

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 936**

21 Número de solicitud: 201301183

51 Int. Cl.:

C08B 37/06 (2006.01)

C08L 5/06 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

11.12.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.06.2015

Fecha de la concesión:

14.04.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.04.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
(100.0%)**

**Avda. de la Universidad s/n Edificio Rectorado y
Consejo Social
03202 Elche (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**SAURA LÓPEZ , Domingo ;
MARTÍ BRUÑÁ , Nuria ;
MICOL MOLINA, Vicente;
FÚNES GÓMEZ, Lorena Lourdes;
VEGARA GÓMEZ, Salud;
IGNATIEVA, Galina;
BARRAJON CATALÁN, Enrique;
VALERO ROCHE , Manuel ;
MENA PARREÑO, Pedro;
MARTÍNEZ FONT , Rafael;
BERENGUER MARTÍNEZ, María De Los Remedios
y
MOLINER GOSALBEZ, Miguel**

54 Título: **Método de producción de pectina modificada de cítricos**

57 Resumen:

La presente invención se enmarca dentro del sector de fabricación de polisacáridos, más concretamente pectinas modificadas de cítricos.

La materia prima proviene de subproductos de la industria de cítricos, ésta es hidratada y tratada enzimáticamente, se trata con una solución de celulasa y una solución de pectinesterasa en condiciones suaves y medias. De esta forma logramos la modificación química de los componentes de la pared vegetal de la materia prima. Mediante la combinación de temperaturas de extracción y de secado por nebulización se consigue obtener una pectina con un peso molecular de 10-20 KDa, un grado de polimerización de 30-70 unidades y un grado de esterificación inferior al 50%. De este modo se obtienen pectinas modificadas y un extracto alcohólico de alto poder antitumoral.

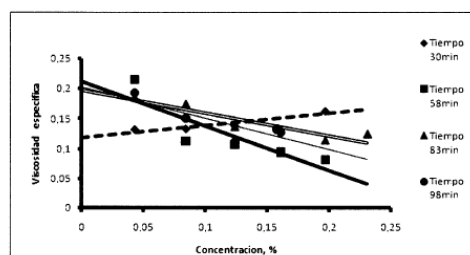


Figura 6.

ES 2 537 936 B1

DESCRIPCIÓN

Método de producción de pectina modificada de cítricos**Sector de la técnica**

La presente invención se enmarca en la industria de productos alimenticios, específicamente en la transformación de desechos de materia prima vegetal. En particular se trata de la transformación de desechos de fabricación de zumos cítricos con el fin de obtener pectina modificada de cítricos. Esta transformación conduce a una pectina modificada que exhibe determinadas actividades fisiológicas.

10 Estado de la técnica

Las sustancias pécticas son polímeros lineales de restos de ácido α -(1,4)-D-galacturónico, que tienen una parte más o menos amplia de grupos carboxilos esterificados por radicales metilo en diferente proporción, lo que le da un grado de metilación del cual dependerá su capacidad de producir geles en condiciones normales con azúcar y ácido. Se encuentran principalmente en las paredes celulares y los espacios intercelulares de los tejidos vegetales; son capaces de retener gran cantidad de agua y participan en la transferencia de agua en las plantas.

Las pectinas se dividen en dos grupos principales, en función de su grado de esterificación, clasificándolas en pectinas de alto grado de metoxilación (HM), pectinas de bajo grado de metoxilación (LM) y en otras sustancias pécticas como las pectinas desmetiladas o moléculas amidadas (5). Las pectinas HM presentan valores de metoxilación comprendidos entre el 60 y 75 % mientras que este valor disminuye hasta un 20-40 % en las pectinas LM. Esta diferencia en el grado de metoxilación influye directamente en la capacidad formadora de geles de cada pectina.

La fabricación de la pectina comprende la extracción, purificación, concentración y secado. El uso de un método adecuado para la extracción de pectina es importante con el fin de maximizar su rendimiento y calidad. La literatura cita como los métodos más comunes para la extracción de pectina la ebullición directa y el calentamiento por microondas (Joye, D.D., 2000; Fishman 2000; Yeoh 2008). Sin embargo, ninguno de los métodos de extracción mencionados consigue un alto rendimiento sin causar cierta degradación.

El método de ebullición es un método convencional de extracción de pectina, mediante el cual, el subproducto tiene que ser sometido al tratamiento durante al menos 2

horas para obtener un buen rendimiento (El-Nawawi, S.A., 1987; Kertesz 1951) pero la pectina obtenida presenta alta degradación. La extracción por calentamiento mediante la utilización de microondas, por otro lado, no necesita más de 15-20 minutos para extraer una cantidad satisfactoria de pectina (Joye, D.D., 2000). Los métodos que emplean
5 calentamiento por microondas son generalmente más efectivos en términos de rendimiento de pectina y además la calidad del producto obtenido es mayor que en el método de ebullición (Kratchanova, M., 2004; Liu 2006), aunque la degradación de la pectina es evidente.

La estructura ramificada de la pectina de cítricos puede verse sometida a cambios
10 producidos por los métodos de extracción, pues se sabe que los diferentes métodos de extracción hacen variar las propiedades y características de las pectinas, obteniéndose compuestos de menor peso molecular ricos en galactosa (Pectinas Cítricas Modificadas, MCP por su siglas en inglés). Generalmente, la MCP presenta un peso molecular de 15400 g/mol y es un homogalacturonano principalmente lineal con una esterificación 3,8% y con
15 aproximadamente un 10% ramnogalacturonano II (Eliaz et al., 2006). Los cambios producidos en la MCP debidos al proceso de producción hacen que ésta sea más fácilmente absorbida por el tracto digestivo que la pectina normal de cítricos y que además, pueda pasar al torrente sanguíneo.

Los métodos de modificación de la pectina para la obtención de MCP están
20 centrados en hidrólisis ácida, siendo la temperatura y tiempo de tratamiento factores decisivos del proceso. Las extracciones iniciales de la pectina a partir de piel de limón suelen realizarse mediante la puesta en contacto del subproducto con una solución ácida entorno a pH 2-3, perdiendo ésta algo de su ramificación y longitud de cadena pasando a la solución y siendo recuperada mediante la precipitación con alcoholes (etanol o
25 isopropanol). El producto obtenido se lava y se seca obteniéndose pectina de bajo grado de esterificación (Masmoudi 2012; Joe and Lucio 2000).

