

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 530**

21 Número de solicitud: 201400835

51 Int. Cl.:

C07D 311/86 (2006.01) **A61K 36/83** (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 36/22 (2006.01)
A61K 36/51 (2006.01)
A61K 36/74 (2006.01)
A61K 36/60 (2006.01)
A61K 36/38 (2006.01)
A61K 36/69 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.04.2016

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ (100.0%)
C/ Ancha, 16
11001 Cádiz ES

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ DE LA OSSA FERNÁNDEZ, Enrique
José;
MANTELL SERRANO, Casimiro;
CASAS CARDOSO, Lourdes y
FERNÁNDEZ PONCE, María Teresa

54 Título: **Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial**

57 Resumen:

Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial a partir extractos de las familias Gentianaceae, Anacardiaceae, Rubiaceae, Moraceae, Clusiaceae, Polygalaceae y Thymelaeaceae, especialmente de la especie *Mangifera indica* L., a escala semi-industrial combina el uso de una fase estacionaria apolar o hidrofóbica y una fase móvil compuesta por CO₂ puro o una mezcla de CO₂ y un codisolvente polar como metanol o etanol en modo isocrático o modo gradiente. Consta de una etapa de lavado que utiliza un mínimo porcentaje de codisolvente para eluir inicialmente compuestos polares con poca afinidad por la fase móvil y/o solubles en CO₂, y una etapa de concentración de xantonas en la cual se incrementa el porcentaje de codisolvente a una concentración que permita eluir este tipo de moléculas las cuales presentan una afinidad media por la fase estacionaria y son escasamente solubles en el CO₂.

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE CONCENTRACIÓN DE XANTONAS A ALTA PRESIÓN A ESCALA SEMI-INDUSTRIAL

SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 Concentración de xantonas, especialmente mangiferina, a partir de extractos naturales de las familias de plantas *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, *Polygalaceae* y *Thymelaeaceae*, especialmente extractos de subproductos de *Mangifera indica* L., por medio de un método de concentración a alta presión a escala planta piloto que combina el uso de un absorbente apolar o
- 10 hidrofóbico y un eluyente compuesto mayoritariamente por dióxido de carbono (CO₂).

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las xantonas son una familia de moléculas biológicamente activas pertenecientes al grupo químico de los fenoles. Su estructura polifenólica posee un núcleo que consta

15 de tres anillos hexacíclicos con seis enlaces dobles de carbono que las hacen altamente estables, y cuyo anillo central tiene incluidos un grupo cetónico y un grupo éter. Su esqueleto único, junto con el tipo y la posición de los grupos químicos adheridos, definen las propiedades específicas de las xantonas.

Las xantonas, a diferencia de otros compuestos fenólicos como los flavonoides o

20 ácidos fenólicos, se encuentran solo en unas pocas familias de plantas, principalmente en las familias *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, *Polygalaceae* y *Thymelaeaceae* (Negy et al. (2013) Review Article Naturally Occurring Xanthones: Chemistry and Biology, Journal of Applied Chemistry 2013, 1-9). Son compuestos muy escasos en la naturaleza. En total se han

25 descrito alrededor de 1000 xantonas diferentes con sustituyentes en diferentes posiciones lo que da lugar a una gran variedad de propiedades farmacológicas y biológicas (Pinto et al. (2005) Xanthone Derivatives: New Insights in Biological Activities, Current Medicinal Chemistry, 12, 2517-2538).

Las xantonas han sido reconocidas como los antioxidantes más potentes que existen en la naturaleza llegando a ser clasificadas como “super-antioxidantes. Su gran capacidad antioxidante y sus múltiples propiedades biológicas tales como propiedades antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-histamínicos, anti-tumorales, antidiabéticas (*Peres et al. (2000) Review Tetraoxygenated naturally occurring xanthones, Phytochemistry 55, 683-710*) resultan de gran interés para aplicaciones cosméticas, farmacéuticas o nutraceuticas.

La mangiferina, es la molécula más representativa de la familia de las xantonas. Fue el primer compuesto identificado con un residuo de glucosa unido a un nucleo xantonoide polioxygenado. Se obtuvo a partir de *Mangifera indica* Linn en 1908, siendo la corteza y hojas de esta planta las principales fuentes naturales de esta xantona, aunque también ha sido identificada en muchas otras especies de plantas. La mangiferina representa las características más importantes de todas las demás sustancias afines conocidas hasta la fecha: el residuo glucosilo está unido al carbono 2 o 4 del núcleo que se oxigena en las posiciones 1, 3, 6 y 5 o 7 respectivamente.

Sus cuatro grupos hidroxilo aromáticos determinan sus fuertes propiedades anti-radicalarias y antioxidantes. Es también un agente quelante eficiente, por tanto previene la generación de radicales hidroxilo en las reacciones tipo Fenton. Numerosas propiedades farmacológicas han sido demostradas en estudios *in vivo* e *in vitro*: analgésicas, antidiabéticas, antiescleróticas, antimicrobianas, antivirales, cardio, hepato, y neuro-protectoras, antiinflamatorias, antialérgicas. Por tanto se considera una potente droga natural beneficiosa para el tratamiento de enfermedades degenerativas como el cáncer, Alzheimer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, así como enfermedades relacionadas con exceso de hierro (*Rocha et al. (2010) Bioactive Compounds in Mango (Mangifera indica L.). Bioactive foods in promoting health. Fruits and vegetables. El Sevier Chapter 34, 507-514; Massibo et al. (2008) Major Mango Polyphenols and their Potential Significance to Human Health. Comprehensive review in food science and food safety 7, 309-318; Teng Lin et al. (2009) Standardised Mangifera indica extract is an ideal antioxidant. Food Chemistry 113, 1154-1159*).

La compleja estructura fenólica de las xantonas dificulta sintetizarlas químicamente, limitando su producción industrial a procesos de extracción y purificación a partir de plantas o residuos agroindustriales (Kulkarni et al. (2014a) *Extraction of mangiferin from Mangifera indica leaves using three phase partitioning coupled with*
5 *ultrasound. Industrial Crops and Products* 52, 292–297). Los extractos comerciales de los subproductos de *Mangifera indica* L. se obtienen principalmente por medio de técnicas de extracción sólido-líquido, como por ejemplo se describe en la patente P0793476: *Utilisation de mangiferine o uses dérivés pour une application cosmetique*, Rouillard, F; Josse, A, Robin, J-R. Sin embargo, en años recientes se ha
10 despertado un gran interés por el uso de estas moléculas en productos farmacéuticos, cosméticos y nutraceuticos, debido sus elevadas propiedades biológicas, y se han realizado numeroso esfuerzos para desarrollar técnicas de extracción más eficientes y amigables con el medio ambiente para la recuperación de mangiferina a partir de plantas o residuos agro-industriales. Entre ellas se incluyen: la extracción con fluidos
15 supercríticos (Fernández-Ponce et al. (2012) *Extraction of antioxidant compounds from different varieties of Mangifera indica leaves using green technologies. Journal of Supercritical Fluids* 72, 168– 175; Prado et al. (2013) *Supercritical CO2 and low-pressure solvent extraction of mango (Mangifera indica) leaves: Global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. Food and*
20 *Bioproducts Processing* 91, 656–664), la extracción con líquidos presurizados (CN 101429222 A: *Method for extracting mangiferin*, 2009), la extracción con agua subcrítica (Fernández-Ponce et al. (2012); Kim et al. (2010) *Extraction of mangiferin from Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa) using subcritical water. Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 16, 425-430), la extracción con
25 ultrasonido (US2011/0046077 A1: *Process for the extraction of mangiferina and isomangiferin*; Zou et al. (2013) *Comparison of microwave-assisted and conventional extraction of mangiferin from mango (Mangifera indica L.) leaves. Journal of Separation Science* 36, 3457–3462), y la extracción por microondas (Kulkarni et al. (2014a); Kulkarni et al. (2014b) *Mapping of an ultrasonic bath for*
30 *ultrasound assisted extraction of mangiferin from Mangifera indica leaves. Ultrasonics Sonochemistry* 21, 606–611).

