

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 652**

51 Int. Cl.:

B01D 39/16 (2006.01)

A23L 2/70 (2006.01)

A23L 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2014 PCT/IB2014/059208**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14132176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014 E 14756484 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2961510**

54 Título: **Aclaración y unión selectiva de los compuestos fenólicos de alimentos líquidos o bebidas usando polímeros inteligentes**

30 Prioridad:

26.02.2013 US 201313777989

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

25.05.2020

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN FRAUNHOFER CHILE RESEARCH (50.0%)
Av. del Cóndor 844, piso 3, Ciudad Empresarial,
Huechuraba
Santiago 8580704, CL y
UNIVERSIDAD DE TALCA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SILVA SANTOS, LEONARDO;
AMALRAJ, JOHN y
LAURIE GLEISNER, VICTOR**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 762 652 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

Aclaración y unión selectiva de los compuestos fenólicos de alimentos líquidos o bebidas usando polímeros inteligentes

CAMPO TÉCNICO

5 La presente solicitud está relacionada al campo del procesamiento de alimentos, en particular, a la clarificación de alimentos líquidos o bebidas. La invención corresponde a una composición, que comprende principalmente un polímero diseñado específicamente, para la adsorción de compuestos determinados. Más específicamente, la invención está dirigida a la clarificación de alimentos líquidos o bebidas, mediante la aplicación de la composición que comprende el polímero diseñado específicamente para la remoción de compuestos fenólicos específicos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Agentes de clarificación son sustancias usadas comúnmente en la producción de alimentos líquidos o bebidas para clarificación, estabilidad, y mejoramiento de características sensoriales. Estos agentes ayudan a proporcionar claridad, evitan la formación de precipitados amorfos (por ejemplo, macromoléculas tales como proteínas, azúcares, taninos) y cristales (por ejemplo, potasio o tartratos de calcio), y son usados para realizar correcciones al color y sabor de los

15 productos tratados.

Algunos de los agentes clarificantes usados más típicamente en producción de bebidas incluyen sustancias tales como bentonita, materiales basados en proteínas tales como gelatina, caseína y albúmina, carbón activado, y productos sintéticos como polivinilpirrolidona (PVPP).

PVPP es un agente clarificante producido por la polimerización N-vinil-2pirrolidona en medio alcalino. Por ejemplo, en

20 producción de vino blanco PVPP es usado para eliminar el color café formado por efecto de oxidación enzimática o química, como también para prevenir la formación de color rosado debido a una reacción desconocida que ha sido relacionado a intermedios fenólicos inestables. PVPP es un producto sintético capaz de adsorción no selectiva de las sustancias no deseadas, principalmente de compuestos fenólicos oxidables. Dependiendo de la aplicación y restricción del mercado, las adiciones de PVPP pueden variar entre 0,1 hasta 0,8 g/L.

25 Debido a sus selectividades limitadas, algunas de las consecuencias negativas del uso de agentes de clarificación están relacionadas a sus capacidades de remover compuestos que son responsables de algunas de las características organolépticas del producto (por ejemplo, aromas), reduciendo así la calidad de los productos.

En este documento, la descripción del alcance de la invención es usualmente ejemplificada mediante referencias a la industria del vino, sin embargo, esto no debe ser entendido como una limitación de la invención a dicha industria, ya que

30 los compuestos, composiciones y métodos de la presente invención pueden ser aplicados a una amplia variedad de alimentos líquidos y bebidas. Por lo tanto, los términos alimentos líquidos o bebidas deben ser entendidos en sus significados más amplios, tal como por ejemplo, pero no limitado a, jugos de frutas, jugos o extractos de plantas, bebidas fermentadas, bebidas fermentadas alcohólicas, tal como, vino, cerveza, sidra, vino espumoso, cerveza inglesa, cerveza de centeno, chicha, sake, pulque; o bebidas alcohólicas destiladas tales como whisky, whiskey, vodka, korn, brandy,

35 coñac, vermut, pisco, armagnac, branntwein, singani, arak, ouzo, pastis, sambuca, grappa, orujo, aguardiente, ron, cachaza, tequila, mezcal, entre muchos otros alimentos líquidos o bebidas que contienen compuestos fenólicos que, dependiendo de los requerimientos de la industria o los clientes, deberían ser eliminados de los alimentos líquidos o bebidas.

Por mucho tiempo el progreso científico y técnico en la industria del vino ha estado centrado en su mayoría en los esfuerzos para estabilizar vino y así evitar los precipitados. La existencia de precipitado refleja la calidad y estandarización del vino. De hecho, es muy bien conocido que los clientes que encuentran precipitados usualmente devuelven el producto de vino al fabricante.

40

En general, la existencia de depósitos de cristales y/o materia colorante en los vinos no es aceptable con respecto a la edad del vino; la demanda es por la claridad. Por lo tanto, clarificación y estabilización de vinos son realizadas para evitar cualquier defecto en claridad o en cualquier desequilibrio físico-químico o microbiológico.

45

La clarificación es usualmente facilitada por el uso de productos minerales, tales como bentonita, productos orgánicos, tales como gelatina y claras de huevo y albúminas de sangre, y también en materiales sintéticos, tal como polivinilpirrolidona (PVPP), un producto desarrollado específicamente para este fin.

Suspensiones de silicato y taninos enológicos también participan en la clarificación, aunque no sean considerados como agentes clarificantes por derecho propio, pero como ayuda al proceso, especialmente cuando es realizado con productos minerales y orgánicos.

50

Otras sustancias, tal como el carbón, tienen poder clarificante reducido pero dan un mejor color, y así mejora la apariencia del producto.

La filtración es también considerada una operación de estabilización porque elimina aquellas sustancias y agentes microbianos que son responsables de los precipitados. El método más común de realización de filtración es a través del uso de filtros de nylon u otros materiales con un tamaño de poro específico.

5 La principal desventaja del uso de PVPP y los otros agentes es su selectividad pobre. Existe una oportunidad de remover los compuestos vitales del producto, los cuales afectarán su calidad. Más aún, PVPP funciona óptimamente en un rango de pH definido.

10 Una nueva área que ha sido desarrollada es aquella de polímeros inteligentes que tienen muchas ventajas y aplicaciones. Particularmente, estos polímeros inteligentes pueden ser usados para atrapar los compuestos fenólicos con alta selectividad de acuerdo a los requerimientos de una industria particular. Otras ventajas que tienen estos polímeros son su fácil síntesis y caracterización además de ser ambiental y biológicamente benignos, fáciles de separar del producto final y una selectividad que puede ser alterada cambiando el grupo funcional de los polímeros.

15 Una manera de dirigir los problemas anteriores es a través de la detección, cuantificación y remoción de sustancias no deseadas usando polímeros inteligentes. El uso de polímeros ramificados a diferencia de los tradicionales lineales, sobre la remoción de sustancias no deseadas, podría mejorar en gran medida la eficiencia y especificidad de prácticas donde son empleados los métodos tradicionales.

20 El procedimiento empleado para el desarrollo de estos polímeros inteligentes consistió en lo siguiente: la identificación de polifenoles objetivo comunes en la mayoría de las bebidas a base de fruta, la síntesis y caracterización química de una formación de polímeros basados en su potencial de capacidad de unión a compuestos fenólicos, la proyección de la interacción entre los polímeros y compuestos fenólicos seleccionados mediante cromatografía líquida y espectrometría UV-Vis, y la prueba de los polímeros en matrices alimentarias reales (por ejemplo, vino).

Así, el problema a resolver mediante la presente invención es remover selectivamente compuestos no deseados desde un alimento líquido o bebidas, con un alto rendimiento, y un amplio rango de pH de funcionamiento, y la solución propuesta en la presente invención es proporcionar compuestos o composiciones para adsorción selectiva de compuestos que afectan negativamente la calidad de un alimento líquido o bebida.

25 La presente invención está dirigida a compuestos que han mostrado que adsorben selectivamente compuestos fenólicos específicos que son responsables de la cristalización en bebidas, o producen turbidez.

30 Con el fin de resolver el problema técnico propuesto, diferentes polímeros fueron diseñados, probados, y evaluados, los cuales tendrían la más alta selectividad y rendimiento para un conjunto de compuestos específicos identificados. Estos polímeros resultaron ser formas específicas de polianilina y polímeros de poliamidoamina funcionalizados con polímeros de polianilina.

35 Polianilina es un polímero conductor formado por la combinación de monómeros de anilina. Los monómeros de anilina polimerizados pueden ser encontrados en diferentes estados de oxidación, donde el estado completamente reducido es conocido como leucoemeraldina, mientras que el estado completamente oxidado es conocido como (per)nigranilina. El estado intermedio, emeraldina, tiene dos formas, la base emeraldina (PANI-EB) es la forma neutral, y sal emeraldina (PANE-ES) es la forma protonada. El uso de polímeros de polianilina ha sido dirigido primeramente a los dispositivos semiconductores, o dispositivos eléctricos; su uso en baterías o en la conversión de energía química en energía eléctrica, donde la aplicación de polímeros de polianilina en la industria alimentaria ha sido limitada al uso del compuesto como un sensor, por ejemplo para evaluar la toxicidad de un producto alimentario.

40 Otra parte de las moléculas consideradas en la presente invención son dendrímeros. Los dendrímeros corresponden a una molécula ramificada repetitivamente basada en polímeros. Un dendrímero es usualmente simétrico alrededor de su núcleo y puede adoptar una forma esférica. Existen dendrímeros de alto y bajo peso molecular, dependiendo de la cantidad y longitud de las ramas. Estas moléculas son usadas típicamente como un núcleo para una molécula más grande la cual tendría características y funciones específicas dependiendo de los grupos funcionales que pueden ser agregados a la superficie de un dendrímero.

45 Los dendrímeros también pueden ser clasificados en términos de su generación. La generación corresponde al número de ciclos de ramificación repetidos que son realizados durante su síntesis. Mientras más alta es la generación de un dendrímero, más alto es el número de grupos funcionales expuestos en su superficie.

50 En particular, la presente invención está dirigida a dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). El núcleo de PAMAM es una diamina (comúnmente etilenodiamina), que se hace reaccionar con acrilato de metilo, y luego otro etilenodiamina para hacer la generación-0 (G-0) PAMAM. Más ciclos de reacciones harán luego generaciones PAMAM más altas.

El uso de dendrímeros de PAMAM ha visto una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, polímeros PAMAM han sido usados en composiciones farmacéuticas como portadores, como sustratos para análisis o detección de compuestos, asociados con ácidos nucleicos para propósitos terapéuticos.

ARTE PREVIO

La industria alimentaria tiene una larga historia de uso de diferentes composiciones con el propósito de ayuda con la clarificación de alimentos líquidos. En particular, en bebidas, más específicamente en la industria del vino, el uso de diferentes compuestos es muy bien conocido en el arte, sin embargo, a la fecha, y en la medida de los conocimientos de los inventores, ninguna composición es tan selectiva como las composiciones de la presente invención.

Por ejemplo, el documento FR2907462 describe un procedimiento para la reducción de concentración de compuestos no deseados en el vino, donde la bebida es puesta en contacto con un medio absorbente compuesto de partículas nanoporosas. Este documento describe específicamente compuestos fenólicos volátiles como no deseados, y las partículas son hechas de un poliestireno reticulado no funcional. En este caso, los compuestos usados alcanzan, dependiendo del compuesto volátil analizado, desde alrededor de 30% de remoción del compuesto, hasta 94%. Sin embargo, el rendimiento de adsorción de los compuestos fenólicos específicos es más alto cuando se usan las composiciones de la presente invención, donde la cantidad más baja de compuestos fenólicos eliminados de la bebida es sobre 90%.

