

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 723**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**C08J 3/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2013 PCT/EP2013/078061**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102332**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2013 E 13814180 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2938638**

54 Título: **Despolimerización del ácido algínico**

30 Prioridad:

**28.12.2012 EP 12199699**  
**28.12.2012 US 201261746853 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.04.2019**

73 Titular/es:

**J. RETTENMAIER & SÖHNE GMBH + CO. KG**  
**(100.0%)**  
**Holzmühle 1**  
**73494 Rosenberg, DE**

72 Inventor/es:

**KLINGER, MARKUS;**  
**AHMED, TOQEER;**  
**JUUL, ANNE GRETE y**  
**STENBÆK, DORTHE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 709 723 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**

Despolimerización del ácido alginico

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método de despolimerización del ácido alginico y al ácido alginico despolimerizado obtenido por el método.

**10 Antecedentes de la invención**

Alginato y ácido alginico son los términos genéricos que se aplican a un polisacárido hidrófilo natural que se distribuye ampliamente en las paredes celulares de las algas pardas y ciertos microorganismos. En forma extraída absorbe el agua rápidamente; es capaz de absorber 200-300 veces su propio peso en agua.

15 El alginato se utiliza en diversas preparaciones farmacéuticas, como medicamentos gástricos y antirreflujo. El alginato se usa aún más como material para hacer impresiones en odontología, prótesis, modelado natural y, en ocasiones, para crear resultados positivos para el moldeado a pequeña escala. También se utiliza en la industria alimentaria, como espesante y agente gelificante, y como fibra dietética. Además, el alginato se utiliza en  
20 aplicaciones industriales tales como impresión textil, varillas de soldadura y recubrimiento de papel. El alginato de calcio se usa en diferentes tipos de productos médicos, incluidos los apósitos para quemaduras que promueven la curación y se pueden eliminar con menos dolor que los apósitos convencionales. Además, debido a la biocompatibilidad del alginato y la gelificación simple con cationes divalentes como el calcio, se usa ampliamente para la inmovilización y encapsulación de células.

25 Para muchos de los usos anteriores, como la medicación gástrica antirreflujo y la fibra dietética, se necesitan alginatos de bajo peso molecular, ya que se desea una baja viscosidad del producto final, incluso aunque los alginatos se dosifiquen en altas concentraciones.

30 Actualmente, los métodos de producción se basan en la despolimerización térmica de intermedios, es decir, ácido alginico, o de productos terminados, es decir, alginato de sodio. [H.K. Holmea, K. Lindmoa, A. Kristiansena, O. Smidsrød Thermal depolymerization of alginate in the solid state, Carbohydr. Polym. 2003, 54, 431-438].

35 La patente KR 20010100250 describe un método que comprende las etapas de suspender algas marrones en polvo y una maraña en polvo en agua, dejándola a temperatura ambiente durante 30 minutos y, posteriormente, pretratar el material con un tratamiento de microondas.

La patente US 2011/0028708 describe un tratamiento de microondas de un material de ácido alginico en agua.

40 Sin embargo, todavía se desea un método delgado, continuo y rentable.

Además, las algas marinas usadas comúnmente para la producción de alginato, bajo ciertas condiciones de almacenamiento o debido a la estacionalidad, pueden dar lugar ocasionalmente a un alto recuento microbiológico en el producto final de alginato.

**45 Objeto de la invención**

Es un objetivo de las realizaciones de la invención proporcionar un método eficiente y rentable que minimice la manipulación mecánica o manual. Es un objetivo adicional de las realizaciones de la invención proporcionar un  
50 método para la despolimerización del ácido alginico con un bajo uso de productos químicos por razones ambientales. Además, es un objetivo de las realizaciones de la invención proporcionar un método que reduzca el recuento microbiano en el producto final de alginato. Además es un objetivo de las realizaciones de la invención proporcionar un método que también dé como resultado un producto de alginato despolimerizado esterilizado.

**55 Sumario de la invención**

Se ha encontrado por el presente(s) inventor(es) que usando el tratamiento con microondas descrito en este documento se obtiene un método rápido y eficaz para la despolimerización del ácido alginico. En un experimento, el  
60 peso molecular promedio en peso del ácido alginico se reduce a 43 kDa desde 270 kDa después de 7 minutos y 40 segundos de tratamiento con microondas. En comparación, el tratamiento en un horno tradicional a 105 °C durante 2 horas resulta en un peso molecular promedio en peso ligeramente más alto, es decir, 56 kDa.

Además, no se requiere un procesamiento adicional como la adición de productos químicos o el almacenamiento de  
65 productos intermedios para el tratamiento con microondas. En cambio, ofrece la posibilidad de configurar un proceso continuo.

