

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 955 495**

21 Número de solicitud: 202230376

51 Int. Cl.:

**C07C 37/82** (2006.01)  
**B01D 15/26** (2006.01)  
**B01D 15/38** (2006.01)  
**B01D 61/00** (2006.01)  
**C12Q 1/30** (2006.01)  
**C12Q 1/26** (2006.01)  
**C08F 230/06** (2006.01)  
**B01D 67/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**26.04.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**01.12.2023**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**09.01.2024**

Fecha de concesión:

**10.05.2024**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**20.05.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE BURGOS (67.0%)**  
**Hospital del Rey s/n**  
**09001 Burgos (Burgos) ES y**  
**UNIVERSIDAD DE COIMBRA (33.0%)**

72 Inventor/es:

**GUIRADO MORENO, José Carlos;**  
**GARCÍA PÉREZ, José Miguel;**  
**VALLEJOS CALZADA, Saúl;**  
**GONZÁLEZ CEBALLOS, Lara;**  
**SANCHO ORTIZ, María Teresa;**  
**FERNÁNDEZ MUIÑO, Miguel Angel;**  
**OSÉS GÓMEZ, Sandra María;**  
**UTZERI, Gianluca y**  
**VALENTE, Artur**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

54 Título: **EXTRACCIÓN O SEPARACIÓN SELECTIVA DE FENOLES CON POLÍMEROS QUE  
COMPRENDEN GRUPOS BORÓNICOS**

57 Resumen:

Extracción o separación selectiva de fenoles con polímeros que comprenden grupos borónicos. Se describe el uso de polímeros que comprenden grupos funcionales de ácido borónico en métodos para la extracción o separación de moléculas que contienen grupos diol aromáticos, es decir, grupos 1,2-dihidroxifenilo o grupos 1,2-dihidroxiarilo, de manera selectiva en composiciones o mezclas en las que se encuentran presentes también otras moléculas con grupos diol no aromáticos. También se describen métodos de determinación de la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de una composición o mezcla que comprende compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo y también sacáridos.

ES 2 955 495 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### EXTRACCIÓN O SEPARACIÓN SELECTIVA DE FENOLES CON POLÍMEROS QUE COMPRENDEN GRUPOS BORÓNICOS

#### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención se engloba en el campo de la química y se relaciona, de manera más en particular, con los campos de la química analítica y con el sector de la industria alimentaria. En concreto, la presente invención describe el uso de polímeros que comprenden grupos funcionales de ácido borónico para la extracción o separación de compuestos que comprenden grupos diol aromáticos, es decir, compuestos que comprenden uno o más grupos  
10 1,2-dihidroxifenilo o grupos 1,2-dihidroxiarilo, de manera selectiva, en composiciones o mezclas en las que se encuentran presentes otras moléculas con grupos diol no aromáticos.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La determinación de la actividad de los enzimas catalasa y glucosa oxidasa es un procedimiento que se lleva a cabo a diario en laboratorios de la industria alimentaria.

La glucosa oxidasa pertenece a un grupo de enzimas denominado oxidorreductasas y cataliza la oxidación de la glucosa en presencia de oxígeno para formar D-glucono- $\delta$ -lactona y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Es un enzima producido por ciertas especies de microorganismos, hongos e insectos y es utilizado en las industrias farmacéutica y alimentaria, así como en celdas de  
20 biocombustible. De manera particular, su uso es importante en la industria alimentaria dado que se emplea en masas de pan y derivados, dado que, su capacidad oxidante, hace la masa más fuerte. Por otro lado, este enzima también se usa en productos alimentarios para mejorar el aroma, sabor y el periodo de conservación de los alimentos gracias a la eliminación de glucosa y oxígeno.

25 El enzima catalasa es un enzima perteneciente también al grupo de las oxidorreductasas, producido por diferentes organismos entre los que se encuentran hongos y levaduras y que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La catalasa se utiliza, sobre todo, con otros enzimas, en la industria alimentaria. A menudo, dicho enzima es utilizado junto con glucosa oxidasa para la conservación de alimentos para controlar la presencia de  
30 oxígeno y peróxidos y, por tanto, controlar la posible oxidación de dichos alimentos.

Por otro lado, la miel es un alimento en el que la determinación de la actividad de catalasa y glucosa oxidasa se realiza para determinar sus propiedades. La miel es un alimento dulce elaborado por las abejas, cuya composición incluye una variedad de compuestos entre los que

se encuentran azúcares reductores, ácidos orgánicos, minerales, vitaminas, aminoácidos, polifenoles, sustancias responsables del aroma y sabor, así como diferentes tipos de enzimas (diastapas, invertasa, glucosa oxidasa, catalasa y otras) [Bogdanov S. et al. ]. Además, la miel es un producto alimentario con actividad antibacteriana y antioxidante. Aunque los motivos no están completamente dilucidados, la actividad antibacteriana se correlaciona con muchos factores, entre los que se han citado el contenido en peróxido de hidrógeno y polifenoles, su bajo pH, su alta osmolaridad y componentes específicos como el metilglioxal y el péptido de la abeja defensiva-1. De manera general se considera que su actividad antioxidante se debe principalmente a la presencia de polifenoles, mientras que muchos autores consideran que el agente antibacteriano más relevante presente en la miel es el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ).