Otro documento, US2003124233, describe el uso de polímeros “palomitas de maíz” (“popcorn”) altamente reticulados. El uso de estos polímeros está descrito en la filtración de diferentes bebidas, describiendo como un problema específico la separación de compuestos fenólicos sin alterar la calidad o sabor de la bebida filtrada. Los compuestos son hechos de una parte de un agente hidrofílico, más preferentemente N-vinil-lactam o N-vinilamina, una parte de un componente bifuncional reticular, y una parte de al menos un monómero el cual puede ser polimerizado por radicales libres. Sin embargo, la reducción más alta de un compuesto fenólico particular reportada, catequina, es un poco más de 20%. Sin embargo, el porcentaje de remoción usando alguno de los compuestos de acuerdo a la presente invención, permite la remoción de al menos 79% para catequina.

Más particularmente, EP1567195 describe el uso de un dendrímero como un conjugado con una sustancia solubilizante de proteína. Este documento está dirigido a la solubilización de agregados de proteína, los cuales podrían conducir a enfermedades, tal como por ejemplo, enfermedades relacionadas con priones, enfermedad de Alzheimer. En una aplicación particular, el dendrímero conjugado es aplicado a una preparación de alimento, donde una proteína agregada maligna podría estar presente. Sin embargo, no existe referencia al uso de dendrímeros de PAMAM usados en la industria alimentaria para adsorción y remoción de compuestos fenólicos.

WO2009016018 describe composiciones que comprenden polifenoles, más particularmente, este documento describe el uso de polímeros que comprenden grupos amina para proporcionar composiciones mejoradas que comprenden polifenoles. WO2009016018 describe diferentes tipos de polímeros para diferentes aplicaciones, más particularmente esta solicitud está dirigida a enmascarar la amargura en productos alimentarios que son causados por la presencia de algunos polifenoles específicos. Aunque esta solicitud menciona polianilina entre los polímeros potenciales que comprenden grupos amina, la función del polímero que comprende un grupo amina no es adsorber los compuestos fenólicos para su remoción de las bebidas, sino que la solicitud está limitada a sólo enmascarar el sabor amargo en composiciones de alimentos, formando complejos polifenol-polímero.

Belaib et al., *Elimination of Phenol by Adsorption on Mineral / Polyaniline Composite Solid Support*, ENERGY PROCEDIA 18 (2012) pp. 1254-1260, describe la adsorción de fenol en gel de sílice recubierto de polianilina como un método para el tratamiento de efluentes industriales.

La Publicación de Patente US 2009/0035440 A1 describe una composición, tal como una bebida, que comprende polifenoles y polímeros que comprenden grupos amino, en donde al menos 0.1% de polifenoles en peso de la composición está presente como parte de un complejo con el polímero, en donde el complejo está en forma de partículas. Los autores afirman que se dice que la presencia del polímero que comprende grupos amino reduce o elimina el amargor y/o la astringencia del polifenol, aumenta la estabilidad oxidativa del polifenol y/o reduce o elimina el color del polifenol.

Zhang et al., *Removal of phenols from the aqueous solutions based on their electrochemical polymerization on the polyaniline electrode*, ELECTROCHIMICA ACTA 55 (2010) pp. 7219-7224, describe la polimerización de fenol y 3-nitrofenol en una solución acuosa de NaCl con pH 4,0 en un electrodo de polianilina utilizando ciclos potenciales. Los autores afirman que los polímeros conductores son un material prometedor para el tratamiento electroquímico del agua contaminada.

Como se puede ver del arte previo, el uso de polímeros de polianilina o dendrímeros poliamidoamina funcionalizados con polímeros de polianilina para remover selectivamente compuestos no deseados de una bebida, con un alto rendimiento, y un amplio rango pH de funcionamiento, no ha sido abordado previamente, y los polímeros alternativos previamente usados para este fin, tienen rendimientos más bajos y selectividad más baja que los compuestos descritos en la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando polivinilpolipirrolidona (PVPP) en pH bajo (A) y pH neutral (B).

- Figura 2. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando PAMAM G4 – polietilenglicol (G4-PEG) en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- Figura 3. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando PAMAM-G 0,5 en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- Figura 4. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando PAMAM-G 1,0 en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- 5 Figura 5. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando PAMAM-G 1,5 en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- Figura 6. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando PAMAM-G 2,0 en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- Figura 7. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando PAMAM-G0 alilo en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- Figura 8. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando PAMAM-G 0 imina en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- 10 Figura 9. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando Polianilina base emeraldina (PANI-EB) en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- Figura 10. Capacidad de adsorción de los compuestos fenólicos usando Polianilina sal de emeraldina (PANI-EB) en pH bajo (A) y pH neutral (B).
- Figura 11. Vis-espectros para el vino blanco en blanco y oxidado, que se utiliza en el ensayo de prevención.
- 15 Figura 12. Vis-espectros de tratamientos preventivos con PVPP.
- Figura 13. Vis-espectros de tratamientos preventivos con PANI-EB.
- Figura 14. Vis-espectros de tratamientos preventivos con PANI-ES.
- Figura 15. Vis-espectros para el vino blanco en blanco y oxidado, usado en ensayo paliativo.
- Figura 16. Vis-espectros de tratamientos paliativos con PVPP.
- 20 Figura 17. Vis-espectros de tratamientos paliativos con PANI-EB.
- Figura 18. Vis-espectros de tratamientos paliativos con PANI-ES.
- En todas las figuras, las pruebas fueron realizadas en pH 3,5 (pH bajo) y 6,5 (pH neutral).

RESUMEN

25 La presente invención es un método para la eliminación de compuestos fenólicos específicos de bebidas que comprende poner en contacto un polímero con una bebida que contiene uno o más compuestos fenólicos a ser eliminados de la bebida.

El polímero se selecciona entre polímeros de polianilina base emeraldina (PANI-EB), polímeros de polianilina sal de emeraldina (PANI-ES), dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) funcionalizados con al menos un polímero de polianilina (PANI), polianilina base emeraldina (PANI-EB) y polianilina sal de emeraldina (PANI-ES), en lo sucesivo denominados "polímeros PANI". Estos polímeros se denominan en lo sucesivo "polímeros PANI".

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha encontrado que polímeros PANI, ya sea PANI-EB o PANI-ES tienen propiedades de adsorción interesantes, específicamente para compuestos fenólicos determinados.

35 En una realización más específica, el uso de polímeros PANI en el método de la presente invención está dirigido a la remoción de compuestos fenólicos específicos de los jugos de fruta, jugos o extractos de plantas, de bebidas alcohólicas tal como vino o cerveza, y de las bebidas alcohólicas destiladas, o licores.

En una realización más específica, la bebida alcohólica fermentada es vino, cerveza, sidra, vino espumoso, ale, cerveza de centeno, chicha, sake o pulque.

40 En otra realización más específica, la bebida alcohólica destilada es whisky, whiskey, vodka, korn, brandy, coñac, vermut, pisco, armagnac, ron, cachaza, tequila o mezcal.

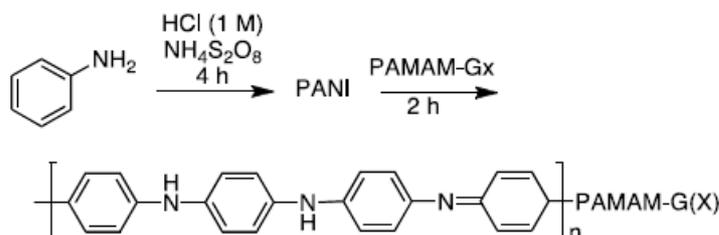
En una realización más específica, los polímeros PANI de la invención son seleccionados en un rango de peso molecular desde 7 kDa hasta 150 kDa, más preferentemente desde 15 kDa hasta 70 kDa.

Previamente, y a la fecha de presentación de esta solicitud, y hasta el mejor de los conocimientos de los inventores, no existe un reporte publicado indicando el uso de polímeros PANI para remoción de compuestos fenólicos de alimentos líquidos o bebidas.

5 Los dendrímeros PAMAM son funcionalizados agregando polímeros PANI a la superficie externa, y así se aumenta el contacto potencial de una única molécula de la invención con varios compuestos fenólicos presentes en una bebida.

En la presente invención, dendrímeros PAMAM de diferentes generaciones son incluidos en el alcance de la invención. Por ejemplo, PAMAM de generaciones 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 están incluidos en el alcance de la invención.

10 En una realización adicional, dendrímeros PAMAM de cualquier generación son funcionalizados agregando polímeros PANI a sus superficies. La funcionalización de dendrímeros PAMAM usando polímeros de polianilina es realizada usando polímeros PAMAM como agentes de captura de PANIs hasta el final del proceso de polimerización, en la presencia de una sal de persulfato adecuada, produciendo así polímeros PAMAM-(PANI)_n.



La presente invención, como se indicó previamente, está dirigida al uso de polímeros PANI o polímeros PAMAM-PANI en la industria alimentaria, más específicamente en la clarificación de bebidas, más particularmente bebidas alcohólicas.

20 Polímeros PANI, como los descritos previamente, pueden ser usados de diferentes maneras para permitir la remoción de moléculas no deseadas de bebidas particulares.

En una realización de la invención, los polímeros de la invención (PANI-ES, PANI-EB, PAMAM-PANI-ES y PAMAM-PANI-EB) son añadidos directamente a la bebida a ser tratada. El polímero es añadido en una proporción de 0,3 g/l hasta 0,7 g/l, y la bebida es agitada por un período de tiempo de entre 1 y 2 horas.

25 Después de que el período de tiempo es completado, el polímero de la invención es separado de la bebida usando procedimientos industriales estándar, tal como por ejemplo, decantación, sedimentación, filtración, y centrifugación.

30 En una forma de realización diferente, los polímeros de la invención (PANI-ES, PANI-EB, PAMAM-PANI-ES y PAMAM-PANI-EB) pueden ser inmovilizados en una matriz adecuada, permitiendo su uso en un modo continuo. Por ejemplo, los polímeros de la invención pueden ser inmovilizados en la matriz de un pre-filtro, permitiendo la remoción de moléculas no deseadas mientras la bebida está siendo sujeta a filtración.

En una realización adicional, los polímeros de la invención pueden ser inmovilizados o pueden ser conjugados con partículas magnéticas, permitiendo la separación de los polímeros usados de la bebida usando medios magnéticos.

En aún otra realización, los polímeros de la invención pueden ser inmovilizados en partículas que pueden ser usadas en un cartucho permitiendo la remoción de compuestos no deseados de la bebida en un proceso continuo.

35 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de Polianilina

40 Una sal de polianilina fue preparada mediante técnica de polimerización acuosa. En un frasco de fondo redondo de 250 ml, fue tomada 70 ml de agua deionizada y 3 ml de H₂SO₄ concentrado fue añadido lentamente durante la agitación. A esta mezcla, se agregó 1 ml de anilina y la solución fue mantenida bajo constante agitación magnética a 0-5°C. A esta solución, 30 ml de solución acuosa que contiene persulfato de amonio (2,9 g) se añadió por 10-15 minutos de duración. La reacción continuó por 6 h en condición ambiental. La sal de polianilina precipitada fue filtrada y lavada con agua deionizada, metanol y acetona para remover sub-productos inorgánicos y oligómeros. El polvo de polianilina fue secado a 60°C hasta que fue alcanzado un peso constante.

Ejemplo 2: Preparación de Base de Polianilina

45 Polvo de sal de polianilina (1 g), obtenido desde el ejemplo anterior, fue tratado con 100 ml de solución de hidróxido de sodio acuosa (1M) por 8 h a temperatura ambiente. Polvo base de polianilina fue filtrado y lavado con exceso de cantidad de agua deionizada y finalmente con acetona y secada a 60°C hasta que fue alcanzado un peso constante.