Las técnicas de extracción permiten rendimientos de 30-40 mg mangiferina/g materia prima, así como extractos hojas de mango con contenidos en mangiferina entre 6–12% (*Fernández-Ponce et al. (2012); Kulkarni et al. (2014a); Zou et al. (2013)*). A pesar de la eficiencia de los métodos de extracción desarrollados, aún se requiere, a nivel industrial, el uso de extractos naturales estandarizados con una alta concentración en mangiferina.

Para la purificación de mangiferina tanto a escala laboratorio como a nivel industrial se emplean técnicas de cromatografía líquida (*US2011/004607 A1: Process for the extraction of mangiferin and isomangiferin; Luo et al. (2012) Quantification and Purification of Mangiferin from Chinese Mango (Mangifera indica L.) Cultivars and Its Protective Effect on Human Umbilical Vein Endothelial Cells under H₂O₂-induced Stress. International Journal of Molecular Sciences 13, 11260-11274*). Estas técnicas utilizan grandes volúmenes de disolventes orgánicos, tales como agua, metanol y acetonitrilo, y requieren de largas etapas de concentración.

Una de las mayores dificultades para concentrar las xantonas es que son muy sensibles a la temperatura y a procesos oxidativos accionados por factores como la luz y el oxígeno. Los procesos de concentración que requieren largos tiempos de evaporación del disolvente, tales como los procesos de separación por cromatografía líquida, reducen la eficiencia del proceso ya que conllevan a la degradación de este tipo de moléculas. Continúa así existiendo en el estado de la técnica la necesidad de un procedimiento eficiente y verde que permita obtener extractos naturales enriquecidos en xantonas, tales como la mangiferina, a escala industrial, para que puedan ser aplicables en formulaciones farmacéuticas, nutracéuticas o cosméticas.

Una alternativa a los procesos de separación por cromatografía líquida, son aquellos que emplean dióxido de carbono (CO₂) como fase móvil. El dióxido de carbono es un disolvente apolar por lo que solubiliza solutos no polares o de bajo peso molecular. Debido a su carácter apolar, el CO₂ se utiliza comúnmente para procesos de separación en fase normal. Este modo de separación cromatográfica utiliza una fase móvil apolar y fases estacionarias polares tales como gel de sílice, o sílice modificada con grupos funcionales amino-, ciano-, fenil- o propanodiol (*Ramírez et*

- al. (2006) Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1606–1613; Taylor (2009) Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *Journal of Supercritical Fluids* 47, 566–573;
- 5 Li, et al. (2007) Characterization and use of hydrophilic interaction liquid chromatography type stationary phases in supercritical fluid chromatography, *Journal of Chromatography B* 846, 291–297).

Deferentes métodos de separación en fase normal utilizando dióxido de carbono han sido desarrollados. Por ejemplo la purificación de ácido carnósico a partir de extracto

10 de *Rosmarinus officinalis* L. se llevó a cabo mediante una mezcla de CO₂ y etanol o desactivando/recubriendo la fase estacionaria compuesta por gel de sílice (Ibañez et al. (2000) Tuning of mobile and stationary phase polarity for the separation of polar compounds by SFC. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 43, 25–43; Ramírez, et al. (2007) Use of specially designed columns for antioxidants and

15 antimicrobials enrichment by preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1143, 234–242). Para el fraccionamiento de extracto de *Thymus vulgaris* L. se utilizó una columna de sílice y CO₂ + 3% etanol como fase móvil (García-Risco et al. (2011) Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography. *Journal of Supercritical Fluids*

20 55, 949–954). Los polifenoles de semilla de uva fueron separados con una columna analítica diol utilizando CO₂ + 0,25% ácido cítrico en metanol como fase móvil (Karnangerpour et al. (2002) Supercritical fluid chromatography of polyphenolic compounds in grape seed extract, *Chromatography* 55, 417-421). La separación analítica de flavonas polihidroxiladas tales como quercetina, fesitina e isoramnetina

25 fue optimizada utilizando columnas fenilo y una fase móvil compuesta por CO₂–etanol–ácido fosfórico (90:9.98:0.02, v/v/v) (Liu et al. (1999) Separation of Polyhydroxylflavonoids by Packed-Column Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 37,155-158).

Sin embargo, estos procesos de separación en fase normal utilizando CO₂ como fase

30 móvil se aplican a moléculas solubles en CO₂ cuya solubilidad puede ser mejorada

mediante la adición de porcentajes reducidos de modificadores polares. Por el contrario, las xantonas son moléculas con escasa solubilidad en el CO₂ debido a su compleja estructura y su alta polaridad y los métodos usados para la separación de estas moléculas implican el uso de técnicas de cromatografía líquida en fase inversa

5 (Berardini et al. (2004) *Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (Mangifera indica L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry* 18, 2208–2216; Berardini et al. (2005) *Screening of mango (Mangifera indica L.) cultivars for their*

10 *contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1563–1570). Sin embargo, el desarrollo de procesos de separación en fase reversa utilizando el CO₂ como fase móvil resulta complejo (Guiócho et Tarafder (2011) *Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography, Journal of*

15 *Chromatography A* 1218, 1037–1114); Ibañez et al. (2000)) debido al escaso poder de solvatación del CO₂ para sustancias polares complejas, como son las xantonas.

Por otra parte, la mayoría de métodos de separación de sustancias naturales que utilizan CO₂ han sido desarrollados a una escala laboratorio para aplicaciones analíticas en los cuales se busca aislar o purificar un compuesto para su

20 identificación, o para aplicaciones preparativas con el fin de separar y recolectar fracciones que requieran análisis posteriores de verificación del compuesto aislado tales como análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Guióchon et Tarafder (2011); Karnangerpour et al. (2002); Liu et al. 1999; West et Lesellier (2008) *Orthogonal screening system of columns for supercritical fluid chromatography,*

25 *Journal of Chromatography A* 1203, 105–113; Desmorteux et al. (2009) *Improved separation of furocoumarins of essential oils by supercritical fluid chromatography, Journal of Chromatography A* 1216, 7088–7095).

No obstante, los métodos de purificación desarrollados a una escala analítica son inviables a una escala industrial. A una escala de laboratorio la carga de alimentación

30 se reduce a cantidades pequeñas, lo que significa que para aplicaciones industriales

- se requieren numerosos ciclos para recuperar una cantidad suficiente de producto así como largas etapas de separación del disolvente (*Guiochon et Tarafder (2011)*). Además las columnas empleadas a una escala analítica no son aplicables a escalas superiores y se hace necesario el diseño de columnas que puedan ser empleadas a
- 5 escala industrial. El desarrollo de métodos de separación utilizando CO₂ a escalas superiores es muy escaso y los métodos desarrollados se basan en la separación en fase normal de compuestos solubles en CO₂ (*Pettinello et al. (2000) Production of EPA enriched mixtures by supercritical fluid chromatography: from the laboratory scale to the pilot plant. Journal of Supercritical Fluids 19, 51–60; Lia et al. (2007)*
- 10 *Efficient and scalable method in isolation of polymethoxyflavones from orange peel extract by supercritical fluid chromatography. Journal of Chromatography B 846, 291–297*). Por tanto, en el estado de la técnica aún se requiere de métodos industriales de concentración que utilicen CO₂ en la fase móvil y que sean aplicables a sustancias polares y poco solubles en este disolvente.
- 15 La invención objeto de esta patente consiste en un método de concentración a escala semi-industrial de sustancias polares e insolubles en CO₂, particularmente las xantonas, mediante un proceso de concentración a alta presión que utiliza CO₂ como componente mayoritario de la fase móvil y una columna de fase reversa rellena con un absorbente apolar o hidrofóbico. El proceso de concentración de xantonas,
- 20 especialmente la mangiferina, se realiza a partir de extractos naturales de las familias de plantas *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, *Polygalaceae* y *Thymelaeaceae*, especialmente extractos de subproductos de *Mangifera indica* L. los cuales poseen una alta concentración en este tipo de moléculas altamente bioactivas.
- 25 Esta técnica presenta ventajas tales como: el uso mayoritario de un disolvente no-tóxico y seguro como es el CO₂, la reducción del consumo de disolventes líquidos y la fácil recuperación del analito por simple descompresión del CO₂ o por concentración en el disolvente lo cual minimiza las etapas de evaporación del solvente. Por tanto, el proceso permite reducir los problemas de degradación de las
- 30 xantonas obteniendo así un extracto enriquecido en compuestos con alta