En base a sus parámetros físico-químicos éstas pueden ser aplicadas en diversos procesos como la producción de geles y además, se ha demostrado en múltiples estudios que las pectinas pueden ejercer una influencia positiva en los procesos metabólicos del
30 organismo humano, atribuyéndosele propiedades importantes como adyuvante para la terapia de algunos cánceres inhibiendo el crecimiento de células cancerígenas y evitar la metástasis como en cáncer de próstata (Pienta *et al.*, 1995), de mama (Glinsky 2000; Naik 1995) y colon (Havashi, A., 2000), también en la desintoxicación de metales pesados en

sangre, disminución de colesterol (Vargo, D., 1985), creatinina (problemas renales) y otras enfermedades.

Dado el amplio espectro de su uso resulta necesario perfeccionar específicamente la tecnología de obtención de pectina, Marshall, L., Fishman et al. “*Chemistry and function of pectins*” American Chemical Society - Washington (1986); Reginald, H., Walter “*The chemistry and technology of pectin*” Food science and technology series - San Diego, California (1991); Imeson, A. “*Thickening and gelling agents for food*” Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall – London (1992); Pilnik et al. “*Gelling agents (pectin) from plants for the food industry*” on Adv. in Plant Cell Biochemistry Biotechnology J.: p.232-241 (1992); C.D. May “*Industrial pectin sources, production and applications*” Carbohydrate Polymers. J. 12: p.79; “*Modified pectins, compositions and methods related thereto*” (WO 2005/095463).

Se conoce, por ejemplo, cierto tipo de MCP, capaz de penetrar en el flujo sanguíneo y “adherirse” a las células cancerosas impidiendo su propagación y la formación de tumores malignos. El Dr. Isaac Eliaz es uno de los principales investigadores en MCP, con varias patentes con respecto a la MCP (USP 8,426,567, Method for enhancing mammalian immunological function, USP 6,462,029, Compositions and methods for treating mammals with modified alginates and modified pectins, y USP 6,274,566, Methods for treating mammals with modified alginates and pectins), si bien el arranque de su interés se debe a los trabajos del Dr. K.J. Pienta, (Pienta *et al.*, 1995) sobre el uso de la pectina de cítricos en la prevención de la metástasis del cáncer de próstata en los pulmones. MCP es una pectina parcialmente despolimerizada y desesterificada, cuyo menor tamaño molecular permite que sea mejor absorbida para alcanzar el flujo sanguíneo donde actúa frente a las células malignas.

Acerca de la influencia del tiempo de tratamiento, en la bibliografía existe una opinión unánime acerca del procedimiento más adecuado para la obtención de una pectina modificada, la aplicación de un tratamiento enzimático, que permite condiciones de trabajo mejor controladas y menos agresivas para el medio ambiente. En una revisión exhaustiva de la bibliografía, incluidas las patentes, llama la atención las condiciones extremas de los procesos aplicados.

A continuación y para facilitar su localización se detallan las referencias utilizadas en la descripción del estado de la técnica, excepto la referencia a las patentes cuya indicación en el texto resulta suficiente para su localización e identificación.

Referencias

1. Eliaz, I., Hotchkiss, A.T., Fishman, M.L. and Rode, D., 2006. *The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements*, *Phytotherapy Research*, 20 (10) 859-864.
2. Glinsky, V.V., Huflejt, M.E., Glinsky, G.V., Deutscher, S.L., Quinn, T.P., 2000. *Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells*, *Cancer Research*, 60: 2584-2588.
3. Havashi, A., Gillen, A.C., Lott, J.R., 2000. *Effects of Daily Oral Administration of Quercetin Chalcone and Modified Citrus Pectin*, *Alternative Medicine Review*, 5 (6) 546-552.
4. Joye, D.D. and Luzio, G.A., 2000. *Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH*, *Carbohydrate Polymers*, 43 (4): 337-342.
5. Masmoudi, M., Besbes, S., Abbes, F., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., Attia, H., (2012) *Pectin Extraction from Lemon By-Product with Acidified Date Juice: Effect of Extraction Conditions on Chemical Composition of Pectins*, *Food Bioprocess Technology*, 5: 687-695.
6. Naik, H., Pilat, M.J., Donat, T., 1995. *Inhibition of in vitro tumor cell-endothelial adhesion by modified citrus pectin: a pH modified natural complex carbohydrate*, *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 36:377.
7. Kratchanova, M., Pavlova, E., and Panchev., I., 2004. *The effect of microwave heating of fresh orange peels on fruit tissue and quality of extracted pectin*, *Carbohydrate; Polymers*, 56(2) 181-185.
8. El-Nawawi, S.A. and Shehata, F.R., 1987. *Extraction of pectin from Egyptian orange peel*. Factors affecting the extraction, *Biological Wastes*, 20(4) 281-290.
9. Kertesz, Z.I., 1951. *The Pectic Substances*, Interscience Publisher Inc., New York, pp. 71, 161, 216, 217, 308, 309.
10. Fishman, M.L., Chau, H.K., Hoagland, P. and Ayyad, K., 2000. *Characterisation of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure*, *Carbohydrate Research*, 323(1-4) 126-138.
11. Liu, Y., Shi, J. and Langrish, T.A.G., 2006. *Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels*, *Chemical Engineering Journal* 120: 203-209.

12. Yeoh, S., Shi, J. and Langrish, T.A.G., 2008. *Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels*, De salination, 218: 229-237.
13. Pienta, K.J., Naik, H., Akhtah, A., Yamazaki, K., Replogle, T.S., Lehr, J., Donat,
5 T.L., Tait, L., Hogan, V., Raz, A. 1995. *Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin*, Journal of the National Cancer Institute, 87 (5) 348-353.
14. Vargo, D., Doyle, R., Floch, M.H., 1985. *Colonic bacterial flora and serum cholesterol: Alterations induced by dietary citrus pectin*, American Journal of
10 Gastroenterology 80 (5) 361-364.
15. Eliaz, I., Mc Culloc, M. Methods for treating mammals with modified alginates and pectins. United States Patent 6,274,566. 2001.
16. Eliaz, I. Compositions and methods for treating mammals with modified alginates and modified pectins. United States Patent 6,462,029. 2002.
- 15 17. Eliaz, I. Compositions and methods for treating mammals with modified alginates and modified pectins. United States Patent 7,452,871. 2008.
18. M.A.V. Axelos, J.F., Thibault, J., Lefebvre. Structure of citrus pectins and viscometric study of their solution properties. International Journal of Biological Macromolecules. 1989. P.186-191.
- 20 19. Femenia, A., Waldron, K.W., Robertson, J.A., & Selvendran, R.R. Compositional and structural modification of the cell wall of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var botrytis) during tissue development and plant maturation. Carbohydrate Polymers. 1999. 39, 2, P. 101-108.
20. Ignatieva, G., N. Increase in sensitivity of the conductance-measuring method to
25 analyze pectic substances. Storage and processing of farm products. 2001. P.60-62.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención describe un método de producción de pectina modificada de cítricos utilizando protocolos de tratamiento que influyan lo mínimo en las características y propiedades de calidad de este compuesto.

