

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 497**

51 Int. Cl.:

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2015 E 15190390 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3009132**

54 Título: **Método para producir compuestos de estilbeno purificados**

30 Prioridad:

17.10.2014 JP 2014212754

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

22.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**UMEHARA, MASAHIRO;
KURITA, IKUKO;
YANAE, KOJI y
SAI, MASAHIKO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 720 497 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

Método para producir compuestos de estilbano purificados

Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos para producir compuestos de estilbano purificados.

5 Antecedentes de la técnica

Los polifenoles han encontrado aplicaciones en diversos campos, tales como farmacéuticos, cosméticos, y alimentarios, debido a sus propiedades.

10 El piceatanol, por ejemplo, es un compuesto de estilbano que es un tipo de polifenol. Está contenido en las semillas de la fruta de la pasión, es decir, un fruto del género *Passiflora* en la familia *Passifloraceae*, y se ha informado que suprime la producción de melanina, una causa principal de manchas marrones, pecas, y pigmentación debido a quemaduras solares (patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 2009-102298).

15 El piceatanol también se encuentra en los géneros *Rhodomyrtus tomentosa* y *Callistemon rigidus*, que son arbustos de hoja perenne pequeños y grandes, respectivamente, en la familia *Myrtaceae*. Los extractos de estos arbustos tienen un efecto positivo en la recuperación del daño por UV y un efecto inhibitorio sobre MMP-2. Se ha informado que el piceatanol es el principio activo en extractos de ese tipo (patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 2012-46448; Kenroh Sasaki *et al.*, *Journal of Tohoku Pharmaceutical University*, 57, 61-65 (2010)).

20 En el uso, los polifenoles a menudo se procesan mediante formación de complejos de inclusión con ciclodextrina (CD) para mejorar la solubilidad, absorción, y sabor. Por ejemplo, la solubilidad en agua y la absorción intestinal de los estilbenos se mejoró mediante encapsulación en una α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD), o una mezcla de α -CD, β -CD y γ -ciclodextrina (γ -CD) (patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 2000-344622). El sabor amargo de los polifenoles se suprimió mediante formación de complejos de inclusión con una ciclodextrina altamente ramificada (patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 2011-162539).

25 Para usar polifenoles en diversos campos, se han purificado a partir de extractos de plantas usando equipo experimental para adición, adsorción y filtración enzimática (patente japonesa abierta a la inspección pública N.º 2013-021950).

Problema a resolver con la presente invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos métodos para producir compuestos de estilbano purificados.

Compendio de la invención

30 Los presentes inventores han realizado amplios esfuerzos para desarrollar métodos más fáciles y más convenientes para producir compuestos de estilbano purificados y, como resultado, encontraron que la adición de γ -ciclodextrina (γ -CD) a un líquido que contiene un compuesto de estilbano da como resultado un precipitado que contiene γ -CD y el compuesto de estilbano y que el compuesto de estilbano se puede purificar mediante separación del precipitado obtenido.

35 Un aspecto de la presente invención es un precipitado obtenido por adición de γ -ciclodextrina a un líquido que contiene piceatanol. El precipitado se puede haber separado del líquido.

Otro aspecto de la presente invención es un método para purificar un compuesto de estilbano a partir de un líquido que contiene un compuesto de estilbano, que comprende las etapas de añadir γ -ciclodextrina al líquido para producir un precipitado; y separar el precipitado del líquido. El compuesto de estilbano purificado puede ser sólido.

40 Un aspecto de la presente invención es un método para producir un compuesto de estilbano purificado a partir de un líquido que contiene un compuesto de estilbano, que comprende las etapas de añadir γ -ciclodextrina al líquido para producir un precipitado; y separar el precipitado del líquido. El líquido puede ser un material de extracto de plantas. El líquido puede ser un material de extracto obtenido a partir de semillas de fruta de la pasión, mirto rosa, o árbol del cepillo. El líquido puede contener un disolvente orgánico. El método puede comprender adicionalmente la etapa de añadir agua, disolvente orgánico anhidro, o disolvente orgánico que contiene agua al precipitado separado. El disolvente orgánico puede ser alcohol. El alcohol puede ser etanol.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un gráfico que muestra precipitación de piceatanol con α -ciclodextrina.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra precipitación de piceatanol con β -ciclodextrina.

50 La Fig. 3 es un gráfico que muestra precipitación de piceatanol con γ -ciclodextrina.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra precipitación de resveratrol con γ -ciclodextrina.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra precipitación de rapontigenina con γ -ciclodextrina;

La Fig. 6 es un gráfico que muestra precipitación de isorrapontigenina con γ -ciclodextrina.

5 La Fig. 7 es una vista que muestra la relación entre la concentración de etanol y la actividad de precipitación de γ -ciclodextrina; y

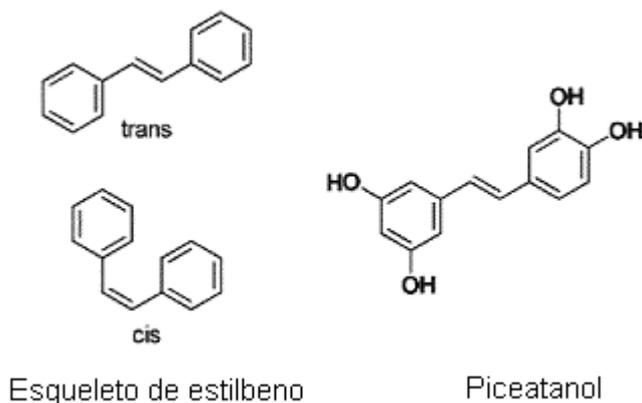
La Fig. 8 es una vista que muestra la relación entre la actividad de precipitación de γ -ciclodextrina y la concentración de etanol en materiales de extracto de plantas.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

10 Los objetos, características, ventajas, e ideas de la presente invención son evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción de la presente memoria descriptiva. Los expertos en la técnica pueden reproducir la presente invención fácilmente a partir de la descripción en la presente memoria.

