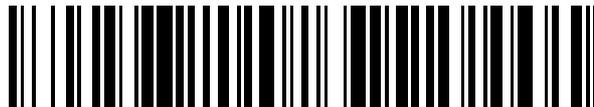


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 760**

51 Int. Cl.:

A61K 35/64 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2011 PCT/IB2011/051086**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11114291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11714664 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2547347**

54 Título: **Proceso para obtener propóleo no alérgico**

30 Prioridad:

16.03.2010 IT VR20100050

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

26.10.2016

73 Titular/es:

**RICCHIUTO, GIUSEPPE MARIA (100.0%)
Via Ciro Menotti 22
37126 Verona, IT**

72 Inventor/es:

**GARDANA, CLAUDIO SEBASTIANO y
GUGLIELMETTI, SIMONE DOMENICO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 587 760 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para obtener propóleo no alérgico

5 La presente invención se refiere a un proceso para obtener un derivado de propóleo que tiene un contenido reducido en sustancias alergénicas, provocando con ello que su uso en la salud humana está sustancialmente exento de contraindicaciones, a un método para tratar el propóleo el bruto, o uno de sus derivados, y a un derivado hidroalcohólico del propóleo para ser utilizado de modo ventajoso en el campo nutracéutico y cosmético.

El propóleo producido por las abejas (*Apis mellifera*) se obtiene a partir de exudados resinosos de la corteza y los brotes de hojas de plantas, por ejemplo, álamo, haya, abedul, castaño, pino, etc., que son recogidos y procesados por las abejas por medio de sus secreciones salivares y la adición de cera.

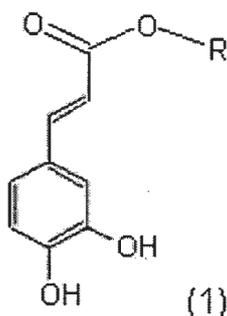
10 A temperatura ambiente, el propóleo tiene el aspecto de una sustancia pegajosa y maleable, un olor aromático y un color diferente dependiendo de la planta de origen. Su composición química depende de la planta original del exudado resinoso, así como del área de procedencia y de la estación en que se recoge. El propóleo que proviene de plantas del género *Populus* consiste en resina (20-55%), cera (30-40%), aceites volátiles (5-10%), y diversos compuestos fenólicos (10-30%) que incluyen, en particular, flavonoides. La porción fenólica también comprende
15 ácidos fenilalquílicos, tales como ácido cinámico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico y algunos de sus ésteres.

Debido a algunos de sus componentes, el propóleo tiene numerosas propiedades biológicas y farmacológicas, que incluyen actividades antibacterianas, antivíricas, antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, inmunoestimulantes, cariostáticas, antitumorales y anti-*Helicobacter pylori* (L. G. Coelho et al., "Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. A pilot clinical study", *Helicobacter*, vol. 12:572-574 (2007)).
20

Por estas propiedades, el uso de preparaciones basadas en propóleo se ha conocido desde hace mucho tiempo en la medicina popular, y las principales aplicaciones se relacionan con el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, gripe, acné, heridas, quemaduras, herpes, gingivitis y estomatitis, así como en la prevención de la caries. El propóleo también se emplea en el campo de los cosméticos para la formulación de cremas, ungüentos,
25 champús, lociones, geles y similares.

Sin embargo, además de sus muchos efectos beneficiosos, el uso de propóleo puede provocar algunos efectos no deseados, tales como sequedad bucal, ligeros trastornos gástricos y reacciones alérgicas de la piel (dermatitis por contacto alérgica) en personas particularmente sensibles (*Contact dermatitis*, vol. 17:163 (1987); *Pediatr. Dermatol.* vol. 22:1 (2005); *Contact dermatitis*, vol. 51:255 (2004)).

30 Estudios recientes (F. Giusti, "Sensitization to propolis in 1255 children undergoing patch testing", *Contact Dermatitis*, vol. 51:255-258 (2004)) han demostrado que estas reacciones alérgicas son atribuibles a una mezcla bien definida de componentes del propóleo, denominada LB-1, que consiste en ácido cafeico y algunos de sus ésteres de fórmula general (1)



en la que R puede ser: 3-metil-2-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 3-metil-3-butenilo, bencilo y feniletilo.

35 Estos compuestos están presentes en la fracción LB-1 en diferentes porcentajes, por ejemplo, cafeato de 3-metil-2-butenilo (54%), cafeato de 3-metil-3-butenilo (28%), cafeato de 2-metil-2-butenilo (4%), cafeato de feniletilo (8%), cafeato de bencilo (1%) y ácido cafeico (1%) (DeGroot A.C., Weyland J.W, Nater J.P., *Unwanted effects of cosmetics and drugs used in dermatology*, pp. 770, Elsevier, NY, 1994). Entre estos compuestos el cafeato de 3-metil-2-butenilo muestra el efecto más alergénico, según se indica en *Food Chem. Toxicology*, vol. 36:34763 (1998).

40 El propóleo también comprende ácido 3-metoxicafeico (o ácido ferúlico) y ésteres del ácido 3,4-dimetoxicafeico, aunque no se considera que tengan actividad alergénica (*Contact Dermatitis*, vol. 23:274-275, (1990)).

Para eliminar las reacciones alérgicas del propóleo se han sugerido métodos, tales como los descritos en el

documento de patente WO 2009/133073, en el que se describe un proceso químico o fisicoquímico para obtener un extracto de propóleo hipoalergénico eficaz. Este proceso comprende una serie de etapas, que incluyen la extracción del propóleo con un disolvente, tal como una mezcla de alcohol y agua, que se realiza a una temperatura mayor que 25°C, una primera separación de material insoluble a una temperatura de reacción igual a la temperatura ambiente, una segunda separación de sustancias insolubles a una temperatura menor que 0°C, y la eliminación del medio de extracción. Sin embargo, este método tiene algunos inconvenientes. En primer lugar, el tiempo de trabajo en general es largo, en especial porque la disminución en la temperatura proporcionada por el proceso debe producirse de modo gradual para permitir la formación y la precipitación cuantitativa de las sustancias prácticamente insolubles, lo cual requiere un control cuidadoso y preciso. Así, son necesarios unos equipos y/o plantas que aseguren una alta precisión en el control de la temperatura.

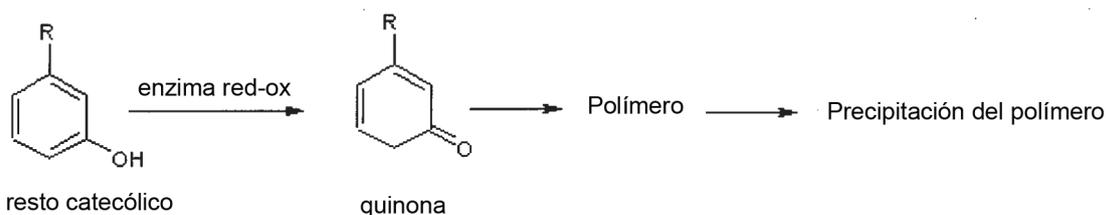
Otra desventaja es que la eliminación del material insoluble mediante precipitación y filtración nunca se produce completamente, puesto que, tal como se sabe, cada compuesto tiene una solubilidad específica en un disolvente, incluso si es muy baja. Así, para obtener los mejores resultados, es necesario repetir las etapas de precipitación y filtración. Es evidente que los costes de fabricación son obviamente altos.

Además, el método descrito anteriormente, puesto que no es selectivo, no puede asegurar que se mantenga la eficacia biológica/farmacológica del extracto obtenido. Sin embargo, el método descrito en la solicitud de patente WO 2009/133073 no muestra la reducción eficaz en el contenido de sustancias alergénicas del propóleo.

Otro método para eliminar las reacciones alergénicas del propóleo se describe en la solicitud de patente japonesa n.º 7-8185, que indica un método enzimático para eliminar algunas sustancias alergénicas del propóleo sin afectar a sus propiedades farmacológicas y provocar alergenicidad. En este documento de la técnica anterior, las sustancias que se indican como alergénicas son algunos ésteres del ácido cafeico, más en concreto ácido del cafeato de isoprenilo y cafeato de feniletilo, que se eliminan de modo enzimático por medio de una hidrolasa u oxidorreductasa. La hidrolasa es preferiblemente una esterasa, y más preferiblemente una carboxilesterasa, mientras que la oxidorreductasa es preferiblemente lacasa, tirosinasa, fenolasa, bilirrubina oxidasa o peroxidasa.

Según el documento JP-7-8185, las enzimas se seleccionan por su alta especificidad, y si se seleccionan las enzimas precisas se obtiene la degradación de los compuestos no deseados del propóleo. Para ilustrar esta teoría según el documento JP-7-8185, se han incubado patrones y propóleo junto con las enzimas, y después de la extracción se ha evaluado la cantidad residual de cafeato de isoprenilo y cafeato de feniletilo por medio de LC-UV o GC-FID.