Ejemplo 3: Preparación de Polianilina PAMAM

H₂SO₄ fue añadido lentamente durante la agitación. A esta mezcla, 1 ml de anilina fue añadida y la solución fue mantenida bajo agitación magnética constante a 0-5°C. A esta solución, 30 ml de solución acuosa que contiene persulfato de amonio (2,9 g) fue añadido por 10-15 minutos de duración. La reacción continuó por 4 h en condición ambiente. Luego, 0,01% molar de solución acuosa de PAMAM-Gx (x= 0 hasta 5) fue añadida de una vez a la mezcla de reacción. La reacción fue agitada por 2 h a temperatura ambiente. La sal de (polianilina)_n-PAMAM-Gx (x= 0-5 y n= 4-128) precipitada fue filtrada y lavada con agua deionizada, metanol y acetona para remover PAMAM residual y sub-productos inorgánicos y oligómeros. El polvo de polianilina-PAMAM fue secado a 60°C hasta que fue alcanzado un peso constante.

Ejemplo 4: Estudio de afinidad de los compuestos Fenólicos mediante el método HPLC**10 Materiales y métodos****Reactivos**

Hidrato de quercetina ≥ 95% (Aldrich), PM: 302,24 g/mol, 50 mg (0,1654 mmoles); (-)-Epicatequina (Sigma), PM: 290,27 g/mol, 48,01 mg, (0,1654 mmoles); 4-metilcatecol ≥ 95% (Aldrich), PM: 124 g/mol, 20,5 mg (0,1654 mmoles) Monohidrato de ácido gálico ≥ 98% (Aldrich), PM: 188,14 g/mol, 31,11 mg (0,1654 mmoles); Ácido cafeico (Sigma), PM: 180,16, 29,7 mg (0,1654 mmoles); (+)-Hidrato de catequina ≥ 98% (Sigma), PM: 290,3 g/mol, 47,9 mg, (0,1654 mmoles); etanol fue suministrado por Merck, Alemania y agua MilliQ fue filtrada con filtros Millipore de 0,45 µm.

Muestras

Compuesto fenólico total: Quercetina, (-)-Epicatequina, 4-metil catecol, Ácido gálico, Ácido cafeico, (+)-Catequina. Soluciones estándar de compuestos fenólicos fueron preparadas en una mezcla de etanol: agua 12% v/v (solvente grado HPLC).

Ensayos de afinidad

Las pruebas fueron realizadas a pH 3,0 (pH bajo) y 6,5 (pH neutral). La cinética de adsorción fue realizada en 3 tiempos (0, 15 y 60 minutos). Compuesto fenólico total fue preparado en 0,1654 mM diluido 1:6 (ácido gálico, catequina, ácido cefeico, epicatequina, 4-metilcatecol, quercetina) en agua: 4,5% de ácido fórmico (pH 6,5) y agua 12% etanol (pH 3,5). La quercetina, fue insoluble o ligeramente soluble en agua pura, en etanol al 12% fue soluble. 4 mL de cada solución fue mezclado con 0,012-0,028 mg de cada polímero (c= 0,3-0,7 g/L). Las muestras fueron mezcladas por 45 minutos a temperatura ambiente constante (25°C) y luego centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. Las concentraciones de compuestos fenólicos en sobrenadantes fueron analizados mediante HPLC. La eficiencia de adsorción de cada compuesto fenólico mediante polímeros fue evaluada determinando el porcentaje de disminución en la absorbancia en cada longitud de onda de absorbancia máxima específica usando la siguiente ecuación:

$$\text{Adsorción(\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Donde A₀ es la absorbancia inicial a una longitud de onda específica y A₁ es la absorbancia final en la misma longitud de onda.

Figuras 1 hasta la 10 muestran diferentes gráficos, como porcentajes de remoción, para los diferentes compuestos fenólicos eliminados con cada uno de los polímeros evaluados. Desde los gráficos, se puede ver claramente que polímeros PANI-PAMAM (Figuras 9 y 10) son los de mejor desempeño, con porcentajes de remoción de al menos un 54% más, comparado con PVPP, los nuevos polímeros PANI muestran un comportamiento similar para todos los compuestos fenólicos evaluados, mejorando así la selectividad de compuestos fenólicos no deseados.

Más aún, PANI-EB y PANI-ES se desempeñaron mejor que PVPP cuando fueron expuestos a ambientes a pH bajo, lo cual es un resultado sorprendente extremadamente relevante ya que los valores de pH están en rangos desde 2,9 hasta 4,2 en procesamiento de vino, lo cual es una de las aplicaciones del método de la presente invención.

Ejemplo 5: Evaluación de polímeros de acuerdo a la invención para remover compuestos fenólicos desde vino blanco

Un vino blanco joven, cosecha 2012, Sauvignon Blanc, fue usado. La muestra estuvo sin filtrar y sin la adición de ningún agente clarificante. La muestra de vino fue embotellada en una botella de vidrio transparente. La botella fue llenada, y cerrada con un corcho sintético.

Para evitar la apariencia de enrosamiento una vez expuesto al aire, las muestras fueron tratadas en una cámara de atmósfera inerte, llenado con nitrógeno.

La oxidación del vino fue controlada. Se añadió 0,3 % p/v H₂O₂ a cada muestra de vino, hasta una cantidad de 75 mg L⁻¹ H₂O₂. Las muestras fueron agitadas en un agitador de placas con un movimiento oscilante de 20 rpm, por 15 horas.

5 Fueron realizados dos ensayos, uno preventivo y otro paliativo. En ambos casos, fueron usadas 10 ml de muestra. Cantidades equivalentes de 30, 50, 70 y 100 mg de cada polímero (PVPP, PANI-EB y PANI-ES) por 100 ml de vino, fueron añadidos a cada muestra. Una muestra blanco, y una muestra oxidada sin polímero fueron usadas para evaluar la capacidad preventiva y/o paliativa de los polímeros, y para obtener el índice de sensibilidad.

En el ensayo preventivo, los polímeros fueron añadidos a las muestras antes del proceso de oxidación. En el experimento paliativo, los polímeros fueron añadidos a las muestras inmediatamente después de la oxidación, luego las muestras fueron agitadas por 1 h.

10 Antes de la determinación espectrofotométrica, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 rpm, para separar el polímero del vino. La prueba preventiva se realizó después del ensayo paliativo. Teniendo en cuenta las condiciones de envasado, el índice de sensibilidad de la muestra se determinó a 500 nm, dando como resultado 3,9.

Ensayo Preventivo

15 Los Vis-espectros registrados para vino oxidizado y vino blanco (control), usados en un ensayo preventivo son mostrados en la Figura 11. Se puede ver que el vino oxidizado tiene una densidad óptica aumentada, respecto del vino blanco (control). Las densidades ópticas convergen en el área de 600 nm.

La figura 12 muestra los tratamientos preventivos con PVPP. Se puede observar que PVPP efectivamente previene la ocurrencia de enrosamiento en el vino blanco en todas las tasas de aplicación. Desde 70 mg/100 ml, la disminución en densidad óptica excede el espectro registrado por el blanco (control).

20 Los tratamientos preventivos con PANI-EB son mostrados en la Figura 13. Este polímero tiene un comportamiento similar a PVPP.

Sin embargo, la densidad óptica presentada por cada tratamiento disminuye bajo la densidad óptica del blanco desde 550 nm.

25 Este comportamiento es observado análogamente por el tratamiento preventivo con PVPP, en dosis de 70 y 100 mg/100 mL de vino. Así, la densidad óptica disminuye respecto al blanco más eficientemente en tratamientos preventivos con PANI-EB que los tratamientos con PVPP.

La Figura 14 muestra los tratamientos preventivos con PANI-ES. El comportamiento es análogo a la que se presentó para PANI-EB en que las densidades ópticas de todos los tratamientos preventivos disminuyeron desde los 550 nm, convirtiéndose más bajos que el blanco.

30 En dosis de tratamiento más baja (vino de 50 y 70 mg/100 mL), la densidad óptica alcanza valores más bajos que en los ensayos preventivos con PANI-EB y PVPP.

Considerando los resultados anteriores, PANI-ES y PANI-EB son polímeros que ayudan a la prevención de la ocurrencia de enrosamiento en el vino blanco, mucho más eficientemente que PVPP.

Ensayo paliativo

35 El espectro de adsorción de vino blanco (control) y oxidado es mostrado en la Figura 15. El índice de sensibilidad de la muestra fue determinada a 500 nm, resultando en 5,1.

Se observó que las densidades ópticas divergen a 600 nm. Como era de esperar, el vino oxidado presenta densidades ópticas mayores que las del vino blanco (control) a cualquier longitud de onda.

40 La figura 16 presenta los tratamientos paliativos con PVPP. Tal como en el tratamiento preventivo, PVPP reduce la densidad óptica del vino oxidado. Se observa que a medida que aumenta la dosis de PVPP, la absorbancia de la muestra tratada se aproxima a la del vino de control. Desde 70 mg PVPP/100 mL de vino, la densidad óptica disminuye al nivel del blanco.

El tratamiento paliativo de PANI-EB es mostrado en la figura 17. Se observó que PANI-EB reduce la absorbancia del vino oxidado.

45 El comportamiento del tratamiento paliativo con PANI-EB es similar al observado en el tratamiento preventivo. La eficiencia de PANI-EB es mayor que la observada en el tratamiento paliativo con PVPP, en cualquier dosis de polímero, la absorbancia disminuye a niveles muy cercanos al vino de control.

50 Similares resultados fueron observados cuando se realiza el tratamiento preventivo con PANI-ES (Figura 18). Se observó que los polímeros PANI son más eficientes que PVPP. El comportamiento observado en tratamientos paliativos es similar al que se obtuvo por el tratamiento preventivo.

Son necesarias dosis más altas de PVPP, sobre 50 mg/100 mL para obtener los mismos resultados como en el caso de los polímeros PANI.

5 Las propiedades únicas de materiales de PANI, en términos de facilidad de síntesis, insolubilidad en soluciones acuosas, y alta estabilidad la convierten en una alternativa a considerar en la industria del vino. Son más eficientes en controlar el enrosamiento en vinos blancos, tanto preventiva como paliativamente. Son una alternativa a PVPP como agente clarificante. Más aún, el uso de materiales PANI en matrices de alimentos ha sido poco explorado, y sus aplicaciones parecen prometedoras.

REIVINDICACIONES

1. Un método para quitar compuestos fenólicos específicos de bebidas, en **donde** el método comprende los pasos de contactar un polímero seleccionado entre polímeros polianilina base emeraldina (PANI-EB), polianilina sal de emeraldina (PANI-ES) y dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) funcionalizados con al menos un polímero polianilina (PANI), polianilina base emeraldina (PANI-EB) y polianilina sal de emeraldina (PANI-ES), con las bebidas que contienen uno o más compuestos fenólicos a ser quitados de la bebida.
2. El método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde los polímeros PANI, PANI-ES o PANI-EB son seleccionados en un rango de peso molecular desde 7 kDa hasta 150 kDa.
3. El método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde los polímeros PANI, PANI-ES o PANI-EB son seleccionados en un rango de peso molecular desde 15 kDa hasta 70 kDa.
4. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la generación del dendrímero PAMAM es seleccionado entre generación 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7
5. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los dendrímeros PAMAM funcionalizados con polímeros PANI, PANI-ES, o PANI-EB son seleccionados en un rango de peso molecular desde 7 kDa hasta 150 kDa
6. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los dendrímeros PAMAM son funcionalizados con polímeros PANI, PANI-ES, o PANI-EB son seleccionados en un rango de peso molecular desde 15 kDa hasta 70 kDa.
7. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la generación del dendrímero PAMAM es seleccionado entre generación 1, 2, 3, 4, 5, 6, ó 7.
8. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polímero seleccionado desde uno o más de PANI-ES, PANI-EB, y los dendrímeros PAMAM funcionalizados con polímeros PANI, PANI-ES, o PANI-EB, es añadido a la bebida en una proporción de 0,3 g/l hasta 0,7 g/l, y la bebida es agitada por un período de tiempo de entre 1 y 2 horas.
9. El método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde los dendrímeros PAMAM funcionalizados con polímeros PANI, PANI-ES, o PANI-EB son inmovilizados en una matriz adecuada, y usados en un modo continuo.
10. El método de acuerdo a la reivindicación 9 en donde la matriz es un pre-filtro.
11. El método de acuerdo a la reivindicación 9 en donde la matriz es un conjunto de partículas magnéticas.
12. El método de acuerdo a la reivindicación 9, en donde la matriz es un cartucho.
13. El método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la bebida es seleccionada entre jugo de fruta, jugo o extracto de planta, una bebida alcohólica fermentada, una bebida alcohólica destilada.
14. El método de acuerdo a la reivindicación 13, en donde la bebida alcohólica fermentada es vino, cerveza, sidra, vino espumoso, cerveza inglesa, cerveza de centeno, chicha, sake, pulque.
15. El método de acuerdo a la reivindicación 13, en donde la bebida alcohólica destilada es whisky, whiskey, vodka, korn, brandy, coñac, vermut, pisco, armagnac, branntwein, singani, arak, ouzo, pastis, sambuca, grappa, orujo, aguardiente, ron, cachaza, tequila, o mezcal.

