrado basada en concentraciones de un patrón. Obsérvese que el resveratrol también se cuantificó para la referencia del mismo modo como se describe anteriormente.

10 (2) Extracción con acetona acuosa al 70 %

Al residuo de extracción obtenido después de la extracción con etanol acuoso al 80 % descrita anteriormente se añadieron 50 ml de acetona acuosa al 70 % y se realizó la extracción sometiéndolo a ultrasonidos durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y la extracción se realizó adicionalmente dos veces (tres veces en total) por los mismos procedimientos. Los extractos recogidos se combinaron y el volumen del extracto resultante se ajustó a 200 ml con acetona acuosa al 70 %, seguido de la cuantificación del piceatannol y del resveratrol contenidos en el extracto del mismo modo como se describe anteriormente.

20 (3) Extracción con acetato de etilo

La extracción se realizó para las semillas de la fruta de la pasión (la anteriormente mencionada crecida extranjera) del mismo modo que en el caso de la extracción con etanol acuoso al 80 % excepto que el acetato de etilo se usó como el disolvente y el piceatannol y el resveratrol extraídos de 5 g de polvo de semillas secadas por congelación se cuantificaron.

25 (4) Extracción con diclorometano

La extracción se realizó para las semillas de la fruta de la pasión (la anteriormente mencionada crecida extranjera) del mismo modo que en el caso de la extracción con etanol acuoso al 80 % excepto que el diclorometano se usó como el disolvente y el piceatannol y el resveratrol extraídos de 5 g de polvo de semillas secadas por congelación se cuantificaron.

Los resultados se muestran colectivamente en la Tabla 1. Obsérvese que la Tabla 1 muestra valores obtenidos convirtiendo los resultados de las eficacias de extracción en cantidades de piceatannol y resveratrol extraídos de 100 g de polvo de semillas secadas por congelación.

[Tabla 1]

	Piceatannol extraído (mg) convertido en cantidad por 100 g de semillas secadas por congelación							
	Muestra 1 de fruta de la pasión (doméstica)			Muestra 2 de fruta de la pasión (crecida extranjera)				
Disolvente de extracción	Etanol acuoso al 80 % (A)	Acetona acuosa al 70 % (B)	Total (A+B)	Etanol acuoso al 80 % (A)	Acetona acuosa al 70 % (B)	Total (A+B)	Acetato de etilo	Diclorometano
Piceatannol	63	280	343	65	255	320	14,3	No detectable
Resveratrol (referencia)	5	10	15	3	15	18	0,6	No detectable

Como se muestra en la Tabla 1, incluso del residuo de extracción obtenido después de la extracción con etanol acuoso al 80 %, se extrajo piceatannol en una cantidad mayor que la del caso de la extracción con etanol acuoso al 80 %. Por otro lado, en el caso de la extracción con acetato de etilo solo, la eficacia de extracción era baja, mientras que en el caso de la extracción con diclorometano solo, el piceatannol y el resveratrol no eran detectables. Por lo tanto, se clarificó que la extracción con acetona acuosa al 70 % proporcionó la mayor eficacia. Además, se clarificó que una combinación de la extracción con etanol acuoso al 80 % y la extracción con acetona acuosa al 70 % se encontró que proporciona todavía mayor eficacia de extracción.

<Ejemplo de Ensayo 3> [Extracción de piceatannol de semillas de fruta de la pasión (2)]

El procedimiento para extraer piceatannol de las semillas de la fruta de la pasión se examinó adicionalmente. Específicamente, se investigó un efecto de un contenido de agua en etanol o acetona como un disolvente en la eficacia de la extracción.

Para investigar el efecto, el piceatannol y el resveratrol extraídos de 5 g de polvo de semillas secadas por congelación de la fruta de la pasión (la anteriormente mencionada crecida extranjera) se cuantificaron usando etanol o acetona con diferentes contenidos de agua como el disolvente del mismo modo que en el Ejemplo de Ensayo 2. Obsérvese que cualquiera de los disolventes usados en el Ejemplo de Ensayo 2 anterior, el acetato de etilo y el

diclorometano, tienen una compatibilidad pobre con el agua, y por lo tanto es imposible preparar disolventes con los mismos contenidos de agua.