Además la presente invención describe el proceso de obtención de Pectina de Cítricos Modificada (PCM) y Extracto Alcohólico a partir de subproductos de la industria de cítricos:

- 5 • Utilizar subproductos derivados de la producción de zumos cítricos, como piel o pulpa.
- Adición de agua en relación 1:1 (p/v) con un entre un 5-10 % de citrato de sodio para aumentar el pH, a una temperatura de entre 40-50°C.
- Tratamiento enzimático con celulasa a 500 ppm manteniendo el producto en agitación entre 40-50°C durante 30 minutos.
- 10 • Tratamiento enzimático con pectinesterasa a 200 ppm manteniendo en agitación a 40-50°C durante 30 minutos.
- Una vez finalizado el tratamiento enzimático, las enzimas deben ser desactivadas mediante un tratamiento térmico a 85°C durante 2 minutos y posterior enfriamiento hasta 25-30°C.
- 15 • A la mezcla anterior se le adicionan 2 litros de isopropanol (densidad = 0,78 g/ml que equivale a 1,56 kg) y se mantiene en agitación durante 25 minutos a temperatura ambiente.
- Para finalizar el proceso de extracción, se separara la parte sólida y la líquida mediante filtración por papel.
- 20 • El sólido obtenido se pesó y se secó en una estufa de vacío. El líquido se evaporó al vacío hasta la completa eliminación del isopropanol, se ajustaron los grados brix hasta 10 con agua destilada y se secó mediante secado por nebulización.

Se ha partido de pectina comercial obtenida de corteza de limón con peso molecular 25 58 KDa y grado esterificación 65%. Para el tratamiento enzimático se emplearon disoluciones de pectina al 2%, que facilitan la actuación de las enzimas. Las enzimas aplicadas son pectin-transeliminasa con poligalacturonasa y pectinesterasa. Las dosis son 0,2 ml/g y 0,025 ml/g, respectivamente. .

El tratamiento enzimático se verificó sobre disoluciones de pectina al 2% a 35°- 30 38°C. Los tiempos de tratamiento se redujeron de 30 a 14 min. Posteriormente los enzimas se inactivaron llevando las muestras a una temperatura de 90°C durante al menos 1 minuto. La disolución de pectina modificada se concentró a una presión de 0,96 bar y a una

temperatura de 60°C. Para el secado de la muestra se empleó precipitación con alcohol o atomización mediante secado por nebulización.

En otros procesos se puede obtener pectina modificada de muy diversos orígenes, y por diferentes procedimientos productivos. El objeto técnico de la invención es la obtención de PCM que responde a los siguientes datos: Peso molecular: 10-20 KDa; Grado de polimerización: 30-70 unidades; Grado esterificación: < 50%. Se logra la obtención de una pectina modificada con un peso molecular entre 10-20 KDa.

El tiempo de tratamiento enzimático idóneo para la obtención de una muestra de pectina modificada se determinó analizando la influencia del tiempo de tratamiento enzimático sobre la **viscosidad específica** de una muestra de pectina (Figura 7).

La figura 6 representa la relación entre la concentración de pectina y la viscosidad específica a diferentes tiempos de tratamiento. La prolongación de las líneas viscosidad específica/concentración de pectina a concentración cero corresponde a la **viscosidad intrínseca** relacionada a su vez con el **tamaño de la molécula** obtenida para cada uno de los tiempos del tratamiento enzimático (de 30 hasta 98 minutos).

En la **Tabla 1** se muestran los valores de la viscosidad intrínseca correspondientes a cada tiempo de tratamiento.

| Tiempo tto. enzimático, min | Viscosidad intrínseca, $[\eta]$ |
|-----------------------------|---------------------------------|
| 0 | 3,48 |
| 30 | 0,118 |
| 58 | 0,213 |
| 83 | 0,199 |
| 98 | 0,202 |

Tabla 1. Influencia tiempo tratamiento enzimático en la viscosidad

En la **Tabla 2** se resumen los tiempos óptimos de tratamiento enzimático relacionados con el peso molecular de la muestra final.

| Tiempo tratamiento enzimático (min) | Peso molecular de pectina modificada (KDa) |
|-------------------------------------|--|
| 15 | 10 |
| 10 | 15 |

Tabla 2. Tiempo optimizado para obtener pectina modificada tipo MCP.

El proceso de secado tiene influencia en las características de la pectina modificada. Se empleó PCM obtenida a los 14 min. Una parte del concentrado de PCM se secó

mediante un secador por nebulización (*spray dryer*; Mini Spray Dryer B-290, Buchi) otra parte se seco mediante precipitación con alcohol etílico de acuerdo al método industrial de elaboración de pectina. Esto se realizó para cotejar posibles diferencias en el producto final debido al proceso de secado por atomización que se realizó a una temperatura de entrada de 120°C.

En la **Tabla 3** se muestran las principales características de las muestras obtenidas.

| Tipo de secado | Precipitación alcohólica | Spray Dryer |
|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| PM (KDa) | 12 | 11 |
| Color | Gris | Blanco |
| Humedad (%) | 9,5 | 6 |
| Pectina (%) | 90,5 ± 0 | 69,7 ± 1 |
| Na (%) | 0 | 0 |
| K (%) | 0 | 0 |
| Glucosa (%) | 0 | 1,8 ± 0,1 |
| Fructosa (%) | 0 | 0 |
| Sacarosa (%) | 0 | 19,0 ± 0,3 |
| Acido cítrico (%) | 0 | 1,7 ± 0,01 |

Tabla 3. Características de PCM en función de la tecnología de secado empleada.

En la figura 8 se esquematiza el proceso de producción de la pectina modificada.