(1) Compuestos de estilbeno

15 Los compuestos de estilbeno purificados según un método de la presente invención generalmente se refieren a polifenoles que tienen un esqueleto de estilbeno. Los ejemplos incluyen estilbeno, piceatanol, scirpusina A, scirpusina B, scirpusina C, rapontigenina, isorrapontigenina, pteroesstilbeno, resveratrol, oxirresveratrol, piceido, astringina, raponticina, y ϵ -viniferina. Los compuestos de estilbeno se pueden sintetizar por vía química o se pueden obtener a partir de fuentes naturales tales como plantas.



(2) Líquido que contiene un compuesto de estilbeno

20 Los compuestos de estilbeno purificados se pueden producir a partir de líquidos que contienen un compuesto de estilbeno según un método de la presente invención. Los ejemplos de líquidos que contienen un compuesto de estilbeno incluyen soluciones obtenidas por disolución de un compuesto de estilbeno parcialmente purificado en un disolvente o producto sin procesar tal como un material de extracto de plantas. Las soluciones que contienen un compuesto de estilbeno pueden contener un disolvente orgánico tal como etanol. Por ejemplo, la concentración del etanol no está limitada de forma específica; sin embargo es preferible un 80 % o menos, más preferiblemente un 70 % o menos, y lo más preferiblemente un 50 % o menos. Como se usa en la presente memoria, la expresión "compuesto de estilbeno purificado" se refiere a un compuesto de estilbeno con una pureza más elevada producido a partir de un líquido que contiene un compuesto de estilbeno con una pureza más baja. El compuesto de estilbeno purificado es preferiblemente sólido. La pureza del compuesto de estilbeno se refiere al porcentaje de peso del compuesto de estilbeno contenido en el sólido cuando el compuesto de estilbeno se proporciona como un sólido, o el porcentaje de peso del compuesto de estilbeno contenido en el sólido obtenido después de retirar un disolvente cuando el compuesto de estilbeno se proporciona como un líquido. Se observa que el peso de una sustancia, tal como ciclodextrina, añadida al sólido o al líquido que contiene un compuesto de estilbeno en un método de purificación se resta del peso del sólido para calcular la pureza. La purificación es un método para aumentar la pureza.

35

Los materiales de extracto de plantas se pueden producir usando un método conocido. Por ejemplo, una planta se puede secar, seguido por trituración, molienda, o corte para producir partes pequeñas de, por ejemplo, semillas, que a continuación se tratan usando un disolvente. A continuación, los residuos se retiran para producir un extracto. Este extracto se puede usar sin ningún procesamiento adicional. Como alternativa, se puede usar un extracto de una pureza o concentración diferente, que se ha obtenido mediante purificación de un compuesto de estilbeno a partir de un extracto mediante uno o más de los diversos métodos o mediante dilución de un extracto usando uno o más de

40

los diversos disolventes. Un extracto sin disolventes se puede obtener retirando el disolvente del extracto. La forma del extracto sin disolvente no está limitada de forma específica. Puede ser, por ejemplo, insólito tal como un polvo, sustancia amorfa, o aceite. Como se ha descrito anteriormente, cualquier producto proporcionado durante el método de obtención de un estrato sin disolvente a partir de una planta se puede usar como un material de extracto de plantas de la presente invención. Como alternativa, una solución obtenida por disolución del extracto sin disolvente en un disolvente se puede usar como el material de extracto de plantas.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar de forma apropiada el tipo del disolvente usado para la extracción. El disolvente puede ser, por ejemplo, agua; un disolvente orgánico o un disolvente orgánico que contiene agua, tal como metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, glicerina, propilenglicol, dipropilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetil sulfóxido, acetonitrilo, N,N-dimetilformamida, 2-propanol, 1,4-dioxano, hexanos, cloroformo, y diclorometano; o una mezcla de dos o más disolventes seleccionados entre los que se han mencionado anteriormente. Es preferible que el disolvente sea agua, etanol, 1,3-butilenglicol o una mezcla de dos o más disolventes seleccionados entre los mismos. Es más preferible que el disolvente sea agua, etanol, o un etanol hidratado que es una mezcla de disolvente de agua y etanol. La expresión "disolvente orgánico que contiene agua" como se usa en la presente memoria indica "disolvente orgánico que contiene agua". El agua añadida al disolvente orgánico para producir el disolvente orgánico que contiene agua no está limitada de forma específica y puede ser agua pura o agua con impurezas, una solución acuosa ácida o una solución acuosa alcalina, o una solución tampón que contiene diversos iones. Además, la temperatura del disolvente usado para la extracción se puede seleccionar de forma apropiada De un intervalo de temperaturas del cual el disolvente mantiene sus propiedades líquidas.

La proporción de los disolventes no está limitada de forma específica cuando se usa una mezcla de disolventes. Por ejemplo, cuando se usa una mezcla de disolventes de agua y etanol, la proporción de volumen de agua y etanol puede ser de 1:99 a 99:1, preferiblemente de 3:97 a 80:20, más preferiblemente de 5:95 a 50:50, y de forma particularmente preferible de 10:90 a 40:60.