5 Los resultados se muestran colectivamente en la Tabla 2 a continuación. Además, los resultados del piceatannol se muestran como un gráfico en la Figura 5. Obsérvese que la Tabla 2 y la Figura 5 muestran valores obtenidos convirtiendo los resultados de las eficacias de extracción en cantidades de piceatannol y resveratrol extraídos de 100 g de polvo de semillas secadas por congelación.

[Tabla 2]

Piceatannol extraído (mg) convertido en cantidad por 100 g de semillas secadas por congelación					
Etanol			Acetona		
Contenido de agua (representado como % en volumen de etanol)	Piceatannol	Resveratrol	Contenido de agua (representado como % en volumen de acetona)	Piceatannol	Resveratrol
0	No detectable	No detectable		No detectable	No detectable
20	3,8	0,6	20	27,5	0,8
40	20,8	0,8	40	101,5	3,0
60	33,0	1,5	70	214,4	7,2
80	56,5	2,2	*	*	*
100	7,0	1,1	100	10,7	1,0

\*: Sin datos

10 Como se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 5, en el caso de usar etanol, la extracción con etanol acuoso al 80 % proporcionó la mayor eficacia. Mientras tanto, en el caso de usar acetona, la extracción con acetona acuosa al 70 % proporcionó la mayor eficacia.

15 <Ejemplo de ensayo 4>

Los extractos obtenidos después de retirar los disolventes en el Ejemplo de Ensayo 2 anterior (derivados de la fruta de la pasión crecida extranjera) se pesaron para calcular los contenidos de piceatannol en términos de contenido sólido. La Tabla 3 muestra los valores resultantes.

20

[Tabla 3]

Disolvente de extracción	Etanol acuoso al 80 %	Acetona acuosa al 70 %
Contenido de piceatannol (% en masa) en términos de contenido sólido en el extracto	2,6	3,7

25 Como se muestra en la Tabla 3, en el caso de la extracción con etanol acuoso al 80 %, la concentración de piceatannol en términos de contenido sólido se encontró que era 2,6 mg/100 mg del extracto (2,6 % en masa). Mientras tanto, en el caso de la extracción con acetona acuosa al 70 % después de la extracción con etanol acuoso al 80 %, la concentración de piceatannol en términos de contenido sólido se encontró que era 3,7 mg/100 mg del extracto (3,7 % en masa). Por lo tanto, se clarificó que la extracción con acetona acuosa al 70 % era capaz de dar una mayor cantidad de piceatannol (como se muestra en los Ejemplos de Ensayo 2 y 3) y una mayor pureza del piceatannol.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que contiene piceatannol, que es un extracto de semillas de *Passiflora edulis* y que contiene piceatannol en un contenido del 0,01 al 50 % en masa en términos de contenido sólido, en la que el extracto es obtenible mediante la extracción con un disolvente acuoso.
- 10 2. Una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el disolvente acuoso es un disolvente acuoso basado en alcohol o un disolvente acuoso basado en cetona.
- 15 3. Una composición que contiene piceatannol de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el disolvente acuoso es un etanol acuoso o una acetona acuosa.
- 20 4. Una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el etanol acuoso contiene del 20 al 99,9 % en volumen de etanol.
- 25 5. Una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la acetona acuosa contiene del 20 al 99,9 % en volumen de acetona.
- 30 6. Una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición contiene piceatannol en un contenido del 0,1 al 10 % en masa en términos de contenido sólido.
- 35 7. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol, que comprende: añadir un disolvente acuoso a una semilla pulverizada de *Passiflora edulis*; y agitar la mezcla para extraer el piceatannol en el disolvente.
- 40 8. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el procedimiento comprende: añadir un disolvente acuoso basado en alcohol o un disolvente acuoso basado en cetona a la semilla de *Passiflora edulis*; y agitar la mezcla para extraer el piceatannol en el disolvente.
- 45 9. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en donde el procedimiento comprende: añadir uno cualquiera de un disolvente acuoso basado en alcohol o un disolvente acuoso basado en cetona a la semilla de *Passiflora edulis*; agitar la mezcla para extraer el piceatannol en el disolvente, obteniendo de esta manera un primer extracto; añadir el otro no seleccionado de los anteriores disolvente acuoso basado en alcohol y disolvente acuoso basado en cetona a un residuo no recogido como extracto; agitar la mezcla para extraer el piceatannol en el disolvente, obteniendo de esta manera un segundo extracto; y mezclar el primer extracto y el segundo extracto.
- 50 10. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la semilla de *Passiflora edulis* es una semilla de *Passiflora edulis* sin procesar o una semilla de *Passiflora edulis* seca, que se obtiene secando la semilla de *Passiflora edulis* sin procesar.
- 55 11. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el disolvente acuoso basado en alcohol es etanol acuoso, o el disolvente acuoso basado en cetona es acetona acuosa.
- 60 12. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el etanol acuoso contiene del 20 al 99,9 % en volumen de etanol.
- 65 13. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la acetona acuosa contiene del 20 al 99,9 % en volumen de acetona.
14. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que la agitación en cada uno de los disolventes se realiza por vibración ultrasónica o por agitación.
15. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, que comprende adicionalmente destilar el disolvente a presión reducida después de la extracción.
16. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, que comprende adicionalmente una etapa de pulverizar el extracto de semillas de *Passiflora edulis* por secado por congelación o por secado por pulverización.
17. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, que comprende adicionalmente una etapa de filtración para retirar la materia insoluble contenida en el extracto de semillas de *Passiflora edulis*.

18. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, que comprende adicionalmente una etapa de fraccionar y purificar el extracto primario de semillas de *Passiflora edulis* Sims para concentrar el piceatannol contenido en las mismas.
- 5 19. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18, que comprende adicionalmente formular la composición como un cosmético o un fármaco.
20. Un procedimiento para producir una composición que contiene piceatannol de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18, que comprende adicionalmente una etapa de mezclar la composición que contiene piceatannol en un alimento o en una bebida.
- 10
21. Uso de las semillas de *Passiflora edulis* Sims como una fuente de piceatannol.

FIG. 1A

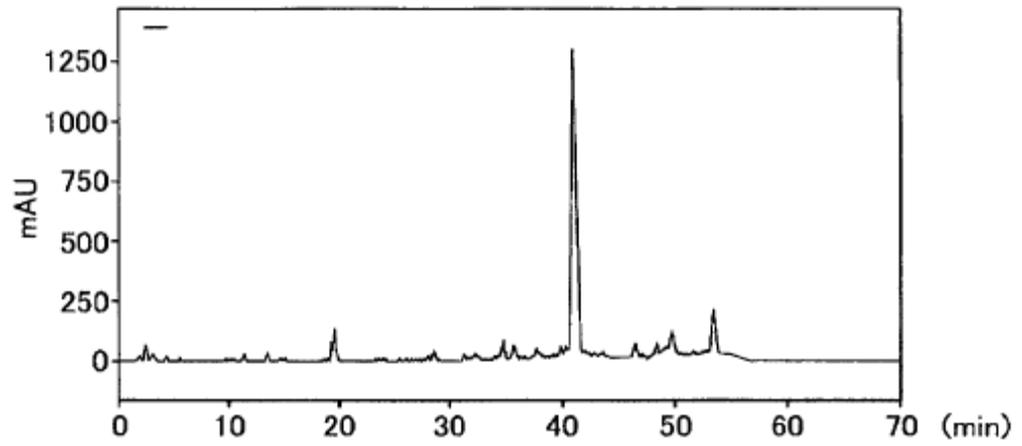


FIG. 1B

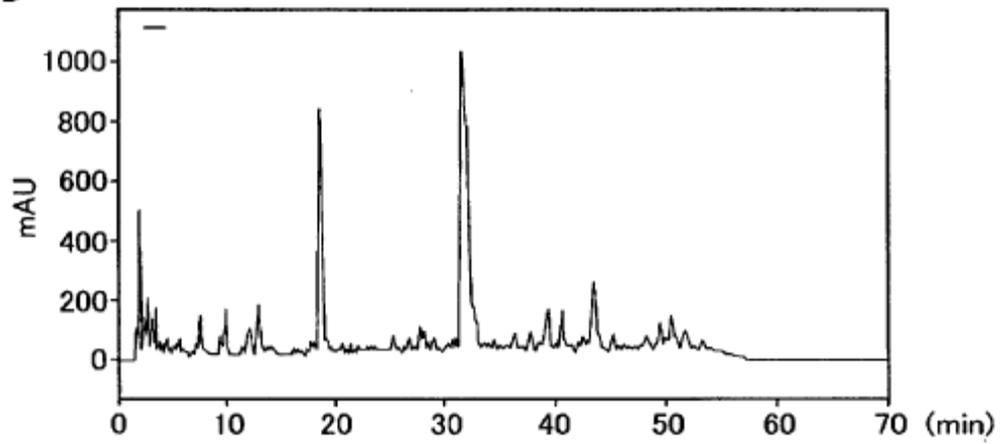


FIG. 1C

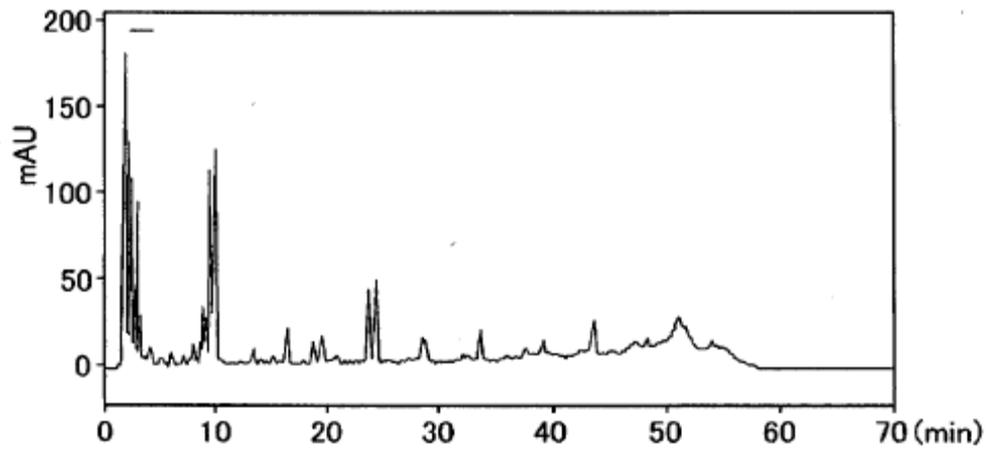


FIG.2A

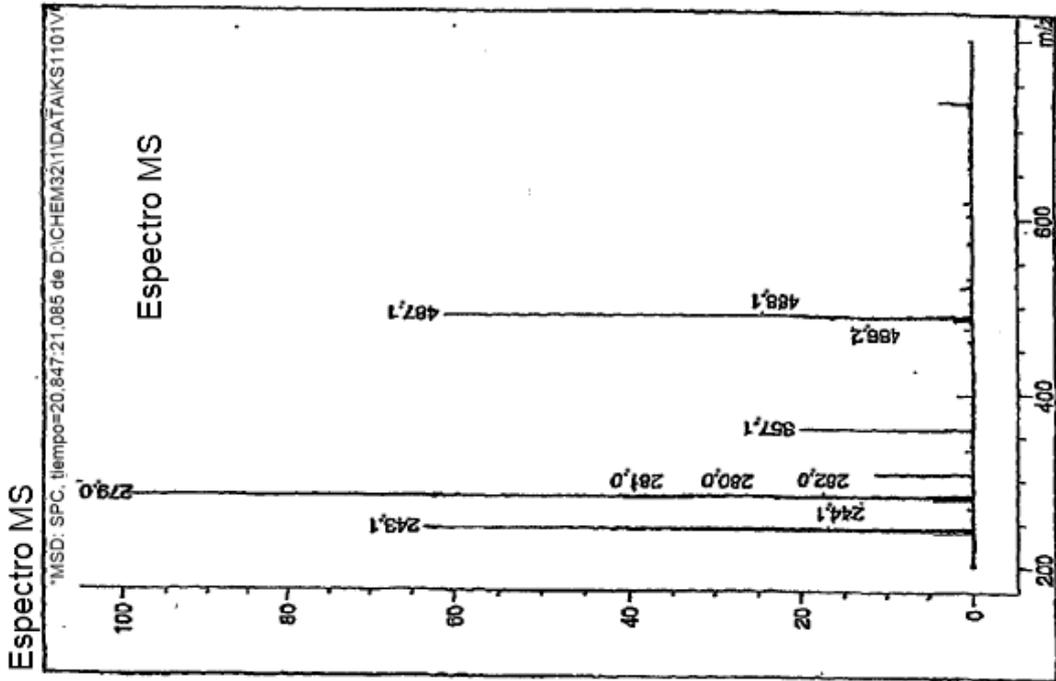


FIG.2B

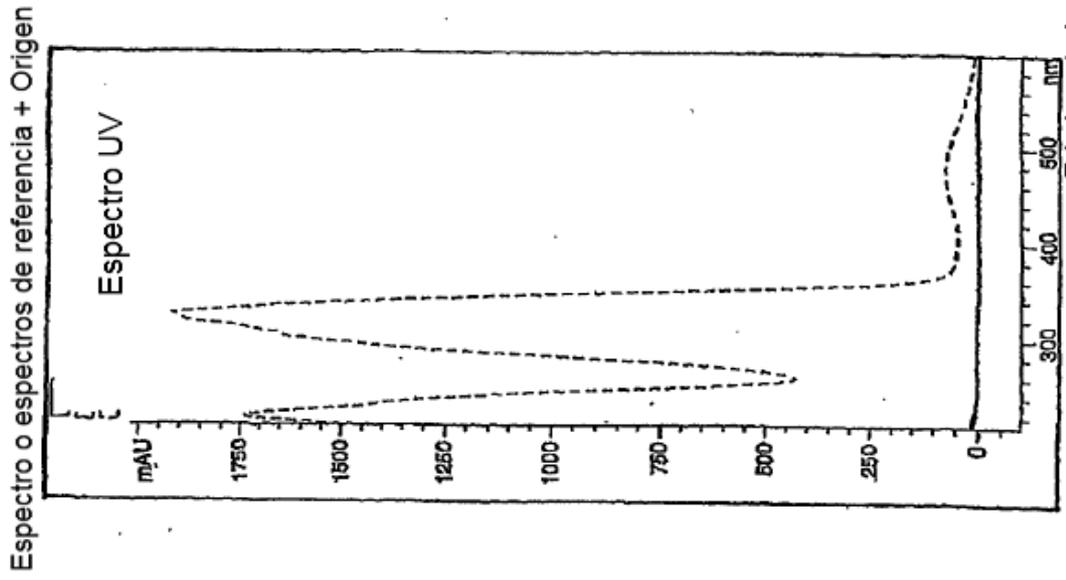
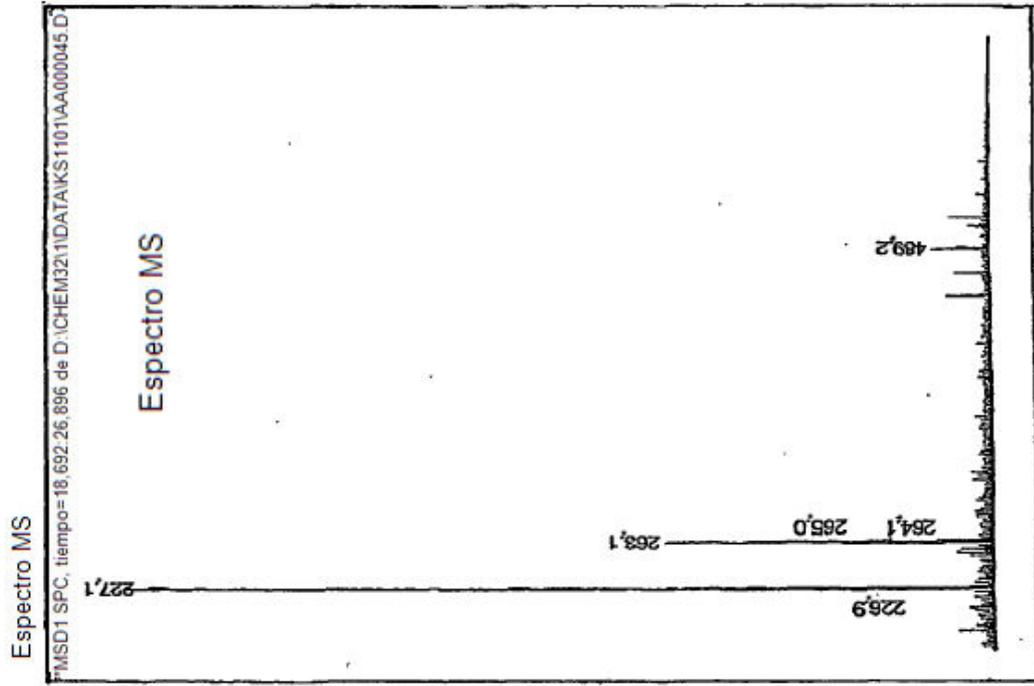
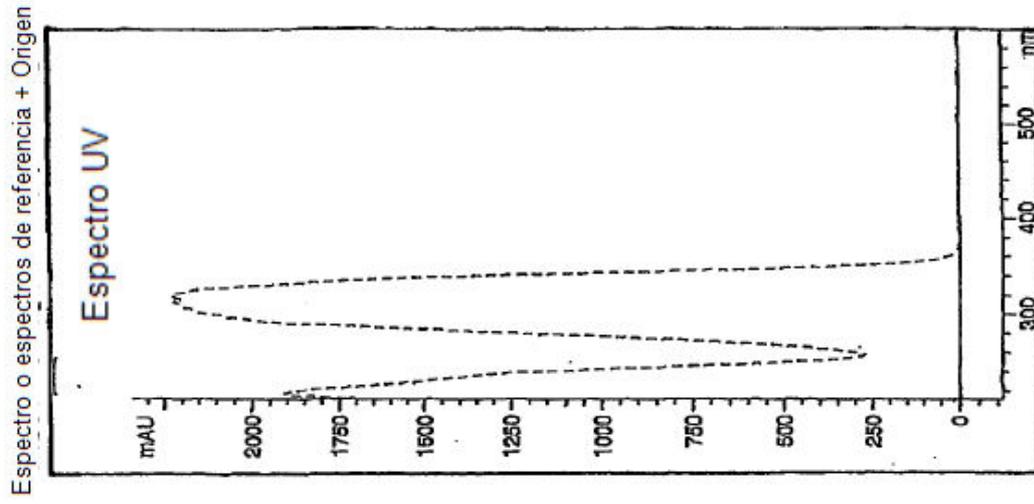