bioactividad. Además, debido a la baja viscosidad y alta difusividad del CO₂ en condiciones de alta presión es posible diseñar un proceso de concentración utilizando un absorbente con un tamaño de partícula muy fina sin que se produzcan pérdidas de resolución y problemas de sobrepresión, comúnmente presentados en equipos de cromatografía líquida a escala industrial en los cuales se hace necesario el uso de partículas con un mayor tamaño que las partículas utilizadas en aplicaciones analíticas en detrimento de la resolución y eficiencia del proceso (*Guiócho y Tarafder (2011)*). El método propuesto también ofrece la ventaja de diseñar un proceso en línea de extracción y concentración de mangiferina a nivel industrial.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método de concentración a alta presión de xantonas, principalmente del “super-antioxidante” mangiferina altamente valorado en aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y nutraceuticas, a partir de extractos naturales de las familias de plantas *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, *Polygalaceae* y *Thymelaeaceae*, especialmente de la especie *Mangifera indica* L.

El procedimiento de obtención que se protege se basa en la concentración a alta presión de xantonas a una escala semi-industrial que combina el uso de absorbente apolar o hidrofóbico y de un eluyente compuesto mayoritariamente por CO₂. El proceso de concentración de xantonas utiliza un equipo de alta presión acoplado a una columna escala planta piloto empaquetada con partículas finas (5-10 µm) de una fase estacionaria apolar, donde los problemas de sobrepresión, comúnmente presentados en equipos de cromatografía líquida a escala industrial, son minimizados por la baja viscosidad y alta difusividad del disolvente supercrítico y por tanto es posible utilizar velocidades de flujo más rápidas que las utilizadas en cromatografía líquida de alta presión a gran escala (HPLC). El proceso también minimiza el consumo de solventes líquidos y reduce las etapas de concentración que causan pérdidas en la bioactividad de las moléculas. De igual manera, ofrece la posibilidad

de desarrollar un proceso en línea de extracción-concentración de mangiferina a alta presión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS Y TABLAS

- 5 **Figura 1:** Esquema del equipo de concentración a alta presión a escala planta piloto., que muestra:
- 1) Baño refrigerante, 2) bomba de CO₂, 3) mezclador, 4) bomba codisolvente, 5) intercambiador de calor, 6) columna empaquetada, 7) detector UV, 8) válvula reguladora de presión, 9) separadores ciclónicos.
- 10 **Figura 2:** Cromatogramas de HPLC a 340 nm de las fracciones F1 a F3 obtenidas del proceso de concentración a alta presión en fase reversa de una mezcla de polifenoles a una escala planta piloto utilizando como condiciones de operación: 40 MPa de presión, 40 °C de temperatura, 20 g/min de flujo de la fase móvil compuesta por CO₂ + % modificador (metanol + 0.5% ácido fórmico) en modo gradiente establecido de la siguiente manera (% modificador, tiempo): (5%, 270 min); (25%, 90 min); y (50%,90 min).
- 15 **Figura 3:** Cromatogramas obtenidos por HPLC de: A) extracto crudo; B) primera fracción F1; C) segunda fracción F2; D) tercera fracción F3; and E) cuarta fracción F4 recolectadas por medio del proceso de concentración a alta presión en fase reversa y a escala planta piloto de un extracto supercrítico de hoja de *Mangifera indica* L. utilizando como condiciones de operación: 40 MPa de presión, 40 °C de temperatura, 20 g/min de flujo de la fase móvil compuesta por CO₂ + % modificador (metanol + 0.5% ácido fórmico) en modo gradiente establecido de la siguiente manera (% modificador, tiempo): (5%, 270 min) y (25%, 90 min). Los compuestos fenólicos
- 20 **Tabla 1:** Tiempos de retención, espectros de masa, área del pico relativa y factor de concentración (área relativa en la fracción/área relativa en el extracto) de los polifenoles de mango identificados por HPLC-MS en el extracto supercrítico crudo
- 25 están numerados en la Tabla 1.

de hoja de *Mangifera indica* L. y las fracciones obtenidas por el método de concentración a alta presión en fase reversa y a escala planta piloto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 La presente invención consiste en un método de concentración a alta presión en fase reversa a escala semi-industrial de xantonas, especialmente del “super-antioxidante” mangiferina altamente valorado en la industria cosmética, farmacéutica y nutracéutica, a partir de extractos de plantas de las familias *Guttiferae*, *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae* y *Thymelaeaceae*, el cual combina el uso de
- 10 un absorbente apolar o hidrofóbico y un eluyente con un alto contenido en CO₂.

El método de separación se caracteriza por una primera etapa de lavado de la columna con CO₂ puro o con una mezcla de CO₂ y codisolvente en modo isocrático o en modo gradiente, utilizando un incremento del porcentaje de codisolvente entre 0-15%, preferiblemente entre 3-5%, con el fin de reducir el consumo de disolventes orgánicos. En esta primera etapa se separan compuestos polares, con afinidad baja o

15 media por la fase estacionaria apolar y/o solubles en el CO₂. Esta etapa de lavado se realiza por el tiempo necesario para reducir la contaminación de la fracción de interés, rica en xantonas, por compuestos fuertemente retenidos en la columna y solubles en CO₂.

- 20 Posterior a la etapa de lavado se pasa a la etapa de concentración de xantonas. En esta etapa se incrementa el porcentaje de codisolvente en modo isocrático o modo gradiente, entre 15 y 50%, preferiblemente entre 20 y 30%. Las xantonas presentan una afinidad media por la fase estacionaria hidrofóbica y una escasa solubilidad en el CO₂, por lo tanto se requieren mayores porcentajes de codisolvente para su elución.

- 25 Este método de concentración a alta presión permite la obtención de una fracción rica en xantonas, principalmente en mangiferina cuya concentración puede ser incrementada en un factor mínimo de 5 con respecto al extracto original, el cual puede ser incrementado mediante inyecciones sucesivas de la fracción enriquecida para elevar la pureza de la misma.

Durante la etapa de lavado también se obtienen otras fracciones ricas en diferentes familias de compuestos fenólicos tales como ácidos fenólicos, benzofenonas y flavonoides, que también pueden resultar de interés para la industria cosmética, farmacéutica y nutracéutica. El proceso de concentración a alta presión de las xantonas, donde la fase móvil está compuesta mayoritariamente por CO₂, considerado un solvente verde y seguro, reduce substancialmente el consumo de disolventes líquidos orgánicos con la consecuente reducción de las etapas de evaporación del disolvente y la disminución de pérdidas de bioactividad de las moléculas fraccionadas.

10

Procedimiento de obtención

El procedimiento de obtención de una fracción rica en xantonas, especialmente en mangiferina, que propone la presente invención está caracterizado porque se describe un método de concentración de xantonas a alta presión para aplicaciones semi-industriales, a partir extractos de las familias *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, *Polygalaceae* y *Thymelaeaceae*, especialmente de la especie *Mangifera indica* L, utilizando un absorbente apolar o hidrofóbico y un eluyente con un alto contenido en CO₂.