Además, el tratamiento con microondas es un método eficaz para matar los microorganismos, si los hay, en el material de partida del ácido algínico. Los resultados de los experimentos de laboratorio muestran que 5 minutos de tratamiento con microondas de una muestra fue suficiente para reducir el recuento total de placas de  $10^4$  a  $< 100$  unidades formadoras de colonias (ufc)/g, y para las esporas mesófilas de  $10^4$  a  $< 10$  ufc/g. Los resultados a escala piloto mostraron que menos de 3 minutos de tratamiento con microondas de una muestra fue suficiente para reducir el recuento total de placas de  $10^4$  ufc/g a  $< 100$  ufc/g.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de despolimerización del ácido algínico, dicho método que comprende las etapas de:

a) proporcionar ácido algínico como material de partida de ácido algínico para la etapa b, en donde el material de partida de ácido algínico tiene un pH en el intervalo de 0-4,4 y en donde el contenido de materia seca del material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 5-100 % en p/p, y

b) tratar dicho material de partida de ácido algínico con irradiación de microondas para obtener un material de ácido algínico despolimerizado.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un material de ácido algínico despolimerizado obtenible mediante el método como se describe en el presente documento.

#### Divulgación detallada de la invención

En el presente documento se describe un método de despolimerización del ácido algínico, dicho método que comprende las etapas de:

a) proporcionar ácido algínico como material de partida de ácido algínico para la etapa b, en donde el material de partida de ácido algínico tiene un pH en el intervalo de 0-4,4 y en donde el contenido de materia seca del material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 5-100 % en p/p, y

b) tratar dicho material de partida de ácido algínico con irradiación de microondas para obtener un material de ácido algínico despolimerizado.

El alginato y los ácidos algínicos son los copolímeros lineales compuestos por enlaces 1-4 del ácido  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico como bloques de construcción monoméricos (sales; manuronato y guluronato). Los monómeros pueden aparecer en bloques homopoliméricos de restos G consecutivos (bloques G), restos M consecutivos (bloques M) o restos M y G alternantes (bloques MG).

Los valores de pKa del ácido manurónico y gulurónico son de 3,38 y 3,65 respectivamente, lo que limita la solubilidad del ácido polmanurónico y poligulurónico en agua a un pH bajo. Los alginatos con restos alternativos de ácido manurónico y gulurónico (MG) tienen la mayor solubilidad en ácido.

En la naturaleza, el alginato se limita principalmente a las algas pardas marinas, *Phaeophyta*, aunque las bacterias del suelo como *Azotobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas* también producen material polimérico extracelular que se asemeja al alginato de algas pardas. El alginato existe en las algas pardas, como el polisacárido más abundante que comprende hasta el 40 % de la materia seca y el 2-7 % del peso de las algas húmedas. Se encuentra en la matriz intercelular como un gel que contiene sodio, calcio, magnesio y otros cationes multivalentes. Su función principal es estructural dando fuerza y flexibilidad al tejido del alga.

El material de partida para el presente método se basa preferiblemente en alginato natural de algas marinas. Sin embargo, también puede basarse en alginato que procede de *Azotobacter vinelandii* y otros microorganismos.

Tradicionalmente el procesamiento de alginato consta de varias etapas. La primera etapa después de la recolección, y opcionalmente el secado de las algas, puede ser moler y lavar. Posteriormente, se inicia el proceso de extracción alcalina y, después de varias etapas de procesamiento diferentes, se produce ácido algínico puro. El ácido algínico sirve como materia prima para las diferentes sales de alginato y éster.

Una forma de aislar el alginato de la biomasa es disminuir el pH por debajo del pKa de los restos ácidos. Al disminuir el pH, el calcio y otros cationes unidos por los ácidos carboxílicos se intercambian con protones y el polímero precipitará a medida que el ácido algínico se coagula en una fase gelificada o sólida. El contenido de cationes y calcio se ha reducido considerablemente en el material sólido/gelificado durante esta etapa de purificación. El material sólido/gelificado aislado puede disolverse aumentando el pH con álcali para formar, por ejemplo, alginato de sodio, que entonces puede someterse a etapas de purificación adicionales, por ejemplo, filtración. La etapa final de aislamiento puede llevarse a cabo de diferentes maneras. Una de estas es la precipitación del polímero como alginato de Ca seguido de un lavado ácido para convertir el alginato de Ca insoluble en agua en ácido algínico. Otra forma es precipitar el alginato de sodio líquido directamente como ácido algínico mediante la adición de, por ejemplo, ácido sulfúrico. En ambos casos, el ácido algínico resultante se puede usar como material de partida para la

preparación de las diferentes sales de alginato, y también para el éster de propilenglicol modificado covalentemente. Después de neutralizar el ácido algínico, la sal de alginato se seca y se muele al tamaño de partícula deseado. Otra forma más de aislar el alginato final es precipitar alginato de sodio líquido en alcohol, por ejemplo, etanol o alcohol isopropílico, con lo que se obtiene un estado sólido/gelificado de, por ejemplo, alginato de sodio. Las sales de alginato de sodio, potasio y amonio son solubles en agua y forman soluciones viscosas. El ácido algínico y el alginato de calcio son insolubles en agua.