Las abejas añaden glucosa oxidasa al néctar recolectado durante la producción de la miel. Esta enzima se encarga de catalizar la descomposición de la glucosa presente en la miel en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Por otro lado, la catalasa, presente en el néctar, regula la actividad de la glucosa oxidasa, controlando la concentración de peróxido de hidrógeno, ya que cataliza su descomposición en oxígeno y agua. Así, la concentración de peróxido de hidrógeno, en la miel, viene determinada por la actividad de dos enzimas, la catalasa y la glucosa-oxidasa. La catalasa descompone el  $H_2O_2$  generando agua y oxígeno, mientras que la glucosa oxidasa lo genera en el proceso de oxidación de la glucosa.

El peróxido de hidrógeno es responsable de parte de la actividad antibacteriana de la miel, relacionándose asimismo con la conservación de alimentos. La determinación de la actividad de la glucosa oxidasa y catalasa (en relación al contenido de peróxido de hidrógeno), es un procedimiento importante en la industria procesadora de miel y en la industria productora de otros alimentos en los que dichas enzimas se añaden como ingredientes.

Por tanto, de manera general y extendida, la industria alimentaria está confrontada de manera habitual a la necesidad de determinar la actividad de dichos enzimas en alimentos.

La determinación de la actividad de la catalasa y glucosa oxidasa en alimentos se ha llevado a cabo mediante varios métodos. Los más antiguos se basan en la cuantificación de peróxido de hidrógeno. Diversos autores cuantificaron esta especie mediante valoración con permanganato de potasio, aunque también se desarrollaron valoraciones basadas en yoduro de potasio. Sin embargo, todos estos métodos no son válidos para determinar la actividad de la catalasa en matrices o mezclas, como la miel, debido a que ambos reactivos interfieren en el método de medida. También se han desarrollado metodologías basadas en la medida directa de la absorbancia del peróxido de hidrogeno. Sin embargo, al igual que con el permanganato de potasio y el yoduro de potasio, dichos métodos también se encuentran afectados por la existencia de interferencias con otras especies presentes en los alimentos y, en particular, en la miel.

Tal y como se describe en la escasa bibliografía acerca de este tema [Pal et al. (2014)], los principales interferentes a la hora de determinar la actividad de estas dos enzimas son los derivados desde el punto de vista químico del 1,2-dihidroxibenceno (o catecol), como por ejemplo la catequina, quercetina, el ácido gálico, y en definitiva cualquier molécula que contenga en su estructura uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo.

Por tanto, para la utilización efectiva de estos métodos de determinación de la actividad de la catalasa y glucosa oxidasa, es necesario separar, o extraer, previamente, dichas especies interferentes, que contienen en su estructura grupos 1,2-dihidroxifenilo.

En el caso de la determinación de actividad de la catalasa y glucosa oxidasa en la miel, Schepartz y Subers propusieron un paso adicional previo, que consiste en dializar la miel para eliminar estas especies interferentes (Schepartz, 1996; Schepartz & Subers, 1966). Este método fue revisado y optimizado en 2005, utilizando una membrana comercial para llevar a cabo dicho proceso de diálisis [Huidobro et al. (2005)]. Tras ese proceso de purificación o eliminación de interferentes (diálisis), la cantidad de  $H_2O_2$  de la muestra se puede caracterizar a través de espectrometría de ultravioleta visible, utilizando una reacción colorimétrica basada en *o*-dianisidina y peroxidasa. Este procedimiento resultó más específico y considerablemente más sensible, por lo que ha sido el procedimiento de referencia para la determinación de la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa en la miel hasta la actualidad.

Sin embargo, el paso de diálisis es muy laborioso y requiere tiempos de actuación elevados (más de 12 horas en muchos casos), por lo que existe la necesidad de desarrollar otras maneras de eliminar el efecto de dichas especies interferentes de una manera más rápida, pero de igual o mayor eficiencia y sensibilidad.

El ácido borónico es conocido por reaccionar con grupos 1,2- o 1,3-diol presentes en moléculas como la fructosa, glucosa, maltosa, catecol o el ácido gálico. De hecho, la utilización del ácido borónico y de materiales que comprenden grupos de ácido borónico, se ha utilizado, debido a esta reactividad, en aplicaciones tan diversas como la producción de papel, sensores de glucosa (diabetes, medicamentos con sacáridos), sensores de dopamina, entre otros.

Sin embargo, en las matrices o mezclas alimentarias, como frutas, hortalizas, cacao, café, té, miel, zumos, néctares, vinos, especias, cereales, mostos concentrados, agave, exudados vegetales, bebidas de extractos vegetales (frutas, hortalizas, infusiones, especias) o sus mezclas, coexisten muchos tipos de moléculas que contienen grupos 1,2- o 1,3-diol que pueden unirse al ácido borónico. Es decir, en estos alimentos coexisten moléculas con grupos 1,2-dihidroxifenilo (moléculas aromáticas con grupos diol), con muchos otros tipos de moléculas

con grupos diol no aromáticos, tales como azúcares o hidratos de carbono, por lo que, la separación selectiva de un cierto tipo de estas moléculas es, a menudo, complejo.