Determinación de inhibición de la proliferación en líneas celulares tumorales

Para determinar la incidencia en diferentes líneas tumorales se realizaron las siguientes determinaciones en muestras de pulpa inicial, Pectina Cítrica Modificada (PCM), Extracto alcohólico, pulpa tratada enzimáticamente y una muestra de pectina modificada (MCP): pH, ° Brix, % Acidez, % Humedad, % Acido monogalacturónico por método Carbazol, % Metoxilo, % Grado de esterificación por valoración, Capacidad antioxidante por método TEAC en agua y metanol (moles ET / g extracto) y Flavonoides por HPLC expresados como % Hesperidina.

Las líneas celulares empleadas fueron:

HT-29 línea tumoral humana derivada de adenocarcinoma de colon grado 2

SW 480 línea celular establecida de cáncer colorrectal humano grado 4

JIMT1 línea celular establecida de de cáncer de mama humano

INS-1 células β pancreáticas derivadas de un insulinoma de rata

B16/F10 línea celular derivada de melanocitos malignos de ratón

Las muestras se disolvieron en el medio de cultivo adecuado a una concentración de 10mg/ml. Previamente y para favorecer la disolución se humedecieron con unas gotas de etanol. Una vez disueltas en el medio de cultivo se mantuvieron en agitación a 50°C durante 30 min. Se sometieron a ultrasonido durante 10min y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15min. Finalmente se ajustó el pH de las muestras a 7 y se filtraron por 0,22µm para tratar las células.

Siguiendo la metodología de cultivo de las líneas celulares HT29, SW480, JIMT1 y B16/F10 se mantuvieron en número de pase bajo con medio DMEM enriquecido con glutamina estable, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de piruvato, y antibiótico (100 µg/ml de estreptomicina y 100 unidades/ml de penicilina). Por su parte las células INS-1 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino sin inactivar, 1mM de piruvato de sodio, 10 mM de Hepes, 2 mM de glutamina y 0,05 mM de 2-mercaptoetanol. La manipulación se llevo a cabo en condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo laminar para el cultivo de las células y una incubadora a 37°C con una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Las distintas líneas se subcultivaron antes de llegar a una confluencia del 80%.

El ensayo de inhibición de la proliferación celular se realiza por triplicado, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad adecuada para cada línea celular de manera que no llegaran a confluencia después de 72h de tratamiento. Después de la siembra las placas se dejaron en incubación durante 24h. Al término de este tiempo se agregó medio de cultivo con las diferentes muestras a concentraciones de 2 y 1g/l. Una vez expuestas las células al tratamiento se dejaron en incubación durante 72h al término de las cuales se determino la proliferación celular empleando la técnica de azul de tetrazolium (MTT). Como controles se utilizaron medio sin tratamiento y una muestra de pectina modificada comercial (MCP).

Para la determinación de la proliferación celular se aspiró el medio de cultivo, se lavo la placa con 100µl de PBS estéril y se colocó el reactivo MTT mezclado con medio de cultivo a una relación 1:20. Se dejó reaccionar durante 3 h en incubación a 37°C con una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo con el MTT y a cada pocillo se le aplicaron 100µl de dimetil sulfóxido (DMSO). La placa se agitó durante 15min para la disolución de los cristales de la sal de tetrazolium y se midió la

absorbancia con un lector de placa a 570 nm. Se realizaron dos ensayos independientes con 6 replicas de cada tratamiento para cada línea celular.

Resultados parámetros Físico-químicos

- 5 En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran los parámetros físico-químicos de los distintos productos.

| Muestras | pH | °Brix | % Acidez | % Humedad |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| Pulpa Inicial | 2,5 ± 0,03 | 10,1 ± 0,1 | | 87,9 ± 0,5 |
| Pulpa Tratada | 4,4 ± 0,02 | 8,5 ± 0,1 | 1,5 ± 0,01 | 89,8 ± 1 |
| Extracto alcohólico | 4,4 ± 0,01 | 5,0 ± 0,0 | 1,9 ± 0,01 | |
| Pectina Cítrica Modificada | 4,5 ± 0,02 | 24,3 ± 0,4 | 0,8 ± 0,02 | 87,3 ± 0,4 |

| Muestras | % A. Galacturónico | % Metoxilo | % GE |
|-----------------------------------|--------------------|------------|--------|
| Pulpa Inicial | 8,4 ± 0,7 | 5,2 ± 0,6 | 32 ± 3 |
| Pulpa Tratada | 3,3 ± 0,1 | | |
| Extracto alcohólico | 1,0 ± 0,2 | 2,5 ± 0,7 | 15 ± 4 |
| Pectina Cítrica Modificada | 78,0 ± 2,4 | 5,5 ± 1,2 | 34 ± 7 |
| MCP | 77,3 ± 4 | | |

| Muestras | Valor TEAC | | Flavonoides |
|-----------------------------------|------------|----------|-----------------|
| | Agua | MeOH | (% Hesperidina) |
| Pulpa Inicial | 24 ± 0,3 | 14 ± 0,9 | 0,88 ± 0,03 |
| Pulpa Tratada | 14,5 ± 0,4 | 10 ± 1 | 0,25 ± 0,01 |
| Extracto alcohólico | 11,4 ± 0,2 | 10 ± 2 | 0,17 ± 0,0 |
| Pectina Cítrica Modificada | 5,2 ± 2 | 5,2 ± 1 | 0,25 ± 0,01 |

Tabla 4

Resultados de Inhibición de proliferación celular

Para la línea de cáncer de colon HT29 la mayor inhibición de la proliferación celular se obtuvo con la muestra de Pulpa Inicial a 2 g/l de concentración. Para la muestra de pectina modificada empleada como referencia se obtuvo una inhibición de la

proliferación celular similar a 1 g/l de concentración. Esto se ilustra en la gráfica que se muestra en la figura 1.

Sin embargo para la línea de cáncer de colon SW480 la mayor inhibición de la proliferación celular se obtuvo con la muestra de Pectina Cítrica Modificada a 2 g/l y MCP a 1 g/l de concentración. Esto se ilustra en la figura 2.

Para la línea celular JIMT1 la mayor inhibición de la proliferación celular se obtuvo para la muestra de MCP a 1 y 2 g/l de concentración a una densidad de 15000 células por pocillo. Para la muestra de Pectina Cítrica Modificada también se obtuvo una leve disminución de la viabilidad celular con respecto al control a las dos concentraciones empleadas. Se ilustra en la figura 3.

Para la línea celular INS1 la mayor inhibición de la proliferación celular se obtuvo para la muestra de Extracto Isopropanol a 2 g/l de concentración logrando una inhibición del 70% de la viabilidad de las células tumorales de páncreas de ratón, tal y como ilustra la figura 4.