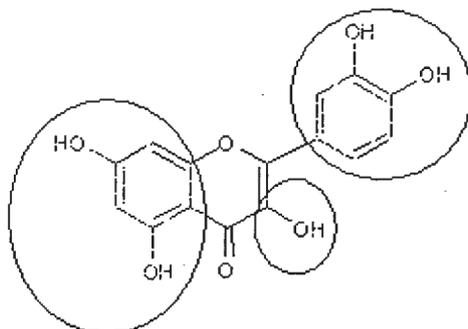
Los límites del método indicado en el documento JP-7 8185 son conceptuales y metodológicos. De hecho, las enzimas lacasa, tirosinasa, fenolasa, bilirrubina oxidasa o peroxidasa son enzimas de actividad oxidorreductora no específica. Estas enzimas realmente tienen un sustrato que incluye un resto fenólico o catecólico, que cambia a una quinona o diquinona, respectivamente, que conduce a una polimerización sucesiva de los productos.



El documento JP-7 8185 indica que se realiza una permeación en gel (LC-GPC-UV) para detectar el surgimiento de polímeros después de la reacción enzimática.

Sin embargo, cada flavonoide (la fracción activa del propóleo) incluye un resto fenólico o catecólico. Así, los flavonoides también son muy degradados por la oxidorreductasa. A continuación se muestra la estructura de un flavonoide, en la que los restos fenólicos o catecólicos pueden ser atacados por las enzimas de actividad oxidorreductora.

40



Según el documento JP-7 8185, no se evalúa el contenido en flavonoides antes y después de las reacciones enzimáticas y, por tanto, no es posible saber cómo cambia su contenido. Además, la dosificación de las sustancias alergénicas, es decir, el cafeato de isoprenilo y el cafeato de feniletilo, se ha realizado de una manera muy poco específica, más en particular en la medida en que está implicado el análisis de muestras de propóleo. Se han realizado evaluaciones por medio de cromatografía de gases con un detector de ionización de llama de hidrógeno (FID), que puede identificar los compuestos comparando solamente su tiempo de retención. Las determinaciones realizadas por medio de cromatografía líquida (HPLC-UV) son escasamente fiables, teniendo en cuenta la compleja estructura del propóleo y que las sustancias alergénicas son una parte minoritaria del propóleo y, así, para identificarlas y cuantificarlas de modo correcto debe utilizarse un método sensible y preciso para evitar que también se elimine una parte activa del propóleo (tal como los flavonoides).

Además, el procedimiento empleado en el documento JP-7 8185 para provocar una reacción de los sustratos con la enzima resulta cuestionable. En primer lugar, el propóleo se dispersa en etanol durante una semana, y después el grado alcohólico debe disminuirse con agua hasta 10%. Una pequeña fracción del líquido, concretamente 10 ml, debe hacerse reaccionar con la enzima (100 mg), y 8 horas después la mezcla debe destilarse y analizarse por medio de cromatografía de gases. Según este documento de la técnica anterior, el grado alcohólico debe reducirse para que la enzima actúe. Si la disolución es totalmente etanólica, la enzima puede desnaturalizarse y provocar una pérdida sustancial de actividad.

Además, las enzimas empleadas en el documento JP-7-8185 son caras, puesto que se obtienen de modo industrial.

Por consiguiente, evidentemente dicho procedimiento no puede industrializarse, puesto que el etanol y las enzimas son bastante caros.

Además, según el documento JP-7-8185, se emplea una cantidad que varía de 0,1 a 0,5 g de enzima por gramo de propóleo, o de 10 a 50 g de enzima si los tiempos de incubación varían de 1 a 3 días. Así, el método indicado en el documento JP-7-8185, además de ser caro también es largo e incompatible con las necesidades de la industria.

El documento EP-0 109 993 indica la preparación de extractos purificados de propóleo mediante una extracción con un disolvente orgánico durante un intervalo de tiempo que varía de 1 a 10 días, y un enfriamiento y una filtración de la suspensión obtenida de esta manera. El filtrado después se emplea para preparar diferentes formulaciones. Debido a este procedimiento, el extracto obtenido no es hidrodispersable, puesto que la alta cantidad de disolvente mantiene a la disolución en la porción grasa, que incluye una porción de ceras presente en el propóleo. El tiempo necesario para la extracción varía de 1 a 10 días, y este hecho, junto con la ausencia de control de la temperatura, hace que este método no pueda aplicarse correctamente a escala industrial. Así, el extracto obtenido de esta forma no está estandarizado ni es estandarizable.

El documento EP-0 109 993 también indica la extracción del propóleo bruto con disoluciones de etanol acuosas a una concentración de etanol que varía del 10% al 25% en volumen/volumen para obtener extractos hidrosolubles.

Los documentos CN-1 162 613 y WO-2009/133 073 describen un extracto hidroalcohólico de propóleo obtenido mediante la siguiente secuencia: la extracción del propóleo bruto con etanol para obtener una suspensión, una filtración para eliminar el sólido residual, el enfriamiento de la disolución hasta una temperatura de 0 °C o menor, y la filtración de la suspensión para eliminar los materiales insolubles y obtener un extracto purificado.

Los extractos obtenidos de esta manera no están estandarizados en el contenido de principios activos ni en la cantidad de grasas. Al final del proceso de extracción, si el disolvente (etanol) se evapora, es decir, se retira del extracto y después se añade más etanol para obtener un extracto titulado, se produciría un gasto exorbitante de materiales caros. Evidentemente, este proceso no puede realizarse a escala industrial, puesto que el etanol es un producto industrial muy caro, y durante el proceso se evapora y, así, se desperdicia.

Según los métodos descritos en los documentos de la técnica anterior mencionados anteriormente, no se puede establecer a priori y, por tanto, estandarizar, el contenido en principios activos del propóleo. Además, se dice que se

eliminan las sustancias alergénicas, pero no se indica ningún análisis con respecto a la evaluación real de su contenido y, así, dicha eliminación queda sin demostrar.

El principal objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para eliminar o sustancialmente reducir los componentes alergénicos contenidos en el propóleo bruto sólido.

- 5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de tratamiento y purificación del propóleo que mantiene sus características organolépticas y su contenido en principios activos típicos del propóleo bruto.

Otro objeto de la presente invención es que dicho proceso y métodos sean completamente seguros para el equipo de producción y para el usuario final del propóleo bruto.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método factible y barato para tratar y purificar el propóleo.

- 10 El proceso según la presente invención para pretratar el propóleo bruto está dirigido a reducir su contenido en compuestos alergénicos de la fórmula estructural general indicada anteriormente (1).

El proceso comprende sustancialmente una etapa de trabajo que incluye poner en contacto y hacer reaccionar el propóleo bruto o una preparación basada en propóleo con un microorganismo específico que comprende una o más enzimas que tienen actividad cinamoil-esterasa específica para obtener un derivado en estado semisólido.

- 15 De forma ventajosa, la enzima o enzimas que tienen actividad esterasa selectiva comprenden al menos una cinamoil esterasa.

Las enzimas que tienen actividad esterasa, en particular la cinamoil esterasa, se obtienen de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, algunos de los cuales se listan en la siguiente tabla 1, en la que también se listan una de sus fuentes.

- 20 Tabla 1. Microorganismos en los que están presentes enzimas que tienen actividad esterasa

Tipo	Especie	Fuente
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. paracasei</i>	Intestino humano
	<i>L. paracasei</i>	Leche fermentada
	<i>L. paracasei</i>	Colección de cultivos internacional
	<i>L. acidophilus</i>	Leche fermentada
	<i>L. acidophilus</i>	Colección de cultivos internacional
	<i>L. helveticus</i>	Iniciadores lácteos
	<i>L. casei</i>	Intestino humano
	<i>L. fermentum</i>	Intestino humano
	<i>L. rhamnosus</i>	Intestino humano; probióticos comerciales
<i>Carnobacterium</i>	<i>C. carnobacterium</i>	Carne
	<i>C. maltaromaticum</i>	Pescado
	<i>C. maltaromaticum</i>	Leche
	<i>C. divergens</i>	Carne
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	Queso
	<i>E. faecium</i>	Queso
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	Yogur
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	Heces humanas
	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces
	<i>B. longum</i>	Heces humanas

	<i>B. animalis</i> sottomsp. <i>lactis</i>	Producto comercial probiótico
	<i>B. adolescentis</i>	Heces humanas

Preferiblemente, la enzima cinamoil esterasa es producida por una serie de especies bacterianas de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* y, de modo específico, por cepas bacterianas de especies de *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis* y similares. Preferiblemente, la enzima cinamoil esterasa es producida por una cepa de *Lactobacillus helveticus* de origen lácteo denominada LH5.

Por tanto, la etapa de reacción del proceso según la presente invención comprende:

- inocular una serie de células bacterianas, por ejemplo, células de *Lactobacillus helveticus*, a un número mayor que 10^4 , preferiblemente que varía de 10^4 a 10^{20} , y más preferiblemente 10^{16} , en propóleo bruto, o uno de sus productos, habiéndose obtenido el inóculo a través de un crecimiento bacteriano en un medio de cultivo adecuado, tal como Man Rogosa Shape (MRS) o infusión de cerebro y corazón (BHI), seguido de centrifugación para eliminar cualquier sobrenadante;
- añadir una disolución acuosa de etanol, en la que el etanol está presente en un porcentaje en volumen menor que 100%, preferiblemente en el intervalo entre 5% y 20%, y preferiblemente a aproximadamente 10%, para producir una mezcla de reacción, generalmente una suspensión; e
- incubar la mezcla de reacción a una temperatura desde 20 °C a 47 °C, preferiblemente entre 30 °C y 42 °C, y más preferiblemente a 37 ± 2 °C durante un periodo de tiempo que varía de 30 minutos a 72 horas, preferiblemente 24 horas, para obtener un derivado, generalmente en estado semisólido.