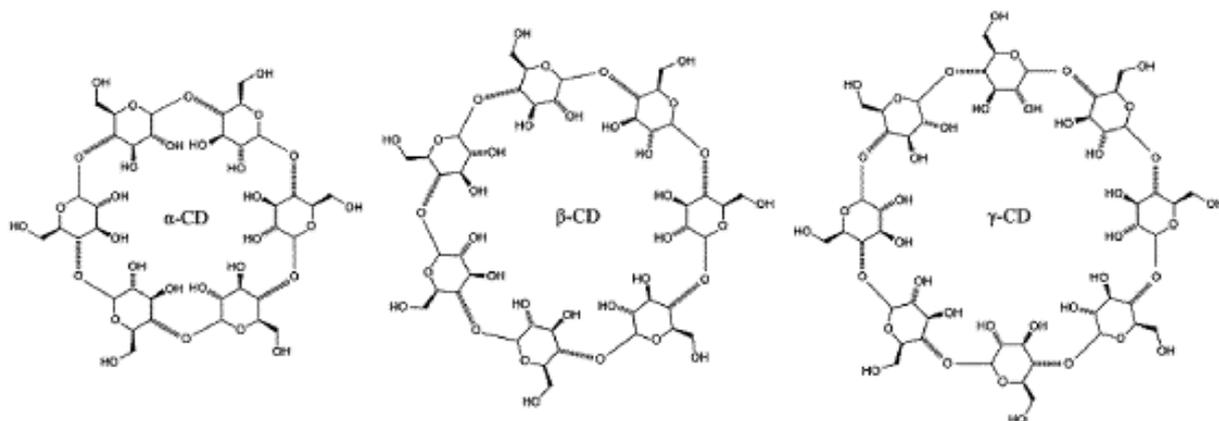
Cuando se usa agua o un disolvente mezclado con agua como disolvente, es preferible que el disolvente sea agua caliente o un disolvente mezclado con agua caliente. El agua o el disolvente mezclado con agua puede contener una sal. El disolvente que contiene una sal puede ser un tampón, por ejemplo. El pH del tampón no está limitado de forma específica y puede ser ácido, neutro o alcalino. El tampón es preferiblemente ácido, más preferiblemente, ácido con un pH de 6 o inferior, y todavía más preferiblemente, ácido con un pH de 1 a 5. El tipo de sal en el tampón no está limitado de forma específica. Los ejemplos incluyen citrato, malato, fosfato, acetato, y carbonato.

El método para retirar el disolvente de un extracto no está limitado de forma específica y se puede usar cualquier método conocido. Por ejemplo, se puede usar destilación a presión reducida, liofilización, o secado por pulverización. La liofilización o el secado por pulverización son preferibles y, el secado por pulverización es el más preferible.

La planta usada no está limitada de forma específica siempre y cuando contenga un compuesto de estilbano. Los ejemplos incluyen frutos de Flores de la pasión (p. ej., *Passiflora edulis*, *Passiflora alata*, *Passiflora amethystina*, *Passiflora antioquiensis*, *Passiflora biflora*, *Passiflora buonaparteana*, *Passiflora capsularis*, *Passiflora cearensis*, *Passiflora coccinea*, *Passiflora cochinchinensis*, *Passiflora filamentosa*, *Passiflora herbertiana*, *Passiflora laurifolia*, *Passiflora ligularis*, *Passiflora lunata*, *Passiflora lutea*, *Passiflora maliformis*, *Passiflora mixta*, *Passiflora mucronata*, *Passiflora mollissima*, *Passiflora nitida*, *Passiflora organensis*, *Passiflora pallida*, *Passiflora parahybensis*, *Passiflora pedata*, *Passiflora pinnatistipula*, *Passiflora popenovii*, *Passiflora quadrangularis*, *Passiflora riparia*, *Passiflora rubra*, *Passiflora serrata*, *Passiflora tiliacifolia*, *Passiflora tripartita*, *Passiflora villosa*, y *Passiflora warmingii*), mirto rosa (p. ej., *Rhodomyrtus tomentosa*), árbol del cepillo (p. ej., árbol del cepillo de las especies *Callistemon speciosus*, y *Callistemon rigidus*), *Caragana tibetica* (p. ej., año), hierba nudosa japonesa (*Fallopia japonica*) (p. ej., raíz), cacahuete (*Arachis hypogaea*), uva (*Vitaceae*) (p. ej., fruto), arándano azul (*Cyanococcus*) (p. ej., fruto), arándano de ciervo (*Vaccinium stamineum*) (p. ej., fruto), arroz, trigo, cebada, café, manzana, alcachofa, cacahuete, naranja, piña, boniato y bardana. Es preferible usar el fruto de una flor de la pasión, mirto rosa o al borde en cepillo que se sabe que tienen un alto contenido de piceatanol. El compuesto de estilbano se puede extraer de cualquier parte de toda la planta incluyendo, por ejemplo, se puede usar fruto, flores, semillas, hojas, ramas, cortezas, troncos, tallos, por raíces. Es preferible que las partes que se van a usar sean semillas para fruto de una flor de la pasión, fruto para mirto rosa, y tallos para árbol del cepillo.

(3) γ -ciclodextrina

Se conocen tres formas de ciclodextrina (CD), α , β , e γ , como se indica a continuación. La ciclodextrina usada en el método según la presente invención es la γ -ciclodextrina (γ -CD).



Aunque la γ -CD se puede sintetizar por vía química con un método conocido, los compuestos comerciales están fácilmente disponibles.