FIG. 3A



Instrumento 1 11/21/2007 10:37:43 AM

FIG. 3B



Página 1 de 1

FIG. 4B

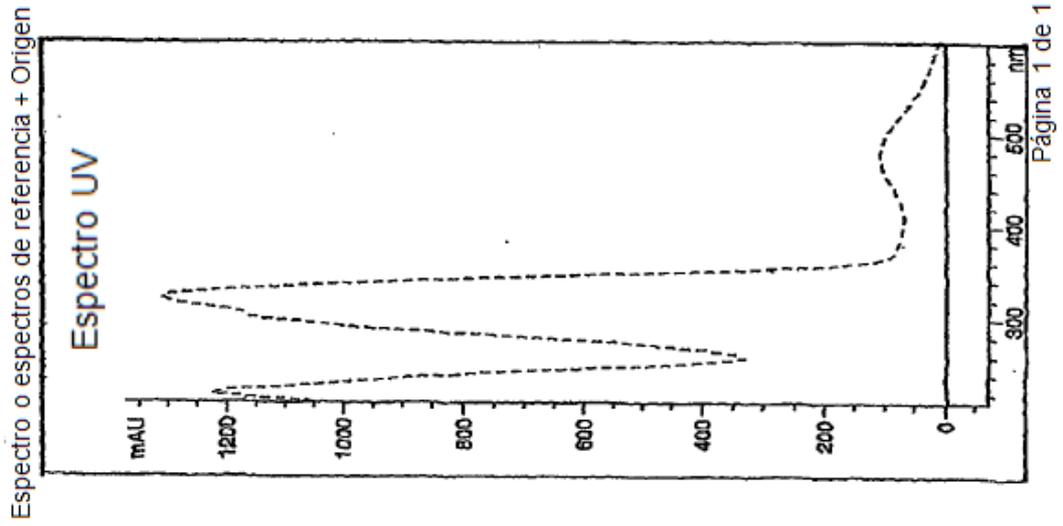