Para la línea celular B16/F10 la mayor inhibición de la proliferación celular se obtuvo para la muestra de Pectina Cítrica Modificada a 2 g/l de concentración logrando una inhibición del 30 % de la viabilidad de las células tumorales de melanocitos malignos de ratón, según se ilustra en la figura 5.

Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Inhibición de la proliferación para una línea celular tumoral de colon HT29

Figura 2. Inhibición de la proliferación para una línea celular tumoral de colon SW480

Figura 3. Inhibición de la proliferación para una línea celular tumoral de cáncer de mama (JIMT1)

Figura 4. Inhibición de la proliferación para una línea celular tumoral de páncreas de ratón (INS 1)

Figura 5. Inhibición de la proliferación para una línea celular B16/F10 l derivada de melanocitos malignos de ratón

Figura 6. Influencia del tiempo tratamiento enzimático sobre la viscosidad específica.

Figura 7. Influencia del tiempo de tratamiento sobre los valores de viscosidad intrínseca (A) y su relación con el peso molecular medio del producto final (B).

Figura 8. Esquema del método de preparación de pectina modificada de cítricos.

Explicación de los símbolos del esquema:

PL.- Pulpa de limón (1 kg FW / 120 g DW)

- 10 1.- Adición 1 L H₂O destilada con 7% Citrato de sodio 1:1 p/v 50 °C
- 2.- Tratamiento Enzimático 1. Celulasa 500 ppm. Agitación 30 min 50°C
- 3.- Tratamiento Enzimático 2. Pectinesterasa 200 ppm Agitación 30 min 50°C
- 4.- Inactivación enzimática. 85 °C 2 min
- 5.- Extracción con Isopropanol 2 L
- 15 6.- Filtración. Papel de filtro
- SD.- Sólido.
- LQ.- Líquido AOX
- SD 8.- Secado. Estufa de vacío a 1 bar a 45°C.
- LQ 8.- Evaporación al vacío
- 20 LQ 9.- Secado por nebulización

Modos de realización preferente de la invención

Ejemplo 1: PREPARACIÓN DE LA PECTINA MODIFICADA DE CÍTRICOS Y DEL
25 EXTRACTO ALCOHÓLICO.

Se parte de 1 Kg de pulpa de limón procedente de la centrifugación de zumo de limón pasado por finisher.

A continuación se mezcla con 1 Kg de agua destilada precalentada a 50°C en un vaso de
30 precipitados de vidrio de 5 L situado sobre una placa calefactora. La mezcla se mantiene en agitación hasta alcanzar los 50 °C.

Posteriormente, se realiza un primer tratamiento enzimático mediante el cual se adicionan 500 mg de enzima Celulasa A y se mantiene en agitación a 50 °C durante 30 minutos.

Tras este proceso, se realiza un segundo tratamiento enzimático en el cual se añaden 174 μ l (200 mg) de enzima Pectinasa A con actividad pectinesterasa y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a 50 °C.

- Una vez finalizado el tratamiento enzimático, se desactivan las enzimas mediante un
- 5 tratamiento térmico a 85° C durante 2 minutos y se deja enfriar hasta 30 °C.

A la mezcla obtenida se le adicionan 2 L de isopropanol (densidad = 0,78 g/ml que equivale a 1,56 kg) y se mantiene en agitación durante 25 minutos a temperatura ambiente.

Al finalizar el proceso de extracción, se separan la parte sólida y la líquida mediante filtración por papel.

- 10 El sólido obtenido se pesa y se seca en una estufa de vacío. Posteriormente el líquido se evapora al vacío hasta la completa eliminación del isopropanol, se ajustan los grados brix hasta 10 con agua destilada y se seca mediante secado por nebulización, obteniéndose el extracto alcohólico.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la obtención de Pectina Modificada de Cítricos y de extracto
5 alcohólico **caracterizado por**:
- Utilizar subproductos derivados de la producción de zumos cítricos, como piel o pulpa.
 - Adición de agua en relación 1:1 (p/v) con un 5-10 % de citrato de sodio para aumentar el pH, a una temperatura entre 40-50°C.
 - 10 • Tratamiento enzimático con celulasa manteniendo el producto en agitación entre 40-50°C durante 30 minutos.
 - Tratamiento enzimático con pectinesterasa manteniendo en agitación a 40-50°C durante 30 minutos.
 - La inactivación enzimática mediante un tratamiento térmico a 90 °C durante 1-5
15 minutos y posterior enfriamiento hasta 25-30°C.
 - La adición posterior de un alcohol monohidroxílico en agitación durante 25 minutos a temperatura ambiente.
 - Se separara la parte sólida y la líquida mediante filtración.
 - El sólido obtenido se seca en una estufa de vacío. Esta es la Pectina Cítrica
20 Modificada.
 - El líquido se evapora al vacío hasta la completa eliminación del alcohol, se ajustan los grados brix hasta 10 con agua destilada y se seca mediante secado por nebulización. Esto es el Extracto Alcohólico.
- 25 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caraterizado porque** el subproducto derivado puede proceder de la pulpa procedente de las centrifugas de tratamiento del zumo cítrico.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el alcohol monohidroxílico utilizado es un alcohol de bajo peso molecular.
- 30 4.- Preparación a base de Pectina Modificada de Cítricos obtenido mediante el procedimiento descrito en la reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por** tener un peso molecular 12 KDa y 11 KDa, que corresponde al rango 10-20 KDa, color entre gris y

blanco, un porcentaje de pectina entre el 65 y el 91%, acidez entre el 0.6-1,0% (como ácido cítrico), unos grados Brix de 20°-25°, y un 0,1-0,3% de flavonoides.

5 5.- Preparación a base de extracto alcohólico seco obtenido mediante el procedimiento descrito en la reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por** tener un 0,6-1,5% de ácido monogalacturónico, una acidez entre el 1,3-2,5% (como ácido cítrico), unos grados Brix de 3,0°-6,0°, y un 0,10-0,20 % de flavonoides.

10 6.- Preparación a base del extracto obtenido según las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizada por** ser usada en la elaboración de un producto útil y eficaz para el tratamiento contra los cánceres de mama, colon y páncreas, y melanomas.