(4) Producción de compuestos de estilbeno purificados

- 5 Según el método de producción según la presente invención, cuando la γ -CD se añade a un líquido que contiene un compuesto de estilbeno representado por piceatanol y la mezcla se agita, se produce un precipitado que contiene γ -CD y el compuesto de estilbeno. Posteriormente, la solución que contiene el precipitado se agita si fuera necesario y a continuación se somete a centrifugación o se permite que repose, seguido por filtración, decantación, o succión para retirar el sobrenadante y separar el precipitado. La adición de un disolvente orgánico, tal como alcohol representado por etanol al precipitado hace que el compuesto de estilbeno en el precipitado se libere del precipitado En el disolvente orgánico. Este disolvente orgánico que contiene el precipitado a continuación se agita si fuera necesario y a continuación se hace centrifugación o se permite que repose para precipitar la γ -CD en el disolvente orgánico, seguido por filtración, decantación, o succión para recoger el disolvente orgánico que contiene el compuesto de estilbeno libre liberado del precipitado, retirando de ese modo la γ -CD del disolvente orgánico. De este modo, se puede obtener una solución de compuesto de estilbeno purificado que contiene una alta pureza de compuesto de estilbeno. Además, al retirar el disolvente orgánico de esta solución, se puede producir fácilmente un compuesto de estilbeno purificado en forma sólida. Las etapas para disolver el compuesto de estilbeno sólido resultante, por ejemplo, en un tampón y purificar adicionalmente el compuesto de estilbeno usando la γ -CD se pueden repetir, aumentando de ese modo la pureza del compuesto de estilbeno. Para la separación del compuesto de estilbeno de la γ -CD, el compuesto de estilbeno se puede purificar mezclando el precipitado que contiene γ -CD y el compuesto de estilbeno con un disolvente, tal como agua, disolviendo el precipitado en el disolvente, y a continuación separando el compuesto de estilbeno mediante cromatografía en columna usando equipos conocidos.

Como se usa en la presente memoria, el término "precipitar" se refiere un sólido que está presente en un líquido pero no está disuelto. El precipitado incluye un sólido que ha sedimentado en el fondo de un recipiente en el que se mantiene el líquido, así como un sólido disperso en el líquido. El sólido no está limitado de forma específica en su tamaño, forma, estructura, o composición siempre y cuando no se disuelva en el líquido. Por ejemplo, el precipitado se puede separar del líquido usando centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos o más.

Se observa que la γ -CD añadida al líquido que contiene un compuesto de estilbeno puede estar en forma de polvo o una solución que contiene la γ -CD. La temperatura del líquido que contiene un compuesto de estilbeno después de la adición de la γ -CD o agitación no está limitada de forma específica. El tiempo de agitación tampoco está limitado de forma específica.

El compuesto de estilbeno purificado producido de ese modo según los métodos reivindicados se puede usar para agentes farmacéuticos (incluyendo medicamentos y reactivos), casi fármacos, cosméticos, o alimentos.

Ejemplos

- 35 <Ejemplo 1> Precipitación de un compuesto de estilbeno con diferentes ciclodextrinas (CDs)

La precipitación de un compuesto de estilbeno con α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD) e γ -ciclodextrina (γ -CD) se examinó. En este ejemplo, el piceatanol se usó como el compuesto de estilbeno.

(1) Precipitación de piceatanol con α -CD

- 40 Se prepararon soluciones de α -CD de seis concentraciones diferentes como se muestra en la Tabla 1. A continuación, 300 μ l de la solución de α -CD preparada o agua pura se añadieron a 10 mg de piceatanol (indicado como "Pic" en la figura), que se agitó en condiciones de protección de luz a 25 °C durante 24 horas. Posteriormente, las soluciones agitadas se sometieron a centrifugación a 15.000 rpm a 25 °C durante 5 minutos para recoger los

sobrenadantes. Las concentraciones de piceatanol contenidas en los sobrenadantes se midieron usando HPLC. Las condiciones de HPLC son las que siguen a continuación.

[Condiciones de HPLC]

Columna: Mightysil RP-18 GP250-10; diámetro: 10 mm, longitud: 250 mm (Kanto Chemical Co., Inc.)

5 Temperatura de la columna: 40 °C

Condiciones de elución: caudal: 3 ml/min, de metanol al 0 %/agua pura al 100 % agua a metanol al 30 %/agua pura al 70 % (gradiente, 10 min)

Detección de UV: 280 nm

Los resultados se proporcionan en la Tabla 1 y en la Fig. 1.

10 Tabla 1

α -CD (mg/ml)	Concentración de Pic en líquido (mg/ml)
0	1,4
27,0	6,1
54,1	11,0
67,6	13,4
81,1	15,8
108,2	20,9
135,2	26,0

Como se observa a partir de la Tabla 1 y de la Fig. 1, se encontró que la concentración de piceatanol aumentaba con el aumento de la concentración de la solución de α -CD añadida.

Como es evidente a partir de lo mencionado anteriormente, el piceatanol no precipita con α -CD.

15 (2) Precipitación de piceatanol con β -CD

20 Se prepararon soluciones de β -CD de cinco concentraciones diferentes (3,37, 6,73, 10,10, 13,46, 16,83 mg/ml). A continuación el piceatanol se añadió a agua pura en la cantina suficiente como para precipitar, que se agitó en condiciones de protección de luz a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación las soluciones se sometieron a centrifugación a 3.000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Una solución saturada de piceatanol obtenida pasando el sobrenadante resultante a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 μ m se mezcló a continuación con agua pura o con cada una de las soluciones de β -CD preparadas en una proporción de volumen de 7:3. Las concentraciones finales de β -CD de las soluciones mixtas se proporcionan en la Tabla 2.

25 Las soluciones mixtas se agitaron en condiciones de protección de luz a 25 °C durante 24 horas. Posteriormente, se sometieron a centrifugación a 15.000 rpm a 25 °C durante 5 minutos para recoger los sobrenadantes. Las concentraciones de piceatanol contenido en los sobrenadantes se emitieron usando HPLC al igual que en el caso de (1).