FIG. 4A

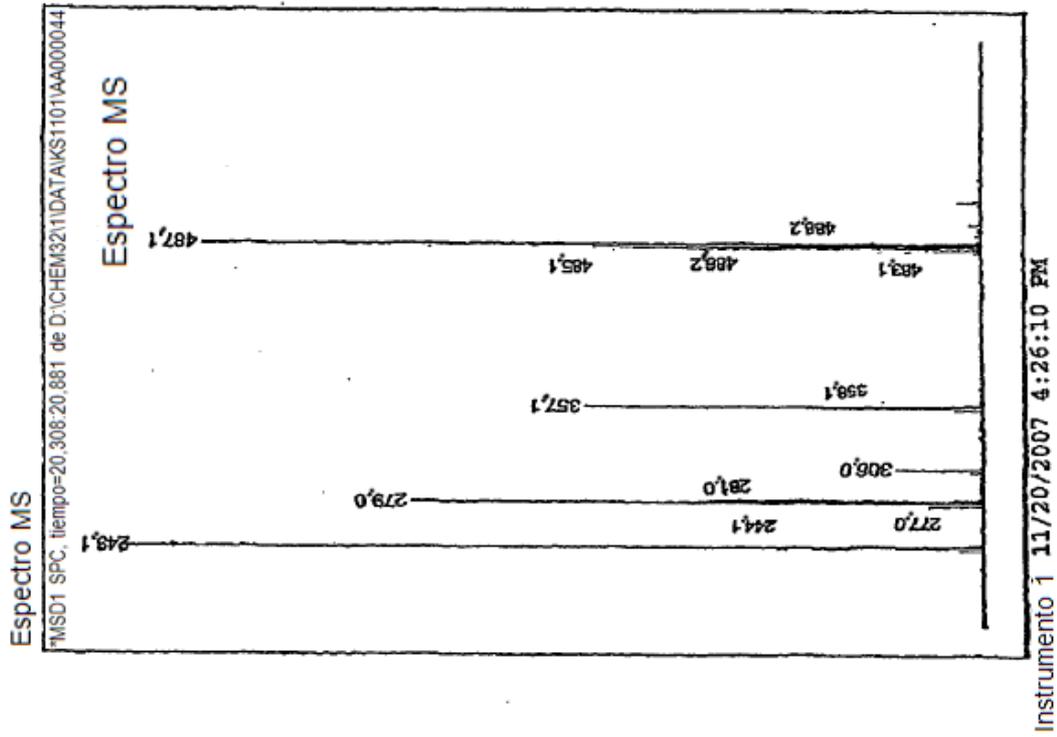


FIG. 5A

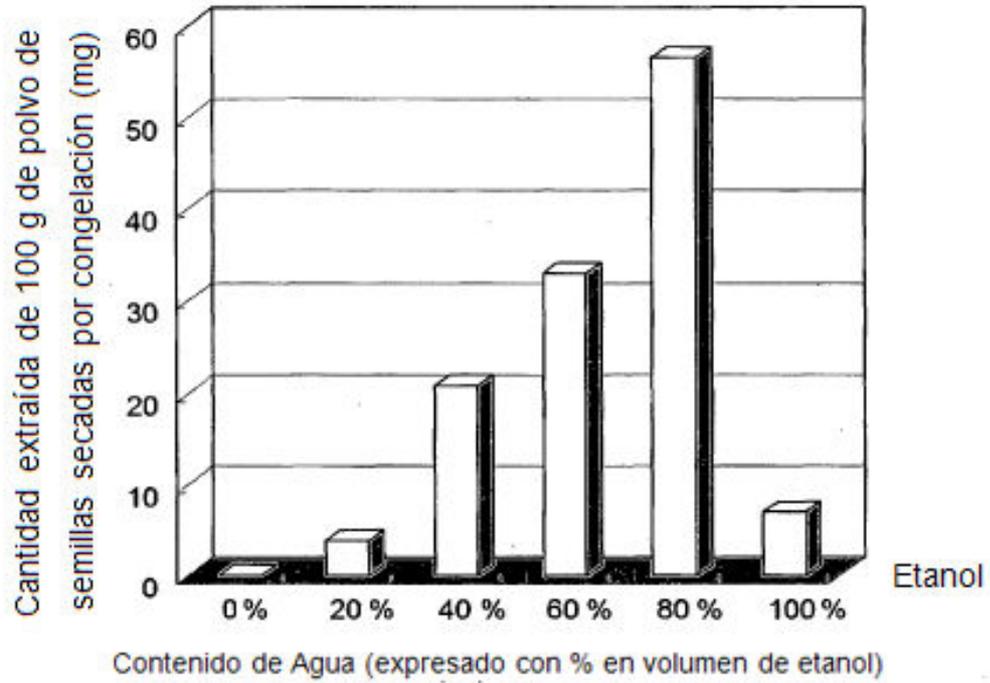


FIG. 5B