*Descripción del material de partida del ácido algínico*

10 El material de partida utilizado en el método descrito en el presente documento comprende ácido algínico.

En el presente contexto, el término "ácido algínico" significa que los ácidos manurónico y gularónico constitutivos están completamente protonados hasta el límite donde el grado de protonación es del 50 %, es decir, sus valores de pKa. Los valores de pKa del alginato se han medido hasta 4,4 [A. Haug, Disociation of alginic acid, Acta Chem. Scand. 1961, 15, 950-952].

Como se ha descrito anteriormente, el ácido algínico se puede obtener disminuyendo el pH por debajo del pKa de los restos ácidos. Esto permite la eliminación de, entre otros cationes, calcio, magnesio, hierro, potasio y sodio del polímero.

En un aspecto, el ácido algínico está en forma de un coágulo de ácido algínico de una fase gelificada o sólida. En un aspecto adicional, el ácido algínico es insoluble. La insolubilidad del ácido algínico se puede medir por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en "A. Haug, B. Larsen The solubility of alginate at low pH, Acta Chem. Scand. 1963, 17, 1653-1662".

En un aspecto, el material de partida de ácido algínico está en forma de fibras de ácido algínico.

El material de partida de ácido algínico en el presente método debe contener suficiente humedad para evitar que el material se oscurezca o se quemara durante el tratamiento con microondas.

En un aspecto, el contenido de materia seca del material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 5-100 % en p/p, tal como en el intervalo del 5-90 % en p/p, tal como en el intervalo del 15-70 % en p/p, preferiblemente en el intervalo del 25-45 % en p/p.

El contenido de materia seca se puede ajustar mediante la adición de uno o más solventes. En un aspecto, el material de partida de ácido algínico comprende ácido algínico en una mezcla con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua, metanol, etanol e isopropanol. En un aspecto preferido, el ácido algínico se mezcla con agua como único disolvente. En un aspecto preferido, el material de partida de ácido algínico comprende ácido algínico en agua.

La concentración de ácido algínico en el material de partida del ácido algínico está preferiblemente en el intervalo del 7,5-100 % en p/p basado en materia seca, tal como en el intervalo del 80-100 % en p/p basado en materia seca, preferiblemente en el intervalo del 90-100 % en p/p basado en materia seca. Las concentraciones de alginato se pueden medir de varias maneras conocidas por los expertos en la técnica, véase por ejemplo, "H.S. Soedjak Colorimetric determination of carrageenans and other anionic hydrocolloids with Methylene Blue, Anal. Chem. 1994, 66, 4514-4518" y las referencias mencionadas en ese documento.

En un aspecto, el material de partida de ácido algínico tiene un peso molecular promedio en peso de 1.500.000-50.000 Da. El peso molecular se puede medir por el método descrito en el presente documento en "Procedimientos generales".

En un aspecto, el material de partida de ácido algínico tiene un pH en el intervalo de 0-4,4, tal como en el intervalo de 0-3,65, tal como en el intervalo de 0-3,5, tal como en el intervalo de 0,1-4,2, tal como en el intervalo de 0,2 a 3,65, tal como preferiblemente en el intervalo de 0 a 2,5. En un aspecto, el pH se ajusta mediante la adición de ácidos tales como el ácido sulfúrico. Al llevar a cabo el tratamiento con microondas del ácido algínico en el intervalo de pH de pH 0-4,4 se ha encontrado que se obtiene una escisión más rápida de los enlaces glicosídicos, lo que resulta en un proceso de despolimerización más rápido, lo que significa un menor consumo de energía.

Con el fin de facilitar la despolimerización, se puede añadir un agente adecuado, es decir, agentes reductores u oxidantes. [O. Smidsrød, A. Haug, B. Larsen. Degradation of Alginate in the Presence of Reducing Compounds, Acta Chem. Scand. 1963, 17, 2628-2637], [O. Smidsrød, A. Haug, B. Larsen. The Influence of Reducing Substances on the Rate of Degradation of Alginates, Acta Chem. Scand. 1963, 17, 1473-1474], [O. Smidsrød, A. Haug, B. Larsen. Kinetic Studies on the Degradation of Alginic Acid in the Presence of Iron Salts, Acta Chem. Scand. 1965, 19, 143-152]. Así, en un aspecto, el material de partida de ácido algínico puede comprender además un agente reductor y/u oxidante tal como se selecciona del grupo de hidroquinona, sulfito de sodio, floriglucinol, sulfuro ácido de sodio, ditionita, cisteína, ácido tioglicólico, fenilhidracina, ácido ascórbico, nucleótido de difosfopiridina reducida (DPNH) en

combinación con azul de metileno, sulfato de hidrazina, ácido dihidroximaleico, peróxido de hidrógeno con o sin la adición de cloruro de hierro (III).