Así, existe la necesidad de proporcionar materiales y métodos para eliminar las interferencias de las moléculas aromáticas de tipo fenólico, que comprenden grupos 1,2-dihidroxifenilo en los ensayos de actividad de la catalasa y la glucosa oxidasa que se efectúan de manera habitual en la industria alimentaria.

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere al uso de un copolímero de fórmula (I) para la extracción selectiva de compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo presentes en una composición o mezcla que comprende también sacáridos;

en el que dicho copolímero de fórmula (I) comprende:

- al menos una primera unidad monomérica que contiene al menos un grupo de fórmula (II):



en el que  $R_1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  cicloalquilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  heterocicloalquilo y un grupo  $C_1-C_{12}$  alquilo; y

- 20 - al menos una segunda unidad monomérica que contiene un grupo catiónico; y
- al menos una tercera unidad monomérica con un grupo hidroxilo;

y en el que la proporción de las unidades monoméricas que contienen dicho grupo de fórmula (II) en dicho copolímero de fórmula (I) representa al menos 0,1% (p/p) del número total de unidades monoméricas.

25 A efectos de la presente invención, el término "comprende" o "contiene" puede ser reemplazado por cualquiera de los términos "consiste en" o "consisten sustancialmente en". Así, cuando el término "comprende" se refiere a un grupo de características técnicas A, B y C, debe interpretarse que puede incluir adicionalmente otras características técnicas además de las características técnicas A, B y C, siempre y cuando la presencia de las otras

30 características no haga la invención impracticable, pero también puede interpretarse como que solamente comprende dichas características A, B y C o que comprende sustancialmente dichas características A, B y C.

Un grupo alquilo, a efectos de la presente invención, es una cadena hidrocarbonada alifática saturada. A efectos de la presente invención el término “arilo” se refiere a un grupo que puede comprender uno o más anillos aromáticos hidrocarbonados sustituidos o no sustituidos con otros grupos funcionales. A efectos de la presente invención el término “heteroarilo” se refiere a un grupo que puede comprender uno o más anillos aromáticos que comprenden uno o más heteroátomos.

El término polímero se refiere a una molécula que comprende una o más unidades monoméricas, o monómeros, que se repiten sucesivamente. A efectos de la presente invención los términos monómeros y unidades monoméricas se usan indistintamente. Los polímeros se obtienen por la unión repetitiva de unidades monoméricas mediante reacción de grupos reactivos (o grupos polimerizables) presentes en cada una de las unidades monoméricas, en un proceso denominado polimerización. Dicha polimerización se realiza por unión o reacción directa entre monómeros o unidades monoméricas, donde dichos monómeros o unidades monoméricas comprenden grupos polimerizables responsables de la reacción de polimerización que da lugar al copolímero de fórmula (I) descrito en el presente documento.

En una realización preferente de la invención, la polimerización de dichos monómeros se lleva a cabo en disolución o en bloque. En una realización preferente el copolímero de fórmula (I) se obtiene en presencia de un iniciador térmico o fotoquímico. A efectos de la presente invención se denomina polimerización en bloque, o polimerización en masa, a la técnica de polimerización en la cual solamente los monómeros y el iniciador están presentes en el medio de reacción. En el caso de que la polimerización se realice por iniciación térmica sin necesidad de iniciador, solamente están presentes los monómeros en el medio de reacción.

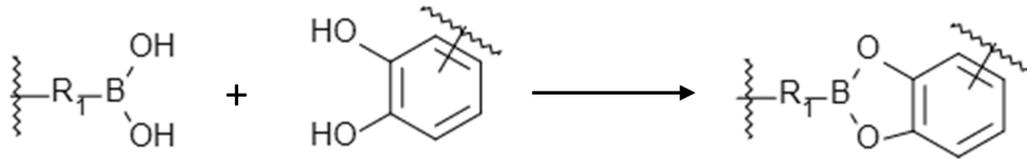
A efectos de la presente invención se denomina polimerización en disolución a la técnica de polimerización en la cual además de los monómeros y del iniciador, se emplea un disolvente.

A efectos de la presente invención el término “unidad monomérica” se refiere a las unidades estructurales que se repiten en un polímero y que resultan de la polimerización de monómeros. Así, por ejemplo, una unidad monomérica de metacrilato resulta de la polimerización de monómeros de metacrilato. Cuando un polímero contiene más de una unidad monomérica diferentes estructuralmente (es decir, cuando el polímero se obtiene por polimerización de más de un monómero diferente estructuralmente) se denomina copolímero, a efectos de la presente invención. Dichos copolímeros pueden ser lineales o reticulados. Se denomina copolímero reticulado, un copolímero que forma una red formada por la unión de diferentes cadenas poliméricas. La formación de dicha red a partir de diferentes cadenas poliméricas se

denomina reticulación y los monómeros responsables de la unión de las diferentes cadenas poliméricas, para formar dicha red, se denominan monómeros entrecruzantes o reticulantes.