De forma ventajosa, la disolución acuosa de etanol empleada en el proceso de la presente invención incluye uno o más agentes dispersantes, tales como polietilenglicol (PEG), preferiblemente polietilenglicol 400 (PEG 400) a una concentración preferiblemente menor que 40% en v/v, y más preferiblemente al 20% en v/v.

La composición cualitativa y cuantitativa de un derivado de propóleo obtenido mediante el proceso de la presente invención se determina preferiblemente mediante el método analítico espectroscópico y espectrométrico descrito continuación en la presente; en particular, se empleó un método analítico de UPLC para la determinación cuantitativa de los ésteres del ácido cafeico, mientras que se utilizó un método analítico de HPLC para determinar el contenido en flavonoides.

La realización práctica del proceso enzimático de la presente invención implica determinar las siguientes condiciones de ejecución:

1. selección de una cepa bacteriana adecuada;
2. determinación de la temperatura óptima para la actividad esterase en el propóleo bruto;
3. determinación del tiempo de incubación óptimo de las células bacterianas;
4. determinación del porcentaje óptimo de etanol que se va a utilizar en la primera etapa;
5. determinación del número óptimo de células bacterianas/g de propóleo;
6. síntesis de los compuestos de éster de fórmula general (1) como patrón analítico de referencia,
7. las condiciones de ejecución que se describirán en detalle a continuación.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para purificar el propóleo bruto, o un derivado del propóleo semisólido obtenido como se indicó anteriormente, que comprende las siguientes etapas en secuencia:

- se realiza una disolución con calor de propóleo pretratado de modo enzimático con un disolvente orgánico polar, preferiblemente etanol, más preferiblemente etanol del 60% al 90%, aún más preferiblemente etanol al 90%, para obtener una dispersión;
- el enfriamiento de la dispersión obtenida de esta manera hasta la temperatura ambiente para formar una suspensión de partículas sólidas en el disolvente orgánico;
- una filtración de las partículas sólidas para separarlas de la suspensión para obtener un filtrado;

y se realiza posteriormente al menos un ciclo, que incluye:

- un análisis químico del filtrado para determinar la titulación volúmica alcoholimétrica (o grado alcohólico), el residuo seco, y la concentración de flavonoides en peso;
- una dilución del filtrado con agua para ajustar la titulación volúmica alcoholimétrica;
- 5 ○ un enfriamiento del filtrado hasta una temperatura menor que 0 °C durante un periodo de tiempo de 8 a 30 horas, obteniendo con ello una dispersión;
- la separación de cualquier material insoluble de la dispersión para aislar un componente fluido;

tras lo cual se realizan las siguientes etapas:

- 10 ● un análisis químico cuantitativo del componente fluido para determinar la concentración en peso/volumen de los flavonoides; y
- el ajuste de la concentración del componente fluido para obtener un derivado hidroalcohólico con un contenido en flavonoides en el intervalo del 2,5% al 3,0% en p/v, preferiblemente del 2,6% en p/v.

De forma ventajosa, al menos un ciclo incluye:

- 15 ● una dilución del filtrado con agua para llevar la titulación volúmica alcoholimétrica a un valor en el intervalo del 70% al 80% en v/v;
- el enfriamiento del filtrado hasta una temperatura menor que 0 °C durante un tiempo en el intervalo de 8 a 30 horas para obtener una dispersión;
- la separación de cualquier material insoluble de la dispersión para aislar un componente fluido;
- 20 ● un análisis químico cuantitativo del componente fluido para determinar la concentración en peso/volumen de los flavonoides;
- una dilución del filtrado con agua para llevar la titulación volúmica alcoholimétrica a un valor en el intervalo del 60% al 70% en v/v;
- el enfriamiento del filtrado hasta una temperatura menor que 0 °C durante un tiempo en el intervalo de 8 a 30 horas para obtener una dispersión;
- 25 ● la separación de cualquier material insoluble de la dispersión para aislar un componente fluido;
- un análisis químico cuantitativo del componente fluido para determinar la concentración en peso/volumen de los flavonoides;
- una dilución del filtrado con agua para llevar la titulación volúmica alcoholimétrica a un valor en el intervalo del 50% al 60% en v/v;
- 30 ● el enfriamiento del filtrado hasta una temperatura menor que 0 °C durante un tiempo en el intervalo de 8 a 30 horas para obtener una dispersión; y
- la separación de cualquier material insoluble de la dispersión para aislar un componente fluido.

35 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un derivado hidrodispersable hidroalcohólico del propóleo obtenido mediante el método de purificación del propóleo bruto, o uno de sus derivados, ilustrado anteriormente, que es particularmente adecuado para su uso como agente nutracéutico o en la formulación de productos cosméticos.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de algunas de sus realizaciones actualmente preferidas, que se ilustran a continuación como realizaciones no limitantes de la invención.

40 **Parte experimental 1**

Abreviaturas

MRS: Man Rogosa Sharpe

BHI: Infusión de cerebro y corazón

LH5: *Lactobacillus helveticus* 5

PEG: Polietilenglicol

EtOH: Etanol

EtOAc: Acetato de etilo

5 THF: Tetrahidrofurano

DMAP: 4-*N,N*-dimetilaminopiridina

DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida

DCU: *N,N'*-diciclohexilurea

UPLC: Cromatografía líquida de ultrarresolución

10 HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

Método analítico

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de los ésteres del ácido cafeico de fórmula general (1) presentes en el propóleo bruto y/o en uno de sus derivados, se empleó un sistema de UPLC modelo Acquity (Waters), acoplado a un espectrómetro de masa cuádruple triple (MS/MS) equipado con una interfase de electronebulización y que actúa en el modo de ion negativo [ESI(-)]. Los análisis se realizaron bajo las siguientes condiciones experimentales: columna cromatográfica HSS C₁₈ (150 x 2,1 mm, 1,8 µm); temperatura de la columna: 60 °C; fase móvil: inicialmente (t = 0) eluyente A al 80% (ácido fórmico al 0,1% en agua) y eluyente B al 20% (acetonitrilo), después B del 20% al 35% en 2 min., después B del 35% al 45% en 2,5 min., después B del 35% al 45% en 10 seg., después B al 45% durante 40 seg., después B del 45% al 95% en 10 seg., después B al 95% durante 2 min., y después de vuelta a las condiciones iniciales en 30 seg.; volumen de inyección: 2 µl; caudal: 0,6 ml/min.

Espectrómetro de masas modelo Quattro micro (Micromass); interfase: ESI negativo, capilar: 3 kV; cono: 15 eV; gas de colisión: argón; presión de argón: 2,5 x 10⁻³ mbar; modo: control de múltiples reacciones (MRM); par de transición: 179→135 (para el ácido cafeico); 247→134 (para el cafeato de 3-metil-2-butenilo y el cafeato de 2-metil-2-butenilo); 247→135 (para el cafeato de 3-metil-3-butenilo); 269→135 (para el cafeato de bencilo) y 283→135 (para el cafeato de feniletilo).

El porcentaje de contenido en flavonoides en el propóleo bruto y/o su derivado se determinó empleando el sistema HPLC-DAD/MS [HPLC modelo Alliance 2695 (Waters) con una interfase de un detector de matriz de diodos (DAD) modelo 2996 (Waters) y un espectrómetro de masas (MS) modelo Quattro micro (Micromass)].

Los análisis se realizaron bajo las siguientes condiciones experimentales: columna cromatográfica Symmetry C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); temperatura de la columna: 40 °C; fase móvil: inicialmente (t = 0) eluyente A al 80% (ácido fórmico al 0,1% en agua) y eluyente B al 20% (acetonitrilo), después B del 20% al 35% en 6 min., después B del 35% al 45% en 40 min., después B del 45% al 65% en 10 min., después B al 65% al 95% en 10 min., después B al 95% en 10 min., y de vuelta a las condiciones iniciales en 3 min.; volumen de inyección: 20 µl; caudal: 1,5 ml/min.

Espectrómetro de masas modelo Quattro micro (Micromass); interfase: ESI negativo, capilar: 3 kV; cono: 20-40 eV; modo: barrido; intervalo de adquisición: 100-800 Da [C. Gardana et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 45(3):390-399 (2007)].

Etapas preliminares

1. Selección de la cepa bacteriana

En una fase preliminar, se identificaron y seleccionaron algunos microorganismos bacterianos intestinales y alimentarios, en los que se conoce la presencia de enzimas con actividad cinamoil-esterasa, por ejemplo, las bacterias listadas en la anterior tabla 1. Se evaluó la actividad cinamoil esterasa de estas bacterias empleando ácido clorogénico o ferulato de etilo como sustrato, empleando las siguientes condiciones experimentales:

Se suspendieron células de la especie bacteriana seleccionada (aproximadamente 10¹⁰ células) en 10 ml de una disolución de ácido clorogénico (sustrato, 0,1 mg/ml) en H₂O/EtOH en el que el porcentaje de EtOH en volumen es igual a 10%. Se realizó una incubación doble de las mezclas de reacción a 37 °C y, después de 24 horas, se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se analizó mediante el método analítico de HPLC-DAD para determinar el porcentaje de hidrólisis del sustrato (ácido clorogénico) para producir ácido cafeico.

