

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 578**

51 Int. Cl.:

C07C 49/713 (2006.01)

C07C 69/16 (2006.01)

C07C 69/28 (2006.01)

A23K 20/10 (2006.01)

A23K 20/121 (2006.01)

C07C 69/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2014 PCT/CN2014/073654**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15123905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2014 E 14882819 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 3098214**

54 Título: **Monoésteres o sales de monoésteres del hexahidro-beta-ácido y aplicación de los mismos como aditivos para piensos de animales**

30 Prioridad:

19.02.2014 CN 201410056734

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

16.03.2018

73 Titular/es:

**GUANGZHOU INSIGHTER BIOTECHNOLOGY CO., LTD (100.0%)
No. 415 Building D Guangzhou International Business Incubator No.3 Juquan Road
Guangzhou Science Park Guangzhou Hi-Tech Industrial Development
Guangzhou, Guangdong 510663, CN**

72 Inventor/es:

**PENG, XIANFENG;
QIN, ZONGHUA y
HUANG, JIJUN**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 659 578 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

Monoésteres o sales de monoésteres del hexahidro-beta-ácido y aplicación de los mismos como aditivos para piensos de animales.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los piensos para aves de corral y ganado, específicamente a monoésteres o sales de monoésteres del hexahidro-β-ácido y a la aplicación de los mismos como aditivos para piensos de animales.

Antecedentes de la invención

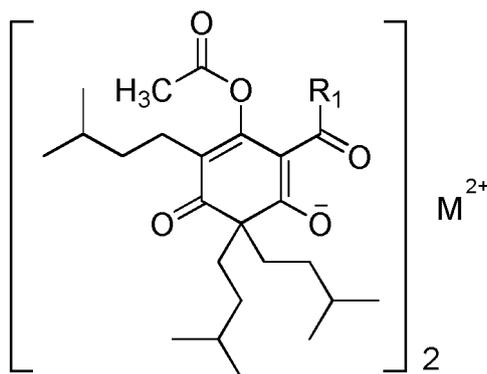
Una pluralidad de patentes US, tales como los documentos US8197863B2, US8012516B2, US20080213342A1, US20060269588, US20040219240, US7090873, US20060134248, US8012516, US20110311663, US7553504, US20130018106 y US6251461, y una pluralidad de patentes europeas, tales como los documentos EP2606742A1, EP1542543A1, EP2429311A2 y EP1722635A2, han divulgado la aplicación de ácidos de lúpulo y β-ácidos hidrogenados como sustitutos de promotores del crecimiento antibióticos que se utilizan en piensos. El documento WO2009/098300 divulga compuestos para su utilización como aditivos para piensos para animales. No obstante, en las patentes mencionadas anteriormente se menciona la aplicación de extractos de lúpulo o de ácidos de lúpulo (por ejemplo, una mezcla de α-ácidos y β-ácidos) como aditivos para piensos de los ya incluidos en el catálogo de aditivos para piensos chino pero que sirven solo como condimento para piensos. En segundo lugar, los fundamentos de las patentes son principalmente resultados de ensayos *in vitro* más que de ensayos de alimentación. Además, no existen datos que demuestren la inocuidad y la estabilidad de estos productos naturales, o de las sales y los ésteres de los mismos, como aditivos para piensos para animales.

Los hexahidro-β-ácidos también se mencionan en las patentes mencionadas anteriormente, pero hasta la fecha no se ha informado de la aplicación de los ésteres, sales o sales de ésteres de los mismos como aditivos para piensos para animales.

Sumario de la invención

El primer objetivo de la presente invención es proporcionar monoésteres o sales de ésteres de acetato de hexahidro-β-ácidos que sean más estables, puedan promover el crecimiento de animales y se utilicen preferentemente como aditivos para piensos.

Las sales de ésteres de acetato del hexahidro-β-ácido de la presente invención presentan la fórmula estructural que se representa en la fórmula (II):

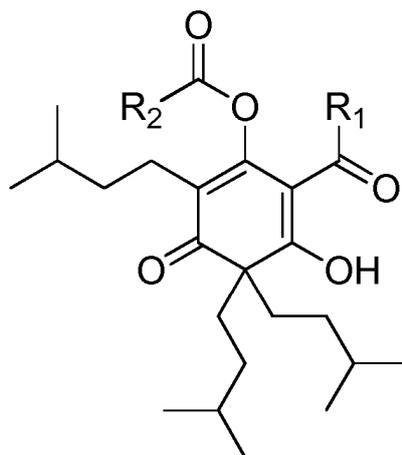


Fórmula (II).

R₁ es isopropilo, isobutilo o sec-butilo; M es un ion metálico divalente de, por ejemplo, cobre, cinc, manganeso, cobalto, hierro, calcio o magnesio.

Las sales de ésteres de acetato del hexahidro-β-ácido se refieren principalmente a las sales formadas mediante la coordinación entre un ion metálico divalente (tal como cobre, cinc, manganeso, cobalto, calcio o magnesio) y dos grupos hidroxilo fenólicos presentes por separado en dos ésteres de acetato del hexahidro-β-ácido.

Los monoésteres de hexahidro-β-ácidos de la presente invención presentan la fórmula estructural que se muestra en la fórmula (III):



Fórmula (III).

R₁ es isopropilo, isobutilo o sec-butilo; R₂ es -(CH₂)_nCH₃ y n=0~16.

5

La presente invención incluye asimismo la aplicación de las sales de ésteres de acetato o los monoésteres de hexahidro-β-ácido mencionados anteriormente en la preparación de aditivos para piensos promotores del crecimiento de animales.

10 Dichos animales incluyen cerdos, pollos, patos, gansos, bovinos de carne, bovinos de leche, ovejas, peces, gambas, zorros, martas o mapaches, en todas las etapas de crecimiento.

El pienso promotor del crecimiento de animales es un pienso de fórmula completa. Una dosis del compuesto que se representa en la fórmula (II) o (III) como aditivo para piensos promotores del crecimiento de animales es de 15 0,1~200 ppm en el pienso de fórmula completa.

El hexahidro-β-ácido incluye principalmente hexahidro-lupulona, hexahidro-adlupulona y hexahidro-colupulona, que se han divulgado en la técnica anterior.

20 Las sales de ésteres de acetato del hexahidro-β-ácido incluyen la sal de calcio, la sal de magnesio, la sal de cobre, la sal de cinc, la sal de manganeso, la sal de hierro y la sal de cobalto del éster de acetato del hexahidro-β-ácido.

Los monoésteres del hexahidro-β-ácido incluyen ésteres comprendidos entre el éster de acetato y el éster de hexadecanoato del hexahidro-β-ácido.

Los compuestos de la presente invención que se representan en las fórmulas (II) y (III) presentan una baja toxicidad o no presentan ninguna toxicidad para los animales, y presentan una estabilidad más elevada y unos mejores efectos de promoción del crecimiento que los divulgados en otras patentes, lo que los hace más adecuados para aplicarlos como promotores del crecimiento que se utilizan en piensos, y presentan unas posibilidades de aplicación muy buenas en la industria de los cultivos.

30

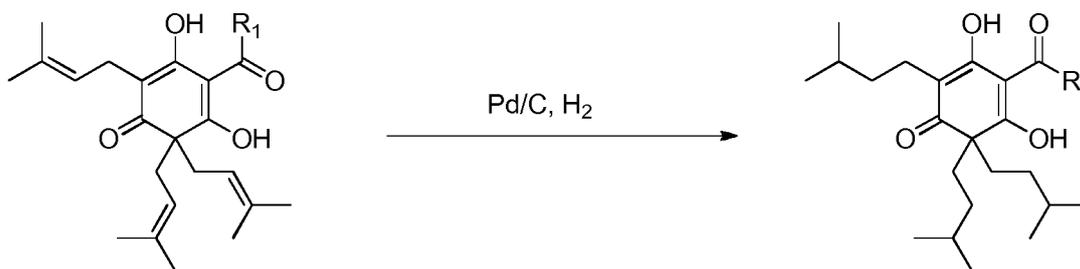
Descripción detallada de las formas de realización

35 La presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a las formas de realización no limitativas de la presente invención.

Forma de realización 1: Extracción de β-ácido

40 Se dispusieron 1 kg de extractos de lúpulo, 1 l de etanol absoluto y 90 g de hidróxido de potasio (que estaba disuelto en 100 ml de agua) en un recipiente de 5 l y se agitaron a temperatura ambiente obteniéndose una mezcla uniforme. Se añadieron a la mezcla 3 l de agua del grifo con agitación, se agitó durante una hora, se dejó en reposo durante 30 minutos y se filtró para eliminar grasa y materiales insolubles. El filtrado se recogió y las capas se separaron. Se hizo pasar CO₂ gaseoso a través de la fase acuosa, lo que produjo una gran cantidad de precipitado. Después se añadieron a la fase acuosa 1,2 l de solución acuosa de hidróxido de potasio al 10%, seguidos de la adición de 200 ml de n-hexano, y las capas se separaron. La fase orgánica y la capa oleosa se eliminaron. La fase acuosa se recogió, se ajustó con una solución acuosa de ácido de fosfato al 20% y se extrajo con 1 l de n-hexano. La fase orgánica resultante se concentró al vacío, obteniéndose aproximadamente 400 g de producto bruto de β-ácido (el contenido era de aproximadamente 90%).

45

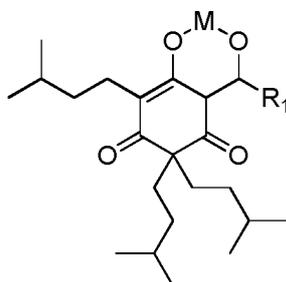
Forma de realización 2: Síntesis de hexahidro-β-ácido

5 $R_1 = -CH(CH_3)_2, -CH_2CH(CH_3)_2, -CH(CH_3)(CH_2CH_3)$

En un reactor de hidrogenación se dispusieron aproximadamente 360 g del producto bruto de β-ácido, seguidos de etanol al 95% para obtener un volumen total de 2,5 l, y eventualmente 36 g de paladio al 10% sobre carbono. Se inició la agitación y el reactor se purgó tres veces con nitrógeno y a continuación tres veces con hidrógeno. Después se prolongó la reacción durante 12~15 horas a temperatura ambiente a una presión de 0,6~0,7 MPa. Después de completar la reacción, la solución resultante se filtró para eliminar el paladio sobre carbono. El filtrado se concentró al vacío para eliminar 3/4 del disolvente, se añadieron 3,5 l de agua del grifo con agitación, se agitó durante aproximadamente 1~2 horas y, a continuación, se sometió a filtración con succión. Los sólidos se recogieron como hexahidro-β-ácido, aproximadamente 340 g después de secarlo durante la noche a 50°C.