Figura 1

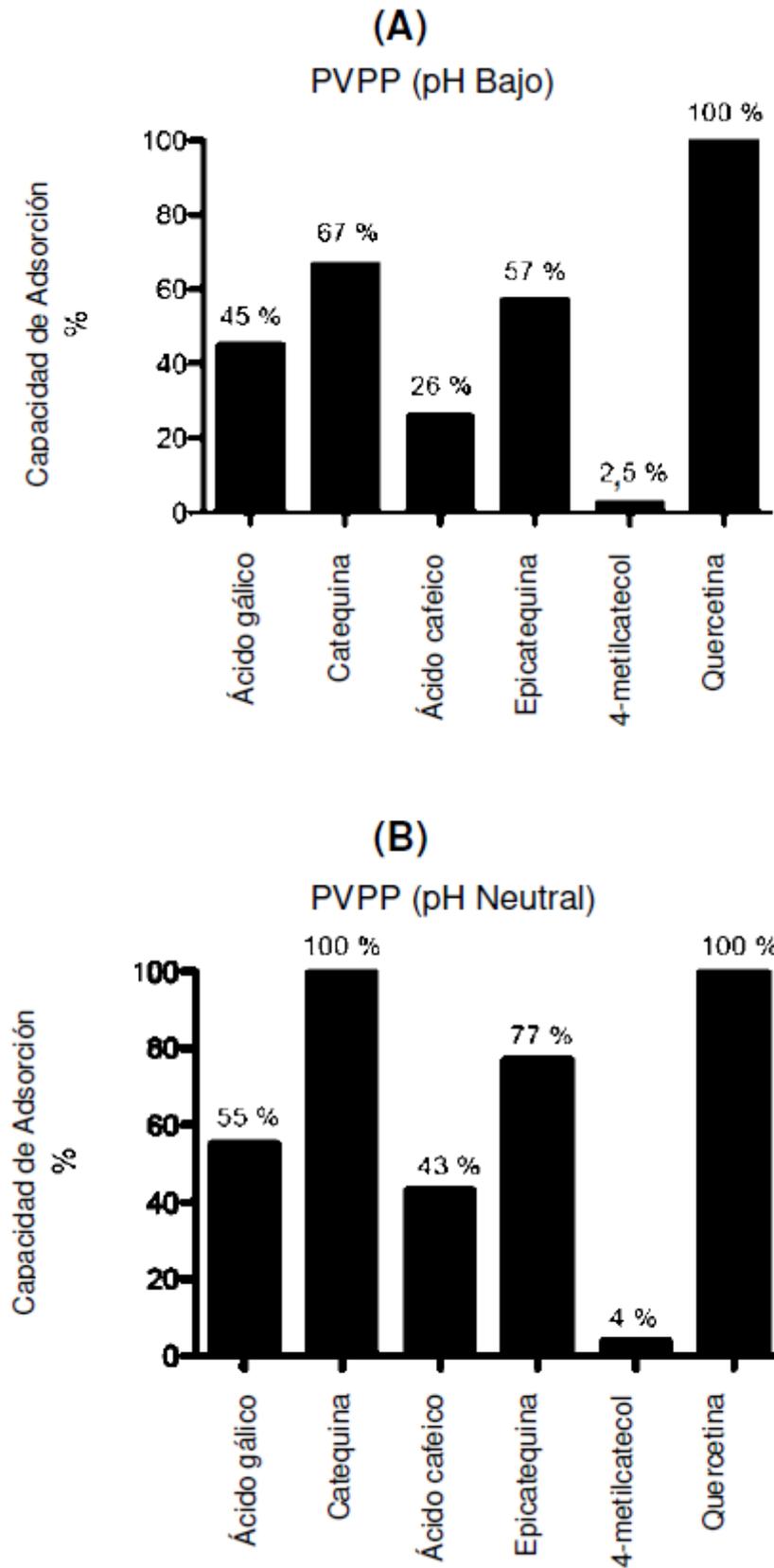


Figura 2

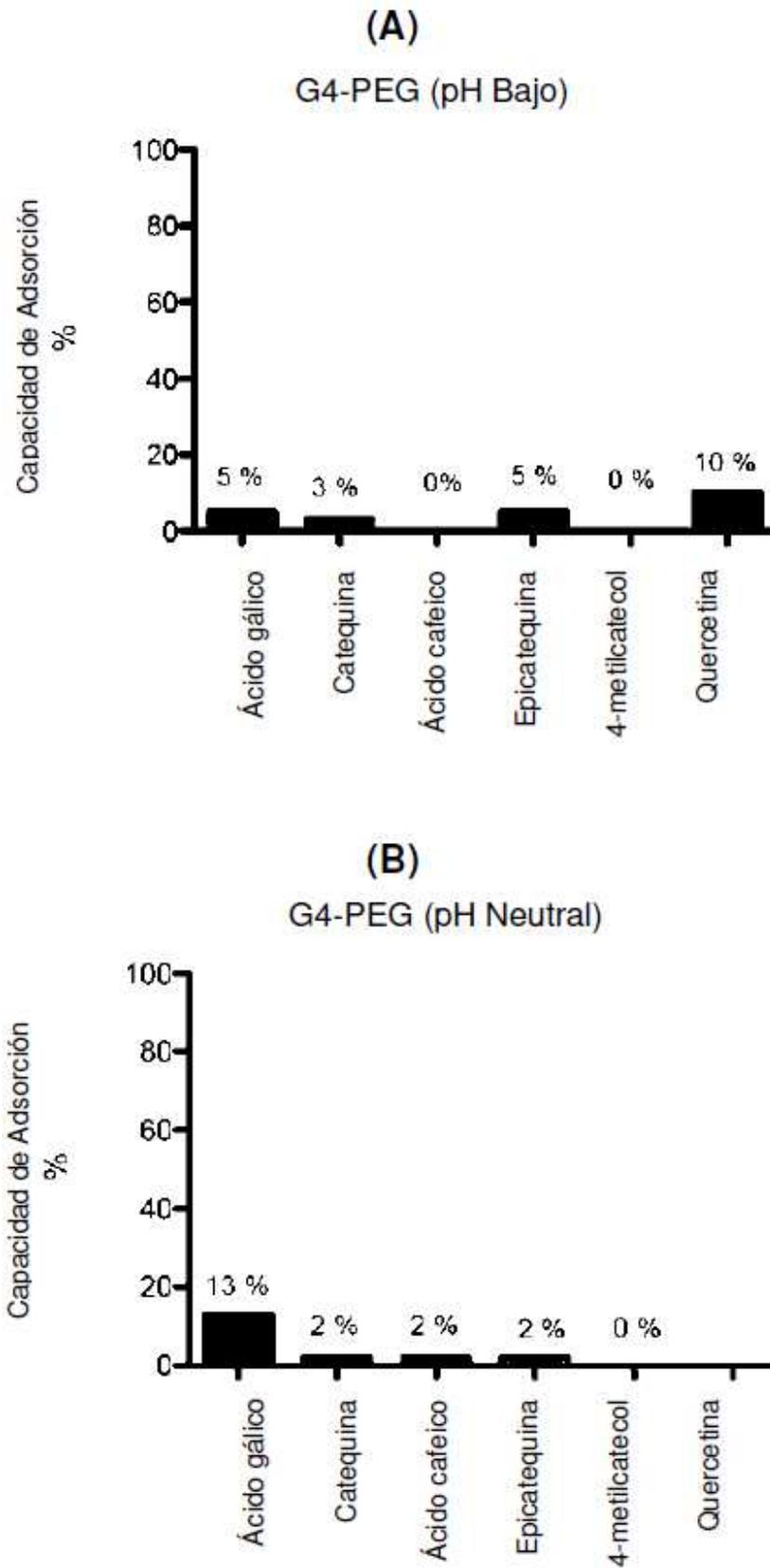


Figura 3

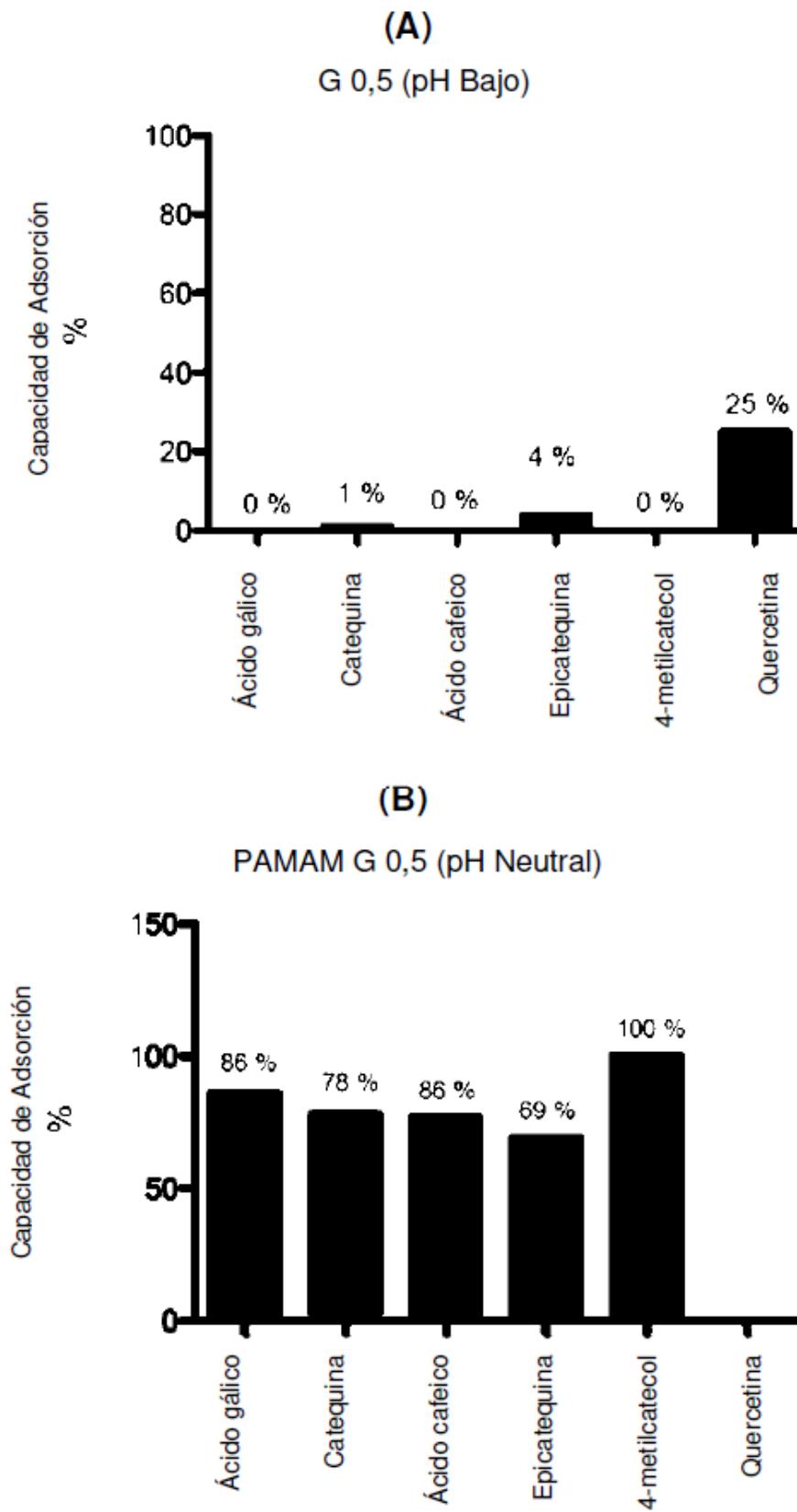