Los resultados se proporcionan en la Tablas 2 y en la Fig. 2.

Tabla 2

β -CD (mg/ml)	Concentración de Pic en líquido (mg/ml)
0	0,94
1,0	0,95
2,0	0,95
3,0	0,96
4,0	0,95
5,0	0,96

* β -CD se indica a concentraciones finales

Como se observa a partir de la Tabla 2 y en la Fig. 2, la concentración de piceatanol no cambió después de la adición de β -CD.

Como es evidente a partir de lo mencionado anteriormente, el piceatanol no precipita con β -CD.

5 (3) Precipitación de piceatanol con γ -CD

Se prepararon soluciones de γ -CD De seis concentraciones diferentes (42,78, 85,56, 106,95, 128,33, 171,11, 213,89 mg/ml). Una solución saturada de piceatanol a continuación se mezcló con agua pura o con cada una de las soluciones de γ -CD preparadas en una proporción de volumen de 7:3. Las concentraciones de γ -CD finales de las soluciones mixtas se proporcionan en la Tabla 3.

10 Las soluciones mixtas se agitaron en condiciones de protección de luz a 25 °C durante 24 horas. Posteriormente, se sometieron a centrifugación a 15.000 rpm a 25 °C durante 5 minutos para recoger los sobrenadantes. Estos sobrenadantes se sometieron adicionalmente a centrifugación usando las mismas condiciones para obtener otro lote de sobrenadantes. Las concentraciones de piceatanol contenidas en los sobrenadantes de la segunda centrifugación se midieron usando HPLC al igual que en el caso de (1). Los resultados se proporcionan en la Tabla 3 y en la Fig. 3.

15 Tabla 3

γ -CD (mg/ml)	Concentración de Pic en líquido (mg/ml)
0	0,88
12,8	0,12
25,7	0,036
32,1	0,026
38,5	0,021
51,3	0,014
64,2	0,011

* γ -CD se indica a concentraciones finales

Como se observa a partir de la Tabla 3 y en la Fig. 3, la adición de γ -CD dio como resultado una rápida disminución de las concentraciones de piceatanol en los sobrenadantes. Como la cantidad de γ -CD añadida aumentó, la concentración de piceatanol en el sobrenadante disminuyó adicionalmente.

Como es evidente a partir de lo mencionado anteriormente, la adición de γ -CD conduce a la precipitación de piceatanol. Por consiguiente, el piceatanol se puede separar del sobrenadante por centrifugación.

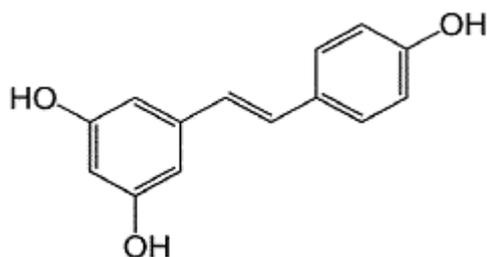
5 Como se ha mostrado en los experimentos mencionados anteriormente, el piceatanol no precipita ya sea por la adición de α -CD o por la adición de β -CD mientras que la adición de γ -CD al líquido que contiene piceatanol da como resultado un precipitado que contiene γ -CD y piceatanol.

<Ejemplo 2> Precipitación de diversos compuestos de estilbeno con γ -CD

(1) Método

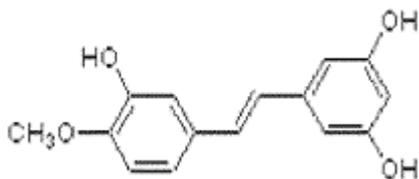
10 El resveratrol (indicado como "Res" en la figura), la rapontigenina (indicada como "Ra" en la figura), y la isorrapontigenina (indicada como "Isorra" en la figura) se usaron como los compuestos de estilbeno para preparar las respectivas soluciones de los compuestos de estilbeno. A cada solución, se añadió γ -CD. La precipitación de estos compuestos de estilbeno con γ -CD y la relación entre la concentración de γ -CD y la precipitación de los compuestos de estilbeno se examinaron. Los métodos para la preparación de las soluciones y la medición usando HPLC fueron similares a los que se han descrito en el Ejemplo 1 (3) que se ha mencionado anteriormente.

Las fórmulas químicas de los compuestos de estilbeno usados son las que siguen a continuación.

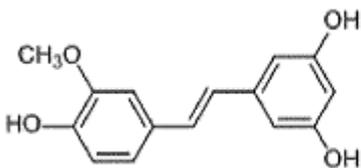


Resveratrol

15



Rapontigenina



Isorrapontigenina

(2) Resultados

Los resultados para estos compuestos de estilbeno se muestran en las Tablas 4 a 8 y en las Figs. 4 a 8.

20 Tabla 4

γ -CD (mg/ml)	Concentración de Res en líquido (mg/ml)
0	0,028
12,8	0,020
25,7	0,012
32,1	0,010

γ -CD (mg/ml)	Concentración de Res en líquido (mg/ml)
38,5	0,0082
51,3	0,0058
64,2	0,0037

* γ -CD se indica a las concentraciones finales

Tabla 5

γ -CD (mg/ml)	Concentración de Ra en líquido (mg/ml)
0	0,097
12,8	0,060
25,7	0,020
32,1	0,017
38,5	0,013
51,3	\leq 0,010
64,2	\leq 0,010

* γ -CD se indica a las concentraciones finales

Tabla 6

γ -CD (mg/ml)	Concentración de Isorra en líquido (mg/ml)
0	0,19
12,8	0,0
25,7	0,0
32,1	0,0
38,5	0,0
51,3	0,0
64,2	0,0

5 * γ -CD se indica a las concentraciones finales

Como se observa a partir de las Tablas 4 a 6 y en las Figs. 4 a 6, con los diversos compuestos de estilbano distintos al piceatanol, la adición de γ -CD a los líquidos que contienen los compuestos de estilbano da como resultado la producción de precipitados que contienen γ -CD y los compuestos de estilbano.