El equipo de concentración a alta presión consta de una columna preparativa a escala planta piloto (25 cm x 3 cm) termostatzada y rellena con una fase estacionaria apolar o hidrofóbica tales como sílica fase reversa C18 o sílica hidrofóbica. El material de relleno tiene un diámetro medio de partícula entre 1 a 15 µm, preferiblemente 3 a 5 µm, con un tamaño de poro entre 7 a 30 nm, preferiblemente 8-10 nm, y un área de superficie específica que no está particularmente limitada y que puede encontrarse entre 5 y 450 m²/g. Esta columna es previamente empaquetada con el material de relleno utilizando un gradiente de presión entre 0 y 40 MPa, y una posterior despresurización lenta del sistema. El equipo también incluye dos bombas de líquidos de alta presión con velocidades de flujo máximas de 200 y 50 g/min que se utilizan para introducir el CO₂ y el codisolvente, respectivamente, un mezclador ubicado antes de la entrada de la columna para asegurar la mezcla homogénea del CO₂ y el codisolvente, un válvula reguladora de presión que controla la presión de la

columna, un detector de luz UV/Vis, y dos separados ciclónicos para recolectar las fracciones obtenidas. Un diagrama esquemático del equipo a escala planta piloto se muestra en la Figura 1.

Al comienzo del procedimiento, la alimentación se seca con el material de relleno en una relación entre 1:5 y 1:10. La alimentación seca se carga a presión atmosférica y temperatura ambiente en la parte superior de la columna. La columna se cierra y se calienta por una chaqueta termostatzada hasta que se alcanza la temperatura de trabajo. Antes de entrar la fase móvil a la columna, el CO₂ y el codisolvente se mezclan en una pequeña columna de pre-mezclado para proporcionar la composición de la fase móvil requerida. La fase móvil fluye en flujo descendente a través del lecho de material de relleno a un caudal constante, disolviendo y eluyendo los compuestos de interés. La presión de la columna se controla por una válvula reguladora de presión. El sistema se acopla a un detector de luz UV/Vis (Linear UVIS 250). Las muestras se colectan en dos separadores ciclónicos dispuestos en paralelo. Finalizado el proceso de concentración se lava la columna para un posterior uso con el 100% de codisolvente y se utiliza una etapa de secado y acondicionamiento utilizando 100% de CO₂ a 70°C.

La fase móvil está compuesta por CO₂ puro o mezclas de CO₂ y codisolventes polares (metanol o etanol). El método de concentración se establece en modo isocrático, o utilizando una rampa que inicia con CO₂ puro aumentando progresivamente el porcentaje de codisolvente entre 0-100%. Se emplea también la adición o no de ácido cítrico, ácido fórmico o ácido acético como aditivos secundarios a una concentración entre 0.1-1,0% v/v con el fin de mejorar la resolución del proceso. Las condiciones de operación del proceso de concentración en fase reversa se establecen en un rango de presión de la columna entre 10-40 MPa, un rango de temperatura de la columna entre 35-120 °C, y un flujo de la fase móvil entre 5-40 g/min, preferiblemente a una presión y temperatura superiores al punto crítico de la mezcla de CO₂ + codisolvente, y más preferiblemente a una presión de columna entre 30-40 MPa, una temperatura de la columna de 40-50 °C y un flujo de la fase móvil de 10-20 g/min.

El procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial comprende una etapa de lavado que utiliza un mínimo porcentaje de codisolvente para eluir inicialmente compuestos polares con poca afinidad por la fase móvil y/o solubles en CO₂, y una etapa de concentración de xantonas en la cual se incrementa el porcentaje de codisolvente a una concentración que permita eluir este tipo de moléculas las cuales presentan una afinidad media por la fase estacionaria y son escasamente solubles en el CO₂.

La etapa de lavado utiliza una fase móvil en modo isocrático o modo gradiente compuesta por CO₂ puro o una mezcla de CO₂ con codisolvente el cual debe ser un alcohol polar, más preferiblemente metanol o etanol, con la adición o no de un aditivo secundario polar (ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético) en una concentración entre 0.1 y 1% v/v, y más preferiblemente entre 0.25 y 0.5% v/v. Se utiliza preferiblemente una fase móvil en modo gradiente que incrementa la concentración de codisolvente en el CO₂ en un porcentaje entre 1 y 15 % y más preferiblemente en un rango entre 3 y 5% de codisolvente, por un tiempo entre 90 y 350 min, preferiblemente entre 250-300 min, para un lavado de la columna y la elución de compuestos fenólicos solubles en CO₂ que puedan contaminar la fracción rica en xantonas.

Durante esta etapa de lavado se eluyen inicialmente, con tiempos de recolección entre 0-15 min, compuestos altamente polares, solubles en CO₂ y con poca afinidad por la fase estacionaria apolar, tales como ácidos fenólicos y sus derivados. Posteriormente se eluyen, con tiempos de recolección entre 15-90 min, compuestos solubles en CO₂ con afinidad media o alta por la fase estacionaria apolar tales como benzofenonas y flavonoides. Estas fracciones pueden ser recolectadas o no dependiendo de la utilidad que tengan a nivel industrial. La etapa de lavado de la columna se extiende a las condiciones de operación hasta el momento utilizadas con el fin de limpiar la columna de compuestos retenidos y acondicionar la columna para la elución de la fracción rica en xantonas.

Posteriormente, la etapa de concentración utiliza una fase móvil con una mayor fuerza eluyente. Se incrementa la concentración de codisolvente en el CO₂ entre 15 y

100%, preferiblemente entre 15 y 50% y más preferiblemente entre 20 y 30% de codisolvente el cual está compuesto por una alcohol polar, preferiblemente metanol o etanol, con la adición o no de un aditivo secundario (ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético) en una concentración entre 0.1 y 1% v/v, y más preferiblemente entre
 5 0.25 y 0.5% v/v. La etapa de concentración se realiza por un tiempo de colección de la muestra entre 0-180 min, preferiblemente entre 10-60 min correspondiente a un tiempo de retención entre 15-30 min. En esta última etapa se obtiene una fracción rica en xantonas, especialmente en mangiferina, con un factor de concentración mínimo de 5 con respecto al extracto crudo, el cual puede ser incrementado con la
 10 inyección sucesiva de la fracción enriquecida para elevar la pureza de dicha fracción.

Ejemplos

Ejemplo 1

Concentración a alta presión en fase reversa de mezclas de compuestos fenólicos puros a escala planta piloto
 15

10 mg de una mezcla de compuestos fenólicos estándar con una amplia gama de polaridades, compuesta por ácido gálico, galato de metilo, mangiferina y quercetina en iguales proporciones, fue mezclada con el relleno de la fase estacionaria en una relación 1:10. La muestra seca fue cargada en la parte superior de la columna
 20 cromatográfica en condiciones de presión atmosférica y temperatura ambiente. La columna supercrítica de 25cm x 3cm fue previamente empaquetada con un relleno hidrofóbico Sinergy Hidro-RP C18 de 5 µm (Phenomenex, USA) utilizando un gradiente de presión entre 0 y 40 MPa. Tras la carga de la alimentación la columna es cerrada y el fraccionamiento por CFS es realizado de acuerdo al procedimiento
 25 previamente descrito. Las condiciones experimentales empleadas fueron: 40 MPa de presión de la columna, 40 °C de temperatura de la columna, 20 g/min de flujo de la fase móvil y elución en modo gradiente con un incremento de la concentración de codisolvente entre 5-50% w/w. La etapa inicial de lavado se llevó a cabo utilizando una fase móvil compuesta por CO₂ + 5% codisolvente (0.5% ácido fórmico en

metanol). Durante esta etapa de lavado se obtuvieron dos fracciones. Una primera fracción, compuesta por $53.4 \pm 0.2\%$ ácido gálico y $46.6 \pm 0.3\%$ de galato de metilo caracterizados por HPLC, fue obtenida tras un tiempo de recolección de 15 min correspondiente a un tiempo de retención de 6 min. Una segunda fracción, compuesta por $78.6 \pm 0.2\%$ quercetina, $13.6 \pm 0.1\%$ ácido gálico y $7.9 \pm 0.1\%$ galato de metilo caracterizados por HPLC, fue eluída con tras un tiempo de recolección entre 15 a 60 min correspondiente a un tiempo de retención de 17 min. El tiempo de lavado de la columna necesario para eliminar compuestos retenidos en la columna fue extendido hasta 180 min. Tras la etapa de lavado, se incrementa el porcentaje de codisolvente (0.5% ácido fórmico en metanol) al 25% por 90 min y al 50% por 90 min y se obtiene la fracción rica en mangiferina con una pureza del $93.7 \pm 0.4\%$ caracterizado por HPLC. Un cromatograma de las fracciones obtenidas se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 2

Concentración a alta presión en fase reversa y escala planta piloto de la xantona mangiferina a partir de un extracto supercrítico crudo de hoja de Mangifera indica L.