Forma de realización 3: Síntesis de sales complejas internas de hexahidro-β-ácido

La síntesis de derivados de sales del hexahidro-β-ácido es tal como se muestra a continuación, siendo la primera etapa la formación de sal de potasio mediante la reacción entre el grupo hidroxilo e hidróxido de potasio, seguida de la formación de la sal correspondiente mediante reemplazo del potasio por otro metal.



25 $R_1 = -CH(CH_3)_2, -CH_2CH(CH_3)_2, -CH(CH_3)(CH_2CH_3)$

Procedimiento**Forma de realización 3.1: Preparación de la sal de cobre del hexahidro-β-ácido (IST_011_011)**

30 Se disolvieron 5,0 g de hexahidro-β-ácido en 15 ml de etanol al 95%. Se disolvieron 2,1 g de hidróxido de potasio en 32 ml de agua. La solución de hidróxido de potasio se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido y la mezcla resultante se agitó, obteniéndose la sal de potasio. Después se disolvieron 5,0 g de cloruro de cobre dihidratado en 30 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de la sal de potasio. Después, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 5,4 g de sólidos de color azul oscuro (sal de cobre del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente el 93%.

Forma de realización 3.2: Preparación de la sal de magnesio del hexahidro-β-ácido (IST_011_012)

40 Se disolvieron 5,0 g de hexahidro-β-ácido en 15 ml de etanol. Se disolvieron 1,8 g de hidróxido de potasio en 20 ml de agua. La solución de hidróxido de potasio se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido y la mezcla resultante se agitó durante 1 hora. Se disolvieron 2,9 g de cloruro de magnesio hexahidratado (1 eq) en 20 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de la sal de potasio. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora, obteniéndose unos sólidos blancos, y a continuación se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 5,0 g de sólidos de color blanco (sal de magnesio del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 97% (figura 1).

Forma de realización 3.3: Preparación de la sal de calcio del hexahidro-β-ácido (IST_011_013)

Se disolvieron 5,0 g de hexahidro-β-ácido en 15 ml de etanol al 95%. Se disolvieron 1,9 g de hidróxido de potasio en 32 ml de agua. La solución de hidróxido de potasio se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido y la mezcla resultante se agitó, obteniéndose la sal de potasio. Se disolvieron 3,4 g de cloruro de calcio en 20 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de la sal de potasio. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 4,4 g de sólidos de color amarillento (sal de calcio del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 80% (figura 2).

Forma de realización 3.4: Preparación de la sal de cinc del hexahidro-β-ácido (IST_011_014)

Se disolvieron 6,0 g de hexahidro-β-ácido en 15 ml de etanol al 95%, seguidos de la adición de 1,8 g de hidróxido de potasio, y después se agitó, obteniéndose la sal. A la solución resultante se le añadieron 3,0 g de cloruro de cinc y se agitó durante 1 hora, después se añadieron gota a gota 20 ml de agua y se agitó durante 1 hora, y se añadieron 60 ml de agua y se agitó durante 2 horas. Después, la solución se filtró, la torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 6,8 g de sólidos de color amarillento (sal de cinc del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 99% (figura 3).

Forma de realización 3.5: Preparación de la sal de manganeso del hexahidro-β-ácido (IST_011_015)

Se disolvieron 5,0 g de hexahidro-β-ácido en 15 ml de etanol al 95%. Se disolvieron 2,0 g de hidróxido de potasio en 32 ml de agua. La solución de hidróxido de potasio se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido y la mezcla resultante se agitó, obteniéndose la sal de potasio. Se disolvieron 4,3 g de cloruro de manganeso en 50 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de la sal de potasio. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 5,6 g de sólidos de color amarillo (sal de manganeso del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 98% (figura 4).

Forma de realización 3.6: Preparación de la sal de cobalto del hexahidro-β-ácido (IST_011_016)

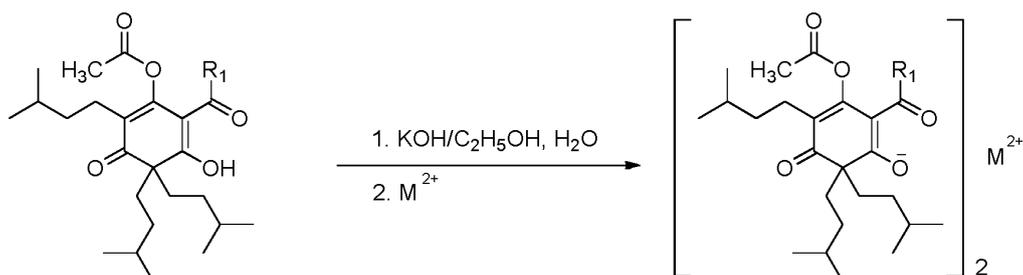
Se disolvieron 5,0 g de hexahidro-β-ácido en 15 ml de etanol al 95%. Se disolvieron 2,0 g de hidróxido de potasio en 32 ml de agua. La solución de hidróxido de potasio se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido y la mezcla resultante se agitó, obteniéndose la sal de potasio. Se disolvieron 7,0 g de cloruro de cobalto hexahidratado en 50 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de la sal de potasio. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 5,3 g de sólidos de color amarillento (sal de cobalto del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 93% (figura 5).

Forma de realización 3.7: Preparación de la sal ferrosa del hexahidro-β-ácido (IST_011_017)

Se disolvieron 6,1 g de hexahidro-β-ácido en 24 ml de etanol al 95%, seguidos de la adición de 2,0 g de hidróxido de potasio, y después se agitó, obteniéndose la sal. A la solución resultante se le añadieron 4,6 g de sulfato ferroso heptahidratado y se agitó durante 1 hora, a continuación se añadieron gota a gota 20 ml de agua y se agitó durante 1 hora, y se añadieron 60 ml de agua y se agitó durante 2 horas. A continuación, la solución se filtró, la torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 6,1 g de sólidos de color marrón (sal ferrosa del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 88% (figura 6).

Forma de realización 4: Síntesis de derivados de sal del éster de acetato de hexahidro-β-ácido

La síntesis de derivados de sal del éster de acetato del hexahidro-β-ácido es tal como se muestra a continuación, siendo la primera etapa la formación de sales de potasio mediante la reacción entre el grupo hidroxilo e hidróxido de potasio, seguida de la formación de la sal correspondiente mediante el reemplazo del potasio por otro metal.



Procedimiento**Forma de realización 4.1: Preparación de la sal de cobre del éster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_004)**

5 Se disolvieron 5 g del éster de acetato del hexahidro-β-ácido en 40 ml de etanol al 95%. La solución resultante se enfrió a 0°C con agitación, y a continuación se añadieron 95 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio al 1% gota a gota en un periodo de aproximadamente 20 minutos. Se disolvieron 2,0 g de cloruro de cobre dihidratado en 20 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de potasio. Después, la mezcla
10 resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 4,5 g de sólidos de color verde oscuro (sal de cobre del éster de acetato del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 83% (figura 7).

Forma de realización 4.2: Preparación de la sal de magnesio del éster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_005)

15 Se disolvieron 5,3 g del éster de acetato del hexahidro-β-ácido en 40 ml de etanol al 95%. La solución resultante se enfrió a 0°C con agitación, y a continuación se añadieron 100 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio al 1% gota a gota en un periodo de aproximadamente 0,5 horas. Se disolvieron 0,98 g de sulfato de magnesio en 10 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de potasio. A continuación, la mezcla
20 resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 4,8 g de sólidos de color amarillento (sal de magnesio del éster de acetato del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 87% (figura 8).

Forma de realización 4.3: Preparación de la sal de calcio del éster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_006)

25 Se disolvieron 5,3 g del éster de acetato del hexahidro-β-ácido en 40 ml de etanol al 95%. La solución resultante se enfrió a 0°C con agitación, y a continuación se añadieron 100 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio al 1% gota a gota en un periodo de aproximadamente 0,5 horas. Se disolvió 1,0 g de cloruro de calcio en 10 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de potasio. A continuación, la mezcla
30 resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 2,5 g de sólidos de color amarillento (sal de calcio del éster de acetato del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 46% (figura 9).

Forma de realización 4.4: Preparación de la sal de cinc del éster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_007)

35 Se disolvieron 5,0 g del éster de acetato del hexahidro-β-ácido en 40 ml de etanol al 95%. A la solución resultante se le añadieron 95 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio al 1% gota a gota en un periodo de aproximadamente 20 minutos. Se disolvieron 0,9 g de cloruro de cinc en 20 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de potasio. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 2,5 g de sólidos de color amarillento (sal de cinc del éster de acetato del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 46% (figura 10).
40

Forma de realización 4.5: Preparación de la sal de cobalto del éster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_009)

45 Se disolvieron 10,4 g del éster de acetato del hexahidro-β-ácido en 80 ml de etanol al 95%. La solución resultante se enfrió a 0°C y se añadieron 200 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio al 1% gota a gota en un periodo de aproximadamente 0,5 h, seguidos de la adición de 4,5 g de cloruro de cobalto hexahidratado. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 8,0 g de sólidos de color marrón (sal de cobalto del éster de acetato del hexahidro-β-ácido), con un
50 rendimiento de aproximadamente 73% (figura 11).