Así, los copolímeros de fórmula (I) de la presente invención se obtienen por polimerización de al menos tres tipos de monómeros:

- 5 - un primer tipo de monómero que comprende grupos de ácido borónico de fórmula (II), en donde dichos grupos de fórmula (II) permiten la unión de los copolímeros de fórmula (I) a grupos diol (di-hidroxi) de los compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo, de acuerdo con la siguiente reacción de condensación, para dar lugar a un éster borónico:



10

*(esta reacción de condensación puede darse tanto a pH básico como pH ácido)*

- un segundo tipo de monómero que contiene un grupo catiónico; y
- un tercer tipo de monómero que contiene un grupo hidroxilo.

Por tanto, a efectos de la presente invención, el término “copolímero de fórmula (I)” se refiere a un copolímero que se obtiene por polimerización de dichos 3 tipos de monómeros (monómeros con grupos ácido borónico de fórmula (II), monómeros con grupo catiónico y monómeros con grupo hidroxilo). Dado que, dicha reacción de polimerización puede dar lugar a copolímeros en los que las unidades monoméricas se encuentran en un orden o disposición diferente, la presente descripción no incluye una representación gráfica de la fórmula general de dichos copolímeros de fórmula (I), aunque, por ejemplo, la figura 3 de la presente descripción proporciona una representación no limitante de una realización particular de dichos copolímeros.

Así, los monómeros que comprenden grupos de ácido borónico permiten que los copolímeros de fórmula (I) obtenidos, sean capaces de unirse a los grupos 1,2 diol presentes en moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo.

Ejemplos no limitantes de moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo (es decir, dos grupos hidroxilo en posición orto en un grupo fenilo o benceno) son: catecol, ácido gálico, catequina, quercetina, hidroxitirosol, pirogalol, miricetina, tanino o ácido elágico, entre otros. De manera general dichas moléculas o compuestos que comprenden uno o más grupos

1,2-dihidroxifenilo se denominan de manera común polifenoles (por contener más de un grupo fenol o hidroxibenceno) o catecoles (por contener la unidad 1,2-hidroxifenilo o catecol).

Por otra parte, la estructura específica de los copolímeros de fórmula (I) de la presente invención les proporciona, además, una excelente selectividad de unión a compuestos o moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo, frente a otro tipo de moléculas con grupos 1,2- o 1,3-diol, en comparación a otros copolímeros conocidos que contienen grupos de ácido borónico. En particular, la inclusión de monómeros con grupos hidroxilos libres (es decir, dichos grupos hidroxilo no representan los grupos polimerizables del monómero), junto con monómeros que contienen un grupo catiónico, produce una selectividad significativamente mejorada para dichas moléculas con grupos 1,2-dihidroxifenilo.

Así, tal como se puede comprobar en los ejemplos descritos en el presente documentos, solamente copolímeros que presentan una estructura como la definida en la fórmula (I) son capaces de unirse de manera selectiva a las moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo. En particular, el ejemplo 6 muestra que la presencia de grupos ácido borónico en un polímero no es, per se, suficiente para obtener una unión efectiva del polímero a moléculas con grupos 1,2-hidroxifenilo como la quercetina, sino que, para una separación selectiva de este tipo de moléculas que comprenden grupos 1,2-dihidroxifenilo, es necesario que el polímero presente, además de unidades monoméricas con grupos ácido borónico, unidades monoméricas con grupos catiónicos y unidades monoméricas con grupos hidroxilo libres, tales como las que presentan los copolímeros de fórmula (I) descritos en la presente invención.

En una realización ventajosa, el copolímero de fórmula (I) comprende entre 30% a 50% (p/p) de unidades monoméricas que contienen un grupo catiónico, entre 30% a 50% (p/p) de unidades monoméricas que contienen un grupo hidroxilo y entre 0,1% a 10% (p/p) de unidades monoméricas que comprenden los grupos reactivos de fórmula (II) respecto al peso total.

Ventajosamente, la proporción de unidades monoméricas que comprenden los grupos reactivos de fórmula (II) con ácido borónico en los copolímeros de fórmula (I) descritos en el presente documento, asegura la unión a los compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo de la composición o mezcla y, preferentemente, representa entre 0,1% a 10% (p/p) respecto al peso total, más preferentemente entre 3% y 8% (p/p) del total de unidades monoméricas y aún más preferentemente 5% (p/p), respecto al peso total.

Además, tal como se pone de manifiesto en las diferentes realizaciones preferentes de los copolímeros de fórmula (I) descritos en el presente documento, gracias a la variabilidad de monómeros con los que se pueden obtener, los copolímeros de fórmula (I) descritos en la

presente invención pueden presentar diferentes formatos. Ventajosamente, dichos copolímeros de fórmula (I) descritos en el presente documento pueden ser fabricados en forma de película o membrana densa, o pueden ser solubles en varios tipos de disolventes, o pueden ser utilizados en la fabricación de una gran variedad de artículos, o en la obtención de fibras, preferentemente fibras textiles, con las que se manufacturan dichos artículos, o en la obtención de pinturas o recubrimientos para recubrir dichos artículos.

Preferentemente, dichas membranas pueden ser membranas densas, o membranas porosas, en donde dichas membranas porosas son obtenidas mediante procesos de espumado químicos y/o físicos, llevados a cabo a partir de las membranas densas descritas previamente.