Los resultados de los ensayos demostraron que las bacterias con la actividad enzimática más alta pertenecen al género *Lactobacillus*. Entre las bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* se seleccionaron diferentes

especies y cepas y se ensayaron para evaluar si la actividad cinamoil esterasa era específica de especie, y después para identificar las cepas que tienen la actividad enzimática selectiva más alta (cinamoil esterasa), que se determinó empleando dos sustratos diferentes, ácido clorogénico y ferulato de etilo, bajo las siguientes condiciones experimentales:

- 5 Se suspendieron células bacterianas (aproximadamente 10^{10}) en 10 ml de una disolución de ácido clorogénico o ferulato de etilo (sustrato, 0,1 mg/ml) en H₂O/EtOH en el que el porcentaje de EtOH en volumen es igual a 10%. Se realizó una incubación doble de las mezclas de reacción a 37 °C y, después de 24 horas, se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se analizó mediante el método analítico de HPLC-DAD para determinar el porcentaje de hidrólisis de los sustratos para producir ácido cafeico y ácido ferúlico, respectivamente.
- 10 Este experimento permite verificar si las enzimas presentes en las cepas bacterianas ensayadas tienen actividad esterasa selectiva o no selectiva. De hecho, ésteres de análogos del ácido ferúlico y ferulato de etilo están presentes en el propóleo bruto, pero no tienen efectos alérgicos. Los resultados obtenidos en este experimento se indican en la siguiente tabla 2, a partir de la cual puede observarse que la actividad cinamoil esterasa hidrolítica es mayor en algunas cepas de la especie *Lactobacillus helveticus*, que incluyen la cepa denominada LH5.

15 Tabla 2. Actividad enzimática de cepas que contienen enzimas cinamoil-esterasa

Tipo	Especie	Cepa	Actividad*		% hidrólisis
			ferulato de etilo	clorogénica	
<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>	MIMLH5	+++	+++	100
	<i>helveticus</i>	SIM7	+++	+++	100
	<i>helveticus</i>	CBT17	++	+++	92
	<i>helveticus</i>	LH22	+++	+++	91
	<i>helveticus</i>	LH28	++	++	70
	<i>helveticus</i>	LH23	++	+	<5
	<i>helveticus</i>	LH4	++	±	<5
	<i>helveticus</i>	LH164	++	-	NT
	<i>acidophilus</i>	ATCC4356	+++	++	81
	<i>acidophilus</i>	LA47	++	++	70
	<i>acidophilus</i>	LA48	+++	++	59
	<i>acidophilus</i>	LA51	+++	++	57
	<i>acidophilus</i>	LA53	++	++	55
	<i>acidophilus</i>	LA46	++	±	<5
	<i>acidophilus</i>	LA50	++	-	NT
	<i>fermentum</i>	LB12, LB18	++	±	<5
	<i>fermentum</i>	LB19	++	+	42
	<i>casei</i>	LB21, LB22	+	-	NT
	<i>rhamnosus</i>	GG	+	±	<5
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	SMT, TD1, TA15	+	-	NT

Leyenda: *, sin actividad; ±, poca actividad o actividad incierta; +, poca; ++, buena; +++, fuerte. NT, no ensayado.

2. Determinación de la temperatura óptima para la actividad enzimática en propóleo bruto

Se prepararon muchas mezclas de reacción según el siguiente procedimiento, que primero proporciona la

preparación de un inóculo (o base de células) que contiene un número determinado de células bacterianas.

Preparación del inóculo

5 Se incubó un preinóculo de *Lactobacillus helveticus* (LH5) a 37 °C durante aproximadamente 16 horas. Se incubaron 4 ml del inóculo resultante en medio MRS (150 ml) a 37 °C durante aproximadamente 16 horas para obtener un medio de caldo de cultivo que se sometió a un recuento celular. Se tomaron 4 ml del medio de caldo de cultivo como muestra y se centrifugó durante 5 min. a 2000 x g para separar las células del medio de caldo de cultivo y así obtener el inóculo deseado.

10 Una base de células de *Lactobacillus helveticus* LH5 (aproximadamente 10^{13} células) obtenido según el procedimiento descrito en el párrafo "Preparación del inóculo" se añadió a una disolución de H₂O/EtOH (9:1, 1 ml) que contenía 1 g de propóleo bruto.

15 Después se realizó una incubación doble de las mezclas de reacción durante 24, 48 y 72 horas a las siguientes temperaturas experimentales: 22, 26, 30, 34, 40, 44 y 47 °C. Después las mezclas se enfriaron, se extrajeron con acetato de etilo (3 x 20 ml) y se centrifugaron a 4000 x g durante 10 min. El disolvente de los sobrenadantes obtenidos se evaporó bajo un flujo de nitrógeno y los residuos se suspendieron en 100 ml de metanol. Las disoluciones obtenidas de este modo primero se diluyeron con metanol (1:10) y después se analizaron mediante UPLC-MS/MS.

Los resultados obtenidos se indican en la figura 1, que demuestra que la degradación de los ésteres del ácido cafeico, determinada como porcentaje residual de alergenicos, es decir, los ésteres de fórmula general (1) que también incluyen los ésteres del ácido cafeico, aparecen a una tasa mayor a una temperatura alrededor de 37 °C.

20 3. Determinación del tiempo de incubación óptimo para el inóculo de células bacterianas

Se realizaron experimentos según el siguiente procedimiento, en el que las temperaturas de incubación se encontraban en el intervalo de 6 a 72 horas.

De modo específico, los tiempos de incubación o de reacción se establecieron a 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 horas.

25 Se mezcló un inóculo de *Lactobacillus helveticus* LH5, que contenía 10^{13} células, preparado según el procedimiento descrito anteriormente en el párrafo "Preparación del inóculo", con 10,0 ml de una dispersión de propóleo bruto (10 g) que tiene una titulación conocida de ésteres del ácido cafeico, en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v. La mezcla se incubó a 37 °C y la reacción se detuvo después de un tiempo preestablecido (tal como se indica en el párrafo anterior) añadiendo etanol (90,0 ml). La mezcla de reacción después se extrajo con acetato de etilo y se evaluó la actividad enzimática mediante análisis de UPLC-MS/MS de los derivados del ácido cafeico (definidos como "alergenicos" en la gráfica), cuyos resultados se muestran en la figura 2.

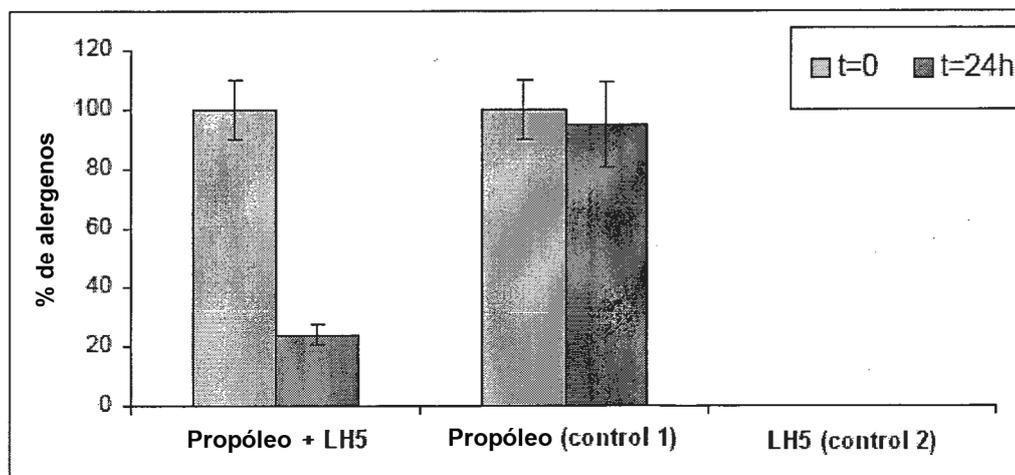
30

Los resultados obtenidos muestran una degradación de los ésteres del ácido cafeico de aproximadamente 80% después de 24 horas de tiempo de incubación. No se produjo un aumento estadísticamente significativo en la degradación en momentos posteriores.

35 Después se preparó otro inóculo de LH5 (10^{13} células) según el procedimiento experimental descrito anteriormente, y se hizo reaccionar con propóleo bruto titulado (10 g) que previamente se había dispersado en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v (10 ml). Se preparó el control 1 con el propóleo bruto titulado (10 g) en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v (10 ml), y se preparó el control 2 con un inóculo de LH5 (10^{13} células) en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v (10 ml).

40 Se realizó una incubación doble con las mezclas de reacción a 37 °C durante 24 horas y después se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml) y la mezcla orgánica obtenida se secó al vacío y el residuo se suspendió con EtOH para ser analizado cualitativa y cuantitativamente mediante UPLC-MS/MS y HPLC-DAD, y los resultados se indican en el histograma 1.

Histograma 1. Degradación de los ésteres alergénicos después del tratamiento del propóleo bruto durante 24 h con LH5



4. Determinación del porcentaje óptimo de EtOH (en v/v) para la actividad enzimática

5 Para determinar el porcentaje óptimo de EtOH en agua para la actividad enzimática se realizaron varios ensayos según el siguiente procedimiento experimental, en el que solo se cambió un volumen (o porcentaje) del EtOH usado de: 0 ml (0%), 0,5 ml (5%), 1,0 ml (10%), 1,5 ml (15%), 2,0 ml (20%), 2,5 ml (25%), 3,0 ml (30%), 3,5 ml (35%), 4,0 ml (40%), 4,5 ml (45%), 5,0 ml (50%), 6,0 ml (60%), 7,0 ml (70%), 8,0 ml (80%), 9,0 ml (90%), 10,0 ml (100%), respectivamente.