Forma de realización 4.6: Preparación de la sal de manganeso del éster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_008)

55 Se disolvieron 10,5 g del éster de acetato del hexahidro-β-ácido en 80 ml de etanol al 95%. La solución resultante se enfrió a -5°C y se añadieron 200 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio al 1% gota a gota en un periodo de aproximadamente 20 minutos. Se disolvieron 1,9 g de cloruro de manganeso en 30 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de potasio. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 8,0 g de sólidos de color marrón oscuro (sal de manganeso del éster de acetato del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de
60 aproximadamente 72%.
65

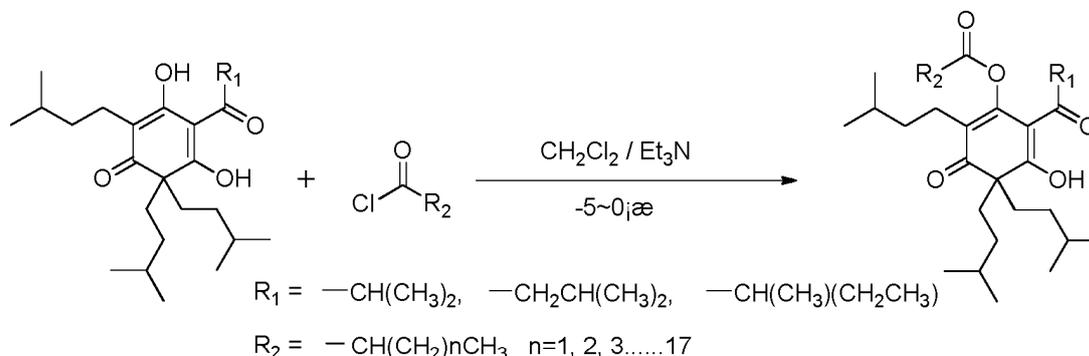
Forma de realización 4.7: Preparación de la sal ferrosa del éster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_010)

Se disolvieron 10,5 g del éster de acetato del hexahidro-β-ácido en 80 ml de etanol al 95%. La solución resultante se enfrió a -5°C y se añadieron 200 ml de solución acuosa de hidróxido de potasio al 1% gota a gota en un periodo de aproximadamente 20 minutos. Se disolvieron 5,0 g de FeSO₄·7H₂O en 30 ml de agua, y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de potasio. A continuación, la mezcla resultante se agitó durante 1 hora y se filtró. La torta del filtro se lavó con agua y se secó, obteniéndose 5,0 g de sólidos de color rojo-marrón (sal de manganeso del éster de acetato del hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de aproximadamente 45% (figura 12).

Forma de realización 5: Síntesis de monoésteres del hexahidro-β-ácido (IST_011)

Se formaron diversos derivados de monoésteres de hexahidro-β-ácido mediante la reacción entre hexahidro-β-ácido y cloruro de acilo con trietilamina como base y dicloruro de metano como disolvente. A continuación se presenta un esquema de la preparación de los derivados de éster objetivo. Deberá evitarse que el agua tome parte en la preparación.

Ecuación de reacción:



20

Forma de realización 5.1: Preparación de monoéster de acetato del hexahidro-β-ácido (IST_011_001)

Se disolvieron 20 g de hexahidro-β-ácido (con un peso molecular de 420) en 200 ml de dicloruro de metano, seguidos de la adición de 4,8 g de trietilamina (con un peso molecular de 101,19). La mezcla resultante se enfrió a -5~0°C con agitación. Se disolvieron 3,9 g de cloruro de acetilo (con un peso molecular de 78,5) en 20 ml de dicloruro de metano y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido en un periodo de 0,5 h. Después se prolongó la reacción durante 1 hora, supervisada mediante HPLC. Después, la mezcla se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añadieron 40 ml de agua pura, se agitó y las capas se separaron. La fase orgánica se lavó con 100 ml de agua tres veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se sometió a descompresión para eliminar el disolvente, proporcionando 22,6 g de producto oleoso (monoéster de acetato de hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de 104% (figura 13).

Forma de realización 5.2: Preparación de monoéster de decanoato del hexahidro-β-ácido (IST_011_002)

Se disolvieron 20,4 g de hexahidro-β-ácido (con un peso molecular de 420) en 100 ml de dicloruro de metano, seguidos de la adición de 4,8 g de trietilamina (con un peso molecular de 101,19). La mezcla resultante se enfrió a -5~0°C con agitación. Se disolvieron 9,8 g de cloruro de decanoilo (peso molecular: 190,71, d: 0,92) en 50 ml de dicloruro de metano y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido en un periodo de 0,5 h. A continuación se prolongó la reacción durante 1 hora, supervisada mediante TLC. A continuación, la mezcla se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añadieron 40 ml de agua pura, se agitó y las capas se separaron. La fase orgánica se lavó con 50 ml de agua tres veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se descoloró sobre gel de sílice y el disolvente se eliminó, proporcionando 27,5 g de producto oleoso (monoéster de decanoato de hexahidro-β-ácido), con un rendimiento de 102% (figura 14).

45

Forma de realización 5.3: Preparación de monoéster de estearato del hexahidro-β-ácido (IST_011_003)

Se disolvieron 10,0 g de hexahidro-β-ácido (con un peso molecular de ~420) en 40 ml de dicloruro de metano, seguidos de la adición de cloruro de estearoilo (con un peso molecular de 302,9). La mezcla resultante se enfrió a 0°C. Se disolvieron 2,4 g de trietilamina (con un peso molecular de 101,19) en 6 ml de dicloruro de metano y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de hexahidro-β-ácido en un periodo de 0,5 h. Se continuó con la reacción durante 2 horas, supervisada mediante TLC. A continuación, la mezcla se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añadieron 50 ml de agua pura. No se observó separación de líquidos

50

diferentes. Después se añadieron a la mezcla 5 g de cloruro de sodio y se agitó, las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y después el disolvente se eliminó, proporcionando 16,9 g de producto oleoso (monoéster de estearato de hexahidro- β -ácido), con un rendimiento de 103% (figura 15).

5 Forma de realización 5.4: Preparación del éster de butirato del hexahidro- β -ácido (IST_011_018)

Se disolvieron 5,0 g de hexahidro- β -ácido (con un peso molecular de ~420) en 40 ml de dicloruro de metano, seguidos de la adición de 1,8 g de cloruro de butirilo (con un peso molecular de 106,6). La mezcla resultante se enfrió a 0°C. Se disolvieron 3 ml de trietilamina (con un peso molecular de 101,19) en 6 ml de dicloruro de metano y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de hexahidro- β -ácido en un periodo de 0,5 h. A continuación se prolonga la reacción durante 2 horas, supervisada mediante TLC. A continuación, la mezcla se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de agua pura, se agitó y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó. Después se realizó una cromatografía en columna, obteniéndose 2,4 g de producto oleoso (éster de butirato del hexahidro- β -ácido), con un rendimiento de 40% (figura 16).

Forma de realización 5.5: Preparación del éster de caprilato del hexahidro- β -ácido (IST_011_019)

Se disolvieron 5,0 g de hexahidro- β -ácido (con un peso molecular de ~420) en 40 ml de dicloruro de metano, seguidos de la adición de 2,9 g de cloruro de caprililo (con un peso molecular de 162,6). La mezcla resultante se enfrió a 0°C. Se disolvieron 3 ml de trietilamina (con un peso molecular de 101,19) en 6 ml de dicloruro de metano y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de hexahidro- β -ácido en un periodo de 0,5 h. A continuación se continuó con la reacción durante 2 horas, supervisada mediante TLC. A continuación, la mezcla se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de agua pura, se agitó y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó. A continuación se realizó una cromatografía en columna, obteniéndose 3 g de producto oleoso (éster de caprilato del hexahidro- β -ácido), con un rendimiento de 46% (figura 17).

Forma de realización 5.6: Preparación del éster de laurato del hexahidro- β -ácido (IST_011_020)

Se disolvieron 5,0 g de hexahidro- β -ácido (con un peso molecular de ~420) en 40 ml de dicloruro de metano, seguidos de la adición de 4,2 ml de cloruro de lauroilo (con un peso molecular de 218,8). La mezcla resultante se enfrió a 0°C. Se disolvieron 3 ml de trietilamina (con un peso molecular de 101,19) en 6 ml de dicloruro de metano y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de hexahidro- β -ácido en un periodo de 0,5 h. A continuación se prolongó la reacción durante 2 horas, supervisada mediante TLC. A continuación, la mezcla se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de agua pura, se agitó y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó. A continuación se realizó una cromatografía en columna, obteniéndose 4 g de producto oleoso (éster de laurato del hexahidro- β -ácido), con un rendimiento de 53% (figura 18).

Forma de realización 5.7: Preparación del éster de cetilato del hexahidro- β -ácido (IST_011_021)

Se disolvieron 5,0 g de hexahidro- β -ácido (con un peso molecular de ~420) en 40 ml de dicloruro de metano, seguidos de la adición de 5,5 ml de cloruro palmítico (con un peso molecular de 274,9). La mezcla resultante se enfrió a 0°C. Se disolvieron 3 ml de trietilamina (con un peso molecular de 101,19) en 6 ml de dicloruro de metano y la solución resultante se añadió gota a gota a la solución de hexahidro- β -ácido en un periodo de 0,5 h. A continuación se prolongó la reacción durante 2 horas, supervisada mediante TLC. A continuación, la mezcla se dejó en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente, se añadieron 50 ml de agua pura, se agitó y las capas se separaron. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó. A continuación se realizó una cromatografía en columna obteniéndose 3,5 g de producto oleoso (éster de cetilato del hexahidro- β -ácido), con un rendimiento de 44% (figura 19).

Forma de realización 6: Ensayo de termoestabilidad de ésteres y/o sales del hexahidro- β -ácido

Los ésteres y/o las sales del hexahidro- β -ácido preparados en las formas de realización anteriores se mezclaron con mazorca de maíz en polvo para obtener premezclas con una fracción en masa de 2%. Las muestras (las premezclas) se dispusieron en crisoles, y a continuación se dispusieron en un horno a 100°C durante diferentes periodos de tiempo. A continuación se dispuso 1,0 g de cada una de las muestras (tres muestras duplicadas de cada muestra) y 50 ml de etanol en un matraz cónico, seguidos de la adición de 100 μ l de ácido clorhídrico concentrado. A continuación la mezcla se sometió a sonicación durante 5 minutos y después se filtró. El filtrado se transfirió a un matraz volumétrico de 50 ml, que se rellenó hasta su volumen final con etanol, y a continuación se filtró utilizando una membrana microporosa de 0,45 μ m y se sometió a análisis por HPLC.

Los resultados del ensayo de estabilidad se presentan en la tabla 1. Los resultados mostraron que se mejoró la estabilidad térmica de cada uno de los ésteres y/o las sales de hexahidro- β -ácido.