*Tratamiento de microondas*

5 En el presente contexto, el término "material de ácido algínico despolimerizado" significa que el material de ácido algínico resultante que se ha tratado tiene un peso molecular promedio en peso más bajo que el material de partida de ácido algínico medido, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

10 Preferiblemente, el tratamiento con microondas se realiza como un proceso continuo.

En un aspecto, el material de partida de ácido algínico se puede drenar y/o prensar y/o secar antes del tratamiento con microondas.

15 En un aspecto, la frecuencia de microondas está entre 300 MHz y 300 GHz, preferiblemente entre 300 MHz y 30 GHz, preferiblemente entre 300 MHz y 3 GHz. Dependiendo de la viscosidad final deseada del material de ácido algínico despolimerizado para la aplicación final, se puede ajustar el tiempo o el efecto del tratamiento con microondas.

20 En un aspecto, el tratamiento con microondas se realiza a presión atmosférica.

En un aspecto, el material de ácido algínico despolimerizado tiene un peso molecular promedio en peso de 300.000-2000 Da.

25 En un aspecto, el método descrito en el presente documento proporciona un ácido algínico despolimerizado sin subproductos o un pequeño porcentaje de subproductos, y el ácido algínico despolimerizado se obtiene así con una pureza elevada.

*Tratamientos opcionales después del tratamiento con microondas*

30 Después del tratamiento con microondas, el material de ácido algínico despolimerizado, en función del uso adicional, puede secarse y/o molerse y/o mezclarse y/o se empaquetarse.

35 En un aspecto, el material de ácido algínico despolimerizado se neutraliza adicionalmente después del tratamiento con microondas para obtener diversos alginatos. La neutralización puede realizarse mediante una serie de métodos conocidos por los expertos. En un aspecto, la neutralización se realiza con una o más sales seleccionadas del grupo de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , tales como del grupo de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_2$  y  $\text{CaCO}_3$  para obtener un alginato neutralizado y despolimerizado.

40 En otro aspecto adicional, el ácido algínico despolimerizado se convierte en alginato de propilenglicol usando óxido de propileno como reactivo.

45 En otro aspecto adicional, el material de ácido algínico despolimerizado y neutralizado se seca adicionalmente y/o se muele y/o se mezcla y/o se empaqueta.

En otro aspecto adicional, el material de ácido algínico despolimerizado y neutralizado se mezcla con otras sales, tales como fosfatos, citratos, carbonatos y sales de calcio, para aplicaciones alimentarias o farmacéuticas.

50 En las siguientes realizaciones adicionales se describen:

Realización 1. Un método de despolimerización de ácido algínico, dicho método que comprende las etapas de:

- 55 a) proporcionar ácido algínico como material de partida para la etapa b, y
- b) tratar dicho material de partida de ácido algínico con irradiación de microondas para obtener un material de ácido algínico despolimerizado.

Realización 2. Un método de despolimerización de ácido algínico, dicho método que comprende las etapas de:

- 60 a) proporcionar ácido algínico como material de partida para la etapa b, en donde el material de partida de ácido algínico tiene un pH en el intervalo de 0-4,4 y en donde el contenido de materia seca del material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 5-100 % en p/p, y
- 65 b) tratar dicho material de partida de ácido algínico con irradiación de microondas para obtener un material de ácido algínico despolimerizado.

## ES 2 709 723 T3

Realización 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-2, en donde el ácido algínico está en una forma insoluble.

5 Realización 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-3, en donde la frecuencia de microondas está entre 300 MHz y 300 GHz, tal como entre 300 MHz y 30 GHz, preferiblemente entre 300 MHz y 3 GHz.

10 Realización 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde la concentración de ácido algínico en el material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 7,5-100 % en p/p basado en materia seca, tal como en el intervalo del 80-100 % en p/p basado en materia seca, preferiblemente en el intervalo del 90-100 % en p/p basado en materia seca.

15 Realización 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico tiene un pH en el intervalo de 0-4,4, tal como en el intervalo de 0-3,5, tal como en el intervalo de 0,1-4,2, tal como en el intervalo de 0,2-3,65, tal como preferiblemente en el intervalo de 0-2,5.