10 La base de células bacteriana obtenida con el procedimiento descrito anteriormente en el párrafo "Preparación del inóculo" se suspendió en 10 ml de una disolución de ácido clorogénico (sustrato, 1 mg) en H₂O/EtOH que se preparó con los porcentajes de EtOH indicados anteriormente. Se realizó una incubación doble de las mezclas de reacción a 37 °C durante 22 horas y después se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se analizó mediante el método analítico de HPLC-DAD-MS para determinar el porcentaje de hidrólisis del ácido clorogénico para producir ácido cafeico. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, en la que el porcentaje de EtOH > 20% tiene un efecto perjudicial sobre la actividad enzimática, mientras que un porcentaje de EtOH en el intervalo del 5% al 20% hace posible obtener una hidrólisis enzimática de aproximadamente 80%.

5. Determinación del número óptimo de células bacterianas

20 Para determinar el número óptimo de células bacterianas por gramo de propóleo bruto se realizaron diversos experimentos según el siguiente procedimiento, en el que el número de células bacterianas del inóculo utilizadas varía y se selecciona de: 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹, 10¹², 10¹³, 10¹⁴, 10¹⁵ y 10¹⁶, respectivamente.

25 Se añadió un inóculo de *Lactobacillus helveticus* LH5 obtenido como se describió anteriormente en el párrafo "Preparación del inóculo" y que contiene un número de células determinado (en el intervalo de 10⁴ a 10¹⁶, según se especifica en el párrafo anterior), a una dispersión de propóleo bruto (1,0 g) en 1,0 ml de una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v. La mezcla control consistió en propóleo y un inóculo de LH5 que contenía 10¹³ células en una disolución acuosa de etanol (al 10% en v/v, 1 ml). Se realizó una incubación doble de las mezclas de reacción a 37 °C durante 22 horas, después se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos y se extrajo un residuo de propóleo con EtOAc (3 x 10 ml). La mezcla orgánica se diluyó con EtOH y se analizó mediante UPLC-MS/MS para determinar el contenido en ésteres del ácido cafeico (por ejemplo, cafeato de 3-metil-2-butenilo) y HPLC-DAD/MS para determinar el contenido en flavonoides.

30 Los resultados del ensayo se muestran en la figura 4, en la que parece que, bajo las condiciones de ejecución reales, son necesarias 10¹⁰ células de LH5/g de propóleo bruto para lograr una reducción de aproximadamente 50% del cafeato de 3-metil-2-butenilo, que alcanza aproximadamente 80% con 10¹³ células/g de propóleo.

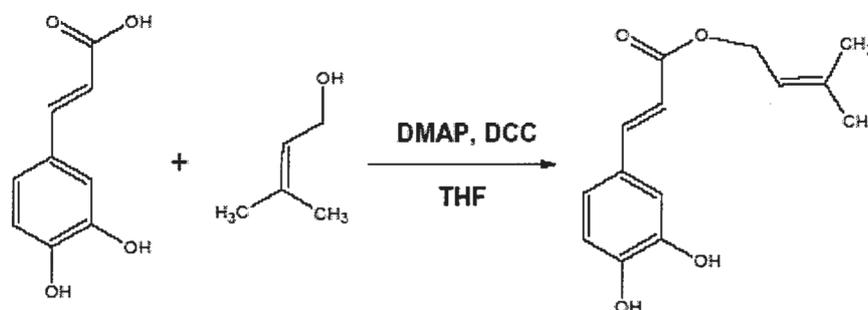
Por otra parte, en la tabla 3 se muestran los resultados de la determinación analítica (mediante el método de HPLC-DAD/MS) del contenido en principios activos (por ejemplo, flavonoides) de las muestras de propóleo pretratadas.

35 Tabla 3. Cantidad (%) de polifenoles en el propóleo bruto antes y después de un tratamiento enzimático con LH5

Componente	(%) Antes	(%) Después	Δ (%)
Ácido cafeico	0,49	1,1	+124
Ácido p-cumárico	1,51	1,71	+13
Ácido ferúlico	0,15	0,19	+26
Ácido isoferúlico	0,26	0,24	-7
Derivados de quercetina	22,2	21,9	-1,3
Crisina	3,07	2,96	-3,5
Pinocembrina	2,94	2,99	+1,7
Flavononas	1,7	1,72	+1,1
Acetato de pinobanksina	2,98	3,02	+1,3
Pinobanksina	0,92	0,90	-2
Pinobanksina-5-ME	0,44	0,48	+9
Galangina	2,74	2,81	+2,5

6. Síntesis de cafeato de 3-metil-2-butenilo como patrón analítico de referencia

Esquema sintético:



5 Se añadió 3-metil-2-buten-1-ol (170 μ l, 1,67 mmol) a una disolución de ácido cafeico (200 mg, 1,11 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 15 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta su completa disolución. Después se
10 añadió 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP; 13,6 mg, 0,11 mmol), la mezcla resultante se enfrió hasta aproximadamente 4 °C en un baño de agua helada y se añadió *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 229 mg, 1,11 mmol). La mezcla después se agitó a 4 °C durante aproximadamente 10 minutos, después se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente mediante la retirada del baño de agua helada y se agitó a esta temperatura durante
15 24 horas. La *N,N*-diciohexilurea (DCU) formada se retiró mediante filtración a través de un embudo Gooch y el disolvente de reacción bruto se evaporó a presión reducida (con un rotovapor). El residuo se suspendió en acetato de etilo y se volvió a filtrar para eliminar cualquier otra cantidad de DCU que pudiera haber precipitado. En un embudo de separación se lavó la disolución orgánica con HCl 0,1 N, salmuera (una disolución acuosa saturada de NaCl), y, por último, con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró hasta la sequedad para obtener un sólido bruto (107 mg), que después se purificó mediante HPLC semipreparativa bajo las condiciones descritas en el siguiente párrafo. Una etapa de purificación permitió obtener el producto deseado (90 mg, 0,36 mmol, rendimiento de 33%).

20 La purificación del cafeato de 3-metil-2-butenilo se realizó empleando un sistema cromatográfico que comprende un HPLC modelo Alliance 2695 (Waters), un recolector de fracciones modelo WFII (Waters) y un detector de matriz de diodos (DAD) modelo 2996 (Waters). Los análisis se realizaron bajo las siguientes condiciones experimentales: columna cromatográfica Symmetry C18 (250 x 4,6 mm, 10 μ m); temperatura de la columna: 40 °C; fase móvil: inicialmente eluyente A al 80% (ácido fórmico al 0,1% en agua) y eluyente B al 20% (acetonitrilo), después B del 20% al 40% en 10 min., después del 40% al 90% en 10 seg., después B al 90% durante 10 min., y después de vuelta a las condiciones iniciales en 3 min.; volumen de inyección: 200 μ l; caudal : 3 ml/min.

Ejemplo 1

Un inóculo de LH5 (10^{13} células/g) preparado según el procedimiento experimental descrito anteriormente se hizo reaccionar con propóleo bruto (10 g) en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v (10 ml) que contenía PEG 400 (al 20% en v/v).

- 5 Se preparó el control 1 con el propóleo bruto (10 g) en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v (10 ml) que contenía PEG 400 (al 20% en v/v), y se preparó el control 2 con un inóculo de LH5 (10^{14} células) en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v (10 ml) que contenía PEG 400 (al 20% en v/v).

10 Se realizó una incubación doble de las mezclas de reacción a 37 °C durante 24 horas, y después se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos para obtener un residuo semisólido. Se tomó una porción del residuo (1 g) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml) y la mezcla orgánica se diluyó con EtOH para los análisis cuantitativos y cualitativos de UPLC-MS/MS y HPLC-DAD.

Ejemplo 2

15 Dos inóculos de LH5 (10^{12} y 10^{13} células/g, respectivamente), preparados según el procedimiento descrito anteriormente, se hicieron reaccionar con propóleo bruto (1 kg) en una disolución acuosa de EtOH al 10% en v/v (2 l) que contenía PEG 400 (al 20% en v/v).

20 Se realizó una incubación doble de las mezclas de reacción a 37 °C durante 96 horas y se tomaron porciones de 10 g cada 24 horas. Las diversas porciones después se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos para obtener un residuo semisólido a partir de cada una. Una porción del residuo semisólido (1 g) se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). La mezcla orgánica obtenida se diluyó con EtOH para los análisis cuantitativos y cualitativos de UPLC-MS/MS y HPLC-DAD.

El propóleo bruto, o el propóleo pretratado según el proceso enzimático de la presente invención que proporciona un derivado de propóleo, generalmente en estado semisólido, se purifica o se empobrece en algunos de sus componentes según un método que hace posible preparar un derivado hidrodispersable e hidroalcohólico del propóleo para ser utilizado generalmente tal cual o en formulaciones de productos nutracéuticos y cosméticos.