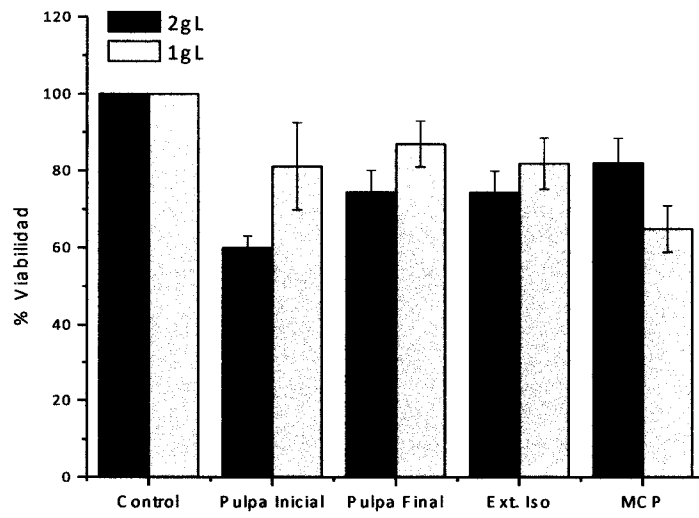


Figura 1

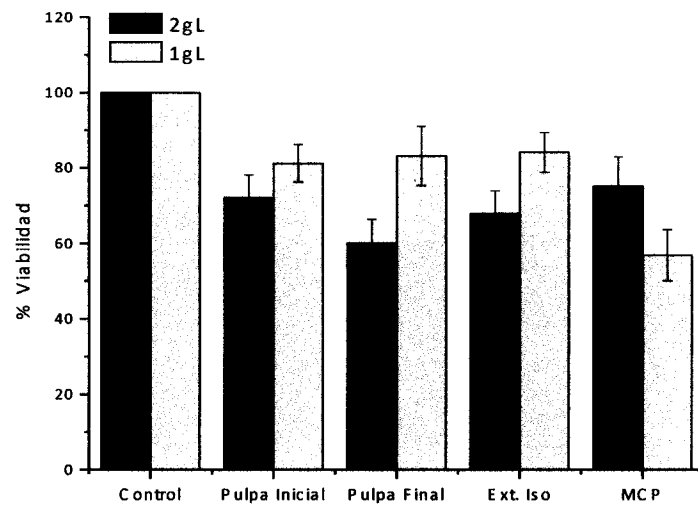


Figura 2

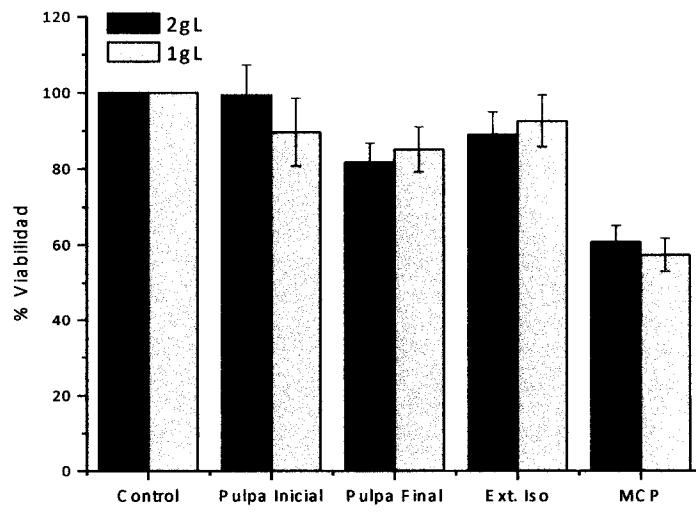


Figura 3

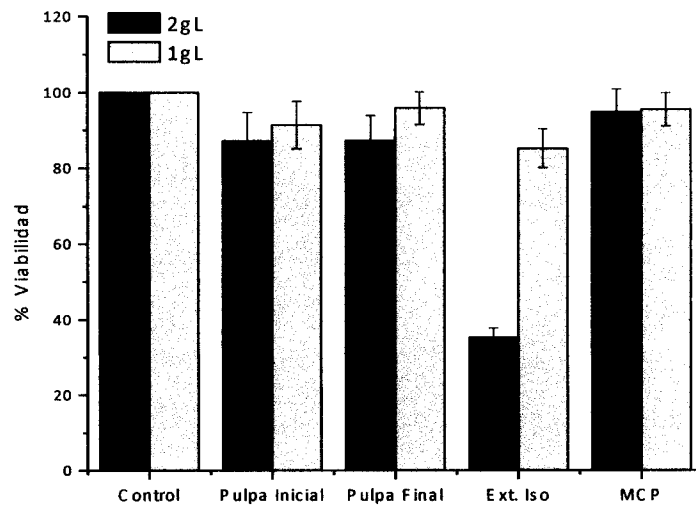