20 Realización 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el contenido de materia seca del material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 5-100 % en p/p, tal como en el intervalo del 5-90 % en p/p, tal como en el intervalo del 15-70 % en p/p, preferiblemente en el intervalo del 25-45 % en p/p.

Realización 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico tiene un peso molecular promedio en peso de 1.500.000-50.000 Da.

25 Realización 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico comprende ácido algínico en una mezcla con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua, metanol, etanol e isopropanol.

30 Realización 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico comprende ácido algínico en agua.

35 Realización 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico comprende además un agente reductor y/u oxidante tal como el que se selecciona del grupo de hidroquinona, sulfito de sodio, floroglucinol, sulfuro ácido de sodio, ditionita, cisteína, ácido tioglicólico, fenilhidracina, ácido ascórbico, nucleótido de difosfopiridina reducida (DPNH) en combinación con azul de metileno, sulfato de hidrazina, ácido dihidroximaleico, peróxido de hidrógeno con o sin adición de cloruro de hierro (III).

40 Realización 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado tiene un recuento total de placas por debajo de 5000 ufc/g, preferiblemente por debajo de 1000 ufc/g.

45 Realización 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico se drena y/o se prensa y/o se seca antes del tratamiento con microondas.

Realización 14. El método de una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado tiene un peso molecular promedio en peso de 300.000-2000 Da.

50 Realización 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado se seca adicionalmente y/o se muele y/o se mezcla y/o se empaqueta.

Realización 16. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado se neutraliza adicionalmente después del tratamiento con microondas para obtener diversos alginatos.

55 Realización 17. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde la neutralización se realiza con una o más sales seleccionadas del grupo de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , como del grupo de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KHCO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_2$ , y  $\text{CaCO}_3$  para obtener un alginato neutralizado despolimerizado.

60 Realización 18. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el ácido algínico despolimerizado se convierte en alginato de propilenglicol usando óxido de propileno.

65 Realización 19. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado neutralizado se seca adicionalmente y/o se muele y/o se mezcla y/o se empaqueta.

Realización 20. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado neutralizado se mezcla con otras sales, tales como fosfatos, citratos, carbonatos y sales de calcio, para aplicaciones alimentarias o farmacéuticas.

5 Realización 21. El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico está en forma de fibras de ácido algínico.

Realización 22. Un material de ácido algínico despolimerizado obtenible por el método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1-21.

10

## Procedimientos generales

### Medida de viscosidad

15 La viscosidad del ácido algínico se mide suspendiendo el ácido algínico en agua en un cilindro concéntrico (taza y bob) utilizando el sistema de medición CC 27/T200/SS. Después de añadir algunas gotas de indicador universal, la suspensión se vuelve de color rosa oscuro. El carbonato de sodio se añade lentamente hasta que el color se vuelve amarillo verdoso. En este punto el ácido algínico se disuelve completamente. La viscosidad se mide entonces utilizando un reómetro (Anton Paar, Physica MCR301) a 20 °C con una velocidad de cizallamiento de 0,33 s<sup>-1</sup>.

20

### Relación M:G

La relación M/G de una muestra de alginato se determina como se describe en la bibliografía (H. Grasdalen, B. Larsen, O. Smidsrød A Proton Magnetic Resonance Study of the Sequence of Uronate Residues in Alginate Carbohydr. Res. 1979, 68, 23-31) utilizando un espectrómetro Bruker Avance III 600MHz con una sonda de observación de banda ancha de 5 mm.

25

### Medición del peso molecular promedio en peso

30 El peso molecular promedio en peso del alginato se puede determinar disolviendo el alginato en un tampón continuo y analizando mediante cromatografía de permeación de gel equipada con un detector de dispersión de luz de ángulo múltiple (DAWN EOS, Wyatt Technology Corporation), un detector de RI (Optilab rEX, Wyatt Technology Corporation) y columnas GPC como PSS SUPREMA-LUX 1000 Å y PSS SUPREMA-LUX 3000 Å.

35 Un tampón de LiNO<sub>3</sub> 0,05 M con 200 ppm de N<sub>3</sub><sup>-</sup> se prepara disolviendo 17,23 g de LiNO<sub>3</sub> y 1,56 g de NaN<sub>3</sub> en 5,00 l de agua Millipore. El eluyente se filtra a través de un filtro de 0,22 µm.

Se disuelven muestras de 1-2 mg/ml en tampón de funcionamiento con agitación y las muestras se filtran a través de un filtro de 0,45 µm (13 mm GHP 0,45 µm Minispike de Waters). Las condiciones normales de funcionamiento son: Flujo = 0,8 ml/min, volumen de inyección = 100 µl, temperatura de la columna = 40 °C, temperatura del detector = 30 °C.