<Ejemplo 3> Relación entre la precipitación con γ -CD y la concentración de disolvente orgánico

El efecto de la concentración de un disolvente orgánico en la precipitación de un compuesto de estilbeno con γ -CD se examinó. Como disolvente orgánico se usó etanol (EtOH).

(1) Métodos

- 5 Se añadieron 100 mg de γ -CD a soluciones de piceatanol obtenidas por disolución de piceatanol en 500 μ l de soluciones acusadas de etanol que tienen cinco concentraciones diferentes que se muestran en la Tabla 9. Las mezclas se agitaron en condiciones de protección de luz a 4 °C durante 2 horas y a continuación se centrifugaron. En las mismas condiciones que se han mencionado anteriormente para recoger los sobrenadantes. Las concentraciones de piceatanol en los sobrenadantes recogidos a continuación se emitieron usando HPLC en las mismas condiciones que se han mencionado anteriormente.

(2) Resultados

Los resultados se proporcionan en la Tabla 8 y en la Fig. 8. Las proporciones de precipitación se calcularon usando la siguiente ecuación.

- 15 Proporción de precipitación = $100 - ([\text{concentración de piceatanol en el sobrenadante}]/[\text{concentración de piceatanol antes de la adición de } \gamma\text{-CD}] \times 100)$

Tabla 7

Concentración de EtOH (%)	Proporción de precipitación (%)
0	$\geq 99,3$
50	99,3
70	99,3
80	35,8
99,5	12,0

A partir de la Tabla 7 y de la Fig. 7, independientemente de la concentración de etanol, la adición de γ -CD dio como resultado la producción de un precipitado que contenía γ -CD y piceatanol. En particular, se observaron proporciones de precipitación considerablemente elevadas para concentraciones de etanol de al menos un 70 % o inferiores.

- 20 <Ejemplo 4> Efecto de la adición de γ -CD en la precipitación de piceatanol en materiales de extracto de plantas y concentración de alcohol

(1) Métodos

- 25 Las γ -CD in en las cantidades que se proporcionan en la Tabla 8 se mezclaron con un material de extracto de semillas de fruta de la pasión, obtenido usando etanol que contiene agua. El material de extracto de las semillas de fruta de la pasión se obtuvo como sigue a continuación. Las semillas de fruta de la pasión se tostaron y se molieron, y se añadieron etanoles que contenían agua al 80 %, al 60 %, al 40 %, y al 20 % (las composiciones de etanol que contienen agua son etanol al 80 % en v/v + agua al 20 % en v/v, etanol al 60 % en v/v + agua al 40 % en v/v, etanol al 40 % en v/v + agua al 60 % en v/v, y etanol al 20 % en v/v + agua al 80 % en v/v respectivamente) y se mezclaron.
- 30 Las mezclas se agitaron seguido por filtración para separar el sólido y el líquido para obtener de ese modo materiales de extracto de las semillas de fruta de la pasión. Las soluciones de etanol del material de extracto se agitaron en condiciones de protección de luz a 4 °C durante 2 horas y se centrifugó a 15.000 rpm a 4 °C durante 5 minutos para obtener los sobrenadantes. A continuación, las concentraciones de piceatanol libre en los sobrenadantes se midieron usando HPLC en las mismas condiciones que se han mencionado anteriormente.

(2) Resultados

- 35 Los resultados se muestran en la Tabla 8 y en la Fig. 8. Las proporciones de precipitación se obtuvieron usando la misma ecuación que se ha mencionado anteriormente.

Tabla 8

Concentración de EtOH (%)	γ -CD (mg)	Proporción de precipitación (%)
20	0	0
	20	83,2
	60	99,3
	100	100,4
40	0	0
	20	57,1
	60	95,4
	100	98,0
60	0	0
	20	52,1
	60	90,4
	100	93,3
80	0	0
	20	20,8
	60	34,5
	100	75,2

Como se muestra en la Tabla 8 y en la Fig. 8, la precipitación del compuesto de estilbano con γ -CD es independiente de la concentración de etanol. En particular, se obtiene un gran efecto de precipitación a concentraciones de etanol de al menos un 60 % o inferiores.

5

<Ejemplo 5> Purificación de compuesto de estilbano a partir de material de extracto de plantas usando γ -CD

(1) Métodos

En primer lugar, 1,95 g de γ -CD se añadieron a 30 ml de material de extracto de semillas de fruta de la pasión. A continuación, la mezcla se agitó en condiciones de protección de luz a temperatura ambiente durante 13,5 horas y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, seguido por la retirada del sobrenadante obtenido. El precipitado obtenido a partir de la centrifugación se liofilizó, y a esto se le añadieron 10 ml de etanol. La mezcla se agitó en condiciones de protección de luz a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante obtenido se recuperó. El sobrenadante recuperado se concentró y se secó usando un evaporador para producir un extracto sin disolvente, sólido. Las concentraciones de piceatanol en el material de extracto de las semillas de la fruta de la pasión en el estrato sin disolvente antes de los exámenes se midieron usando HPLC en las mismas condiciones que se han mencionado anteriormente, después de diluir el material de extracto y el extracto sin disolvente a un factor de dilución determinado previamente.