Tabla 1: Cambio del componente principal de los ésteres y/o las sales de hexahidro- β -ácido después de calentarlos a 100°C durante diferentes periodos de tiempo

Compuesto	Contenido inicial (%)	Contenido cuando se han calentado a 100°C durante 20 h (%)	Contenido cuando se han calentado a 100°C durante 44 h (%)
Hexahidro- β -ácido	2,0	0,06	0
Monoéster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,52	1,11
Monoéster de decanoato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,93	1,82
Sal de cobre del éster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,50	1,28
Sal de magnesio del éster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,42	0,7
Sal de calcio del éster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,21	0,31
Sal de cinc del éster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,64	0,70
Sal de manganeso del éster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	0	0
Sal de cobalto del éster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	0,17	0,12
Sal ferrosa del éster de acetato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,69	1,63
Sal de magnesio del hexahidro- β -ácido	2,0	1,49	0,91
Sal de calcio del hexahidro- β -ácido	2,0	0,35	0,09
Sal de magnesio del hexahidro- β -ácido	2,0	0,95	0,52
Sal ferrosa del hexahidro- β -ácido	2,0	0,14	0,05
Éster de butirato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,74	0,69
Éster de caprilato del hexahidro- β -ácido	2,0	2,0	1,51
Éster de laurato del hexahidro- β -ácido	2,0	2,0	1,96
Éster de cetilato del hexahidro- β -ácido	2,0	1,98	1,93

5 Forma de realización 7: Efecto de la aplicación en pienso para pollos

Se dividieron aleatoriamente 500 pollos de pluma amarilla de crecimiento rápido, sanos, de 1 día de edad (hembras) en la misma etapa de crecimiento y con un peso similar en cinco grupos según la tabla 2, 100 pollos en cada grupo. Los pollos de cada grupo se alimentaron con diferentes dosis de monoéster de decanoato del hexahidro- β -ácido o de hexahidro- β -ácido.

Los pollos se mantuvieron en jaulas y se alimentaron con alimento y agua a voluntad durante un periodo de ensayo de 30 días, en el que la ganancia de peso y la eficacia de conversión de pienso de los pollos alimentados con monoéster de decanoato de hexahidro- β -ácido se mejoraron significativamente, y la mejora en la productividad de los pollos alimentados con monoéster de decanoato de hexahidro- β -ácido fue más significativa que la de los pollos alimentados con hexahidro- β -ácido en la misma dosis (tabla 3).

Tabla 2: Agrupamiento de animales sometidos a ensayo y dosis de aditivos

Grupo	Cantidad de los pollos	Aditivo	Dosis	Administración
1	100	-	-	-
2	100	Hexahidro- β -ácido	2 ppm	Mezclado con la alimentación
3	100	Monoéster de decanoato del hexahidro- β -ácido	2 ppm	Mezclado con la alimentación
4	100	Hexahidro- β -ácido	20 ppm	Mezclado con la alimentación
5	100	Monoéster de decanoato del hexahidro- β -ácido	20 ppm	Mezclado con la alimentación

:- control en blanco, al que no se le añadió ni monoéster de decanoato de hexahidro- β -ácido ni hexahidro- β -ácido

Tabla 3: Efecto de la aplicación de monoéster de decanoato de hexahidro- β -ácido y de hexahidro- β -ácido al pienso para pollos

Grupo	Peso inicial (g)	Tasa de supervivencia (%)	Ganancia de peso media (g)	Consumo (kg)	Ganancia de peso diaria media (g)	Eficacia de conversión del pienso
1	39,0	100	738	154,64	24,6	2,09
2	39,0	100	745	147,76	24,83	1,983
3	39,3	100	768	147,94	25,6	1,926
4	39,2	100	758	149,18	25,26	1,968
5	39,5	100	797	146,42	26,57	1,837

Forma de realización 8: Efecto de la aplicación en pienso para cerdos

- 10 Se dividieron aleatoriamente 120 cerdos magros resultantes de cruces Duroc-Yorkshire-Landrace de 67 días de edad con un peso similar en seis grupos, 20 cerdos en cada grupo. Los cerdos de cada grupo se alimentaron con monoéster de cetilato de hexahidro- β -ácido con los tipos y las dosis presentados en la tabla 4. Los cerdos se alimentaron a voluntad con agua y pienso durante 14 días, en los que la ganancia de peso y la eficacia de conversión de pienso de los cerdos alimentados con monoéster de cetilato de hexahidro- β -ácido se mejoraron significativamente. Los grupos y los resultados del ensayo fueron tal como se muestran en la tabla 4 y en la tabla 5.

Tabla 4: Agrupamiento de los animales y dosis de aditivos

Grupo	Cantidad de cerdos	Aditivo	Dosis (mg/kg)	Administración
1	20	-	-	-
2	20	-	-	-
3	20	Éster de cetilato del hexahidro- β -ácido	5	Mezclado con la alimentación
4	20	Éster de cetilato del hexahidro- β -ácido	25	Mezclado con la alimentación
5	20	Éster de cetilato del hexahidro- β -ácido	5	Mezclado con la alimentación
6	20	Éster de cetilato del hexahidro- β -ácido	25	Mezclado con la alimentación

:- control en blanco, al que no se le añadió éster de cetilato del hexahidro- β -ácido

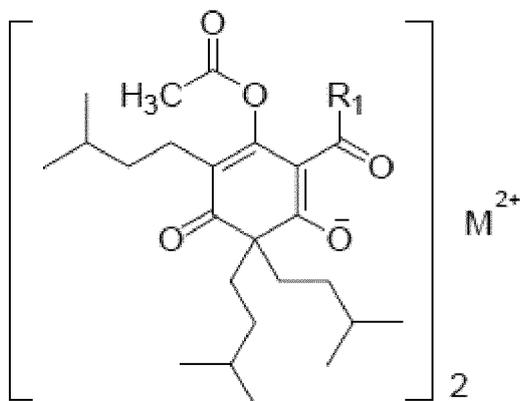
Tabla 5: Efecto de la aplicación del éster de cetilato del hexahidro- β -ácido en pienso para cerdos

Grupo	Peso inicial medio (kg)	Ganancia de peso media (kg)	Ganancia de peso diaria media (kg/día)	Consumo (kg)	Eficacia de conversión del pienso
1	17,01	5,875	0,419	271,3	2,309
2	16,87	5,685	0,406	257,9	2,269
3	17,53	7,18	0,512	298,4	2,078
4	17,74	7,985	0,570	272,5	1,706
5	17,02	7,11	0,508	277,2	1,949
6	17,81	8,12	0,580	274,5	1,690

REIVINDICACIONES

1. Sales de ésteres de acetato del hexahidro-β-ácido, que presentan una fórmula estructural como se representa en la fórmula (II):

5

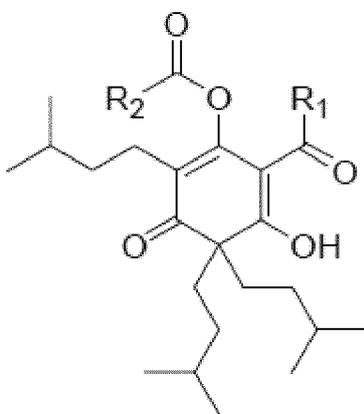


fórmula (II),

10 R₁ es isopropilo, isobutilo o sec-butilo; M es un ion metálico divalente de cobre, cinc, manganeso, cobalto, hierro, calcio o magnesio.

2. Monoésteres del hexahidro-β-ácido, que presentan una fórmula estructural como se representa en la fórmula (III):

15



fórmula (III),

20 R₁ es isopropilo, isobutilo o sec-butilo; R₂ es -(CH₂)_nCH₃, y n=0~16.

3. Aplicación de las sales de ésteres de acetato del hexahidro-β-ácido según la reivindicación 1, o los monoésteres del hexahidro-β-ácido según la reivindicación 2, en la preparación de aditivos para piensos promotores del crecimiento de animales.

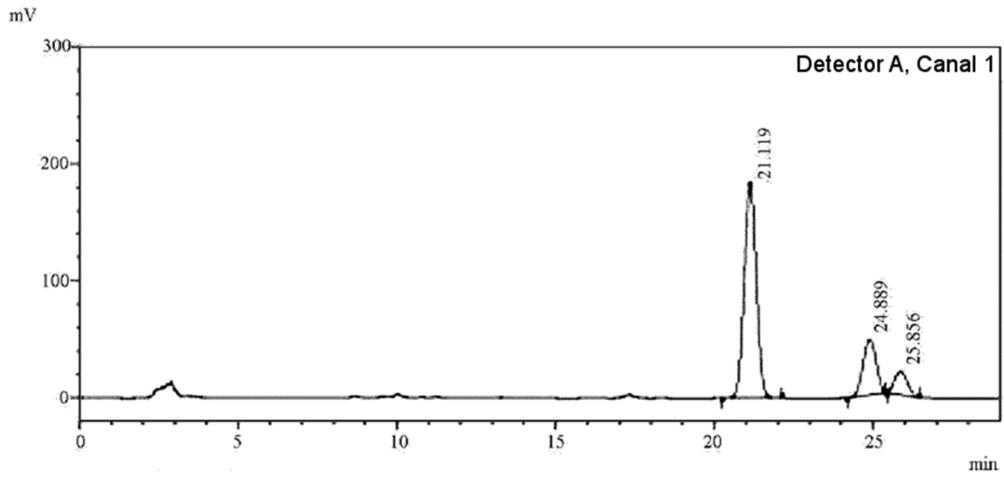
25

4. Aplicación según la reivindicación 3, en la que los animales incluyen cerdos, pollos, patos, gansos, ganado bovino, vacas lecheras, ovejas, peces, gambas, zorros, martas o mapaches, en todas las etapas de crecimiento.

5. Aplicación según la reivindicación 3, en la que una dosis de aditivo del compuesto como se representa en la fórmula (II) o (III) como aditivo para piensos promotores del crecimiento de animales es de 0,1~200 ppm.