40

### Contenido de materia seca

45 El contenido de materia seca del alginato se puede determinar pesando el residuo seco después de la evaporación del agua contenida en una muestra calentada a 105 °C.

Un recipiente de vidrio se seca durante 1 hora en un horno a 105 °C y a continuación se enfría durante 1 hora en un desecador antes de usarlo. Posteriormente, se ponen 2 ± 0,001 g de alginato en el recipiente y el recipiente de vidrio abierto se pone en un horno a 105 °C durante 4 horas. El residuo seco se pesa después de enfriar en un desecador durante 20 minutos.

50

El contenido de materia seca se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ de materia seca} = \frac{P3 - P1}{M} \times 100$$

55

$$\% \text{ de contenido de humedad} = 100 - \text{materia seca}$$

P1 = Tara del recipiente de vidrio, en g

60

P2 = Tara del recipiente de vidrio + alginato de sodio, en g

P3 = Tara + residuo seco, en g

M = P2 - P1, peso de alginato de sodio, en g

**Análisis microbiológico**

Las muestras de AA antes y después del tratamiento con microondas se analizaron de acuerdo con 3M Petrifilm Aerobic Count Plates, Interpretation Guide, Reminders for Use and Sample Preparation.

5 Certificado Nordval No. 012. Método NMKL 146,1993 (Ref. 3) para el recuento total de microbios aeróbicos.

Los esporulados aeróbicos mesófilos se analizaron de acuerdo con la Asociación Americana de Salud Pública para Alimentos y Medicamentos (APHA), 2001, 4ª versión, 22.512.

10 **Parte experimental**

**Ejemplo 1**

15 Tomado de un material de partida de fibra de ácido alginico producido industrialmente (materia seca: 32 %, pH: 1,7), se pusieron 160 g de ácido alginico en un vaso de precipitados de vidrio de 800 ml y se trató con microondas con un efecto de 800 vatios (Electolux) durante 7 minutos y 40 segundos.

20 Alternativamente, 130 g de ácido alginico se pusieron en un horno a 40 °C durante 66 horas, ya sea con o sin la adición de 582 µl de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35 % (p/v).

Alternativamente, se pusieron 150 g de ácido alginico en un horno a 105 °C durante 2 horas.

25 En una serie de ensayos diferente, 200 g de ácido alginico se mezclaron con 17,6 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en un procesador de alimentos (KRUPS). La muestra se secó a 40 °C durante 16 horas en un horno. A continuación, las muestras se molieron (Retsch ZM 200) y se tamizaron a través de un tamiz de 200 µm.

30 A partir de este alginato de sodio, se pusieron 13 g en un horno a 105 °C durante 7 horas y 30 minutos. En un experimento final, se añadieron 110 µl de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35 % (p/v) a 8,75 g de alginato de sodio. Esta mezcla se puso en un horno a 105 °C durante 7 horas y 30 minutos.

35 Los pesos moleculares promedio en peso se determinaron mediante cromatografía de permeación de gel equipada con un detector de dispersión de luz de ángulo múltiple y un detector de RI (Wyatt Technology Corporation). Se disolvieron 1-2 mg/ml de muestra en un tampón que consiste en agua Millipore con 0,05 M de LiNO<sub>3</sub> con 200 ppm de NaN<sub>3</sub>. Antes de la medición, la solución se filtró a través de un filtro de 0,45 µm.

40 Las condiciones normales de funcionamiento fueron: Flujo = 0,8 ml/min, volumen de inyección = 100 µl, temperatura de la columna = 40 °C, temperatura del detector = 30 °C, dn/dc (ml/g) 0,154. Los cálculos se realizaron utilizando el software Astra 5 de Wyatt Technology Corporation.

Tabla 1. Pesos moleculares de alginatos tratados bajo diferentes condiciones

Muestra y tratamiento	Mw/kDa
Alginato de sodio, no tratado	270
Ácido alginico, tratado en microondas 7 min 40 s	43
Ácido alginico, tratado a horno 40 °C 66 h	47
Ácido alginico, tratado a horno 40 °C, con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> añadido, 66 h	42
Ácido alginico, tratado en horno a 105 °C, 2 h.	56
Alginato de sodio, tratado en horno a 105 °C, 7 h 30 min	140
Alginato de sodio, tratado en horno a 105 °C, con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> añadido, 7 h 30 min	130

**Ejemplo 2**

45 La despolimerización inducida por el tratamiento con microondas a 850 W (Electolux) se llevó a cabo en dos materiales de partida de ácido alginico diferentes con las características que se describen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Materiales de partida de ácido alginico seleccionados para la despolimerización inducida por microondas

Ácido alginico	Tipo	pH	Contenido de materia seca (%)	1 % de viscosidad (mPa · s)
Material de partida 1	Alto M	2,0	25,0	660
Material de partida 2	Alto G	2,0	24,5	470

50 Se midieron las viscosidades iniciales de alginato de sodio al 1 %.

Tabla 3: Tratamientos con microondas de ácido algínico, M alto y G alto. El desarrollo del contenido de materia seca se registró para el ácido algínico M alto.