10

15

(2) Resultados

5 La pureza del piceatanol en el material de extracto de las semillas de fruta de la pasión antes de los experimentos era de un 10,5 %, mientras que en el extracto sin disolvente era de un 64, 2. Esto indica que el método según la presente invención conduce a un aumento de 6,1 veces en la pureza de piceatanol. Cada valor de pureza se obtuvo como un porcentaje de peso de piceatanol por peso de sólido en el material de extracto con el sólido sin disolvente calculando el peso de piceatanol en el material de extracto o en el estrato sin disolvente a partir de la concentración de piceatanol medida.

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede proporcionar nuevos métodos para producir compuestos de estilbeno purificados.

REIVINDICACIONES

1. Un precipitado obtenido por adición de γ -ciclodextrina a un líquido que contiene piceatanol.
2. El precipitado según la reivindicación 1, en donde el precipitado se ha separado del líquido.
- 5 3. Un método para purificar un compuesto de estilbeno a partir de un líquido que contiene un compuesto de estilbeno, que comprende las etapas de:
añadir γ -ciclodextrina al líquido para producir un precipitado; y
separar el precipitado del líquido.
4. El método según la reivindicación 3, en donde el precipitado es sólido.
- 10 5. El método según la reivindicación 3, que comprende adicionalmente purificar el compuesto de estilbeno del precipitado.
6. El método según la reivindicación 5, en donde el compuesto de estilbeno es piceatanol.
7. El método según la reivindicación 5 o 6, en donde el líquido es un material de extracto de plantas.
8. El método según la reivindicación 7, en donde el líquido es un material de extracto obtenido a partir de semillas de fruta de la pasión, mirto rosa, o árbol del cepillo.
- 15 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el líquido contiene un disolvente orgánico.
10. El método según la reivindicación 9, en donde el disolvente orgánico es alcohol.
11. El método según la reivindicación 10, en donde el alcohol es etanol.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, que comprende adicionalmente la etapa de añadir agua, disolvente orgánico anhidro, o disolvente orgánico que contiene agua al precipitado separado.

20

Fig. 1 Precipitación con α -CD (Pic)

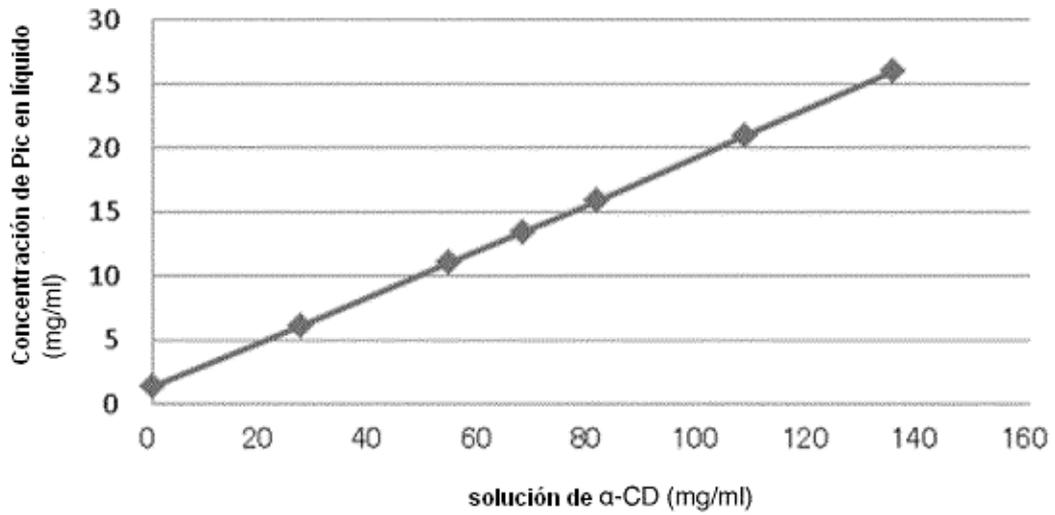


Fig. 2 Precipitación con β -CD (Pic)

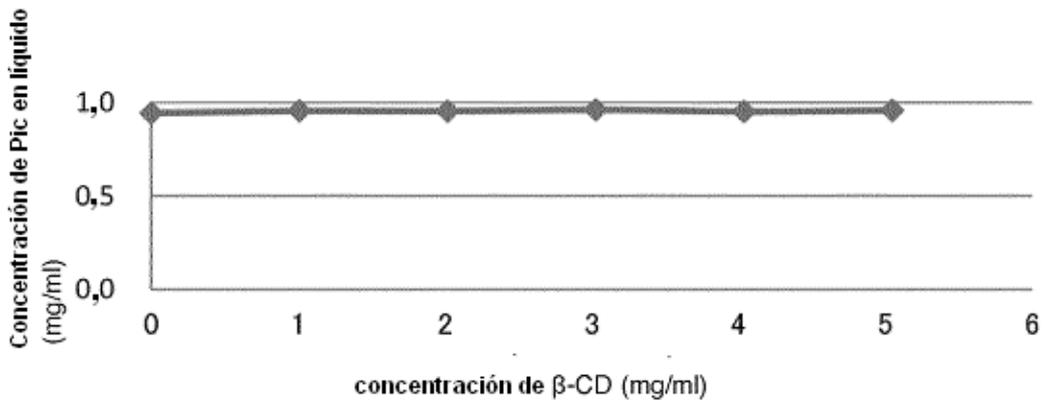


Fig. 3 Precipitación con γ -CD (Pic)