10 A efectos de la presente invención el término artículo se refiere a un objeto o dispositivo, inerte (no vivo). Preferentemente, dichos copolímeros de fórmula (I) descritos en la presente invención, son polímeros lineales y son solubles en un disolvente seleccionado de entre el grupo que consiste en agua, un alcohol, *N,N*-dimetilformamida (DMF), *N*-metil-2-pirrolidona, dimetilsulfóxido (DMSO) y *N,N*-dimetilacetamida. Más preferentemente dichos copolímeros

15 con propiedades antisépticas descritos en la presente invención y/o, obtenibles de acuerdo con el método de la presente invención, son solubles en agua, metanol, isopropanol o etanol.

La capacidad que tienen los copolímeros de fórmula (I) descritos en el presente documento, para separar o extraer moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo de manera selectiva, es de particular importancia en aquellos usos particularmente sensibles a las interferencias con otras moléculas con grupos 1,2- o 1,3-diol. Este es el caso de las composiciones o mezclas que contienen también altos contenidos de sacáridos (como la glucosa o la fructosa), entre las que se encuentran muchos productos alimentarios, tales como frutas, hortalizas, cacao, café, té, miel, zumos, néctares, vinos, especias, cereales, mostos concentrados, agave, exudados vegetales, bebidas de extractos vegetales tales como frutas,

20 hortalizas, infusiones o especias; o una mezcla de los mismos.

La extracción o separación de moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo, de manera selectiva, en composiciones o mezclas alimentarias, como la miel, que comprenden sacáridos, es más compleja si se lleva a cabo por rutas convencionales, es decir, dializando la muestra de composición alimentaria con una membrana de diálisis,

30 utilizando una cantidad elevada de disolución tampón (p.ej. 1 litro de disolución tampón por cada 1.5 gramos de miel) y, consumiendo un tiempo total de alrededor de 24 horas. Dicho proceso convencional requiere de mucho tiempo y volumen de tampón, por lo que encarece mucho el proceso y lo hace poco interesante para aplicaciones industriales. Sin embargo, el método descrito en la presente invención hace uso de un copolímero de fórmula (I), que se

35 puede obtener de forma sencilla y económica, y permite llevar a cabo dicha extracción de

moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo, de forma efectiva en un tiempo mucho menor (1-2 horas) y con un consumo de disolución tampón muy reducido (p.ej. 1 mL de disolución tampón por cada 0,6 gramos de miel).

5 Por tanto, en una realización preferente de la invención, el uso de los copolímeros de fórmula (I) se aplica a cuando la composición o mezcla que comprende también sacáridos es un producto alimentario y, más preferentemente, cuando la composición o mezcla que comprende también sacáridos es un producto que se selecciona de entre el grupo que consiste en frutas, hortalizas, cacao, café, té, miel, zumos, néctares, vinos, especias, cereales, mostos concentrados, agave, exudados vegetales y bebidas de extractos vegetales (tales como frutas o hortalizas), de infusiones o de especias; o una mezcla de los mismos. En una 10 realización particularmente preferente de la invención la composición o mezcla que comprende también sacáridos, es miel. En una realización preferente dicha extracción selectiva de compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo se lleva a cabo en disolución acuosa tamponada a pH 7.

15 En todo caso, los copolímeros de fórmula (I) descritos en el presente documento, también pueden ser utilizados en otras matrices o mezclas, y en particular en otras matrices o mezclas alimentarias, para separar o extraer selectivamente moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo en presencia de otros sacáridos.

20 Tal como se ha indicado previamente en el presente documento, la estructura específica de los copolímeros de fórmula (I) de la presente invención les proporciona, además, una excelente selectividad de unión a compuestos o moléculas que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo, frente a otro tipo de moléculas con grupos 1,2- o 1,3-diol, en comparación a otros copolímeros conocidos que contienen grupos de ácido borónico.

25 Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de extracción selectiva de compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo presentes en una composición o mezcla que comprende también sacáridos, en el que dicho método comprende

(a.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

30 (a.ii) sumergir en la disolución obtenida en (a.i) una membrana que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I) descrito en el presente documento; y

(a.iii) extraer la membrana de la disolución después de al menos 1 hora;

o

(b.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

(b.ii) pintar o aplicar un recubrimiento a un artículo con una pintura o un recubrimiento que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I) descrito en el presente documento;

5 (b.ii) sumergir dicho artículo en la disolución de dicha composición o mezcla obtenida en (b.i); y

(b.iii) extraer el artículo de la disolución después de al menos 1 hora.