30

<Cromatograma>



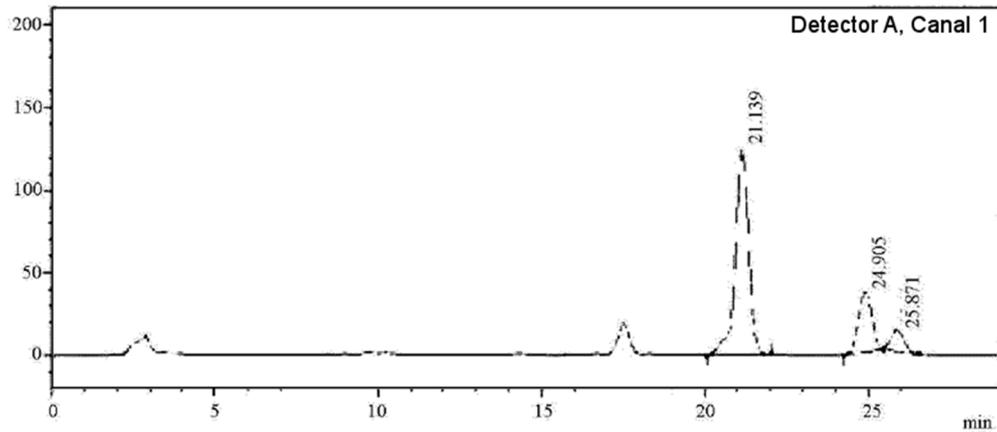
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm						
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura	
1	21,119	4837331	184846	71,781	73,253	
2	24,889	1353602	47689	20,086	18,899	
3	25,856	548105	19803	8,133	7,848	
Total		6739037	252338	100,000	100,000	

Fig 1

<Cromatograma>



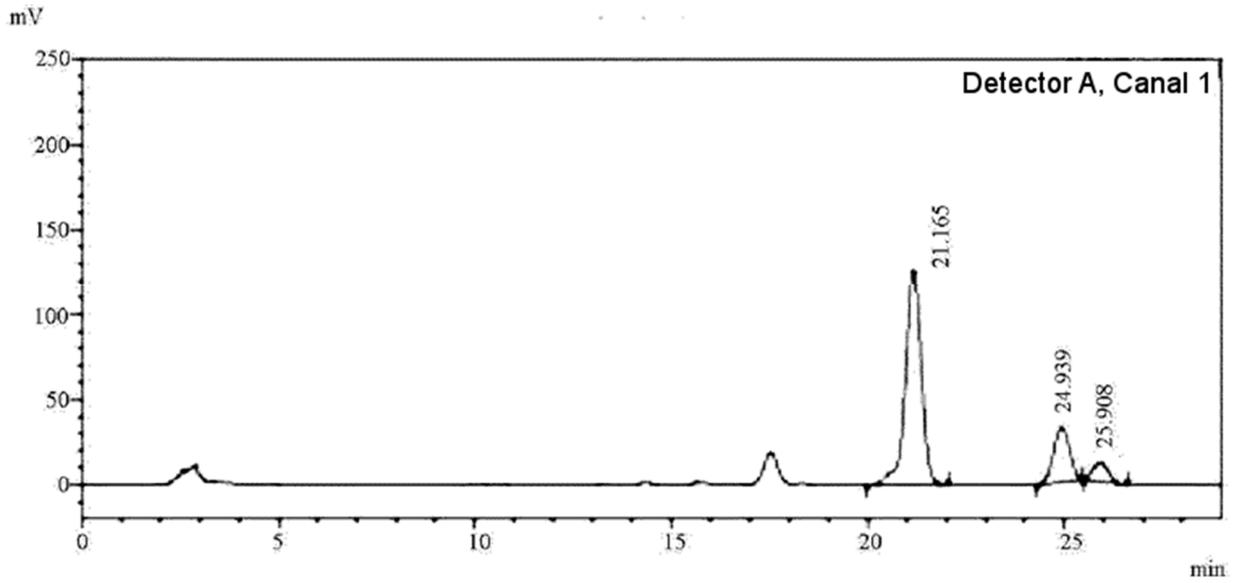
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm						
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura	
1	21,139	3541343	125401	71,416	71,407	
2	24,905	1049949	36835	21,174	20,975	
3	25,871	367468	13378	7,410	7,618	
Total		4958760	175614	100,000	100,000	

Fig 2

<Cromatograma>



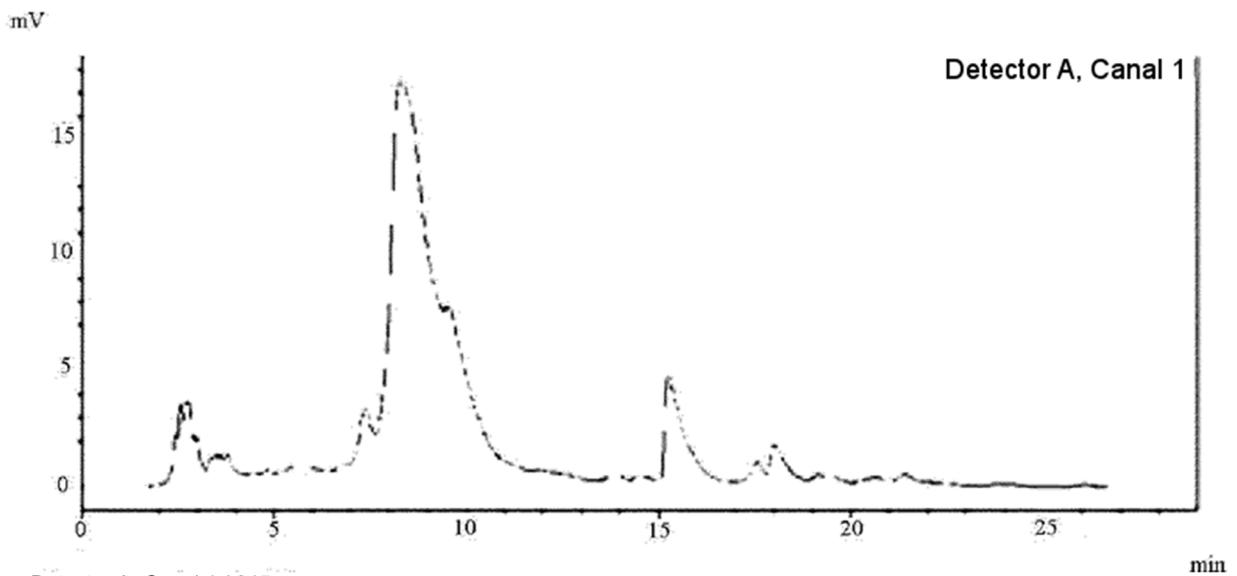
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm						
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura	
1	21,165	3536981	126698	74,288	74,568	
2	24,939	916513	32009	19,250	18,839	
3	25,908	307669	11201	6,462	6,593	
Total		4761163	169908	100,000	100,000	

Fig 3

<Cromatograma>



Detector A, Canal 1 / 315 nm

Fig 4

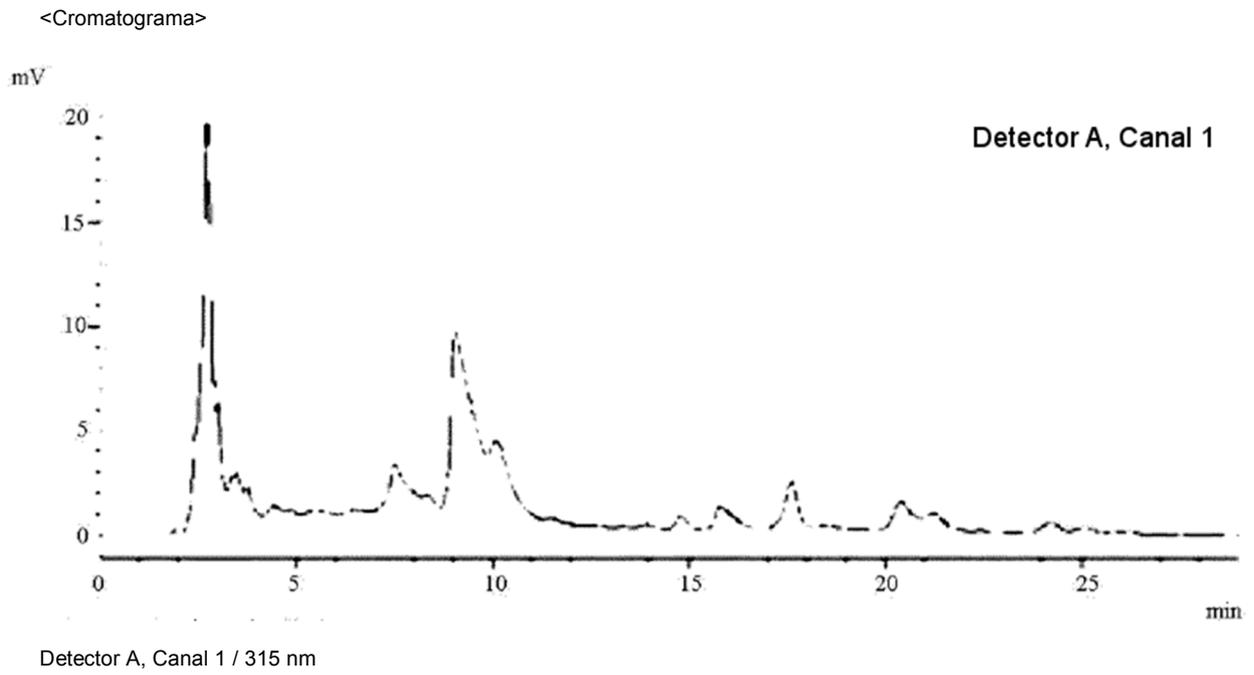
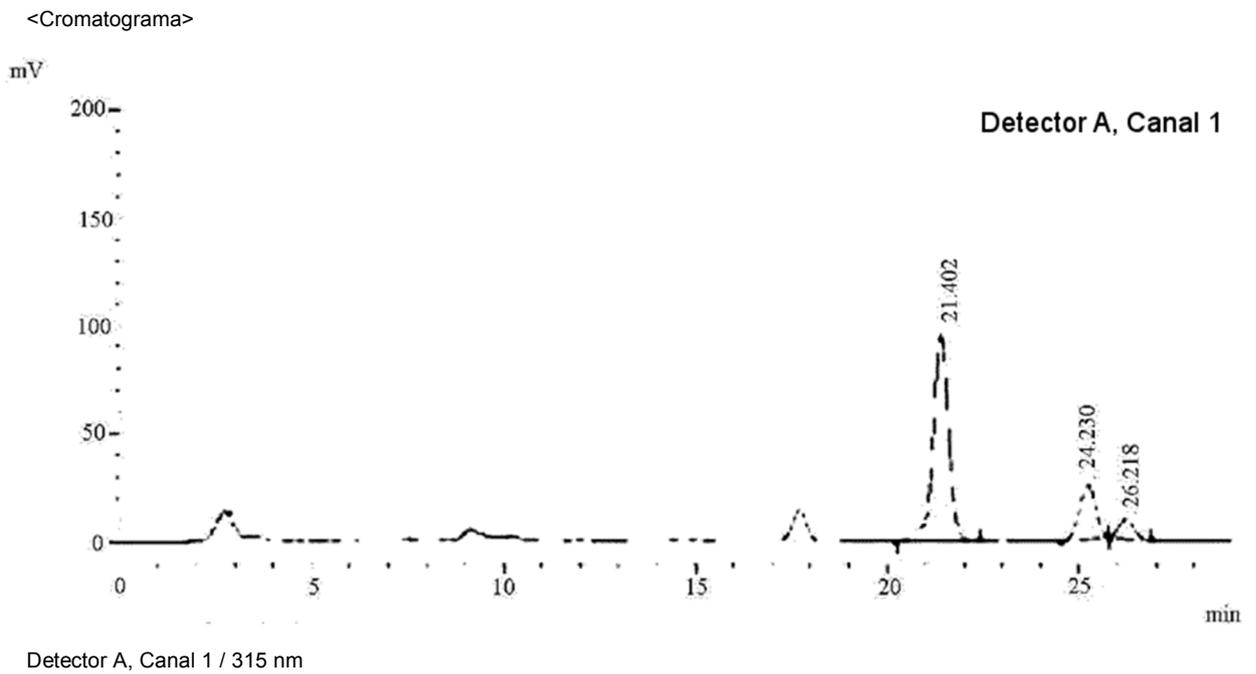