Figura 4

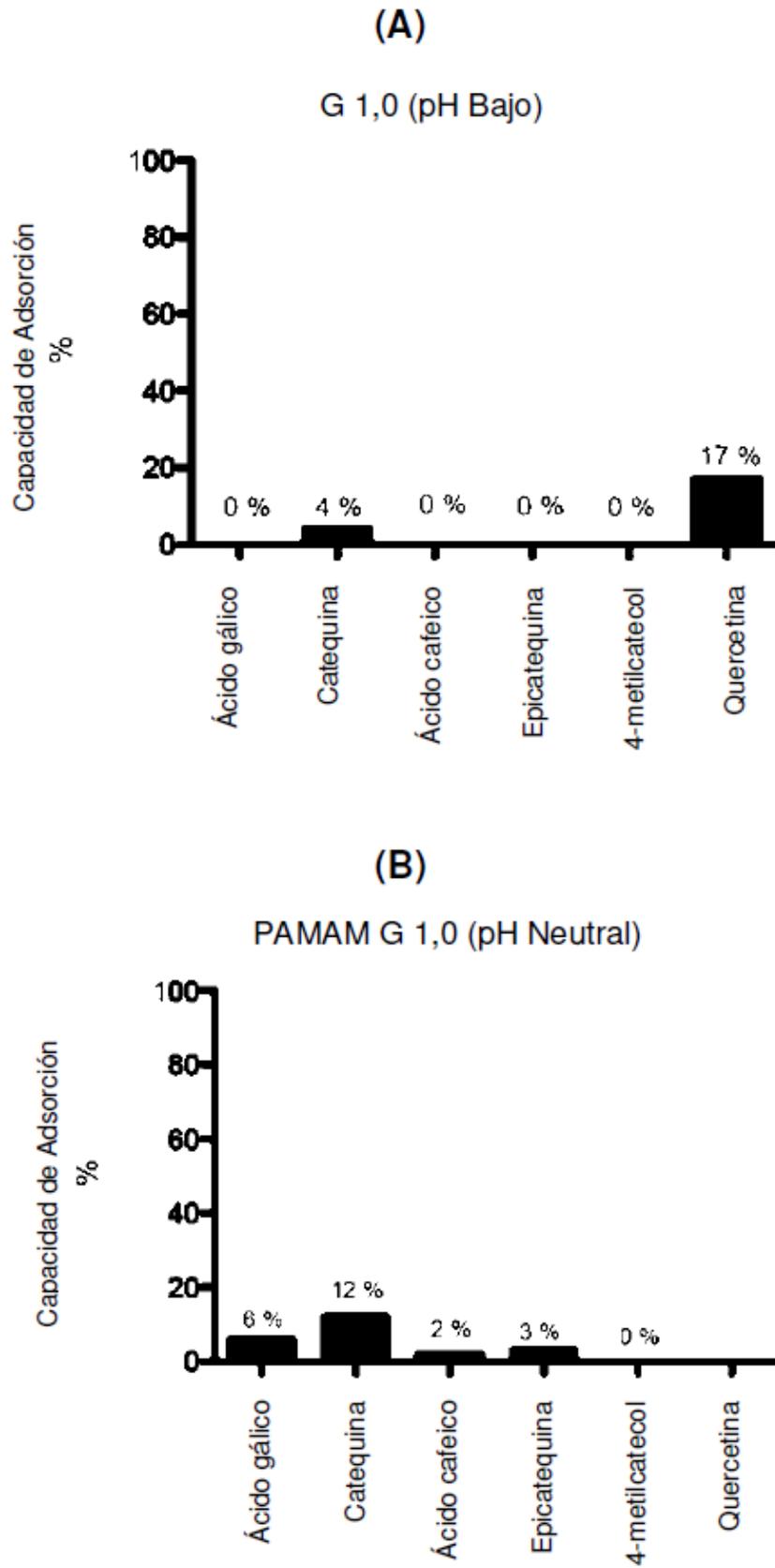


Figura 5

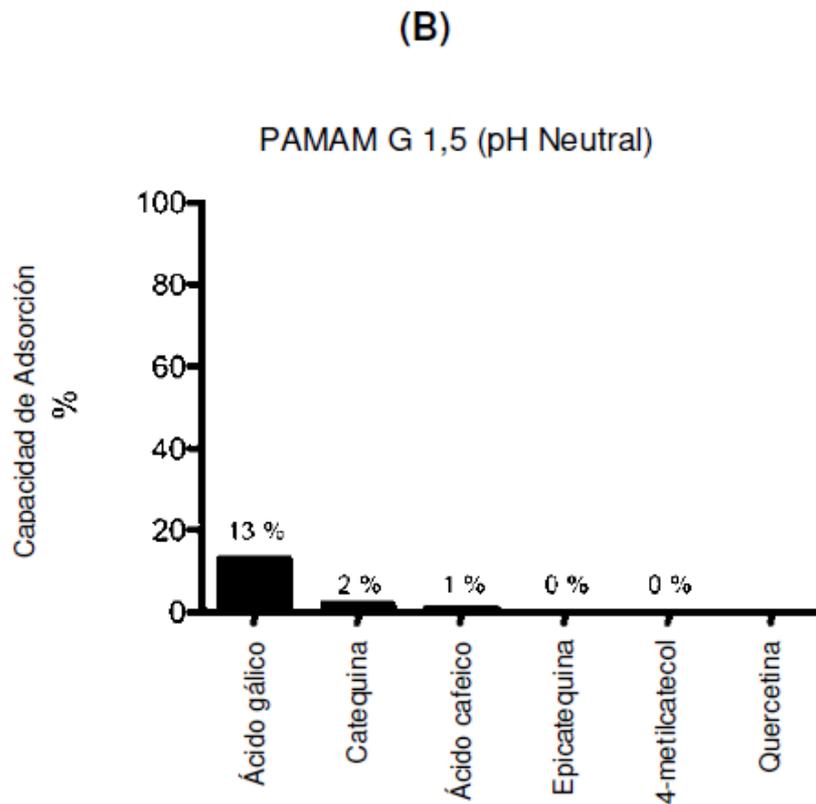
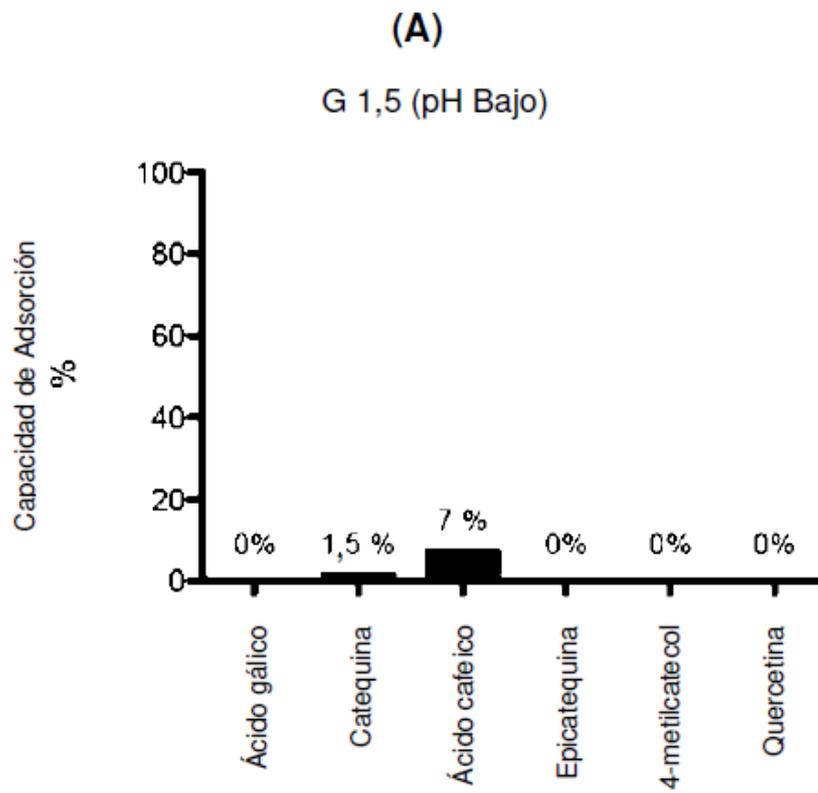