25 Este método de purificación, que también es el objeto de la presente invención, comprende las siguientes etapas secuenciales:

- una disolución con calor con un disolvente orgánico polar, preferiblemente etanol, y preferiblemente etanol al 90%, para obtener una disolución (el término "calor" significa una temperatura mayor que 20 °C y menor que 60%);
- 30 • el enfriamiento de la disolución hasta la temperatura ambiente para formar una suspensión;
- la separación, generalmente mediante filtración, de las partículas sólidas en suspensión para obtener un filtrado;
- un análisis químico del filtrado para determinar la titulación volúmica alcoholimétrica (o grado alcohólico), el residuo seco, y la concentración de flavonoides en peso/volumen;
- 35 • una dilución del filtrado con agua para llevar la titulación volúmica alcoholimétrica (o grado alcohólico) a un valor en el intervalo del 70% al 80%, expresado en porcentaje de etanol en volumen/volumen;
- el enfriamiento del filtrado hasta una temperatura menor que 0 °C, preferiblemente entre 0 °C y -20 °C, durante un tiempo de 8 a 30 horas;
- 40 • la separación de los materiales insolubles, tales como cera y sustancias grasas, del filtrado, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración o decantación, para aislar un componente fluido;
- el análisis químico cuantitativo y cualitativo del componente fluido para determinar la concentración de flavonoides expresada en peso/volumen;
- una dilución del filtrado con agua para llevar la titulación volúmica alcoholimétrica (o grado alcohólico) a un valor en el intervalo del 60 al 70% expresado en porcentaje de etanol en volumen/volumen;
- 45 • el enfriamiento del filtrado hasta una temperatura menor que 0 °C, preferiblemente entre 0 °C y -20 °C, durante un tiempo en el intervalo de 8 a 30 horas;
- la separación del filtrado, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración o decantación, del material insoluble, por ejemplo, ceras o grasa, para aislar el componente fluido;

- un análisis químico cuantitativo del componente fluido para determinar la concentración en peso/volumen de los flavonoides;
- una dilución del filtrado con agua para llevar la titulación volúmica alcoholimétrica (o grado alcohólico) a un valor en el intervalo del 50 al 60%, expresado en porcentaje de etanol en volumen/volumen;
- 5 • el enfriamiento de la disolución hasta una temperatura menor que 0 °C, preferiblemente entre 0 °C y -20 °C, durante un tiempo en el intervalo de 8 a 30 horas para obtener una dispersión;
- la separación del filtrado, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración o decantación, del material insoluble, tal como grasa, para aislar el componente fluido;
- 10 • un análisis químico cuantitativo del componente fluido para determinar la concentración en peso/volumen de los flavonoides;
- el ajuste de la concentración del componente fluido para obtener un derivado hidrodispersable hidroalcohólico con un contenido en flavonoides que varía del 2,5% al 3,0% en p/v, preferiblemente del 2,6% en p/v.

15 Este ajuste de la concentración de la parte fluida puede realizarse mediante dilución con agua o mediante eliminación parcial del disolvente, generalmente mediante destilación, para alcanzar un contenido o titulación deseados de flavonoides.

20 Para las determinaciones analíticas de la titulación volúmica alcoholimétrica o grado alcohólico, el residuo seco y la concentración de flavonoides, se emplean los siguientes métodos analíticos para las determinaciones realizadas en el componente fluido como producto intermedio del proceso de la presente invención: método del alcoholómetro, método de pesado empleando una termobalanza, y método de HPLC-DAD, respectivamente.

Parte experimental 2

Métodos analíticos

1. Determinación de la titulación volúmica alcoholimétrica o grado alcohólico

25 La titulación volúmica alcoholimétrica (avt) se determinó mediante un destilador Super DEE SV y la balanza hidrostática electrónica Densimat. El software de procesamiento de datos fue Gibertini Alcosoft 2.

El equipo está conforme con los métodos oficiales descritos en la norma de EEC Regulation n.º 2676/90 de la comisión del 17 de septiembre, 1990, que determina los métodos analíticos comunitarios de la UE que se van a emplear en el campo vinícola.

30 La muestra que se va a analizar (100 ml) se coloca en primer lugar en una ampolla de destilación, seguido de la adición de reactivos adecuados (una mezcla de agua, disolución antiespumante, cloruro de sodio y alumbre de potasio) y después comienza la destilación. Durante la destilación, el destilado se recoge en un matraz calibrado y se coloca en el brazo de la balanza de precisión, deteniéndose la destilación cuando se obtiene una cantidad preestablecida del destilado. Por último, se obtiene el porcentaje de titulación volúmica alcoholimétrica en v/v (ml de alcohol etílico en una disolución de 100 ml) a partir de la densidad relativa del destilado (que habitualmente se lleva a 100 ml de volumen exacto) a 20 °C.

2. Determinación del residuo seco

Se determinó el residuo seco mediante el método oficial indicado en the European Pharmacopeia, 6ª ed., capítulo 2.2.32 "Loss on drying" empleando un analizador de humedad MB 35 (Ohaus Corporation).

40 En el método, la muestra que se va a analizar se coloca en el platillo de la balanza, que se ajusta de modo adecuado a cero. Se realiza la medición del residuo seco de la muestra a 105 °C cuando, después de la evaporación completa del disolvente, la muestra alcanza un peso constante. Los datos se expresan como porcentaje en p/p.

3. Determinación del contenido en flavonoides

45 El contenido en flavonoides (concentración expresada como g/100 ml o % en p/v) se estableció empleando el sistema HPLC-DAD [sistema HPLC con una interfase de un detector de matriz de diodos (DAD)] bajo las siguientes condiciones experimentales: columna cromatográfica Symmetry C18, 3,5 µm, 150 x 2,1 mm (Waters); temperatura de la columna: 30 °C; temperatura de las muestras: 20 °C; fase móvil: A: ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%; B: TFA al 0,1% en acetonitrilo; gradiente: B al 15-25% durante 10 min., B al 25%-40% en 30 min., B al 40%-55% en 15 min., B al 55%-70% en 20 min., B al 70%-90% en 2 min., y B al 90% durante 3 min.; caudal: 0,25 ml/min.; adquisición: 200-450 nm; longitud de onda de procesamiento: 290 nm.

Otros aspectos de las diversas etapas del método de purificación ilustrado en la presente serán evidentes a partir de la descripción detallada de la realización actualmente preferida, pero no limitante, de la presente invención.

Ejemplo 3

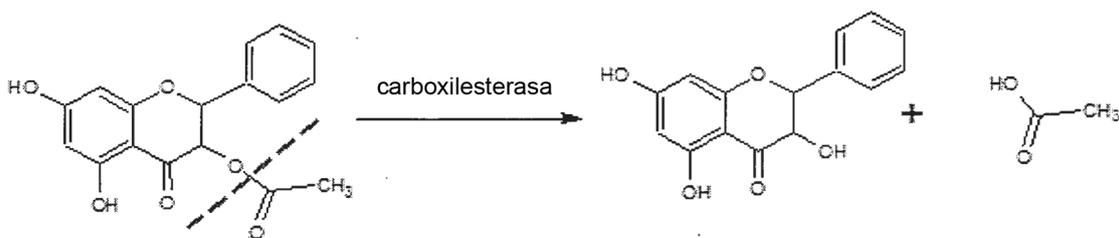
5 Un derivado de propóleo en estado semisólido (100 kg) se disolvió en etanol al 90% (282 l; proporción de derivado:etanol = aproximadamente 1:3 en p/v) agitando la mezcla a 38 °C durante aproximadamente 15 horas. La disolución se enfrió disminuyendo la temperatura hasta 20 °C en aproximadamente 7 horas, obteniendo así una suspensión que después se filtró, y el filtrado se recogió, se pesó (320 l) y se analizó para determinar su grado alcohólico, el residuo seco y el contenido en flavonoides. A partir del análisis se descubrió que el filtrado tenía un grado alcohólico de 76,8°, un residuo seco del 19,4% y una concentración de flavonoides del 6,5% en p/v. El filtrado se diluyó con agua (84 l) hasta alcanzar un grado alcohólico de 55-60%, después se enfrió hasta -15 °C en aproximadamente 15 horas y, por último, se centrifugó durante aproximadamente 7 minutos a 4 °C para eliminar cualquier material insoluble y obtener un sobrenadante (31 l). El sobrenadante se analizó mediante HPLC-DAD. El análisis demostró que el contenido en flavonoides era del 3% en p/v, que se disminuyó hasta 2,6% mediante una dilución con etanol al 96% (48 l) para obtener un derivado hidroalcohólico de propóleo (363 l) que tiene un grado alcohólico de 60 ± 1,5%.

El método indicado por el documento JP-7-8185 tiene una serie de desventajas en comparación con el método según la solicitud de invención, que se resumen a continuación.

20 En primer lugar, las enzimas utilizadas, sobre todo la oxidorreductasa, no son específicas y, por tanto, provocan una disminución notable en la cantidad de principios activos del propóleo, concretamente los flavonoides. Las oxidorreductasas se han mencionado anteriormente, mientras que las carboxilesterasas son menos invasivas que las oxidorreductasas, aunque hidrolizan los ésteres de flavonoides (por ejemplo, acetato de pinobanksina) y otros fenoles (por ejemplo, p-cumarato) que pueden encontrarse en el propóleo. Por tanto, las carboxilesterasas cambian la huella digital característica del extracto de propóleo.