Además, la selectividad mejorada de los copolímeros de fórmula (I), descritos en el presente documento, para unirse a moléculas con uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo, frente a otro tipo de moléculas con grupos 1,2 o 1,3 diol, es de particular relevancia para procedimientos de  
10 determinación de la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa en matrices o productos alimentarios y, en concreto, en la miel.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de determinación de la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de una composición o mezcla que  
15 comprende compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo y también sacáridos, en el que dicho método comprende:

(a.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente o mezcla de disolventes para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

20 (a.ii) sumergir en la disolución obtenida en (a.i) una membrana que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I) descrito en el presente documento;

(a.iii) extraer la membrana de la disolución después de al menos 1 hora; y

(a.iv) determinar la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de la disolución;

o

25 (b.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente o mezcla de disolventes para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

(b.ii) pintar o aplicar un recubrimiento a un artículo con una pintura o un recubrimiento que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I) descrito en el presente documento;

(b.ii) sumergir dicho artículo en la disolución de dicha composición o mezcla obtenida en (b.i);

(b.iii) extraer el artículo de la disolución después de al menos 1 hora; y

30 (b.iv) determinar la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de la disolución;

o

(c.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente o mezcla de disolventes para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

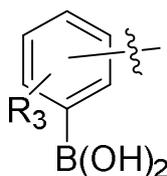
5 (c.ii) disolver en la disolución obtenida en el paso (c.i) un copolímero de fórmula (I) descrito en el presente documento; y

(c.iii) determinar la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de la disolución después de al menos 1 hora desde la disolución de dicho copolímero de fórmula (I).

Tal como se ha indicado anteriormente, la determinación de la actividad de la catalasa y glucosa oxidasa en alimentos se lleva a cabo mediante métodos que miden la presencia de peróxido de hidrógeno (por ejemplo, medida por absorbancia de peróxido de hidrógeno). Sin embargo, en la actualidad, dichos métodos utilizan a menudo, un paso previo para la separación o extracción previa de especies interferentes que contienen en su estructura grupos 1,2-dihidroxifenilo (diálisis de la miel, por ejemplo) que implican tiempos de actuación demasiado elevados, de más de 12 horas. En contraste, tal como se muestra en los ejemplos descritos en el presente documento, los polímeros de fórmula (I) descritos en el presente documento pueden obtener resultados igualmente eficaces en dichos métodos de determinación de la actividad de la catalasa y glucosa oxidasa, utilizando un paso previo de extracción o separación de especies interferentes que contienen en su estructura grupos 1,2-dihidroxifenilo, mucho más corto, de entre 1 y 2 horas.

20 Por tanto, en la presente invención se describe una familia de copolímeros de fórmula (I) obtenibles por polimerización de tres tipos de monómeros: (1) monómeros que comprenden un grupo de ácido borónico de fórmula (II),  $-R_1-B(OH)_2$ , (2) monómeros que contienen un grupo catiónico y, (3) monómeros que contienen grupos hidroxilo. Por otro lado, dichos copolímeros de fórmula (I) pueden comprender, opcionalmente, otros monómeros comerciales o de síntesis, además de los tres tipos de monómeros mencionados.

De manera preferente  $R_1$  es un grupo fenilo opcionalmente sustituido y dichas unidades monoméricas que comprenden grupos reactivos de fórmula (II) tienen una fórmula (IIa):



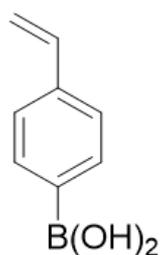
(IIa)

5 en donde cuatro de los carbonos del anillo fenólico se encuentran sustituidos con un resto  $R_3$  seleccionado cada uno de manera independiente de entre el grupo que consiste en H,  $C_1$ - $C_{12}$  alquilo, halógeno,  $C_3$ - $C_{12}$  cicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $-SO_2R_4$ ,  $-OR_4$ ,  $-C(O)R_4$ ,  $-NR_5R_6$ ,  $-C(O)NR_5R_6$  y  $-C(O)OR_5$ , en el que cada uno de los restos  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  se seleccionan de manera independiente de entre el grupo que consiste en H, y  $C_1$ - $C_{12}$  alquilo; o en el que dos de dichos restos  $R_3$  se encuentran en carbonos fenólicos consecutivos y se encuentran unidos formando un grupo arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros.

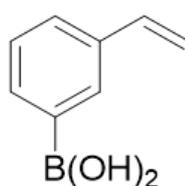
Aún más preferentemente, dichas unidades monoméricas que comprenden grupos reactivos de fórmula (II) tienen una fórmula (IIa), en donde  $R_3$  es H.

10 La presencia de grupos aromáticos de fórmula (IIa) permite, además, que los copolímeros de fórmula (I) de la presente invención tengan un color visible al ojo humano, con luz natural, por lo que la unión entre los copolímeros de fórmula (I) que comprenden unidades monoméricas con grupos de fórmula (IIa) y compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo es detectable por un cambio de color de dicho copolímero de fórmula (I) cuando  
15 éste se encuentra en forma de película o membrana densa, o mediante un cambio de color en la disolución cuando dicho copolímero de fórmula (I) se encuentra disuelto.