30 mg de un extracto supercrítico crudo de hoja de *Mangifera indica L.*, fue mezclado y secado con el relleno de la fase estacionaria en una relación 1:10. La muestra seca fue cargada en la parte superior de la columna cromatográfica en condiciones de presión atmosférica y temperatura ambiente. La columna supercrítica de 25cm x 3cm fue previamente empaquetada con un relleno hidrofóbico Synergy Hidro-RP C18 de 5 μm (Phenomenex, USA) utilizando un gradiente de presión entre 0 y 40 MPa. Tras la carga de la alimentación la columna es cerrada y el proceso de concentración a alta presión es realizado de acuerdo al procedimiento previamente descrito. Las condiciones experimentales empleadas fueron: 40 MPa de presión de la columna, 40 °C de temperatura de la columna, 20 g/min de flujo de la fase móvil y elución en modo gradiente con el incremento de la concentración de codisolvente (0.5% ácido fórmico en metanol) entre 5-25% w/w.

Para la etapa inicial de lavado se utilizó como fase móvil una mezcla de CO_2 + 5% codisolvente (0.5% ácido fórmico en metanol). En esta etapa se recolectaron 3

fracciones de la siguiente manera: la fracción 1 (F1) se recolectó de 0 a 20 min, la fracción 2 (F2) de 20 a 55 min y la fracción 3 (F3) de 55-270 min. La composición semi-cuantitativa del extracto crudo y de las fracciones obtenidas está descrita en la Tabla 1, así como el factor de concentración r_i (área de pico relativa en la fracción/área de pico relativo en el extracto), y los respectivos cromatogramas obtenidos por HPLC en la Figura 2. Estas tres fracciones obtenidas en la etapa de lavado pueden ser descartadas o no dependiendo de su posterior aplicación a nivel industrial.

La primera fracción obtenida posee un incremento en la concentración de ácidos fenólicos: ácido gálico (1) y ácido benzoico (2) (Figura 2B). El contenido de ácido gálico y ácido benzoico se aumentó por factores de concentración de tres y cuatro, respectivamente (Tabla 1). El flavonoide quercetina (13) también fue eluido en esta primera fracción y se concentró por un factor de cuatro en comparación con el extracto crudo (Tabla 1).

La segunda fracción (F2) obtenida posee altos contenidos de las benzofenonas 3-C- β -D-glucosil-iriflofenona (4) y 3-C-(2-O-galoil)- β -D-glucosil-iriflofenona (7) (Figura 2C), los cuales mostraron un incremento en los porcentajes de área relativos en comparación con los del extracto crudo, 38,2 a 57,9% para el compuesto (4) y 7,3 a 13,0% para el compuesto (7) (Tabla 2). La fracción F2 también mostró un aumento de la concentración de galato de metilo (3) que se concentró por un factor de tres en comparación con el extracto supercrítico crudo (1,84 a 5,5% de área relativa). Así como de los flavonoides 3- β -D-glucosil-quercetina (9) y 3-D-galactosil-quercetina (8) cuya concentración se incrementó 2,2 y 1,5 veces, respectivamente con respecto al extracto crudo (Tabla 1). Al final de la etapa de lavado se obtuvo una fracción F3 que fue descartada ya que posee una composición similar a la del extracto crudo.

Tras la etapa de lavado se incrementa el porcentaje de codisolvente a 25% que permitió la elución de la fracción rica en mangiferina (F4). Para su elución se utilizó un tiempo de recolección de 90 min. El contenido semi-cuantitativo de mangiferina se incrementó en un factor de 5 en comparación con el extracto crudo, y el porcentaje de área relativa de la xantona aumentó de 5,1% en el extracto crudo a 26% en la

fracción F4. Esta fracción también contiene altas concentraciones del compuesto 3-C-(2-O-p-hidroxibenzoil)- β -D-glucosil-iriflofenona (5). La ausencia de ácido fenólicos y sus derivados así como de algunos flavonoides y galotaninos tales como 3-O-xilosil-quercetina (10), 3-O- α -L-arabinopiranosil-quercetina (11), quercetin
5 (13), y 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β -D-glucosa (12) en la fracción F4 demuestran la obtención de una fracción concentrada en mangiferina partir de un extracto supercrítico de hoja de *Mangifera indica* L. por medio del proceso de concentración a alta presión en fase reversa a escala de planta piloto. Además, este proceso puede realizarse en etapas sucesivas mediante la inyección consecutiva de la fracción rica
10 en xantona para así obtener una fracción con una pureza elevada.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial caracterizado porque parte de extractos de plantas de las familias *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, *Polygalaceae* y *Thymelaeaceae*, especialmente de la especie *Mangifera indica* L, y combina el uso de una fase móvil compuesta por CO₂ y una fase estacionaria apolar o hidrofóbica compuesta por sílice de fase reversa C18 o sílice hidrofóbica.
2. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial, según reivindicación 1, que comprende:
 - a) una etapa de lavado que utiliza un mínimo porcentaje de codisolvente para eluir inicialmente compuestos polares con poca afinidad por la fase móvil y/o solubles en CO₂,
 - b) una posterior etapa de concentración de xantonas en la cual se incrementa el porcentaje de codisolvente a una concentración que permita eluir este tipo de moléculas las cuales presentan una afinidad media por la fase estacionaria y son escasamente solubles en el CO₂.
3. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial, según las reivindicación 2, caracterizado porque la etapa inicial de lavado utiliza una fase móvil en modo isocrático o modo gradiente compuesta por CO₂ puro o una mezcla de CO₂ con codisolvente el cual debe ser un alcohol polar, más preferiblemente metanol o etanol, con la adición o no de un aditivo secundario polar (ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético) en un concentración entre 0.1 y 1% v/v, y más preferiblemente entre 0.25 y 0.5% v/v.

4. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial, según reivindicación 3, caracterizado porque la etapa de lavado utiliza preferiblemente una fase móvil en modo gradiente que incrementa la concentración de codisolvente en el CO₂ en un porcentaje entre 1 y 15 % y más preferiblemente en un rango entre 3 y 5% de codisolvente, por un tiempo entre 90 y 350 min, preferiblemente entre 250-300 min, para un lavado de la columna y la elución de compuestos fenólicos solubles en CO₂ que puedan contaminar la fracción rica en xantonas.
5. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial, según reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque posterior a la etapa de lavado se incrementa la concentración de codisolvente en el CO₂ entre 15 y 100%, preferiblemente entre 15 y 50% y más preferiblemente entre 20 y 30% de codisolvente el cual está compuesto por una alcohol polar, preferiblemente metanol o etanol, con la adición o no de un aditivo secundario (ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético) en un concentración entre 0.1 y 1% v/v, y más preferiblemente entre 0.25 y 0.5% v/v.
6. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial, según reivindicación 5, caracterizado porque la etapa de concentración se realiza por un tiempo de colección de la muestra entre 0-180 min, preferiblemente entre 10-60 min correspondiente a un tiempo de retención entre 15-30 min.
7. Procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial, según reivindicación 5, caracterizado porque las condiciones de operación del proceso de concentración en fase reversa se establecen en un rango de presión de la columna entre 10-40 MPa, un rango de temperatura de la columna entre 35-120 °C, y un flujo de la fase móvil entre 5-40 g/min,

preferiblemente a una presión y temperatura superiores al punto crítico de la mezcla de CO₂ + codisolvente, y más preferiblemente a una presión de columna entre 30-40 MPa, una temperatura de la columna de 40-50 °C y un flujo de la fase móvil de 10-20 g/min.