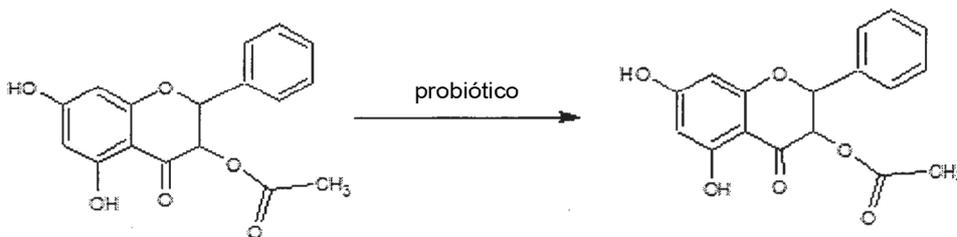
25 El proceso según la solicitud de invención, por el contrario, proporciona el uso de probióticos que tienen actividades enzimáticas, concretamente cinamoil-esterasa, que son específicas para los compuestos alergénicos del propóleo. En el proceso de la solicitud de invención, el contenido en flavonoides no cambia y el extracto de propóleo se mantiene lo más natural posible.

A continuación, el mecanismo de reacción del proceso de la presente invención se compara con el mecanismo de reacción de un método según el documento JP-7-8185, concretamente un método que emplea carboxilesterasa.



flavonoide contenido en el propóleo

flavonoide hidrolizado



flavonoide contenido en el propóleo

reacción no hidrolítica

30 Tal como se entiende, las enzimas obtenidas de modo industrial son muy caras y, por tanto, el método propuesto por el documento JP-7-8185 es caro y difícil de realizar a escala industrial. Por el contrario, el proceso de la solicitud de invención se realiza empleando probióticos, es decir, microorganismos que pueden producirse a coste bajo y en grandes cantidades y, así, este proceso puede ser adoptado de forma ventajosa por la industria.

Además, la oxidorreductasa provoca la formación de polímeros, que se incluirán en el extracto hidroalcohólico del propóleo.

5 Al final del método del documento JP-7-8185 se evalúa la disminución cuantitativa de los alérgenos en el propóleo. No se han sugerido análisis para evaluar el contenido en principios activos después del tratamiento enzimático. Por el contrario, al final del proceso según la solicitud de invención, se realizan evaluaciones específicas y cuantitativas con respecto a las sustancias alérgicas y los principios activos.

10 Además, según el documento JP-7-8185 (véase, por ejemplo, el párrafo [0030], ejemplo 3), es necesaria una gran cantidad de etanol para la etapa de extracción, el grado de alcohol después debe rebajarse con agua, el disolvente se elimina después de la reacción enzimática y, por último, se produce la dispersión en etanol. Evidentemente, este proceso no puede realizarse a escala industrial, debido al alto coste del etanol. Por el contrario, la presente solicitud proporciona una reducción sustancial en las sustancias alérgicas en el agua ambiental y una posterior extracción con un disolvente de tal forma que se evita el desperdicio no deseado de etanol, y hace posible aplicar el proceso de extracción en la industria.

15 Según el método del documento JP-7-8185 no puede obtenerse un propóleo estandarizado, y esto es un requisito fundamental para la industria herborística y farmacéutica. Por el contrario, según la presente solicitud es posible reducir la sustancias alérgicas y estandarizar el extracto hidroalcohólico y su hidrodispersibilidad.

20 Por lo que se refiere al proceso de extracción, el método de la presente solicitud se dirige a obtener extractos de propóleo hidroalcohólicos que son hidrodispersables y que están estandarizados con respecto al contenido en flavonoides y derivados del ácido cinámico (ácido fenólico). Estos extractos pueden utilizarse como tales para producir extractos de propóleo secados para obtener preparaciones sólidas (por ejemplo, comprimidos, ungüentos, caramelos), o jarabes, colutorios o preparaciones similares.

25 Más en concreto, el método de extracción y purificación de la presente invención proporciona un extracto titulado que incluye flavonoides a una concentración de 2,5 + 0,1% y ácidos fenólicos a una concentración de 0,5 + 0,1%. Además, el método de purificación permite reducir drásticamente el contenido en componentes grasos (ácidos grasos, triglicéridos de cadena corta y ceras) que se encuentran en el propóleo bruto. El extracto hidroalcohólico del propóleo, obtenido con el método de la solicitud de invención, incluye menos del 0,5% de componente graso.

30 La cantidad de grasas se determina gravimétricamente después de un reflujo con cloroformo-metanol (1:3, en v/v) en un extractor de Soxhlet. La cantidad reducida de "materia grasa" hace que el extracto hidroalcohólico de propóleo sea dispersable en agua, sin riesgo de que se produzcan micelas y frústulos como consecuencia de la precipitación del material insoluble.

La hidrodispersibilidad del extracto de propóleo obtenido con el método de la presente invención tiene un bajo contenido en materia grasa. Así, los componentes activos, los polifenoles, son absorbidos mejor a un nivel entérico después de la administración oral. La parte grasa, de hecho, actuará como barrera pasiva para la absorción de nutrientes y fitocompuestos, afectando así a su actividad sistémica.

35 Por consiguiente, los inventores de la presente solicitud proporcionan un método de purificación fraccionada que permite reducir sustancialmente el contenido en grasas, manteniendo así inalterada la parte activa del propóleo. La estandarización y la hidrodispersibilidad hace que el extracto hidroalcohólico de propóleo de la presente invención sea un producto exclusivo en el campo fitoterapéutico y farmacológico.

40 Además, las características mencionadas anteriormente distinguen al método de la presente invención con respecto a cualquier método de la técnica anterior.

Con respecto al documento EP-0 019 993, puesto que el porcentaje de etanol utilizado es demasiado bajo, es imposible extraer la parte grasa del propóleo y su parte activa, los flavonoides. Ensayos de laboratorio han demostrado que los flavonoides en el propóleo se extraen cuantitativamente con una disolución de etanol al menos 60% o mayor (en v/v) y a una temperatura en el intervalo de 35 a 45 °C.

45 También debe advertirse que, en este documento de la técnica anterior, no se ofrecen pruebas con respecto a la extracción de grasas y flavonoides, mientras que el producto obtenido según el método de la presente invención incluye una cantidad de principios activos que está estandarizada y el contenido en grasas es menor que 0,5%.

50 Según la presente invención, durante la primera etapa, las sustancias alérgicas del propóleo bruto son reducidas drásticamente por un microorganismo, y el propóleo pretratado después se extrae y se purifica para obtener un extracto de propóleo hidroalcohólico hidrodispersable que tiene una titulación conocida.

55 El propóleo bruto se titula inicialmente para determinar la cantidad de compuestos activos y alérgenos. Después el propóleo bruto se pretrata con un microorganismo que tiene actividad cinamoil-esterasa, que solo hidroliza los alérgenos. El propóleo pretratado después se extrae con etanol a una temperatura controlada y, después de un intervalo de tiempo predeterminado, el residuo sólido se retira y se evalúa el contenido en compuestos activos, alérgenos, el grado alcohólico y el residuo seco del líquido obtenido.

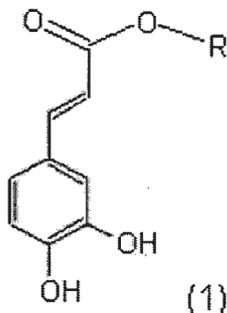
Basándose en los resultados obtenidos de esta manera se realiza una purificación fraccionada añadiendo agua y un corto enfriamiento de la dispersión. La purificación fraccionada con agua no se menciona ni se indica en los documentos de la técnica anterior mencionados anteriormente. En el método de la presente invención, los componentes grasos se eliminan gradualmente sin alterar o variar la cantidad de principios activos. El método puede adaptarse a cualquiera propóleos que tengan diferente origen etnogeográfico, lo cual significa a propóleos que tengan un contenido en principios activos y alérgenos diferente. Además, según el método de la presente invención, no se desperdicia etanol, y se obtiene una mayor cantidad de extracto hidroalcohólico.

Estas ventajas, junto con la estandarización del producto, hacen que el método de la presente invención sea aplicable a nivel industrial y económicamente ventajoso.

10 El proceso enzimático de la presente invención para pretratar el propóleo es susceptible a numerosas variaciones dentro del alcance definido por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1.- Un proceso para pretratar propóleo que comprende al menos una sustancia alergénica de fórmula general (1)



5 en la que R es un alquilo o alqueniilo seleccionado del grupo que comprende 3-metil-2-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 3-metil-3-butenilo, bencilo y feniletilo,

que se caracteriza porque

10 el propóleo bruto se hace reaccionar con un microorganismo que comprende al menos una enzima de origen bacteriano que tiene actividad cinamoil-esterasa para obtener un derivado del propóleo semisólido que sustancialmente carece o está empobrecido en sustancias alergénicas; y dicha enzima con actividad esterasa selectiva es producida por al menos una bacteria de un género seleccionado del grupo que comprende *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, o es producida por al menos una cepa bacteriana de una especie seleccionada del grupo que comprende *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium adolescentis*; y dicha reacción comprende:

- 15 - la inoculación de un número de células bacterianas en el intervalo de 10^4 a 10^{20} , preferiblemente 10^{16} ;
- 20 - la adición de una disolución acuosa de etanol, en la que el contenido en etanol varía de aproximadamente 5% a aproximadamente 20% en volumen, preferiblemente 10% en v/v, obteniendo con ello una mezcla de reacción; y,
- la incubación de dicha mezcla de reacción a una temperatura que varía de 20 °C a 47 °C, durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 72 horas, obteniendo con ello un derivado, generalmente un derivado semisólido.

