



Form with handwritten number "e13x" and horizontal lines.

Ref. 6550/4

F.C. 25-11-75

423449

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL GLUCOSIDO
HESPERETIN-DIHIIDROCALCONA" a favor de la firma suiza
L. GIVAUDAN & CIE. SOCIETE ANONYME, residente en
VERNIER-GENEVE (Suiza).

= . =

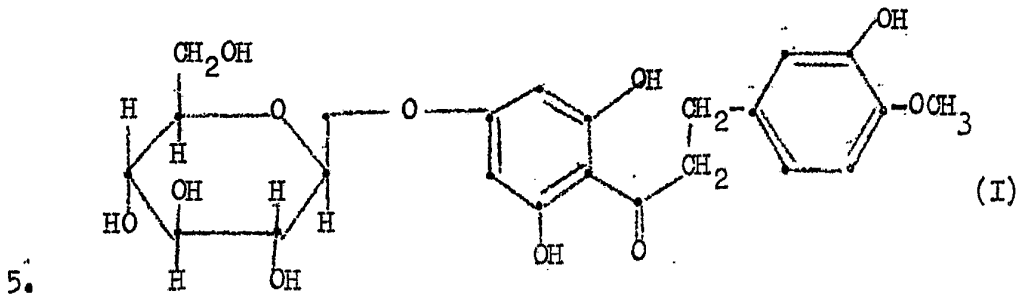
MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un procedi-
miento para la preparaci3n de gluc3sido hesperetin-di-
hidrocalcona.

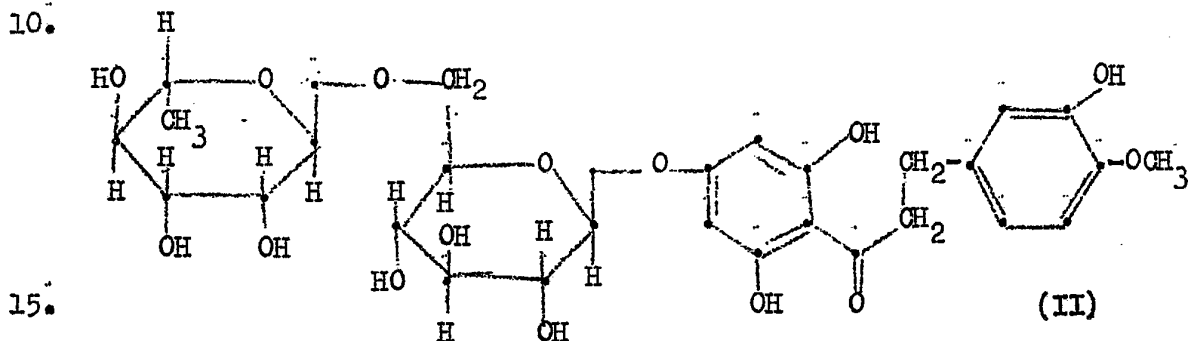
5. Sabido es que la herperidina glic3sida insabora,
que se encuentra principalmente en la piel de frutos
c3tricos, puede convertirse en el gluc3sido hesperetin-
-dihidrocalcona muy dulce (y por consiguiente utilizable
como edulcorante) de la f3rmula

= 2 =

423449



mediante tratamiento con álcali, hidrogenación e hidrólisis enzimática (véase, por ejemplo, la descripción de la patente estadounidense Nº 3.583.894). Procediendo de este modo la hesperidin-dihidrocalcona de la fórmula



20.

se somete a la acción del sistema enzimático de la naringinasa, cuya actividad de la beta-glucosidasa se ha destruido extensivamente de modo que éste únicamente disocia, predominantemente, la rramnosa. La inactivación de la beta-glucosidasa del sistema enzimático se lleva a cabo calentando una suspensión acuosa de naringinasa a una temperatura de unos 60º-65º C durante 30-120 minutos a un pH de 6,4-6,8. Sin embargo, este

423449



procedimiento está asociado con una pérdida parcial de la actividad de la ramosidasa, cuya magnitud absoluta no es reproducible.