Figura 6

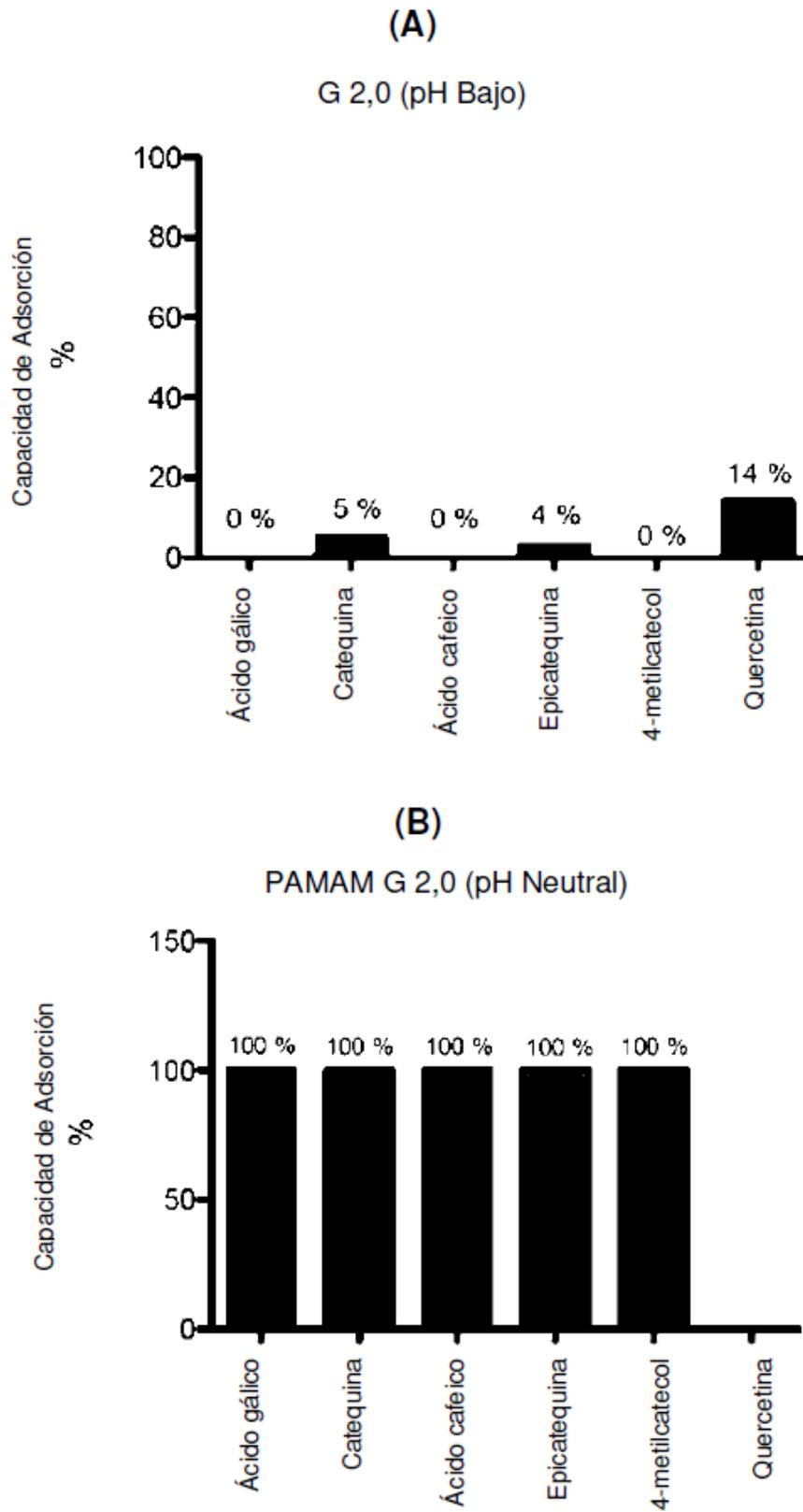


Figura 7

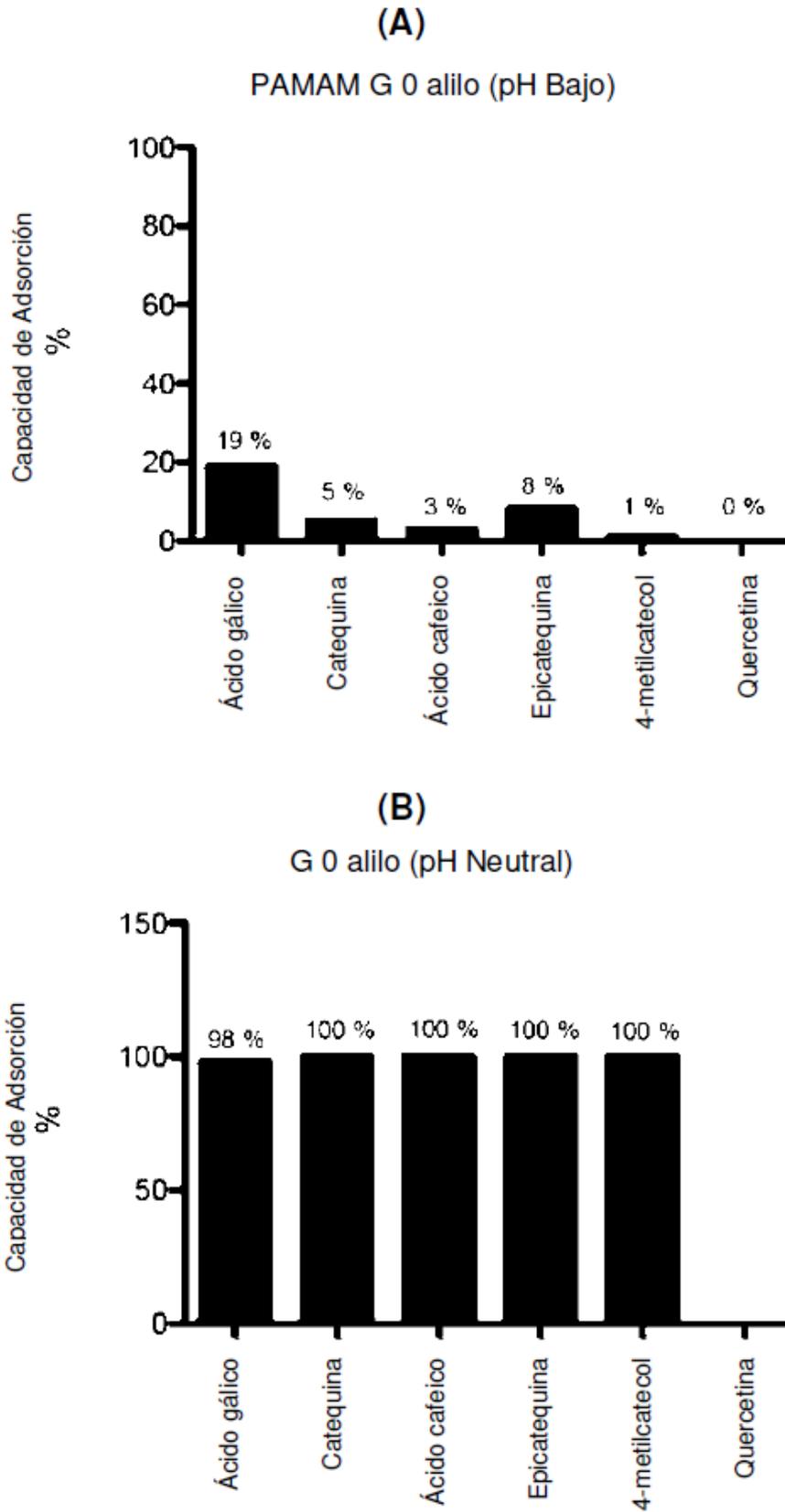


Figura 8

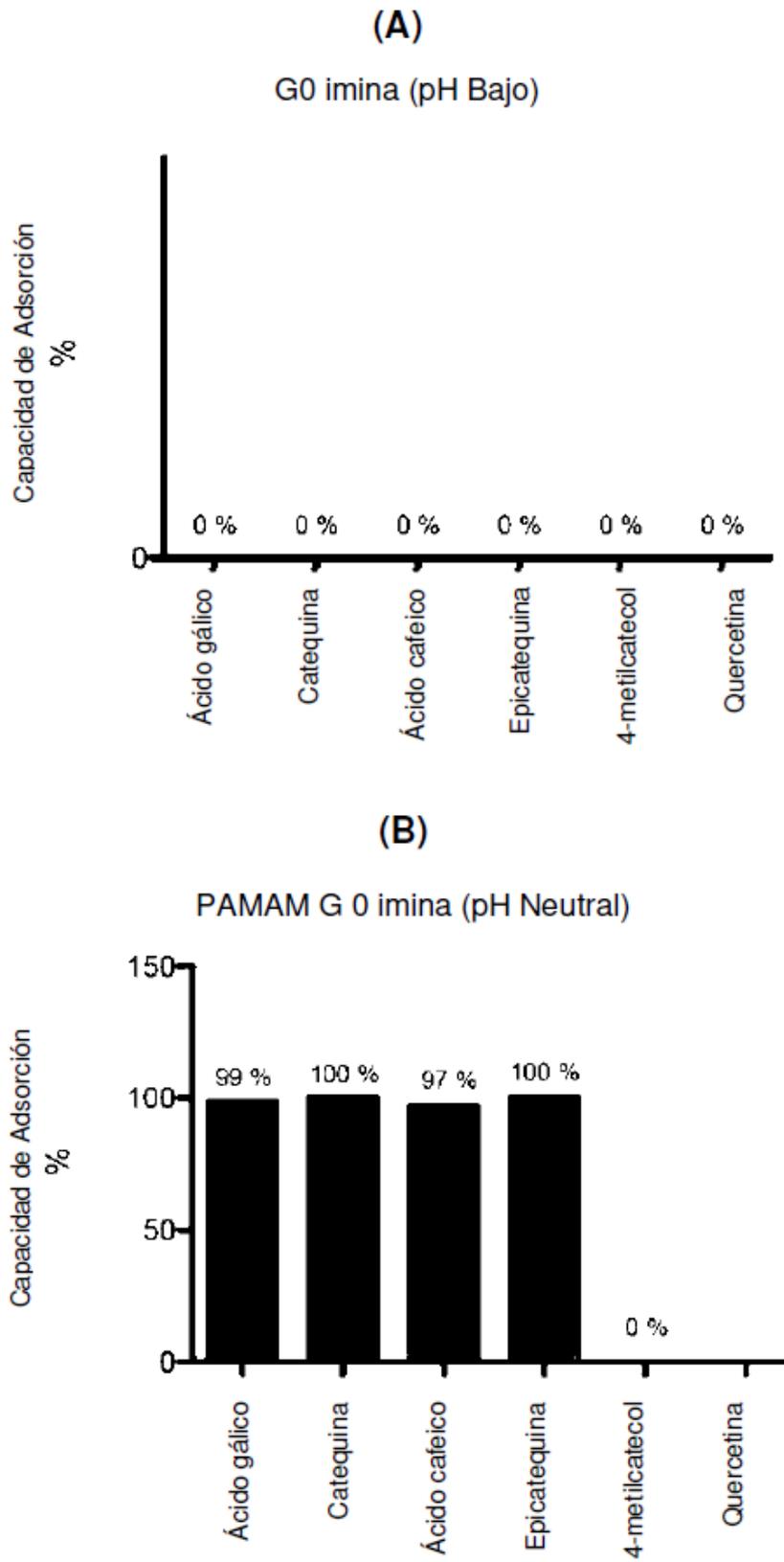


Figura 9

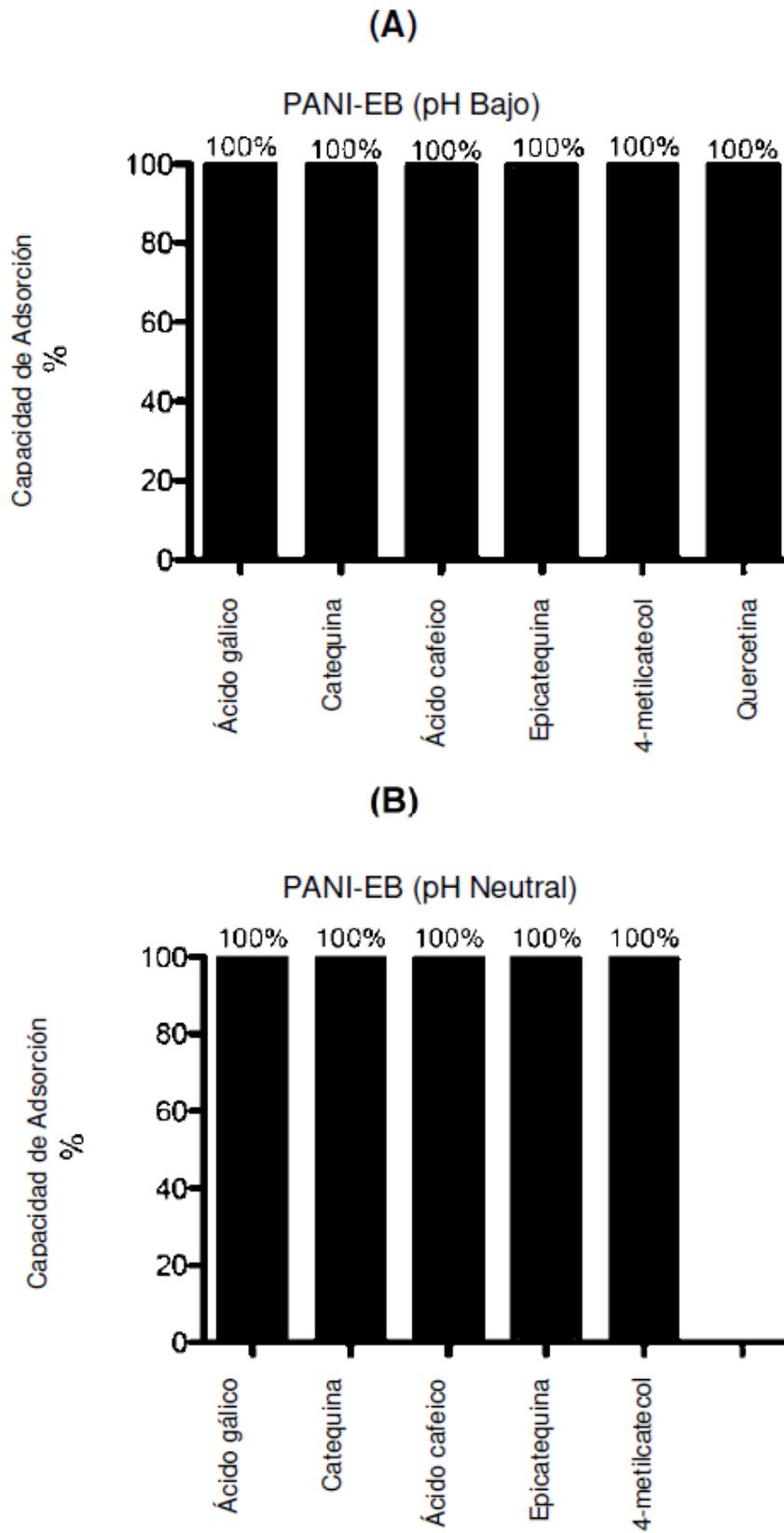


Figura 10