25 2.- Un proceso según la reivindicación 1, que se caracteriza porque dicha disolución acuosa de etanol contiene al menos un agente dispersante.

3.- Un proceso según la reivindicación 2, que se caracteriza porque dicho al menos un agente dispersante comprende polietilenglicol, preferiblemente polietilenglicol 400.

4.- Un proceso según cualquier reivindicación de 1 a 2, que se caracteriza porque dicha temperatura de incubación está en el intervalo de 30 °C a 42 °C, preferiblemente $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

30 5.- Un proceso según cualquier reivindicación de 1 a 3, que se caracteriza porque dicho periodo de incubación es de aproximadamente 24 horas.

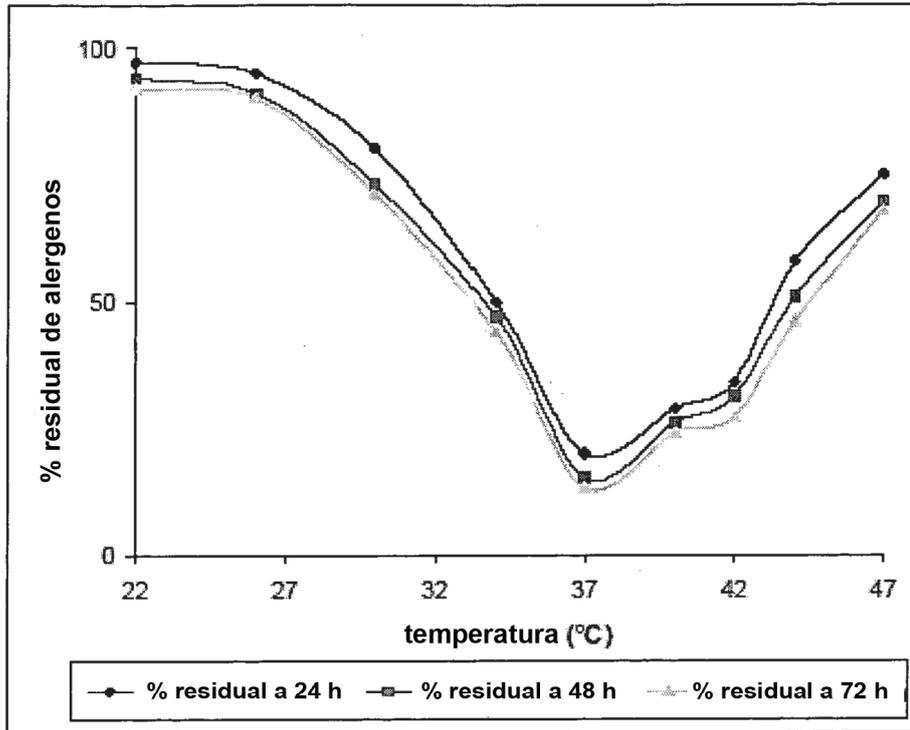


Fig. 1: Efecto de la temperatura de incubación sobre la degradación de los ésteres del ácido cafeico

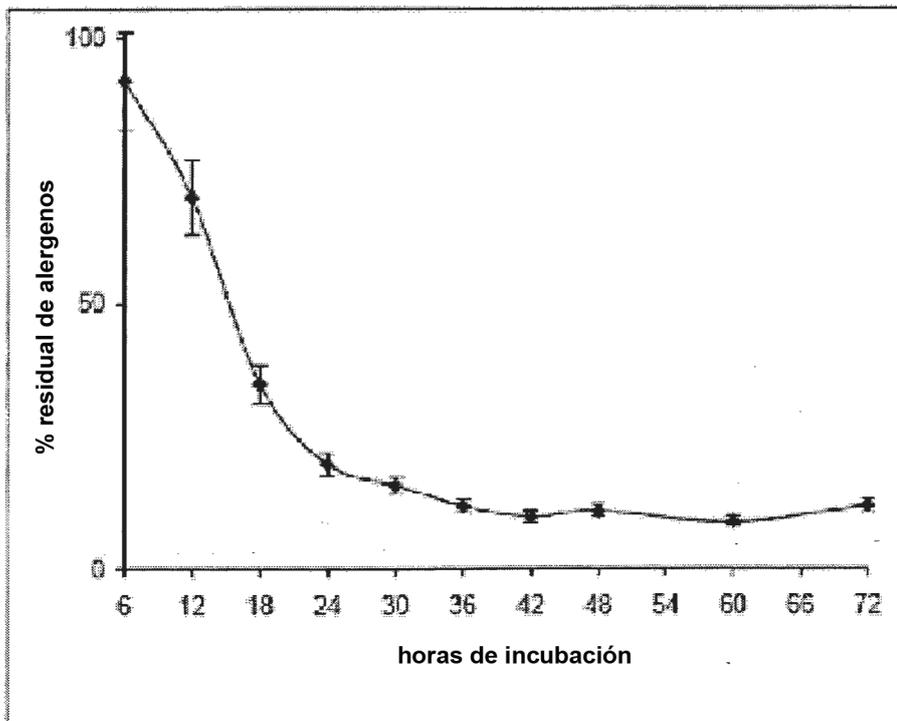


Fig. 2: Efecto del tiempo de incubación sobre la degradación de los ésteres del ácido cafeico

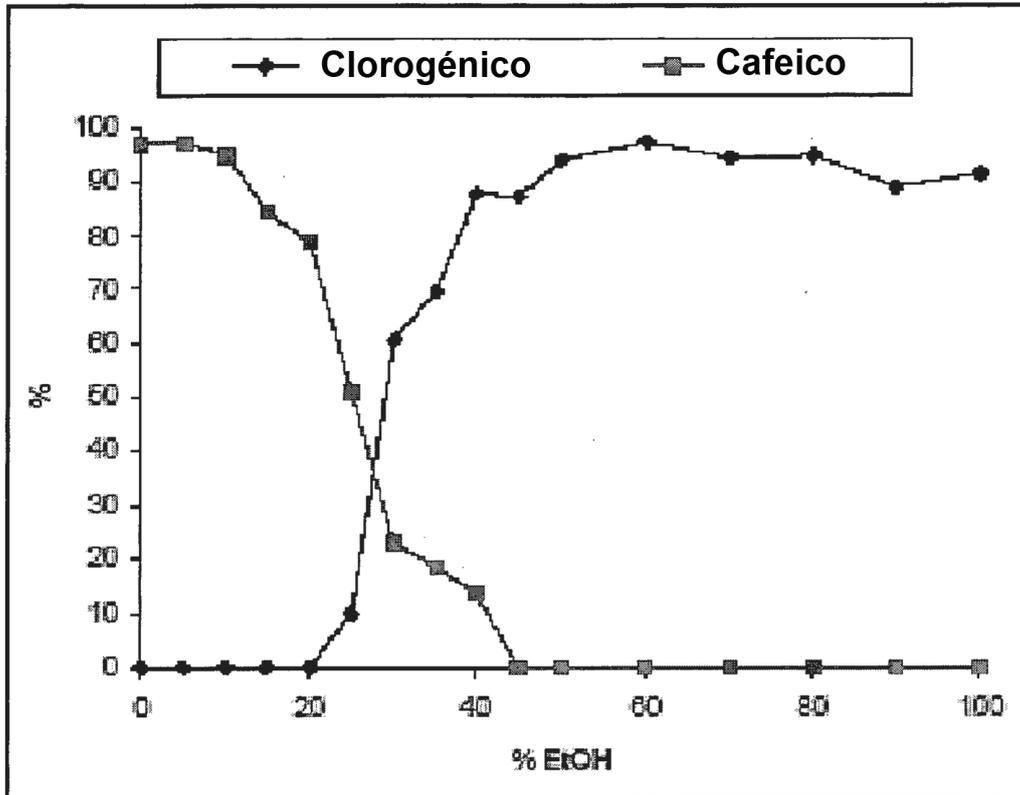


Fig. 3: Efecto del porcentaje de etanol sobre la actividad cinamoil esterasa

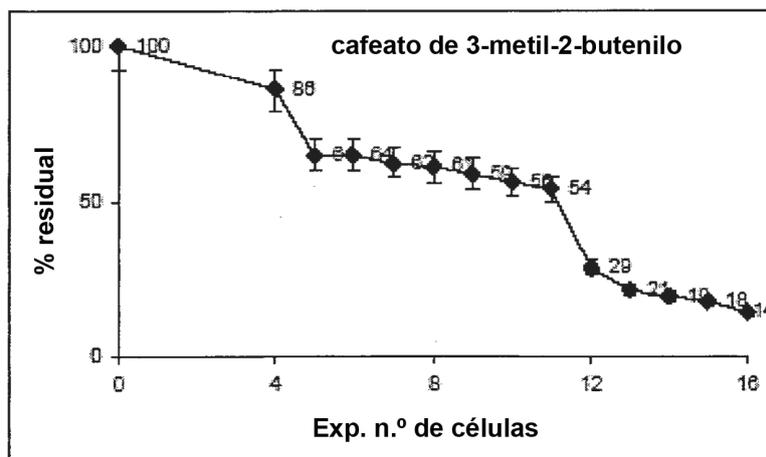


Fig. 4: Degradación del cafeato de 3-metil-2-butenilo dependiendo del número de células bacterianas