Fig 5

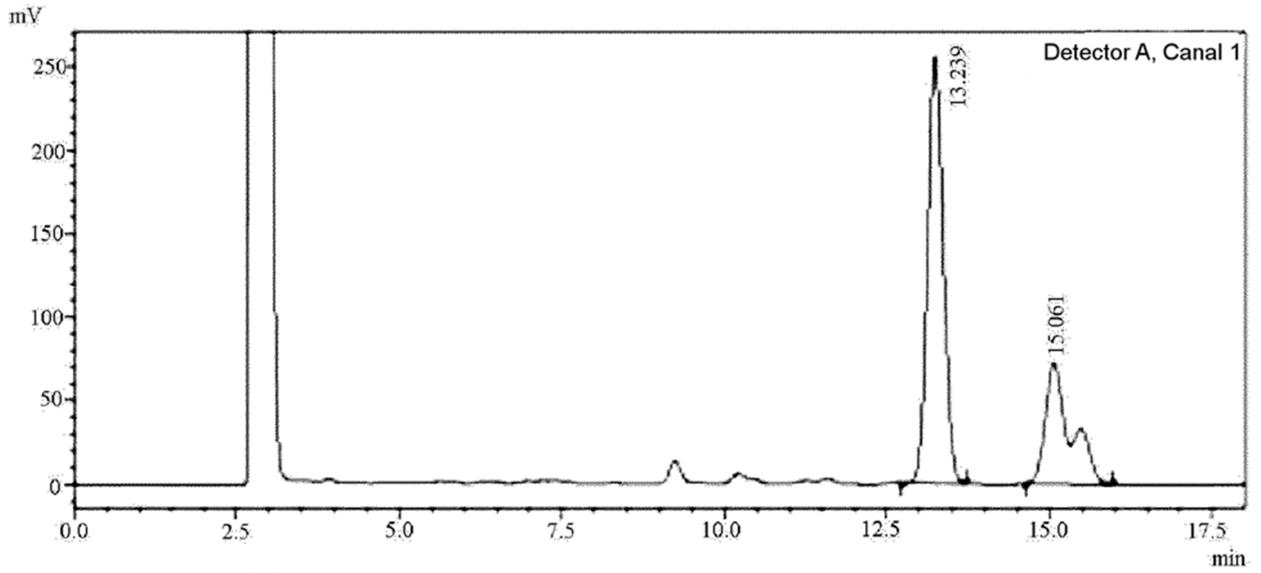


Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	21,402	2725390	96160	73,615	73,940
2	24,230	723105	24884	19,532	19,134
3	26,218	253725	9008	6,853	6,926
Total		3702220	130052	100,000	100,000

Fig 6

<Cromatograma>

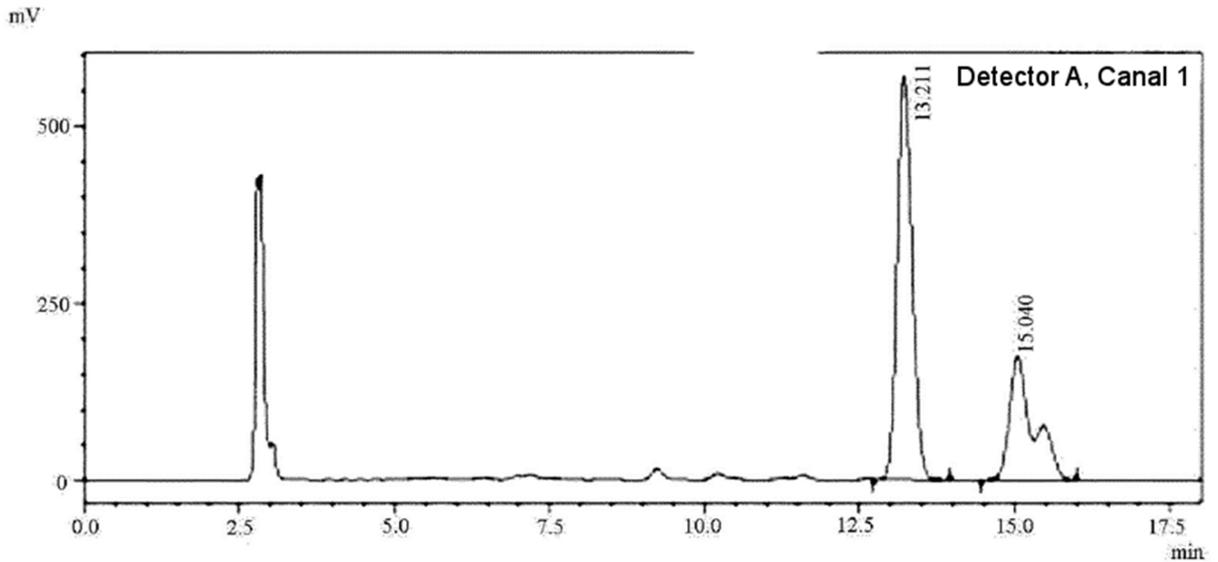


Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	13,239	4175098	255553	68,203	77,916
2	15,061	1946369	72434	31,796	22,084
Total		6121467	327988	100,000	100,000

Fig 7

<Cromatograma>

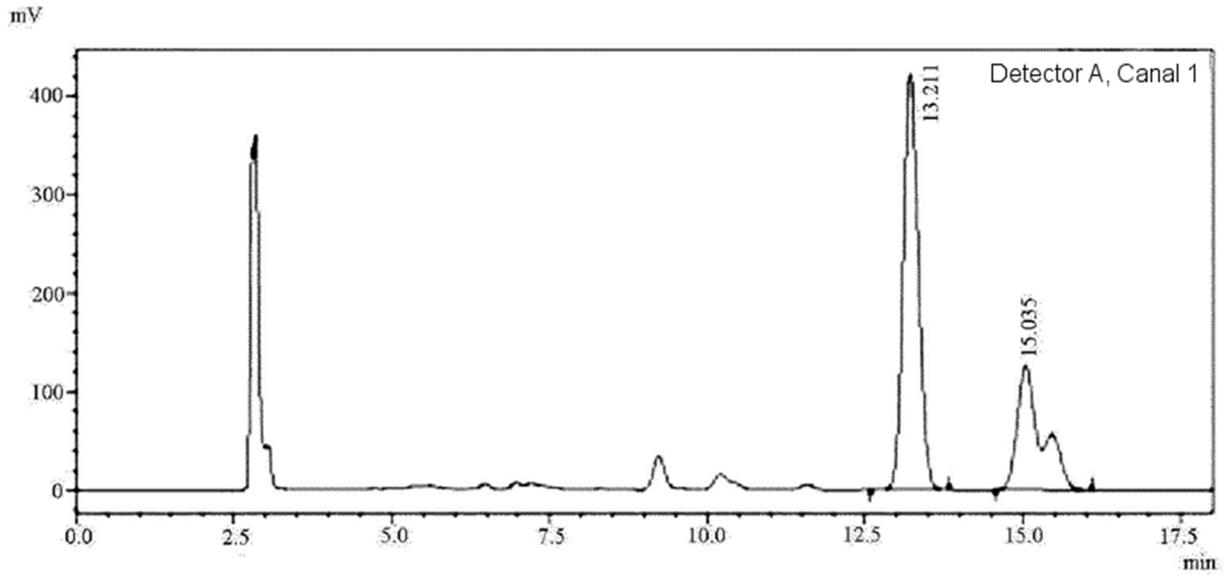


Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	13,211	9499365	569762	66,683	76,500
2	15,040	4746214	175021	33,317	23,500
Total		14245580	744783	100,000	100,000

Fig 8

<Cromatograma>



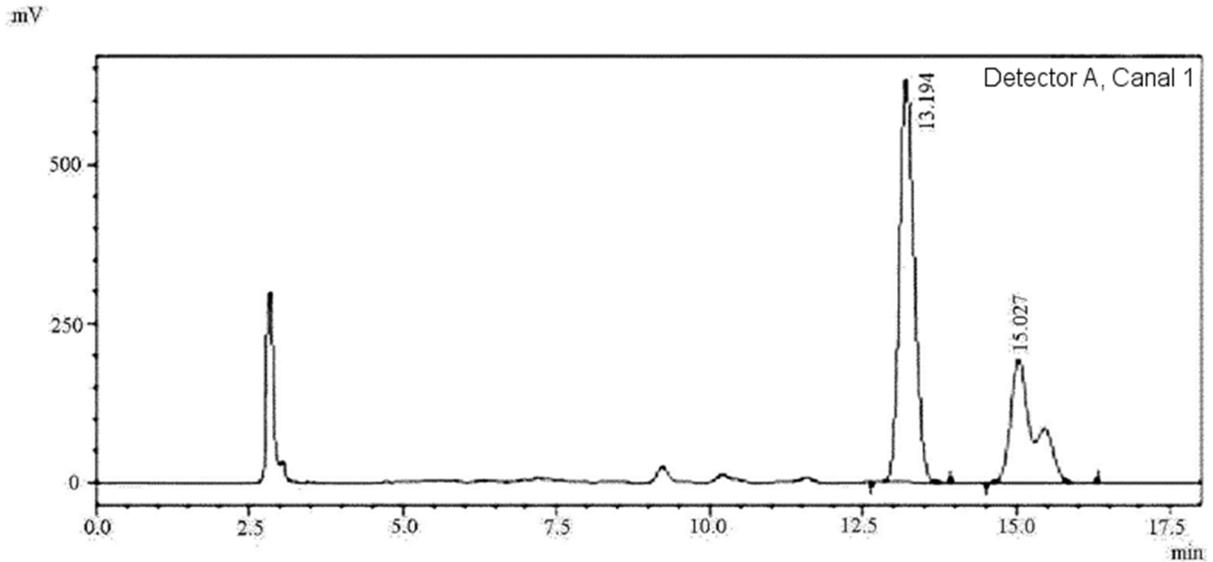
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	13,211	7011202	422258	67,199	77,020
2	15,035	3422232	125985	32,801	22,980
Total		10433434	548244	100,000	100,000