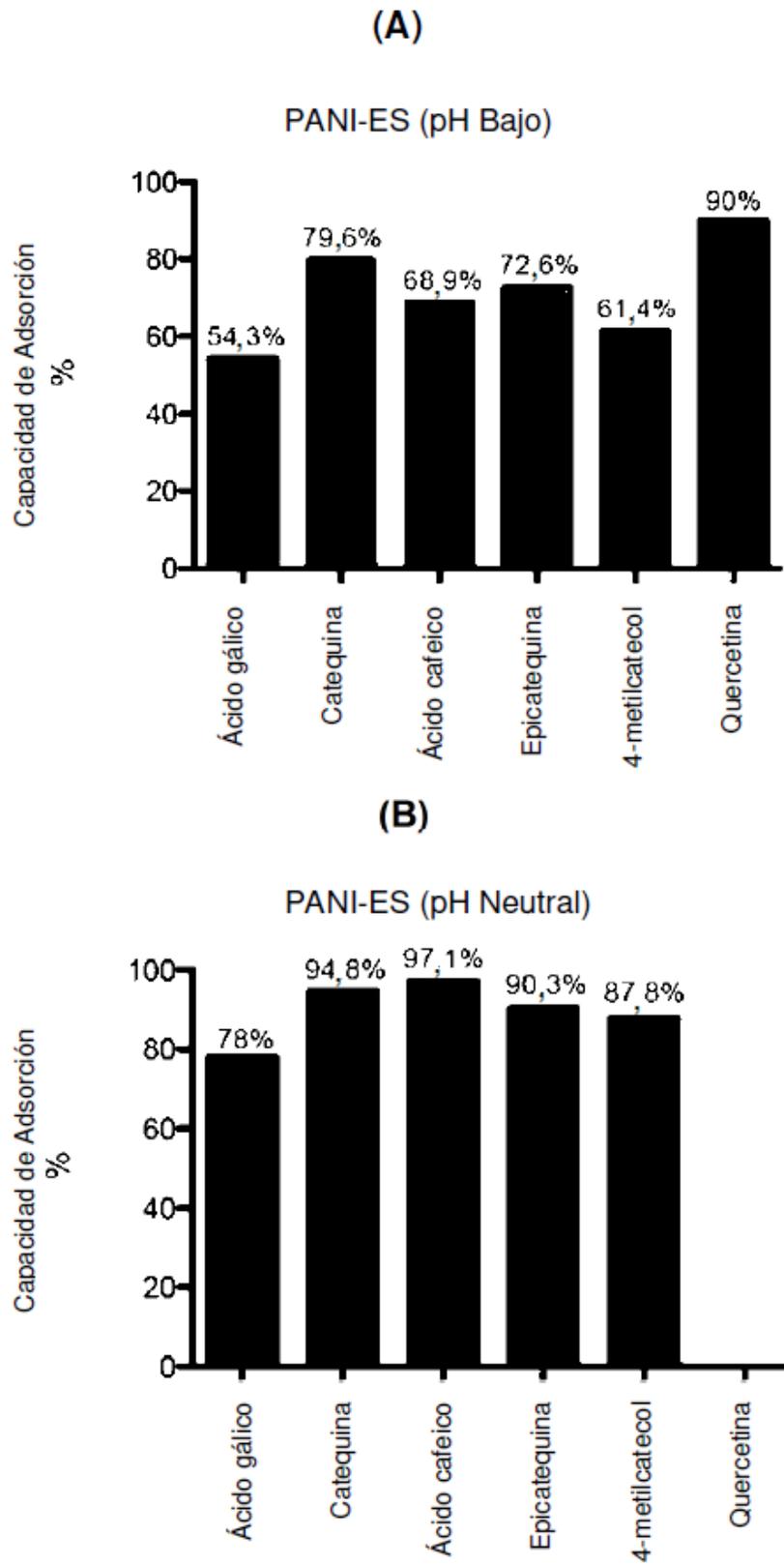


Figura 11

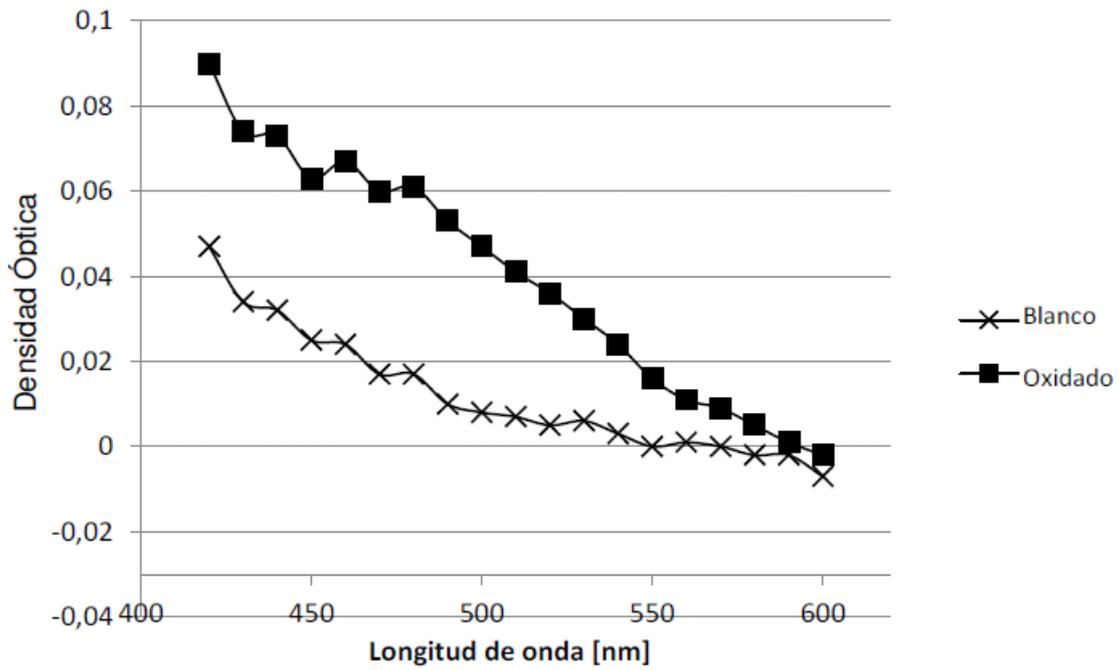


Figura 12

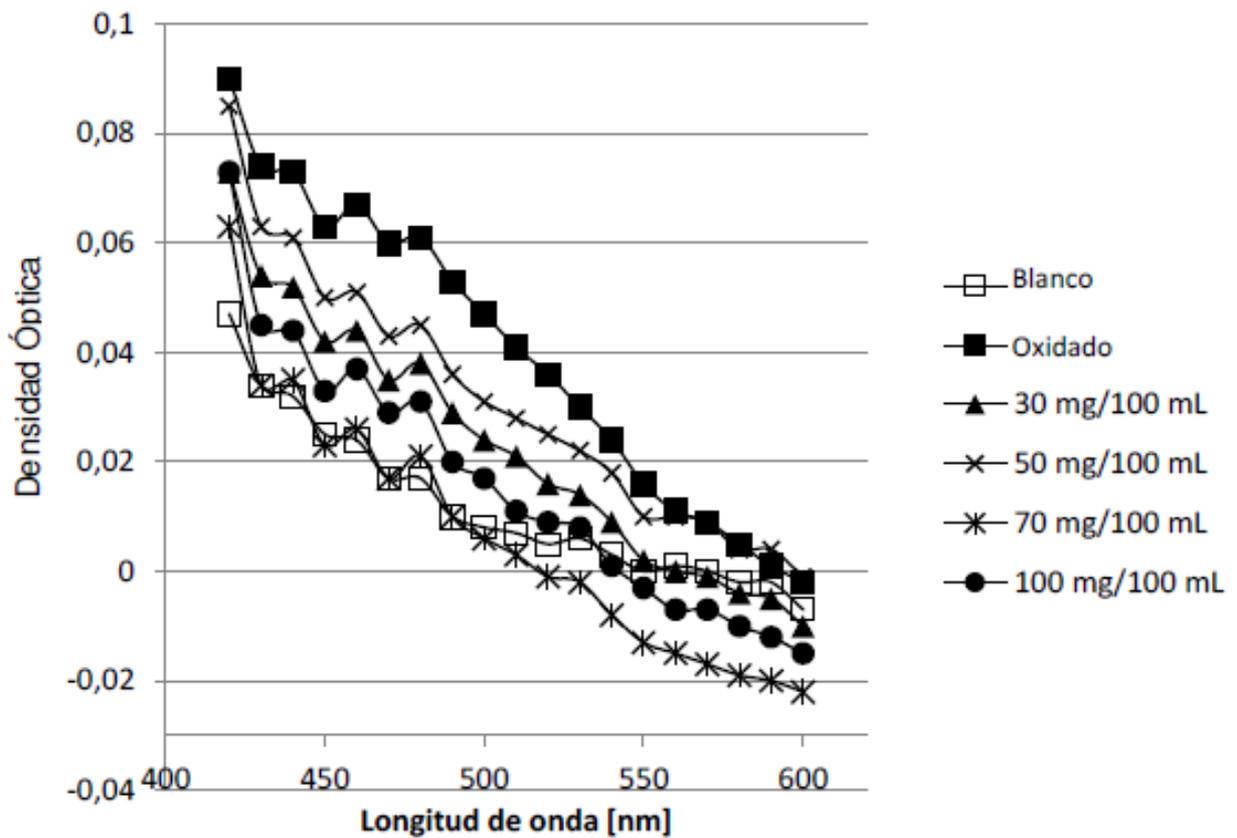


Figura 13

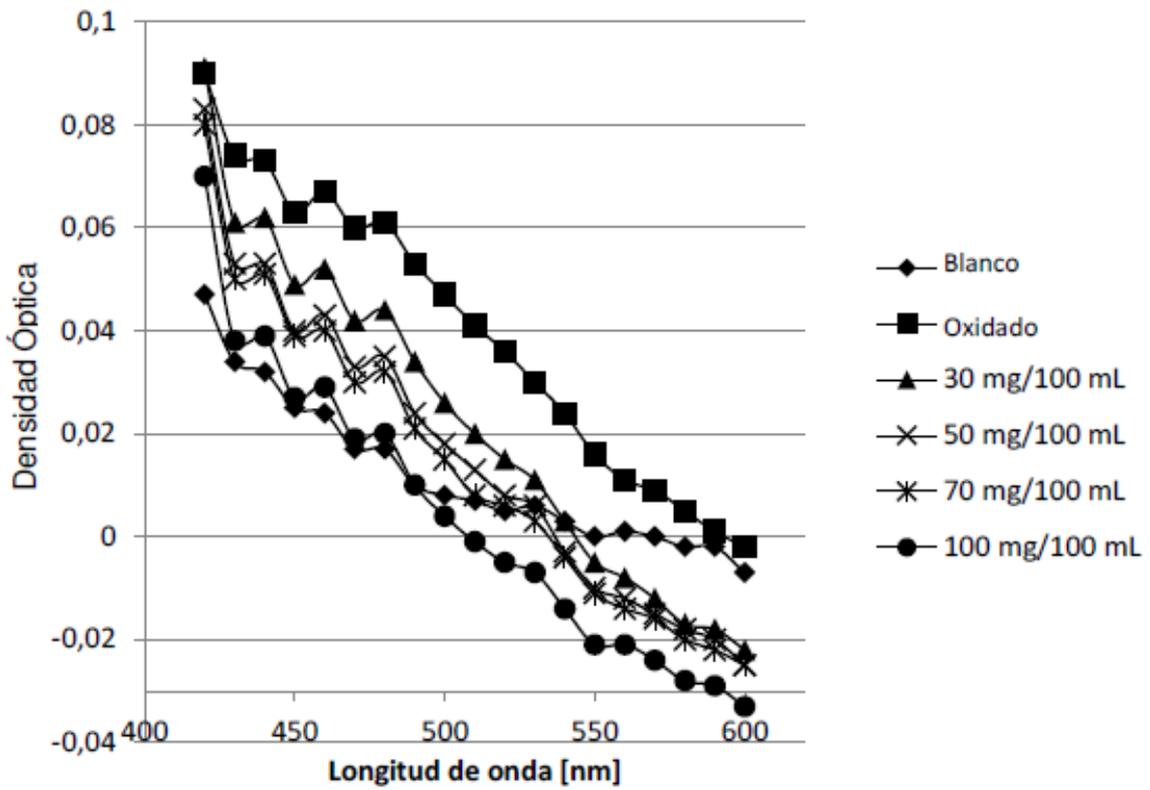


Figura 14