Tiempo (min.)	Contenido de materia seca (%)	10 % de viscosidad (mPa · s)	
		Alto M	Alto G
0	25	$1 \times 10^7$	$5 \times 10^6$
5,0	47	9310	
7,5			3300
9,5			1700
10,0	76,8	932	
10,167			1350
11,333			1225
12,0	86,2	460	
15,0	El material se quema, es decir, se vuelve oscuro/negro		

- La duración del tratamiento con horno de microondas fue limitada ya que la humedad se evaporó del ácido algínico. Sin embargo, el tratamiento requerido parece ser lo suficientemente corto como para evitar que el producto se seque y se queme por completo. Reducir las viscosidades del 1 % de 500-1500 mPa · s a 2000 mPa · s con una viscosidad del 10 % requeriría 10-13 minutos de tratamiento con microondas a 850-900 vatios. Para el cálculo del tiempo de despolimerización requerido se aplicaron medios tiempos. Un prerrequisito es medir la viscosidad de alginato de sodio al 1 % del material de partida de ácido algínico y convertirlo a la viscosidad de alginato de sodio al 10 %. El medio tiempo para el ácido algínico fue de 52 segundos.

### Ejemplo 3

#### Experimentos de laboratorio

- A continuación se usó una muestra de AA basada en *Laminaria hyperborea* con un pH de 2,0 y un contenido de materia seca del 24,5 % en p/p. Los cultivos de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* se produjeron en los laboratorios DuPont Food Protection en Brabrand, Dinamarca.
- Del material AA se transfirieron 3 muestras de 150 g a jarras de plástico. Se añadieron a una jarra 10 ml de cultivo de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, respectivamente, y se mezclaron bien usando una cuchara durante 30 segundos. Dos de las tres muestras se trataron en un horno de microondas, tipo Electrolux 850W como se muestra en la Tabla 4 a continuación.
- Tratamiento en microondas

Tabla 4: Resumen del experimento (tiempo de tratamiento en microondas)

ID de la muestra	Efecto (W)	Tiempo de tratamiento en microondas (min)
Jarra 1	Sin tratamiento en microondas	Sin tratamiento en microondas
Jarra 2	850	5
Jarra 3	850	10

#### Pruebas de planta piloto

- Además de las pruebas de laboratorio, se llevó a cabo una prueba de desafío a escala piloto. Se procesó un lote de AA contaminado con microbios en un tubo de microondas, tipo "Thermo-star" de Bertin Technology. El análisis del recuento total de placas reveló que el lote contenía un nivel de  $3 \cdot 10^4$  ufc/g de AA húmedo. El objetivo de la prueba fue determinar el efecto de la temperatura y el tiempo en la calidad microbiológica de la AA.
- Tratamiento de microondas a escala piloto

Tabla 5: Tratamiento del AA microbiológicamente contaminado en el tubo piloto de microondas

Prueba	Potencia (W por magnetrón)	Velocidad del tornillo (avance/transporte-rpm)	Flujo (kg/h)	Densidad	Tiempo de espera (min)
1	2000/2000/129/71/71/70	11,5/9,8	26,9	0,21	04:30
2	0/401/1607/1603/71/70	11,5/9,8	23	0,21	04:13
3	0/0/502/1602/1605/70	11,5/9,8	24	0,21	03:25
4	0/0/0/500/1602/1605	11,5/9,8	24		02:48
5	0/0/0/1250/1602/1605	15,1/12,7	36	0,21	01:52
7	1500/2000/1600/1600/1602/1605	25/23	55	0,24	01:13

**Análisis microbiológico**

Las muestras de AA antes y después del tratamiento con microondas se analizaron de acuerdo con 3M Petrifilm Aerobic Count Plates, Interpretation Guide, Reminders for Use and Sample Preparation.

Certificado Nordval No. 012. Método NMKL 146,1993 para el recuento microbiano aeróbico total.

Los esporulados aeróbicos mesófilos se analizaron de acuerdo con la Asociación Americana de Salud Pública para Alimentos y Medicamentos (APHA), 2001, 4ª versión, 22.512.