Fig 9

<Cromatograma>

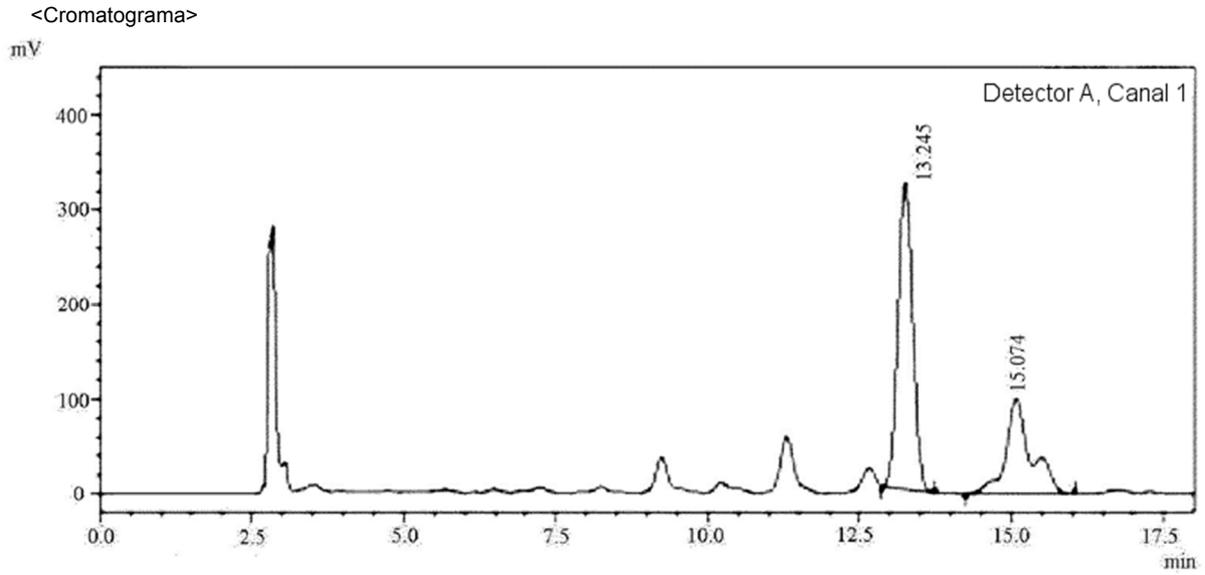


Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	13,194	10565731	632485	66,813	76,632
2	15,027	5248112	192865	33,187	23,368
Total		15813843	825350	100,000	100,000

Fig 10

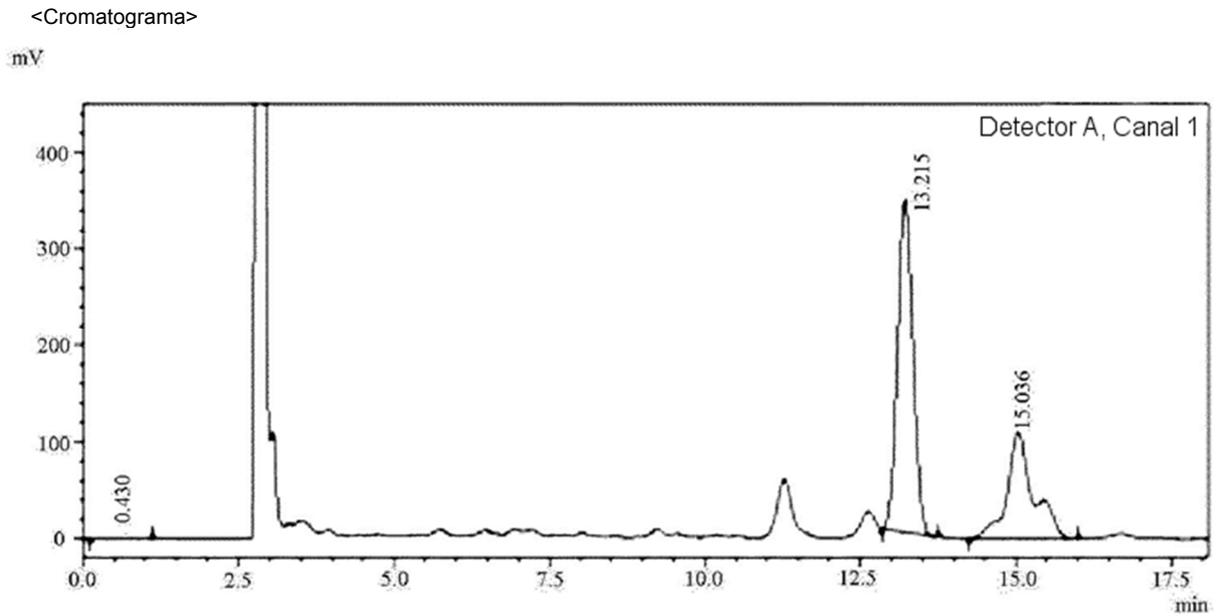


Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	13,245	5447892	324162	65,557	76,368
2	15,074	2862223	100311	34,443	23,632
Total		8310115	424473	100,000	100,000

Fig 11



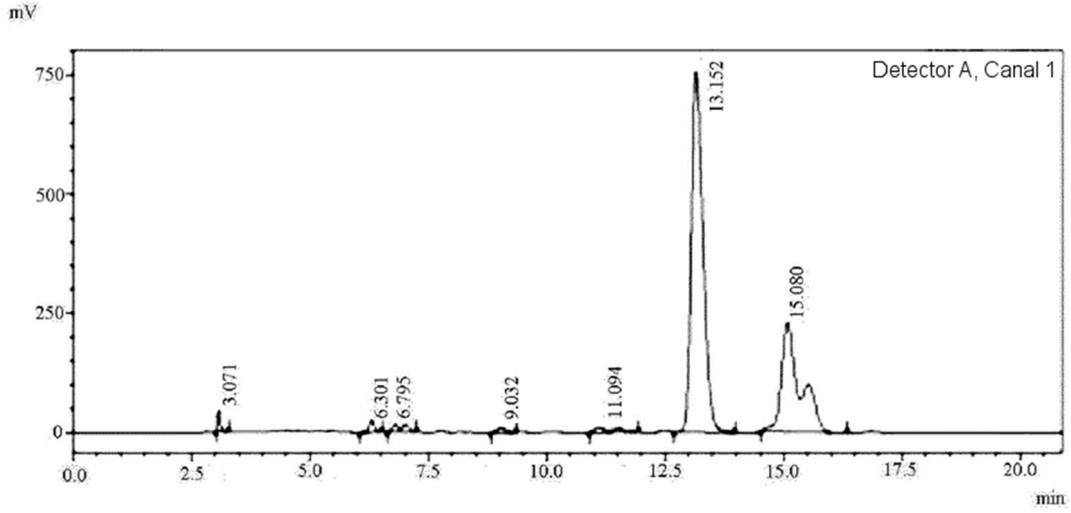
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	0,430	4021	159	0,044	0,035
2	13,215	5987553	344346	64,950	75,759
3	15,036	3227144	110024	35,006	24,206
Total		9218719	454529	100,000	100,000

Fig 12

<Cromatograma>



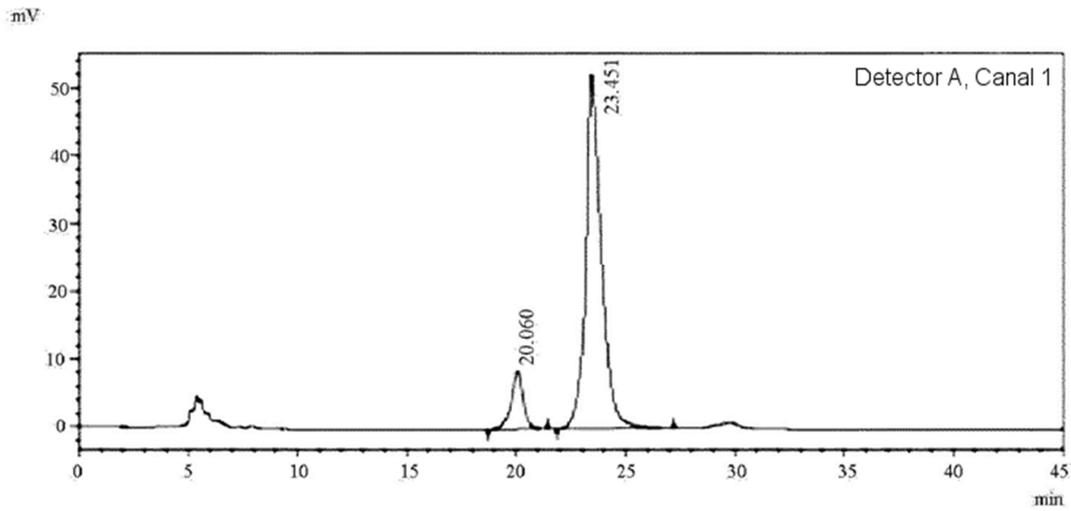
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	3,071	176125	43874	0,878	4,040
2	6,301	183594	22538	0,915	2,075
3	6,795	275638	14824	1,374	1,365
4	9,032	118250	10128	0,589	0,933
5	11,094	303079	10686	1,511	0,984
6	13,152	12819474	756751	63,895	69,676
7	15,080	6187299	227294	30,839	20,928
Total		20063459	1086095	100,000	100,000

Fig 13

<Cromatograma>



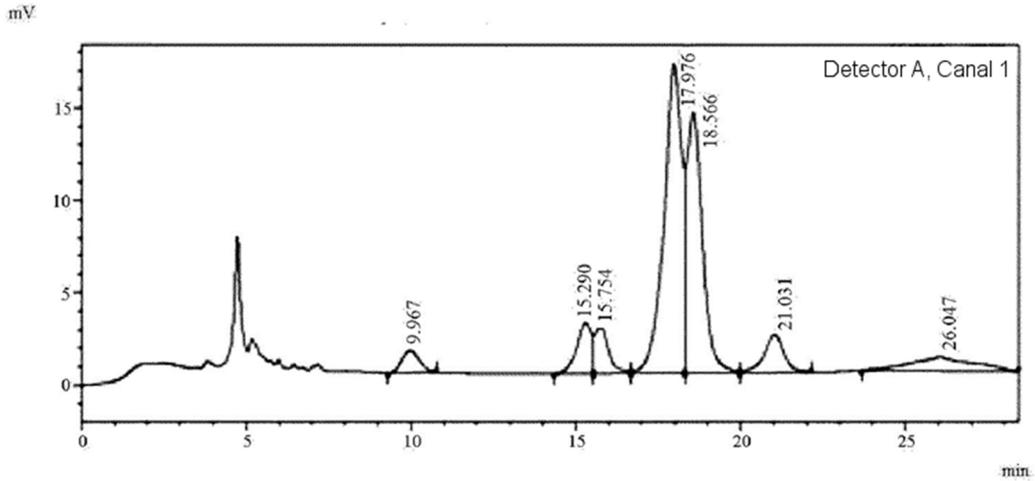
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	20,060	333997	8767	11,341	14,333
2	23,451	2611124	52398	88,659	85,667
Total		2945121	61165	100,000	100,000