5. Ahora se ha descubierto sorprendentemente, según el presente invento, que asociando una enzima glicolítica o sistema enzimático con actividad de la ramosidasa, tal como manifiesta, por ejemplo, la naringinasa y la hesperidinasa, a un vehículo, especialmente a un vehículo sólido activado, se bloquea, de forma selectiva, la actividad de la beta-glucosidasa.

10. El presente invento se basa en el descubrimiento antes referido y, consecuentemente, se refiere a un procedimiento para la obtención de glucósido hesperetin-dihidrocalcona a partir de hesperedin-dihidrocalcona mediante enzimas glicolíticas o sistemas enzimáticos con actividad de la ramosidasa, tal como exhibe la hesperidinasa y la naringinasa, llevándose a cabo dicho procedimiento con el empleo de una enzima o sistema enzimático asociado a un vehículo que tenga inhibida la actividad de la beta-glucosidasa.

20. El invento se refiere, asimismo, a un derivado enzimático glicolítico o sistema enzimático que posee la actividad de la ramosidasa y que tiene inhibida la actividad de la beta-glucosidasa, el cual ha perdido extensivamente la actividad de la beta-glucosidasa, especialmente con respecto a la hesperedin-dihidrocalcona como el substrato, con la asociación de la enzima o sistema enzimático a un material de vehículo sólido, así como a su preparación.



423449

Una enzima o sistema enzimático preferido del presente invento es la hesperidinasasa; un producto que se encuentra en el comercio.

5. Los materiales de vehículo sólido apropiados, que se utilizan para la obtención de preparados enzimáticos de conformidad con el presente invento, especialmente hesperidinasasa que tiene inhibida la actividad de la beta-glucosidasa, son polímeros que poseen una base orgánica o inorgánica. Ejemplos de materiales que tienen
10. una base inorgánica son los silicatos naturales y sintéticos y las sustancias que contienen silicatos tales como, por ejemplo, vidrio, arena, gel de sílice, kieselgur, bentonita y wollastonita, así como óxidos metálicos como óxido de aluminio e hidroxilapatito. Los polímeros
15. apropiados que tienen una base orgánica son, por ejemplo, la celulosa y las poliamidas.

20. En una realización especialmente preferida del presente invento, puede utilizarse, en calidad de material de vehículo, vidrio poroso; por ejemplo, en la forma que se encuentra en el comercio, de preferencia con un tamaño de partícula comprendido entre 80 y 400 mallas, aproximadamente, y un diámetro medio del poro comprendido entre 75 y 2000 Å, aproximadamente. Sin embargo, el material de vehículo puede presentar también otra forma
25. y/o tamaño en caso que las exigencias lo requieran.

El material de vehículo sólido se recubre, convenientemente, con una capa de una diamina aromática. Esto puede llevarse a cabo, convenientemente, mediante



- tratamiento con una solución de la amina y, si se desea, con ligero calentamiento. Las diaminas aromáticas apropiadas son, por ejemplo, la 1,3-fenilendiamina, el 4,4'-diamino-difenilo, el 4,4'-diamino-estilbeno y el 4,4'-diamino-difenilmetano, así como los compuestos correspondientemente sustituidos, siendo la diamina especialmente preferida el 4,4'-diamino-difenil-metano. Luego se diazoa el producto así obtenido en forma de por sí conocida; por ejemplo, mediante reacción con un nitrito y un ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido acético), de conveniencia a una temperatura comprendida entre 0°C y la temperatura del ambiente. De conformidad con el procedimiento anteriormente descrito, se proporciona a las partículas del vehículo una cubrición de fuerte adherencia que es activada por la vinculación de la proteína.

- Para vincular la enzima al vehículo sólido activado se trata el vehículo con una solución de la enzima, manteniéndose, de conveniencia, una relación entre proteína y vehículo de 1-50 mg/g. En calidad de disolvente para la enzima puede utilizarse cualquier disolvente de los utilizados normalmente en la química de las enzimas, pero, de preferencia, se utilizan las soluciones tampón (por ejemplo tampones de fosfonato o de citrato). La reacción de la enzima con el vehículo diazotado se lleva a cabo, de preferencia, en una solución tampón que tenga un pH comprendido entre 4,5 y 8,0 al tiempo que se agita durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 24 horas, aproximadamente, de preferencia durante 1-2 horas,

21 FEB.



423449

y a una temperatura comprendida entre 0°C y 30°C. Cuando se utiliza hesperidinasa, se prefiere de forma especial un tampón con un pH de 6,0 a 7,5 y la temperatura reaccional preferida es de unos 4°C.