Figura 4

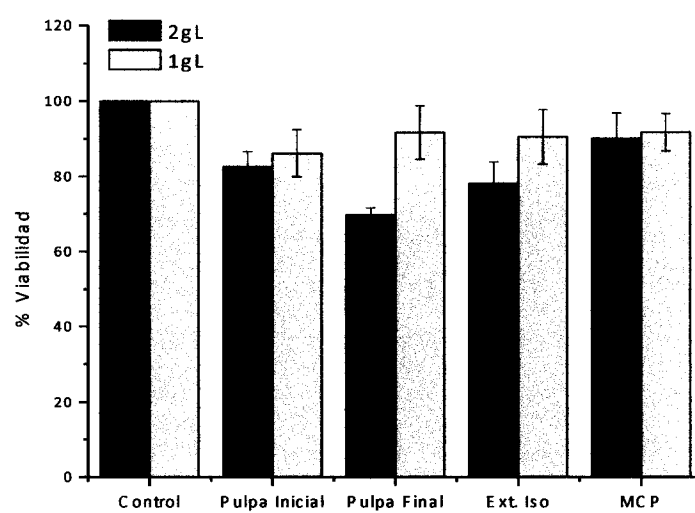


Figura 5

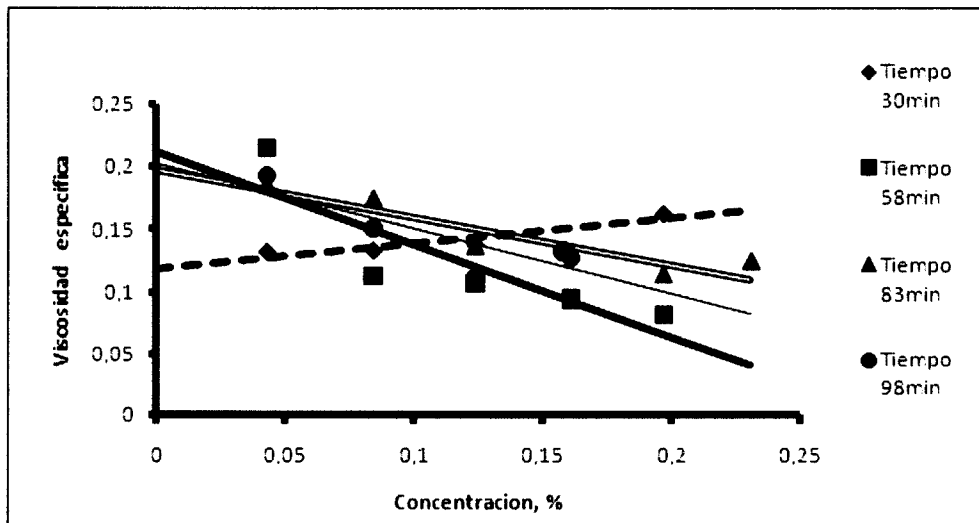


Figura 6.

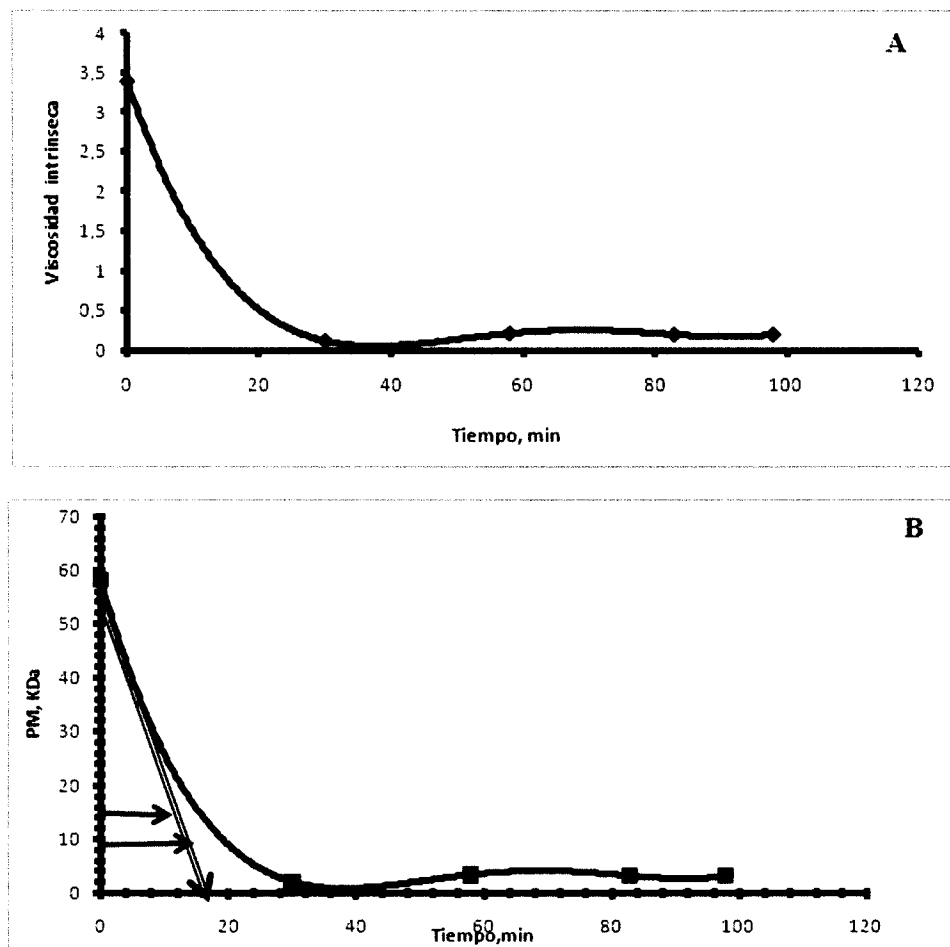


Figura 7.