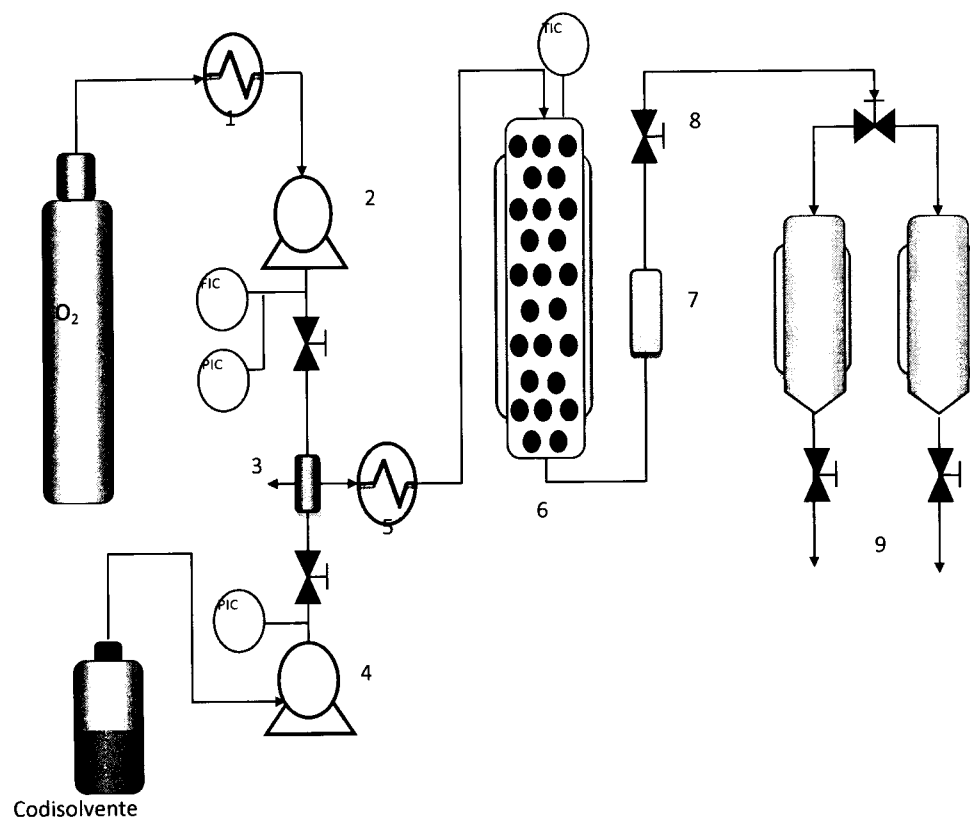


Figura 1

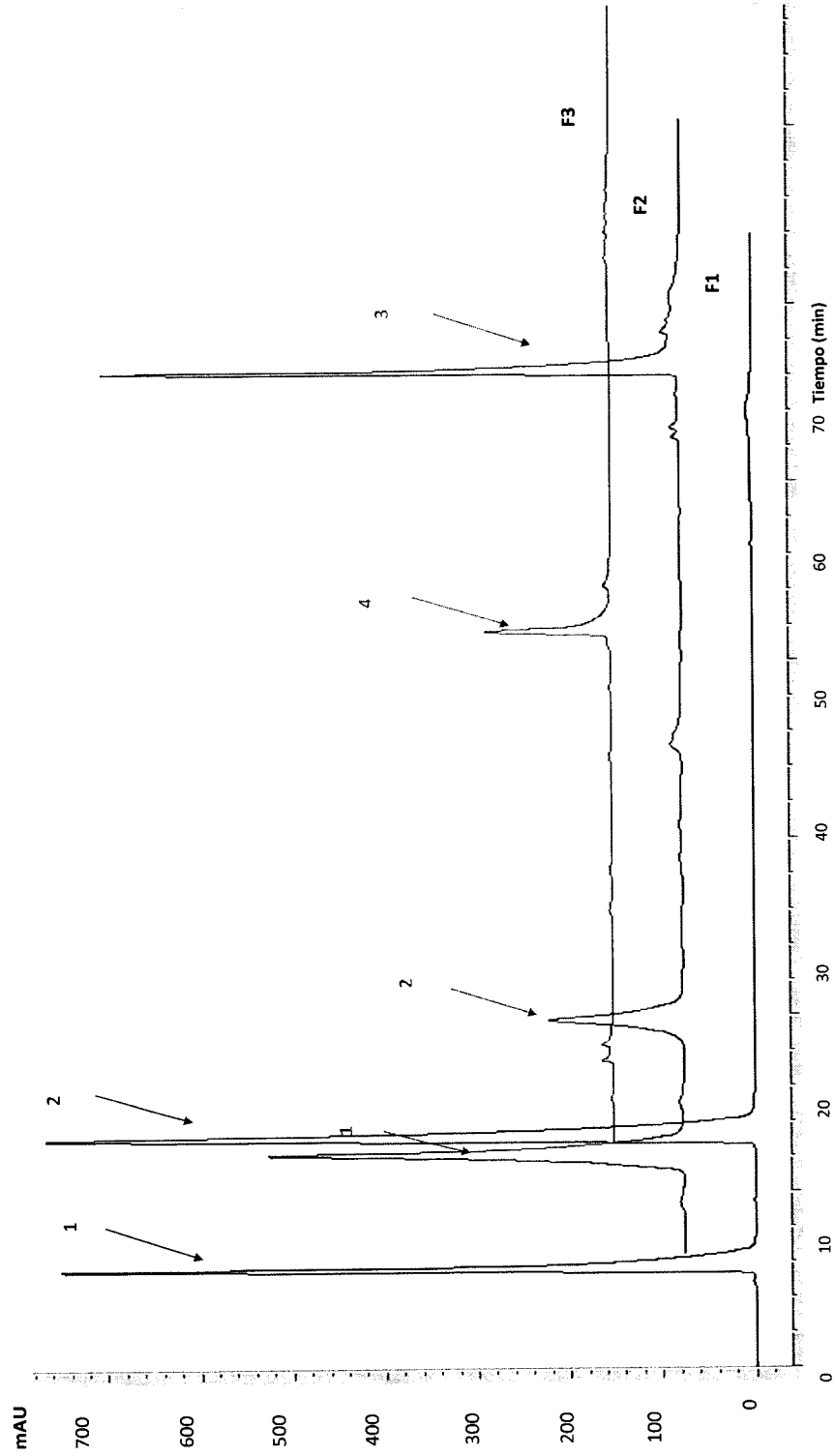


Figura 2

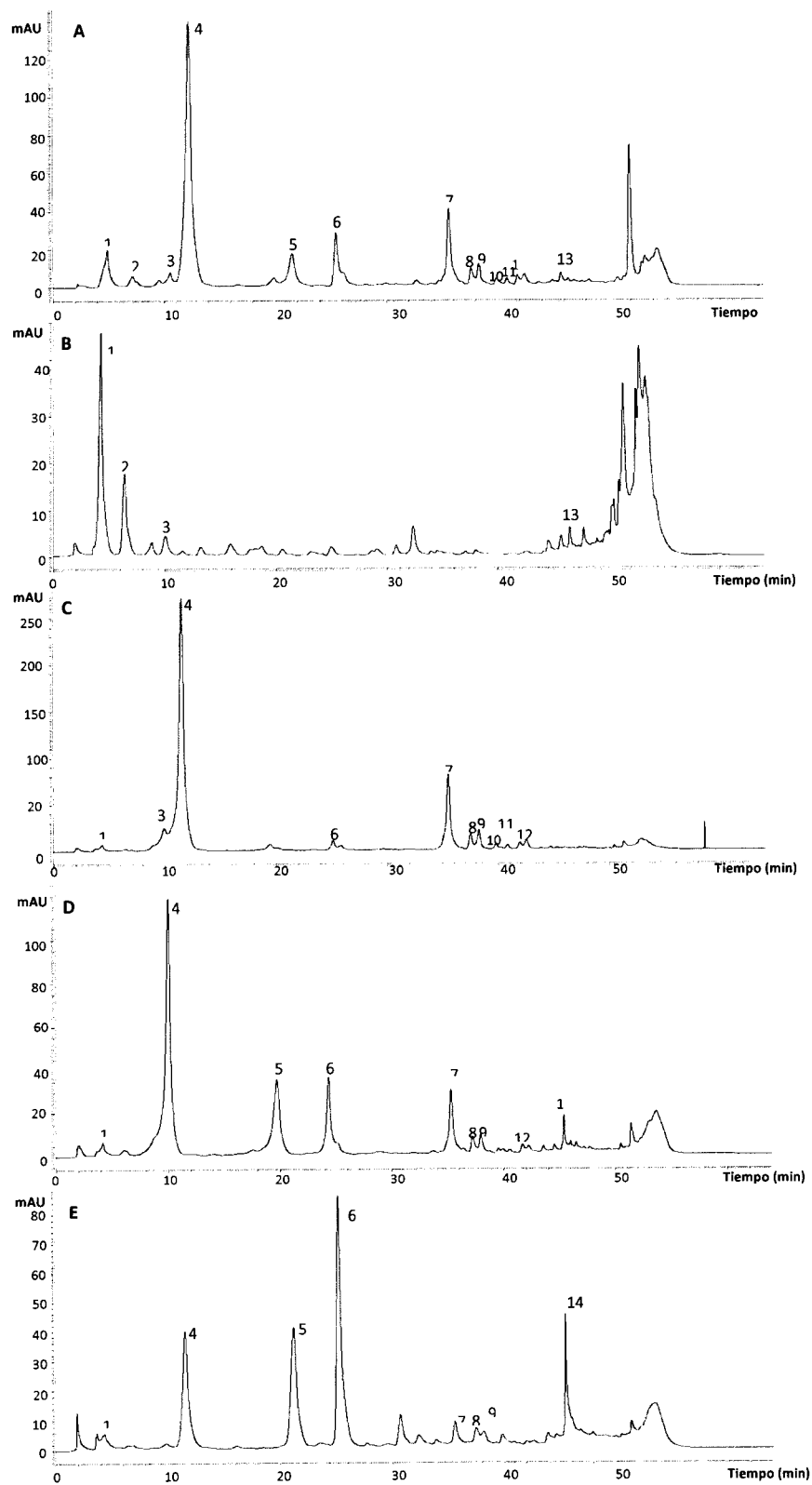


Figura 3

Tabla 2

	Compuesto fenólico	R _t ^c (min)	[M-H] ⁺ ^d	Fragmentos de iones mayoritarios (m/z, %)	Área del pico del extracto crudo (%)	Fracciones							
						F1 Área del pico (%)	F1 r _i	F2 Área del pico (%)	F2 r _i	F3 Área del pico (%)	F3 r _i	F4 Área del pico (%)	F4 r _i
1	Ácido gálico ^a	4.9	169.1	169 (100), 125 (45)	4.67	13.6	2.9	1.0	0.2	1.5	0.3	1.9	0.4
2	Ácido 3,4- dihidroxibenzoico ^a	6.25	153.1	153.1 (100), 112.9 (22), 109.2 (55)	1.30	5.35	4.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	Galato de melito ^a	10.32	183.4	183 (100), 124 (40)	1.84	1.48	0.8	5.5	3.0	nd	nd	nd	nd
4	3-C-β-D-glucosil iriflofenona ^b	11.80	407.2	815.3 (35), 816.3 (17), 08.1 (22), 407.2 (100), 287.1 (14)	38.22	nd	nd	57.9	1.5	38.5	1.0	14.6	0.4
5	3-C-(2-O-p- hidroxibenzoil)-β-D- glucosil iriflofenona ^b	21.50	559.1	561.1 (7), 560.2 (30), 559.2 (100)	5.21	nd	nd	nd	nd	14.4	2.8	16.1	3.1
6	glucosil iriflofenona ^b	25.12	421.1	421 (100), 301 (35)	5.12	nd	nd	1.51	0.3	7.3	1.4	26.3	5.1
7	3-C-(2-O-galoil)-β-D- glucosil iriflofenona ^b	35.5	527.1	641.2 (12), 590.2 (10), 528.2 (27), 527.1 (100)	7.33	nd	nd	13.02	1.8	7.1	1.0	0.9	0.1
8	3-D-galactosil quercetina ^a	37.2	463.1	463 (100), 301 (25), 300 (50)	1.30	nd	nd	2.0	1.5	1.3	1.0	1.7	1.3
9	3-β-D-glucosil quercetina ^a	38.0	463.1	463 (100), 301 (25), 300 (50)	1.92	nd	nd	2.8	2.2	1.4	0.7	1.5	0.8
10	3-O-xyloside quercetina ^b	40.8	433.0	433 (100)	0.41	nd	nd	0.6	0.5	nd	nd	nd	nd
11	3-O-α-L arabinopyranosil quercetina ^a	41.9	433.0	433 (100), 301 (15), 300 (45)	0.63	nd	nd	0.9	0.7	nd	nd	nd	nd
12	1,2,3,4,6-penta-O-galoil- β-D-glucosa ^a	42.5	939.0	939 (100), 769 (75), 617 (17)	1.10	nd	nd	1.5	1.2	0.6	0.5	nd	nd
13	Quercetina ^a	47.0	301.0	301 (100), 179 (25), 151 (45)	0.38	1.68	4.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a Identidad confirmada con patrones. ^b Compuestos identificados tentativamente por el comportamiento cromatográfico y el espectro de masas reportado en la literatura. ^c tiempo de retención, ^d ión de masas negativo. Leyendas: nd: no determinados o detectados