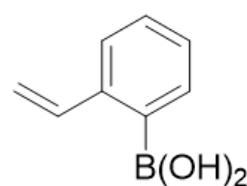
Más preferentemente, la al menos primera unidad monomérica que contiene al menos un grupo de fórmula (II) deriva, por polimerización, de un monómero vinílico seleccionado de entre el grupo que consiste en:



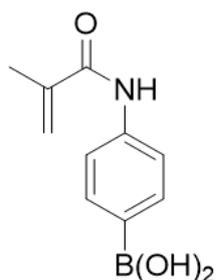
ácido 4-vinilfenilborónico



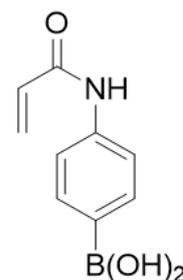
ácido 3-vinilfenilborónico



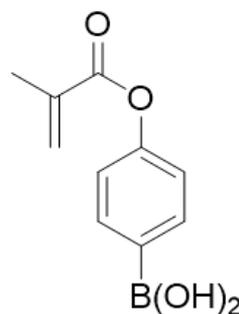
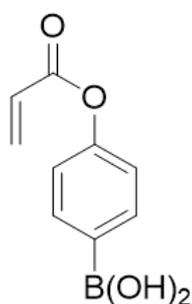
ácido 2-vinilfenilborónico



ácido (4-metacrilamidofenil)borónico



ácido (4-acrilamidofenil)borónico



ácido (4-(acrililoxi)fenil)borónico y, ácido (4-(metacrililoxi)fenil)borónico.

Aún más preferentemente dicha al menos primera unidad monomérica que contiene al menos un grupo de fórmula (II) deriva, por polimerización, de ácido 4-vinilfenilborónico.

- 5 La unidad monomérica que contiene un grupo catiónico y la unidad monomérica con un grupo hidroxilo pueden ser de estructura muy variada siempre y cuando dichas unidades monoméricas contengan, respectivamente, un grupo catiónico y un grupo hidroxilo. Así, la unidad monomérica que contiene un grupo catiónico y la unidad monomérica con un grupo hidroxilo pueden derivar por polimerización de monómeros comerciales o de monómeros de
- 10 síntesis.

En una realización preferente, la unidad monomérica que contiene un grupo catiónico deriva, por polimerización, de monómeros seleccionados de entre el grupo que consiste en monómeros vinílicos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, alcoholes, monosacáridos, óxidos de vinilo, diácidos carboxílicos, dicloruros de ácido, diésteres,

15 diaminas y monómeros que contienen silicio, en donde dichos monómeros contienen un grupo catiónico o son monómeros neutros que pueden protonarse formando un grupo catiónico antes o después de que se lleve a cabo la polimerización. Preferentemente, la formación del grupo catiónico se lleva a cabo después de la polimerización. En una realización preferente dicho grupo catiónico es una amina terciaria protonada o una amina cuaternaria y la unidad

20 monomérica que contiene un grupo catiónico deriva, por polimerización, de acrilatos que comprenden una amina terciaria o una amina cuaternaria, metacrilatos que comprenden una amina terciaria o una amina cuaternaria, acrilamidas que comprenden una amina terciaria o una amina cuaternaria, metacrilamidas que comprenden una amina terciaria o una amina cuaternaria o monómeros vinílicos que comprenden una amina terciaria o una amina

25 cuaternaria. Cuando el monómero comprende una amina terciaria, la protonación, o formación del grupo catiónico (catión amonio), se lleva a cabo antes o después de la polimerización. Preferentemente, la formación del grupo catiónico se lleva a cabo después de la polimerización. De entre las sales aceptables para uso de acuerdo con la presente invención, se incluyen sales de un ácido inorgánico, preferentemente un hidrocloruro, hidrobromuro,

sulfato o fosfato; y sales de un ácido orgánico, preferentemente un citrato, oxalato, salicilato, benzoato, acetato, fumarato o maleato.

Más preferentemente, la unidad monomérica que contiene un grupo catiónico deriva, por polimerización, de monómeros que contienen una amina terciaria, seleccionados de entre el grupo que consiste en metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo, 2-(dimetilamino) etil metacrilamida, acrilato de 2-(dimetilamino) etilo, 2-(dimetilamino) etil acrilamida, metacrilato de 3-(dimetilamino) propilo, 3-(dimetilamino) propil metacrilamida, acrilato de 3-(dimetilamino) propilo, 3-(dimetilamino) propil acrilamida, *N,N*-dimetil-4-vinilanilina, *N,N*-dimetil-1-(4-viilfenil)metanamine, metacrilato de 4-(dimetilamino)fenilo, *N*-(4-(dimetilamino)fenil) metacrilamida, *N*-(4-((dimetilamino)metil)fenil)metacrilamida, metacrilato de 4-((dimetilamino)metil)fenilo, entre otros; o de monómeros que contienen una amina cuaternaria, seleccionados de entre el grupo que consiste en una sal de 2-(*N,N,N*-trimetil)etilamino metacrilato, 2-(*N,N,N*-trimetil)etilamino metacrilamida, 2-(*N,N,N*-trimetil)etilamino acrilato, 2-(*N,N,N*-trimetil)etilamino acrilamida, 3-(*N,N,N*-trimetil)propilamino metacrilato, 3-(*N,N,N*-trimetil)propilamino metacrilamida, 3-(*N,N,N*-trimetil)propilamino acrilato, 3-(*N,N,N*-trimetil)propilamino acrilamida y vinil bencil-*N,N,N*-trimetilamina, entre otros. Aún más preferentemente dicha sal es un hidrocloreuro,