Fig 14

<Cromatograma>



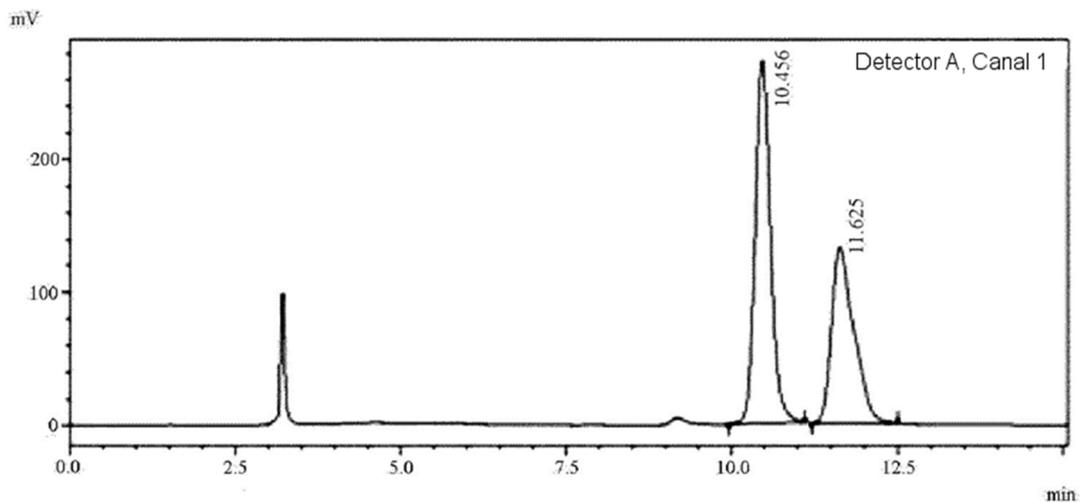
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	9,967	44884	1202	3,003	3,003
2	15,290	86365	2724	5,778	6,809
3	15,754	73141	2503	4,894	6,255
4	17,976	631958	16694	42,282	41,720
5	18,566	467753	14089	31,295	35,211
6	21,031	86097	2055	5,760	5,136
7	26,047	104439	747	6,988	1,866
Total		1494637	40013	100,000	100,000

Fig 15

<Cromatograma>



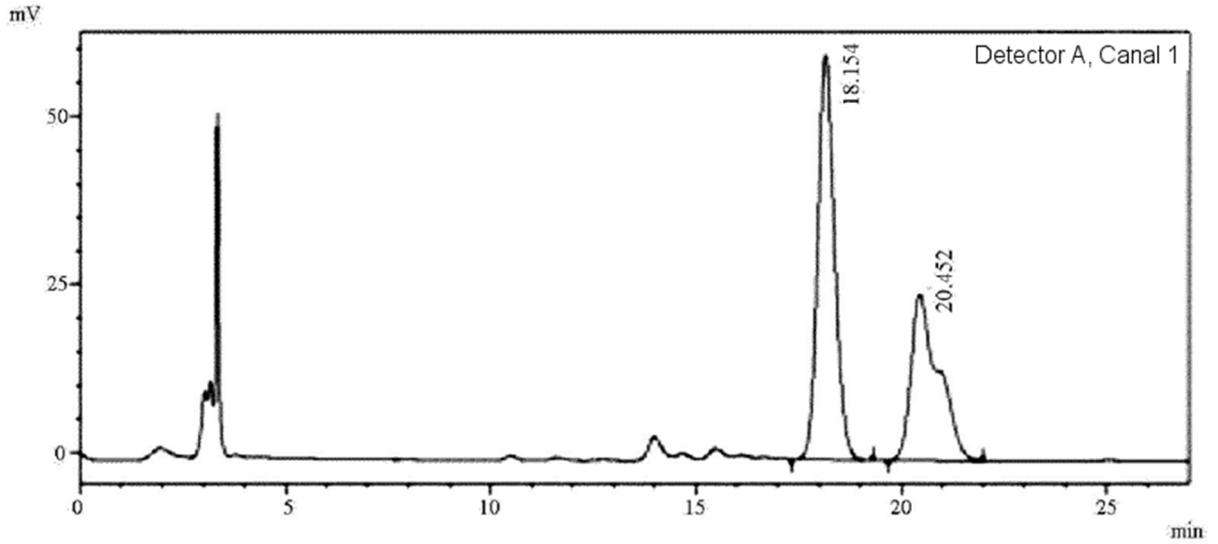
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	10,456	4408851	272744	58,827	67,253
2	11,625	3085726	132805	41,173	32,747
Total		7494577	405549	100,000	100,000

Fig 16

<Cromatograma>



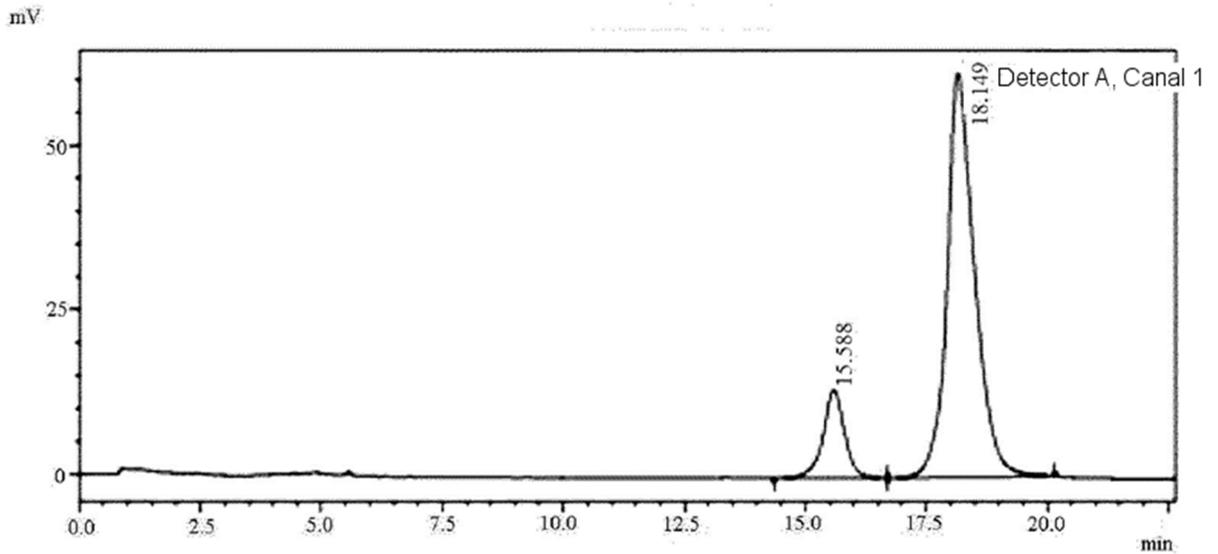
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	18,154	1703470	60129	59,886	70,942
2	20,452	1141051	24629	40,114	29,058
Total		2844521	84758	100,000	100,000

Fig 17

<Cromatograma>



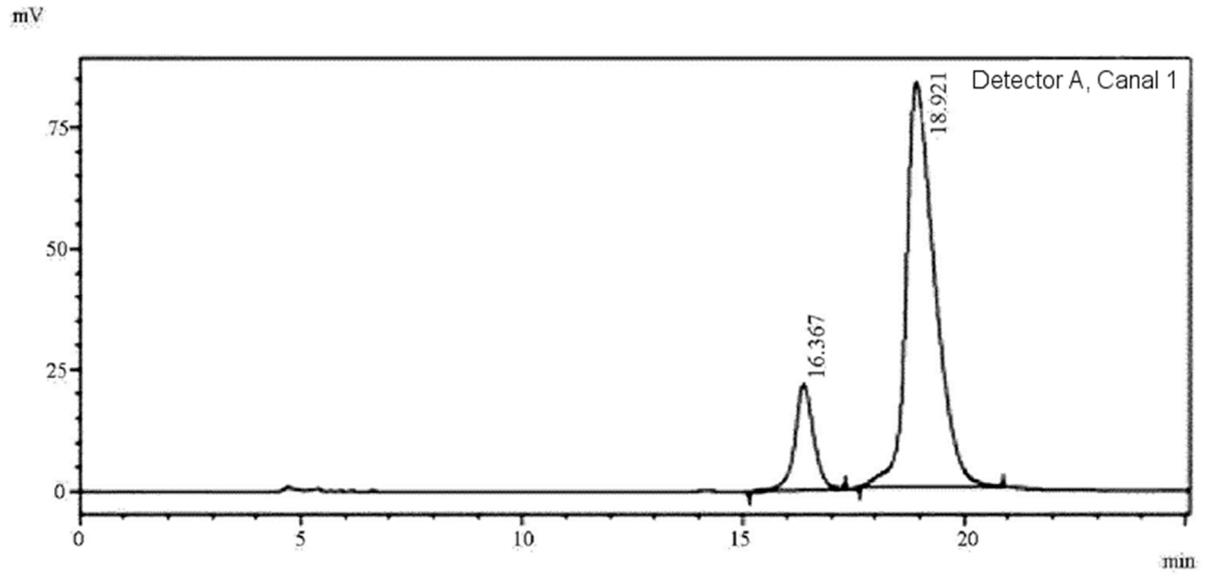
Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	15,588	412531	13376	14,552	17,906
2	18,149	2422261	61327	85,448	82,094
Total		2834791	74703	100,000	100,000

Fig 18

<Cromatograma>



Detector A, Canal 1 / 315 nm

Picos

Detector A C1 315 nm					
Nº de pico	Tiempo de retención	Área	Altura	% de área	% de altura
1	16,367	640244	21714	14,578	20,627
2	18,921	3751576	83555	85,422	79,373
Total		4391820	105269	100,000	100,000

Fig 19