- ②① N.º solicitud: 201400835
②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.10.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FERNÁNDEZ-PONCE M T., CASAS L., MANTELL C., MARTÍNEZ DE LA OSSA E. Fractionation of <i>Mangifera indica</i> Linn polyphenols by reverse phase supercritical fluid chromatography (RP-SFC) at pilot plant scale. Journal of Supercritical Fluids, 2014; Vol. 95, páginas 444-456. ISSN: 0896-8446. Doi:10.1016/j.supflu.2014.10.005. Disponible en línea 16.10.2014.	1-7
A	RAMIREZ, P. et al. Use of specially designed columns for antioxidants and antimicrobials enrichment by preparative supercritical fluid chromatography. Journal of Chromatography A, 2007; Vol. 1143, nº 1-2, páginas 234-242. Doi:10.1016/j.chroma.2006.12.096.	1
A	IBAÑEZ E., SEÑORANS, F J. Tuning of mobile and stationary phase polarity for the separation of polar compounds by SFC. J. Biochem. Biophys. Methods, 2000, Vol. 43, nº 1-3, páginas 25-43. Doi: 10.1016/S0165-022X(00)00078-6.	1
A	TAYLOR L. T. Supercritical fluid chromatography for the 21st century. The Journal of Supercritical Fluids, 2009; Vol. 47, nº 3, páginas 566-573. ISSN: 0896-8446. Doi:10.1016/j.supflu.2008.09.012.	1
A	NEGI, J. S. et al. Naturally Occurring Xanthonenes: Chemistry and Biology. Journal of Applied Chemistry, 2013; Vol. 2013, Article ID 621459, 9 páginas. Doi.org/10.1155/2013/621459.	1
A	FERNÁNDEZ-PONCE M T., et al. Extraction of antioxidant compounds from different varieties of <i>Mangifera indica</i> leaves using green technologies. The Journal of Supercritical Fluids, 2012; Vol. 72, páginas 168-175. ISSN: 0896-8446. Doi: 10.1016/j.supflu.2012.07.016.	2-7
A	DOS SANTOS W J., SILVA, E A., TARANTO O P. Supercritical fluid extraction from mango (<i>Mangifera indica</i> L.) leaves: Experiments and Modeling. Chemical Engineering Transactions, 2013. Vol. 32, páginas 2005-2010. ISSN 1974-9791. Doi: 10.3303/CET1332335.	2-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.06.2015