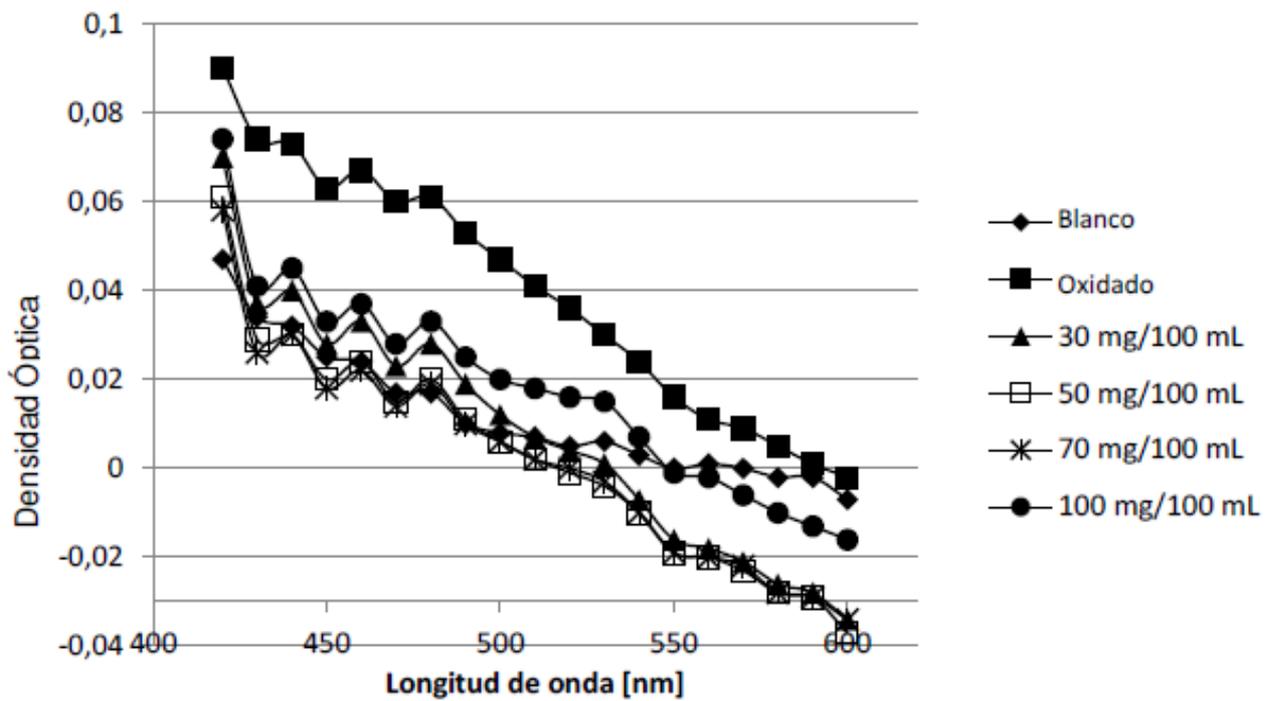


Figura 15

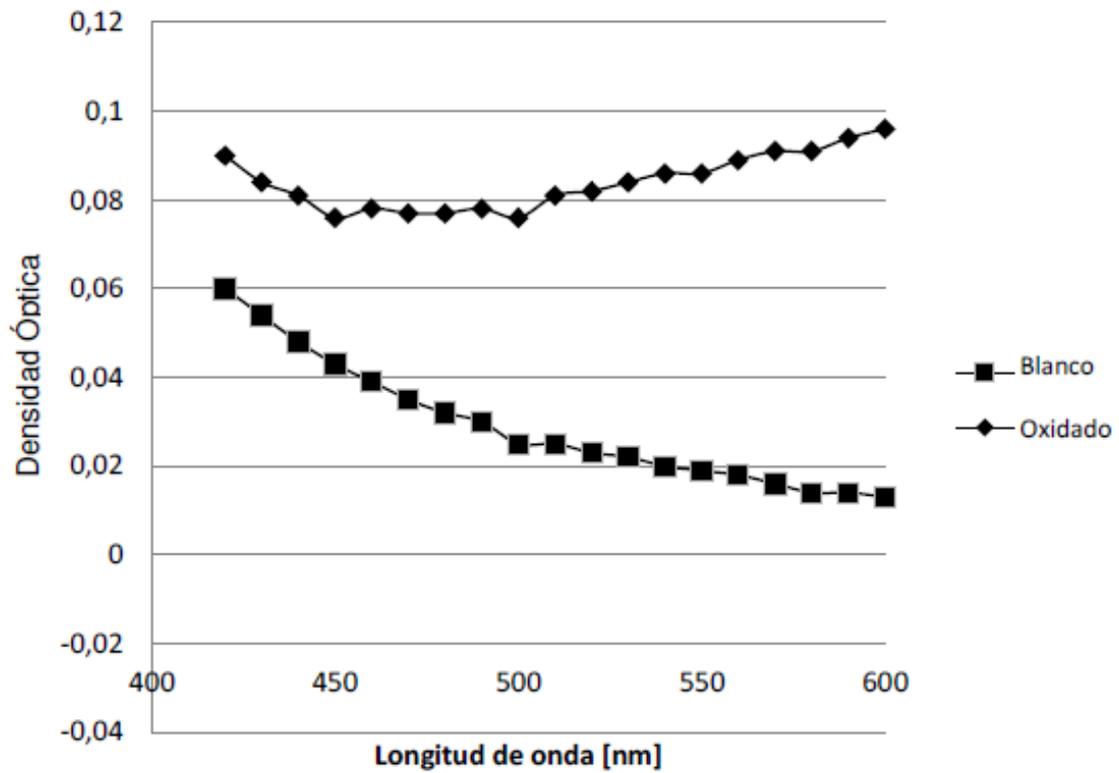


Figura 16

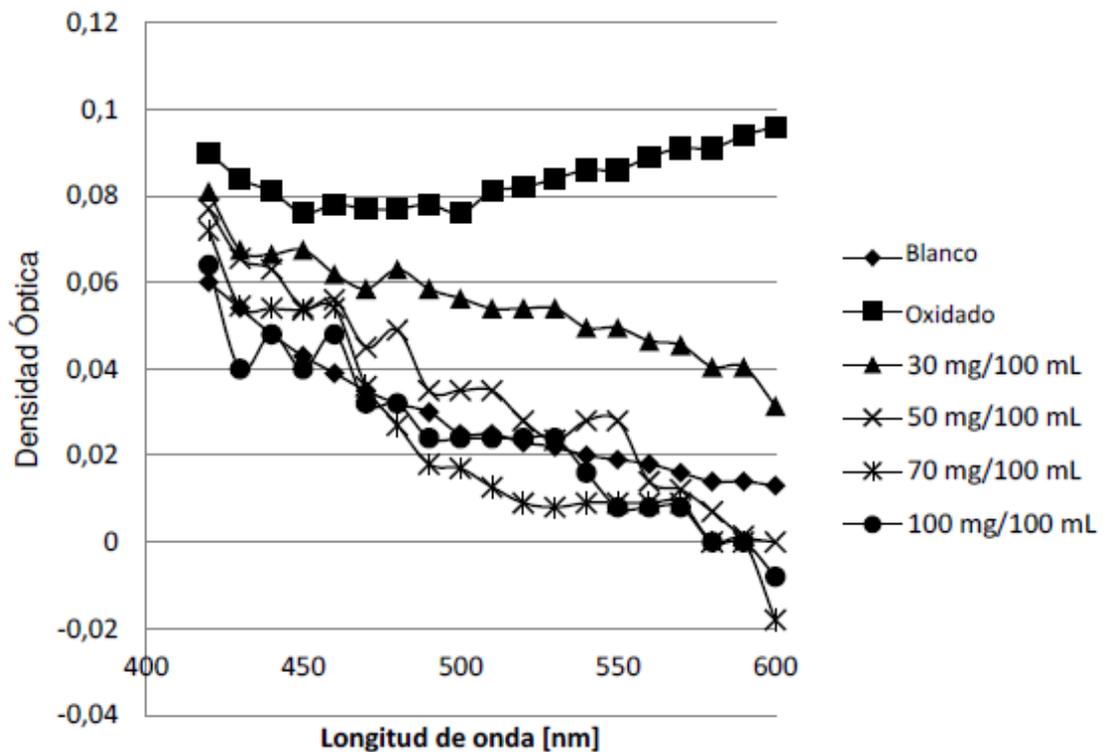


Figura 17

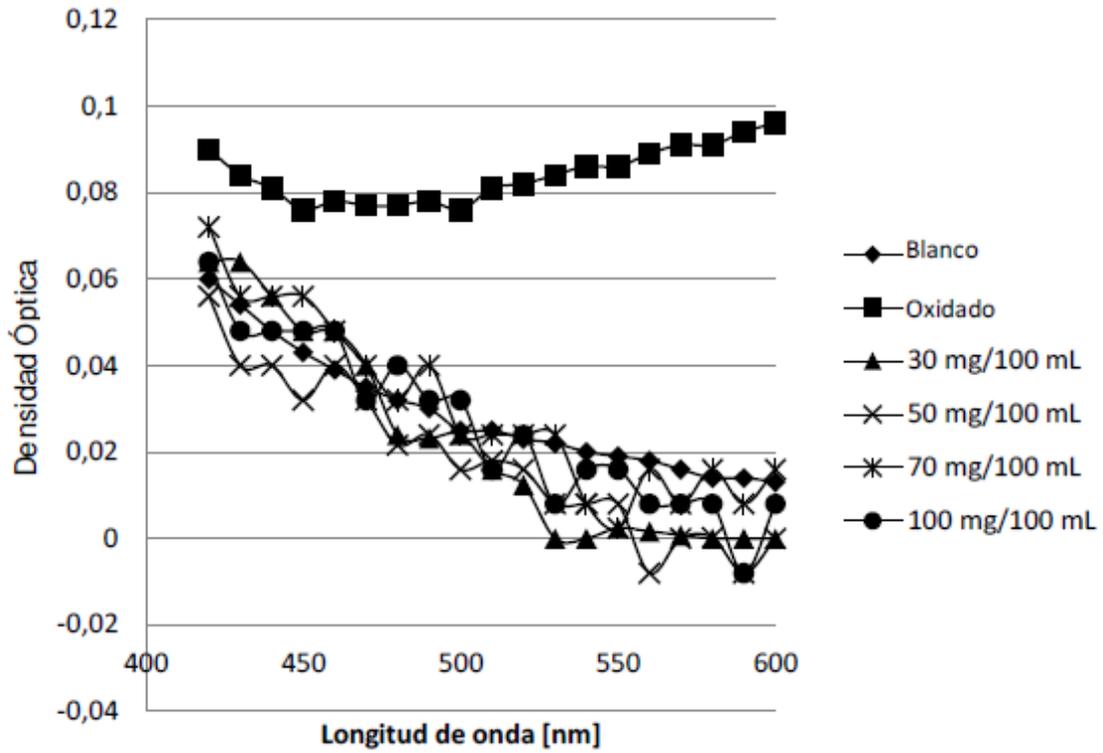


Figura 18