5. La enzima así obtenida que se asocia a un vehículo activado sólido y cuya actividad de la beta-glucosidasa está inhibida de forma selectiva, es apropiada para la degradación de la hesperidin-dihidrocalcona a glucósido hesperetin-dihidrocalcona. Además, la
10. enzima insolubilizada así obtenida posee propiedades ventajosas; puede separarse fácilmente del sustrato (por ejemplo mediante filtración o centrifugación), puede utilizarse varias veces y es especialmente apropiada para ser utilizada en un procedimiento continuo. Por
15. último, la preparación enzimática que se obtiene según el presente invento tiene una gran estabilidad. En el caso de la hesperidinasa asociada a vidrio poroso, se observa una actividad y estabilidad especialmente buena en un procedimiento continuo de columnas, tal como se
20. conoce, por ejemplo, en cromatografía.

- La reacción de la hesperidin-dihidrocalcona con la enzima asociada a un vehículo puede llevarse a cabo en forma de por sí conocida; o sea en una planta estática (por ejemplo en reactores agitados) y, tal como se ha
25. indicado anteriormente, de preferencia, en una planta continua (por ejemplo, en columnas de reacción). Procediendo de este modo se utiliza, de preferencia, una concentración del sustrato inicial del 5%, aproximadamente, si bien pueden utilizarse también, evidentemente, soluciones que contengan mayores o menores concentra-

423449 21 Feb.



- ciones. La elaboración del producto reaccional carece de problemas y puede llevarse a cabo de forma conocida. Por ejemplo, puede llevarse a cabo, simplemente, concentrando la mezcla reaccional hasta sequedad sin ulterior purificación ya que la aglicona, que puede estar presente
5. en ligeras cantidades como subproducto, también es dulce y fisiológicamente inofensiva.

Los ejemplos que siguen ilustran el presente invento.

10. EJEMPLO 1

Preparación del vehículo activado

- Se adicionó 1 g de vidrio poroso (100-200 mallas, diámetro del poro: 2000 Å) a una solución de 200 mg de 4,4'-diamino-difenil-metano en 10 cc de benceno seco.
15. Se calentó la mezcla durante 5 minutos en un baño de agua (80°C) con sacudidas ocasionales, se evaporó luego bajo vacío hasta que se separó todo el benceno. Se adicionó el residuo a 20 c de agua enfriada por hielo, se trató, al tiempo que se agitaba, con 300 mg de nitrito sódico
20. y luego con ácido clorhídrico diluído (20 vol-%) a un pH de 1-2. Luego se agitó la mezcla resultante durante 10 minutos a 0°C, se ajustó el pH a 5 con la adición de hidróxido sódico 1-N y se separó por decantación el sobrenadante. Se lavó el residuo varias veces con agua enfriada con hielo, que se había llevado a pH 4-5 mediante la
25. adición de ácido clorhídrico, hasta que el sobrenadante resultó incoloro. Las partículas así obtenidas se utilizaron inmediatamente para la asociación con la enzima.



EJEMPLO 2

Asociación de la enzima

- Se adicionó 1 g del material del vehículo preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1
5. a 25 cc de una solución enfriada con hielo de 2 mg de hesperidinasa (5,2 unidades/mg) en tampón de fosfato 0,05-M (pH 6,5-7,8) y se sacudió suavemente a 4°C durante 1 hora. Luego se filtró la mezcla, se lavaron las partículas tres veces, cada vez con 50 cc de solución
10. de cloruro potásico 1-M y una vez con 50 cc de tampón de citrato 0,05-M (pH 6,5), se suspendió en 50 cc de tampón de citrato 0,05-M (pH 6,5) y luego se almacena a 4°C.