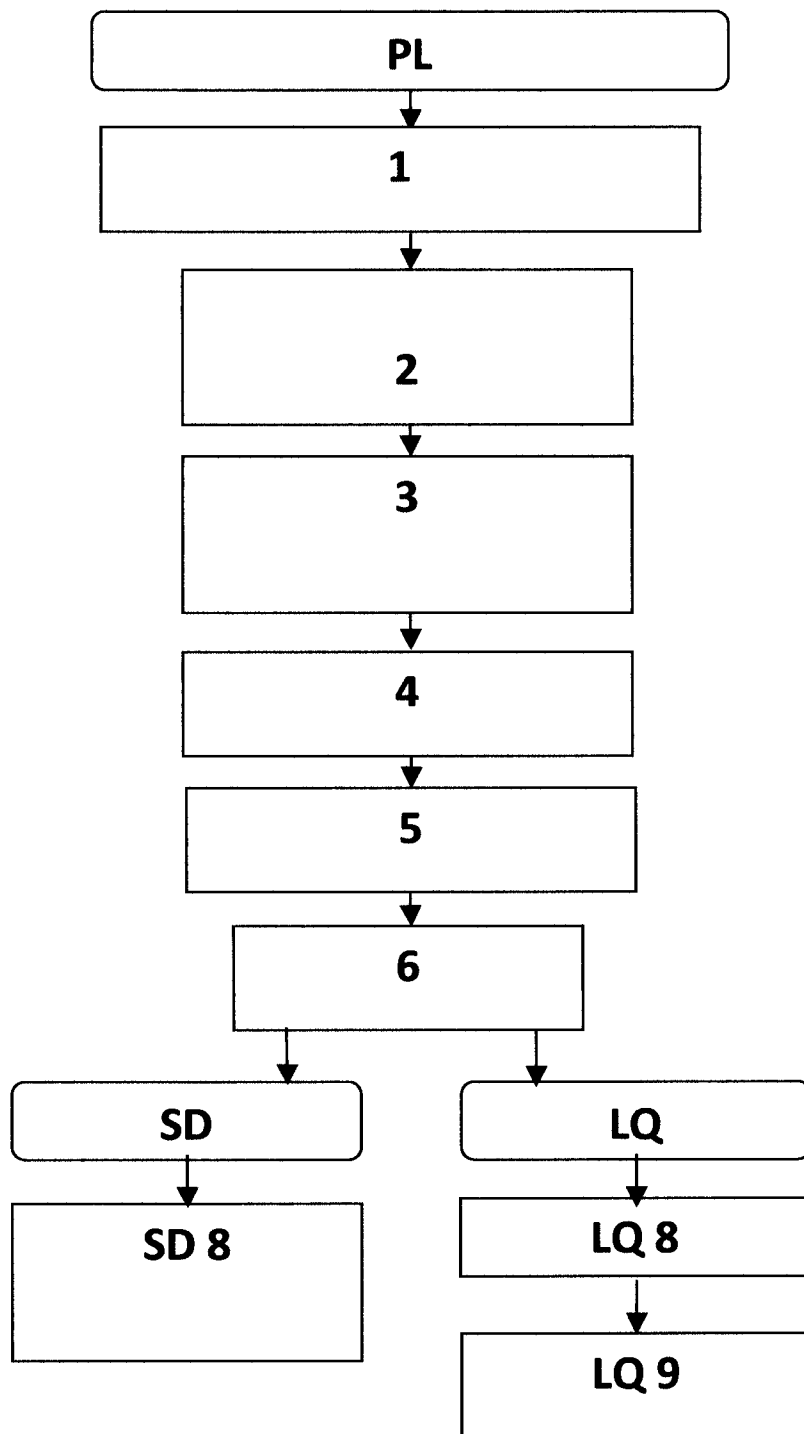


Figura 8



- ②① N.º solicitud: 201301183
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.12.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | MORRIS VICTOR J et al.: "Using AFM and force spectroscopy to determine pectin structure and (bio) functionality." Food Hydrocolloids MAR 2011 (03.2011) VOL: 25 No: 2 Págs: 230-237 ISSN 0268-005X(print) ISSN 1873-7137(electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodhyd.2009.11.015. | 6 |
| X | Newswise [online]: "New Research: Modified Citrus Pectin - A Potent Anti-Cancer Therapy " (20-Jun-2013) [Recuperado el 18.05.2015]. Recuperado de Internet: http://www.newswise.com/articles/new-research-modified-citrus-pectin-a-potent-anti-cancer-therapy | 6 |
| A | WO 2006096884 A2 (CARGILL INC et al.) 14.09.2006, todo el documento. | 1-6 |
| A | WO 2008011086 A1 (SOJITZ CORP et al.) 24.01.2008, todo el documento. | 1-6 |
| A | JP 2010166857 A (OJI PAPER CO) 05.08.2010, (resumen) BASE DE DATOS EPODOC [en línea], Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 19.05.2015]. | 1-6 |
| A | RU 2095372 C1 (VSEROSSIJSKIJ NII KONSERVNOJ I) 10.11.1997, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 19.05.2015]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 199826, N° DE ACCESO 1998-295813. | 1-6 |
| A | RU 2262865 C1 (ZELENE LINII STOCK CO) 27.10.2005, (resumen) BASE DE DATOS EPODOC [en línea], Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 19.05.2015]. | 1-6 |
| A | JP S63273492 A (JAPAN STEEL WORKS LTD) 10.11.1988, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 19.05.2015]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 198851, N° DE ACCESO 1988-363990. | 1-6 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.05.2015

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08B37/06 (2006.01)**C08L5/06** (2006.01)**C12P1/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08B, C08L, C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.05.2015

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-6
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-5
Reivindicaciones 6

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | MORRIS VICTOR J et al. Using AFM and force spectroscopy to determine pectin structure and (bio) functionality. Food Hydrocolloids MAR 2011 (03.2011) VOL: 25 No: 2 Págs: 230-237 ISSN 0268-005X(print) ISSN 1873-7137(electronic) Doi: doi:10.1016/j.foodhyd.2009.11.015 | 28.02.2011 |
| D02 | Newswise [online]: "New Research: Modified Citrus Pectin - A Potent Anti-Cancer Therapy " (20-Jun-2013) [Recuperado el 18.05.2015]. Recuperado de Internet: http://www.newswise.com/articles/new-research-modified-citrus-pectin-a-potent-anti-cancer-therapy | |
| D03 | WO 2006096884 A2 (CARGILL INC et al.) | 14.09.2006 |
| D04 | WO 2008011086 A1 (SOJITZ CORP et al.) | 24.01.2008 |
| D05 | JP 2010166857 A (OJI PAPER CO) | 05.08.2010 |
| D06 | RU 2095372 C1 (VSEROSSIJSKIJ NII KONSERVNOJ I) | 10.11.1997 |
| D07 | RU 2262865 C1 (ZELENE LINII STOCK CO) | 27.10.2005 |
| D08 | JP S63273492 A (JAPAN STEEL WORKS LTD) | 10.11.1988 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un procedimiento para la obtención de pectina modificada de cítricos (PMC) y un extracto alcohólico seco obtenido como subproducto de dicho procedimiento. La solicitud reivindica también preparaciones que contienen estos dos productos en su composición, así como el uso de dichas preparaciones en la elaboración de un producto para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

El procedimiento de obtención de la PMC incluye como etapas más significativas dos de tratamiento secuencial con dos enzimas, una celulasa y una pectinesterasa. Según los ejemplos, se trata de la celulasa A y de la pectinasa A respectivamente. Posteriormente hay una adición de un alcohol monohidroxílico y una separación de dos fases una sólida (pectina modificada) y otra líquida (extracto alcohólico)

D01-D08 representan el estado de la técnica anterior. De ellos, D03-D08 se refieren a procedimientos de obtención de pectina, mientras que D01 y D02 revelan el uso de la pectina modificada de cítricos contra diversos tipos de cáncer.

No se ha encontrado ningún procedimiento en el estado de la técnica anterior que incluya todas y cada una de las etapas del procedimiento reivindicado (reiv. 1-3). Por otro lado, se considera a partir de lo revelado en D03-D08, que un experto en la materia no llegaría de forma obvia al procedimiento reivindicado en la solicitud. Lo mismo se puede aplicar a las preparaciones reivindicadas (reiv. 4 y 5).

En cuanto a la reivindicación 6 y, en lo que respecta al uso (única y exclusivamente) de la preparación que contiene PMC, se estima que las diferencias entre la PMC empleada en D01 y D02 y la reivindicada en la invención no son tales que impliquen un esfuerzo inventivo en el caso de la invención, pues no se describe ningún efecto sorprendente y/o inesperado, a la vista del estado de la técnica anterior.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-6 de la solicitud cumplen el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986, y las reivindicaciones 1-5 el de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986, pero no la reivindicación 6.