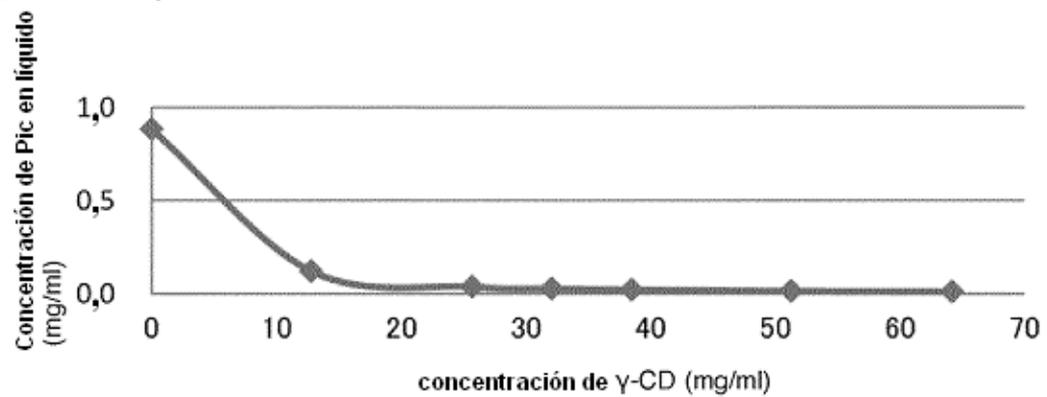


Fig. 4 Precipitación con γ -CD (Res)

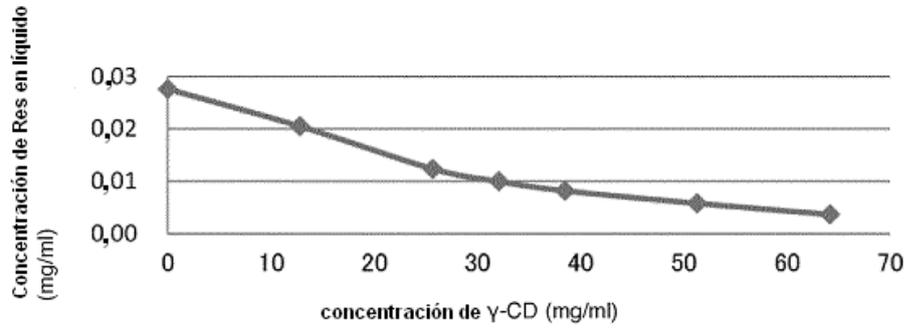


Fig. 5 Precipitación con γ -CD (Ra)

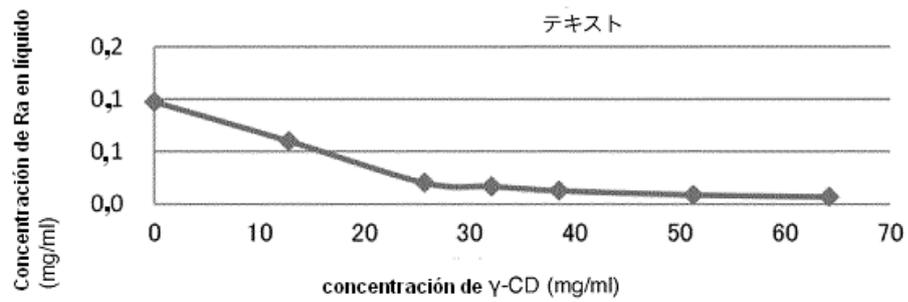


Fig. 6 Precipitación con γ -CD (Isorra)

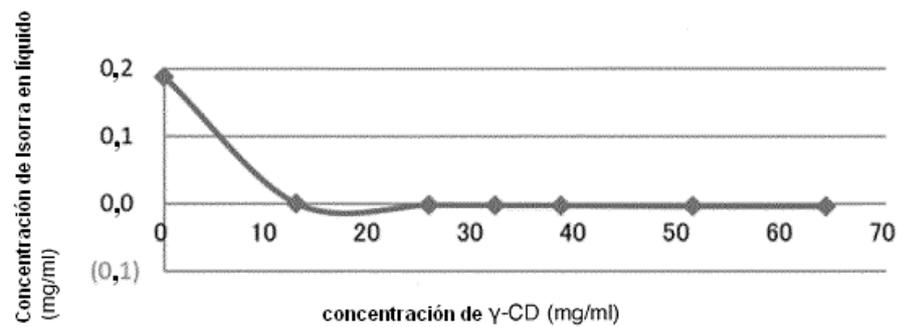


Fig. 7 Precipitación con γ -ciclodextrina con respecto a concentración de etanol

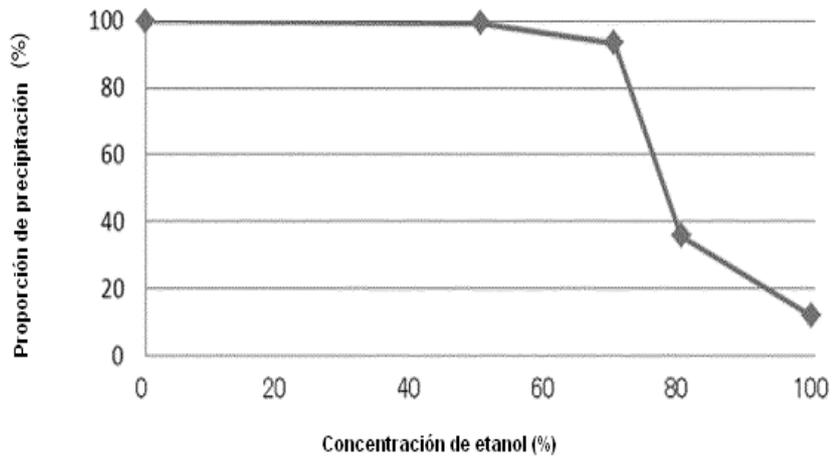


Fig. 8 Precipitación con γ -CD en materiales de extracto que contienen etanol a diferentes concentraciones