EJEMPLO 3

Conversión de hesperidin-dihidrocalcona en glucósido hesperetin-dihidrocalcona

15. Se sacudieron, durante 2 horas, a 45°C 2 g de hesperidinasa (4,3 unidades asociada a vidrio poroso, preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 2, con una solución de 500 mg de hesperidin-dihidrocalcona
20. en 20 cc de tampón de citrato 0,05-M (pH 4,5). El análisis cromatográfico de la solución resultante demostró que, después de transcurrido este período de tiempo, la hesperidin-dihidrocalcona se había convertido, cuantitativamente, en glucósido hesperetin-dihidrocalcona,
25. pudiendo detectarse vestigios de la aglicona respectiva. Se separó por filtración la enzima asociada al vehículo, se lavó con tampón de citrato 0,05-M (pH 6,5) a 45°C y



423449

se utilizó inmediatamente o se almacenó a 4°C para el futuro empleo. Se combinó el filtrado con las soluciones lavadas y se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. Se extrajo el residuo tres veces con 50 cc de dioxano.

5. Después de la separación del disolvente el extracto dió 240 mg (rendimiento del 70%) del glucósido hesperetin-dihidrocalcona muy dulce.

10. Se obtuvo un rendimiento de glucósido similarmente bueno mediante una extracción triple directa de la solución reaccional con acetato de etilo sin concentración previa.

15. Se obtuvo una separación cristalina del glucósido enfriando la solución reaccional con hielo. Es evidente que esta elaboración no es cuantitativa, pero resulta bien apropiada para grandes partidas en donde los métodos de extracción son menos convenientes.

EJEMPLO 4.

Conversión de hesperidin-dihidrocalcona en glucósido hesperetin-dihidrocalcona

20. Se trataron, en una columna de vidrio (1,0 x 10 cm), 3 g de hesperidinasa (8,1 unidades) asociados a vidrio poroso, preparado según el procedimiento descrito en el ejemplo 2, con una solución de 50 mg de hesperidin-dihidrocalcona en citrato 0,05-M (pH 4,5)
25. a 45°C, manteniéndose una velocidad de flujo de 1 cc/hora. El análisis cromatográfico continuo puso de manifiesto la degradación cuantitativa de la hesperidin-dihidrocalcona en glucósido hesperetin-dihidrocalcona y ramaña, así como un vestigio de aglicona.



423449

EJEMPLO 5

Conversión de hesperidin-dihidrocalcona en glucósido hesperetin-dihidrocalcona

5. Se hidrolizaron, cuantitativamente, 118 g de hesperidin-dihidrocalcona en una columna de reacción que contenía 5 g de hesperidinasa asociados a un vehículo (20 mg de enzima) en un proceso continuo durante un período de 2 semanas con una velocidad de flujo inicial de 20 cc/hora que retrocedió hasta 10 cc/hora al término del proceso, sin que se extinguiera la actividad de la enzima.

= . =

REIVINDICACIONES

15. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 2602/73 del 22.2.73.

20. 1. Un procedimiento para la preparación del glucósido hesperetin-dihidrocalcona, a partir de hesperidin-dihidrocalcona mediante una enzima glicolítica o sistema enzimático con actividad de la ramosidasa, caracterizado porque se lleva a cabo utilizando una enzima o sistema enzimático asociado a un vehículo que tiene inhibida la actividad de la beta-glucosidasa.

25. 2. Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza hesperidinasa asociada a un vehículo que tiene inhibida la actividad de la beta-glucosidasa.

423449



- 3. Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el vehículo es un material que contiene sílice activado.
 - 4. Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 2 y la reivindicación 3, caracterizado porque el vehículo está constituido por vidrio poroso con una capa de una diamina aromática diazotada.
 - 5. Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque dicha diamina aromática es el 4,4'-diamino-difenil-netano.
 - 6. Un procedimiento para la preparación del glucósido hesperetin-dihidrocalcona.
- Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 11 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 21 de Febrero de 1974

p.a. JAIME ISERN
P. P.

[Handwritten signature]
Firmado: FELIPE PRIETO

[Handwritten mark]