**Resultados**

**Experimentos de laboratorio**

Recuento total de placas

Los resultados presentados en la Tabla 6 muestran el efecto del tratamiento con microondas en el recuento total de placas. Los resultados para la Jarra 1 (referencia) indican niveles altos por encima de  $6 \cdot 10^4$  ufc/g  $12 \cdot 10^4$  ufc/g para las porciones 1 y 2. Después de 5 minutos de tratamiento con microondas a 850 W, el recuento de placas en ambas porciones disminuyó a  $< 100$  ufc/g, es decir, una disminución de dos órdenes de magnitud. Después de 10 minutos de tratamiento con microondas no se observó una disminución adicional, lo que sugiere que 5 minutos de tratamiento con microondas son suficientes.

Tabla 6: Resultados del recuento total de placas con y sin tratamiento con microondas.

ID de la muestra	Tiempo de tratamiento en microondas (min)	Porción 1 (ufc/g)	Porción 2 (ufc/g)
Jarra 1	Sin tratamiento en microondas	63.600	123.600
Jarra 2	5	< 100	< 100
Jarra 3	10	< 100	-

Esporas mesófilas

La Tabla 7 presenta los resultados correspondientes para las esporas mesófilas específicamente. Se observan tendencias similares a las de la Tabla 6, es decir, después de 5 minutos de tratamiento con microondas, las esporas mesófilas habían disminuido en aproximadamente dos a tres órdenes de magnitud a  $< 10$  ufc/g. De nuevo, no se registraron beneficios adicionales durante 10 minutos de tratamiento con microondas.

Tabla 7: Resultados del recuento de esporas mesófilas con y sin tratamiento con microondas

ID de la muestra	Tiempo de tratamiento en microondas (min)	Porción 1 (ufc/g)	Porción 2 (ufc/g)
Jarra 1	Sin tratamiento en microondas	44.900	157.300
Jarra 2	5	< 10	< 10
Jarra 3	10	< 10	-

**Pruebas a escala piloto**

Recuento total de placas

Tabla 8: Resultados del recuento total de placas antes y después del tratamiento con microondas

Prueba	Potencia (W por magnetron)	Flujo (kg/h)	Tiempo de espera (min)	TPC antes (ufc/g)	TPC después (ufc/g)
1	2000/2000/129/71/71/70	26,9	04:30	> 30.000	1600
2	0/401/1607/1603/71/70	23	04:13	> 30.000	100
3	0/0/502/1602/1605/70	24	03:25	> 30.000	100
4	0/0/0/500/1602/1605	24	02:48	> 30.000	100
5	0/0/0/1250/1602/1605	36	01:52	> 30.000	400
7	1500/2000/1600/1600/1602/1605	55	01:13	2400	< 100

Los resultados presentados en la Tabla 8 muestran el efecto del tratamiento con microondas en el recuento total de placas en la escala piloto. El recuento total de placas se redujo de  $10^4$  ufc/g a  $< 10^2$  ufc/g. La especificación sobre la calidad microbiológica del alginato especifica  $< 1000$  ufc/g, por lo tanto, el lote contaminado microbiológicamente puede tratarse con microondas para cumplir con las especificaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de despolimerización del ácido algínico, comprendiendo dicho método las etapas de:
  - 5 a) proporcionar ácido algínico como material de partida para la etapa b), en donde el material de partida de ácido algínico tiene un pH en el intervalo del 0-4,4 y en donde el contenido de materia seca del material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 15-70 % en p/p, y
  - b) tratar dicho material de partida de ácido algínico con irradiación de microondas para obtener un material de ácido algínico despolimerizado.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la frecuencia de microondas está entre 300 MHz y 300 GHz, tal como entre 300 MHz y 30 GHz, preferiblemente entre 300 MHz y 3 GHz.
- 15 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de ácido algínico en el material de partida de ácido algínico está en el intervalo del 7,5-100 % en p/p basado en materia seca, tal como en el intervalo del 80-100 % en p/p basado en materia seca, preferiblemente en el intervalo del 90-100 % en p/p basado en materia seca.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico tiene un pH en el intervalo del 0-3,5.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico tiene un peso molecular promedio en peso de 1.500.000-50.000 Da.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico comprende ácido algínico en una mezcla con uno o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en agua, metanol, etanol e isopropanol.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico comprende ácido algínico en agua.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico comprende además un agente reductor y/u oxidante.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico se drena y/o se prensa y/o se seca antes del tratamiento con microondas.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado tiene un peso molecular promedio en peso de 300.000-2000 Da.
- 40 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de ácido algínico despolimerizado se neutraliza adicionalmente después del tratamiento con microondas para obtener diversos alginatos.
- 45 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido algínico despolimerizado se convierte en alginato de propilenglicol usando óxido de propileno.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el material de partida de ácido algínico está en forma de fibras de ácido algínico.