Examinador
A. Sukhwani

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D311/86 (2006.01)

A61K31/352 (2006.01)

A61K36/22 (2006.01)

A61K36/51 (2006.01)

A61K36/74 (2006.01)

A61K36/60 (2006.01)

A61K36/38 (2006.01)

A61K36/69 (2006.01)

A61K36/83 (2006.01)

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

C07D, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, X-FULL, NPL, FSTA, CAPLUS, AGRICOLA, KOSMET, SCISEARCH, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.06.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Reivindicaciones

Reivindicaciones 1 - 7

SI

NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones

Reivindicaciones 1 - 7

SI

NO

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

Base de la Opinión.-

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

Consideraciones:

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de concentración de xantonas a alta presión a escala semi-industrial que parte de extractos de plantas de las familias *Gentianaceae*, *Anacardiaceae*, *Rubiaceae*, *Moraceae*, *Clusiaceae*, *Polygalaceae* y *Thymelaeaceae*, especialmente la especie *Mangifera indica* L., y combina el uso de una fase móvil compuesta por CO₂ y una fase estacionaria apolar o hidrofóbica compuesta por sílice de fase reversa C18 o sílice hidrofóbica (reivindicación 1).

El procedimiento que comprende las etapas de (reivindicación 2):

a) Lavado con mínimo porcentaje de codisolventes

b) Concentración de xantonas en la cual se incrementa el porcentaje de codisolventes.

La etapa a) de lavado utiliza una fase móvil en modo isocrático o modo gradiente compuesta por CO₂ puro o una mezcla de CO₂ con codisolvente (alcohol polar) como metanol o etanol con la adición o no de un aditivo secundario polar (ácido fórmico, ácido cítrico, ácido acético) en una concentración entre 0,1 y 1% v/v, preferiblemente 0,2 a 0,5% (reiv. 3). La etapa de lavado utiliza una fase móvil en modo gradiente que incrementa la concentración de codisolvente en el CO₂ en un porcentaje entre 1 y 15%, preferiblemente 3 a 5%, entre 90 y 350 min (reiv. 4).

Posterior a la etapa de lavado se incrementa la concentración de codisolvente en el CO₂ entre 15 a 50%, preferiblemente 20 a 30% (reiv. 5) durante un tiempo (reiv. 6) en un rango de presión entre 10-40 MPa, y temperatura entre 35-120°C y un flujo de la fase móvil entre 5-40 g/min, preferiblemente a una presión y temperatura superiores al punto crítico de la mezcla de CO₂ + codisolvente (reiv. 7).

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERNÁNDEZ-PONCE M T., CASAS L., MANTELL C., MARTÍNEZ DE LA OSSA E. Fractionation of <i>Mangifera indica</i> Linn polyphenols by reverse phase supercritical fluid chromatography (RP-SFC) at pilot plant scale. Journal of Supercritical Fluids, 2014; Vol. 95, páginas 444-456. Disponible en línea 16.10.2014	16.10.2014
D02	RAMÍREZ, P. et al. Use of specially designed columns for antioxidants and antimicrobials enrichment by preparative supercritical fluid chromatography. Journal of Chromatography A, 2007; Vol. 1143, nº 1-2, páginas 234-242	2007
D03	IBAÑEZ E., SEÑORANS, F J. Tuning of mobile and stationary phase polarity for the separation of polar compounds by SFC. J. Biochem. Biophys. Methods, 2000, Vol. 43, nº 1-3, páginas 25-43	2000
D04	TAYLOR L. T. Supercritical fluid chromatography for the 21st century. The Journal of Supercritical Fluids, 2009; Vol. 47, nº 3, páginas 566-573.	2009
D05	NEGI, J. S. et al. Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. Journal of Applied Chemistry, 2013; Vol. 2013, Article ID 621459, 9 páginas	2013
D06	FERNÁNDEZ-PONCE M T., et al.. Extraction of antioxidant compounds from different varieties of <i>Mangifera indica</i> leaves using green technologies. The Journal of Supercritical Fluids, 2012; Vol. 72, páginas 168-175	2012
D07	DOS SANTOS W J., SILVA, E A., TARANTO O P. Supercritical fluid extraction from mango (<i>Mangifera indica</i> L.) leaves: Experiments and Modeling. Chemical Engineering Transactions, 2013. Vol. 32, páginas 2005-2010	2013

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

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos citados **D01** a **D07** divulgan procedimientos de aislamiento de xantonas, algunos en condiciones supercríticas, siendo el más relevante **D01**. En efecto,

- **D01** se refiere al fraccionamiento de polifenoles de *Mangifera indica* mediante cromatografía de fluidos supercríticos en fase inversa (RP-SFC) a escala de planta piloto (página 445) y combina el uso de una fase móvil compuesta por CO₂ supercrítico con adición de solventes como metanol, etanol, y ácido fórmico en cantidades y condiciones de temperatura y presión como en la solicitud reivindicada (página 446, columna 2; página 449, 3.1) y, también, una fase estacionaria apolar o hidrofóbica con sílice en fase reversa C18 (página 446, columna 1) que permite el fraccionamiento de los polifenoles (página 447; página 449, 3.2) y obtener, entre otras, la fracción F4, que corresponde a fracciones concentradas de xantonas, en condiciones SFC semiindustriales divulgando que para la obtención de esta fracción se requiere aumentar el porcentaje del codisolvente a 25% (página 454, 3.5, cuarto párrafo, página 455, primera columna), anticipando las características técnicas de las reivindicaciones de la invención solicitada y afectando a la actividad inventiva.

También en otros documentos se divulga la utilización de dos fases, así:

- **D02** se refiere a columnas para fraccionamiento de extractos supercríticos con fase móvil y la fase estacionaria y divulga que el cambio de polaridad de la fase estacionaria aumenta la gama de compuestos polares que pueden ser analizados utilizando fases estacionarias de sílice (página 235, primera columna), además, la columna no polar da más eficacia y tiempo de elusión más rápido que la polar (página 237, 3.1.), si bien no divulga el porcentaje del codisolvente por lo que no anticipa la invención.

- **D03** divulga también que el enfoque del ajuste de la polaridad de la fase estacionaria aumenta el gama de compuestos polares analizados por SFC usando CO₂ puro y el uso de materiales ya sean a base de sílice o nuevos materiales como fase estacionaria (páginas 26, 34), pero no divulga la utilización de codisolventes por lo que se considera un documento del estado de la técnica.

- **D04** se refiere a la SFC y divulga que la cromatografía líquida de fase inversa es un activo atractivo para la evaluación de la pureza (página 568, 4.) La columna de relleno para la separación de los analitos más polares combinado con aditivos, p. e., con un gradiente de metanol en CO₂ con columna de cianopropil silíceo permite la separación en menos de 10 minutos (página 571, primera columna) pero tampoco divulga los porcentajes de codisolventes.

- **D05** se refiere a las xantonas de las plantas que se aíslan generalmente por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando diferentes mezclas de disolventes con el aumento de la polaridad (página 3, 3.).

- **D06** y **D07** contemplan la fase móvil de CO₂ y codisolventes pero no divulgan la fase estacionaria.

En resumen, el documento más relevante **D01** divulga la combinación de una fase móvil compuesta por CO₂ y una fase estacionaria apolar o hidrofóbica compuesta por sílice de fase reversa C18, también, la utilización de codisolventes para separar las fracciones, que para las xantonas puede llegar a 25-50%, y los parámetros de presión y temperatura reivindicados, anticipando, por lo tanto, la novedad de la invención y afectando a la actividad inventiva de todas las reivindicaciones.

Por ello, a la vista del documento D01, se puede concluir que las reivindicaciones **1 - 7** carecen de novedad de acuerdo con el Artículo 6 LP 11/86 y carecen de actividad inventiva según el Artículo 8 LP 11/86.