En otra realización preferente, la unidad monomérica con un grupo hidroxilo deriva, por polimerización, de monómeros seleccionados de entre el grupo que consiste en monómeros vinílicos, acrilatos, metacrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, alcoholes, monosacáridos, óxidos de vinilo, diácidos carboxílicos, dicloruros de ácido, diésteres, diaminas y monómeros que contienen silicio, en donde dichos monómeros contienen un grupo hidroxilo. En una realización preferente dicha unidad monomérica con un grupo hidroxilo deriva, por polimerización, de acrilatos que comprenden un grupo alcohol, metacrilatos que comprenden un grupo alcohol, acrilamidas que comprenden un grupo alcohol, metacrilamidas que comprenden un grupo alcohol o monómeros vinílicos que comprenden un grupo alcohol. Más preferentemente, la unidad monomérica con un grupo hidroxilo deriva, por polimerización, de monómeros seleccionados de entre el grupo que consiste en acrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, acrilamida de 2-hidroxietilo, metacrilamida de 2-hidroxietilo,

A efectos de la presente invención, el término “monómeros que contienen silicio” se refiere a unidades monoméricas que comprenden uno o más átomos de silicio.

En una realización particularmente ventajosa dicho copolímero de fórmula (I) comprende unidades monoméricas derivadas, por polimerización, de ácido vinilfenilborónico, metacrilato de (2-dimetilamino) etilo, y acrilato de 2-hidroxietilo.

En otra realización particularmente ventajosa ácido 4-vinilfenilborónico, metacrilato de metilo, metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo y acrilato de 2-hidroxietilo.

Ventajosamente, los copolímeros descritos en la presente invención pueden ser fabricados en diferentes formatos, como películas o membrana densa. Así, dichos copolímeros de fórmula (I) se encuentran reticulados, preferentemente con monómeros seleccionados de entre el grupo que consiste en dimetacrilato de etilenglicol, dimetacrilato de dietilenglicol, dimetacrilato de trietilenglicol, dimetacrilato de tetraetilenglicol, dimetacrilato de polietilenglicol, dimetacrilato de propilenglicol, dimetacrilato de dipropilenglicol, dimetacrilato de tripropilenglicol, dimetacrilato de tetrapolietilenglicol, dimetacrilato de polipropilenglicol, 1,4-divinilbenceno.

En otra realización particularmente ventajosa dicho copolímero de fórmula (I) comprende unidades monoméricas derivadas, por polimerización, de ácido vinilfenilborónico, metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo, metacrilato de metilo y acrilato de 2-hidroxietilo y se encuentra reticulado con dimetacrilato de etilenglicol.

15

Para ayudar en la comprensión de la utilización y características del dispositivo de la invención, se describen, a continuación, figuras que acompañan los modos de realización preferentes de la invención y ejemplos descritos en el presente documento.

**FIG. 1.** Resultados conjuntos de la calorimetría de titulación isotérmica, en los que se muestra de forma gráfica el calor de reacción ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) frente a la fracción molar, considerando los efectos de la dilución y la disolución, dependiendo de la especie inyectada: 1,2-dihidroxibenceno (catecol), 1,3-dihidroxibenceno (resorcinol), 1,4-dihidroxibenceno (hidroquinona), D-fructosa, D-glucosa y D-maltosa.

**FIG. 2.** Resultados individuales de la calorimetría de titulación isotérmica, en los que se muestra de forma gráfica el calor de reacción ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ), considerando los efectos de la dilución y la disolución, frente a la fracción molar, dependiendo de la especie inyectada: (fig. 2a) 1,2-dihidroxibenceno (catecol), (fig. 2b) 1,3-dihidroxibenceno (resorcinol), (fig. 2c) 1,4-dihidroxibenceno (hidroquinona), (fig. 2d) D-fructosa, (fig. 2e) D-glucosa y (fig. 2f) D-maltosa. Las gráficas muestran la constante de reacción (K), el incremento de la entalpía ( $\Delta H$ ), el incremento de entropía ( $\Delta S$ ), y un indicativo de si los datos siguen una tendencia que se ajuste a una ecuación basado en la estequiometría 1 a 1 ( $\times$  o  $\checkmark$ ).

**FIG. 3.** Fórmula química, esquemática, de dos realizaciones preferentes de los copolímeros de la presente invención, una realización preferente muestra un ejemplo de copolímero de la invención en formato entrecruzado y la otra realización preferente muestra un ejemplo de copolímero de la invención lineal.

5 **FIG. 4.** Resultados del estudio de permeación, en los que se observa una interacción preferente del material con catecol (1,2-dihidroxibenceno), en comparación con fenol (hidroxibenceno), resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) e hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno). La gráfica representa la concentración de cada una de las especies en función del tiempo que tardan en atravesar la membrana.

10 **FIG. 5.** Representación esquemática de ensayos comparativos de unión a quercetina llevados a cabo con: **(A)** un copolímero de fórmula (I) obtenido por polimerización de metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo posteriormente protonado (NNDA<sup>+</sup>), acrilato de 2-hidroxietilo (A2HE), metacrilato de metilo (MMA) y ácido 4-vinilfenilborónico (BOR), con una relación molar de 42,5:42,5:10:5, respectivamente, y con dimetacrilato de etilenglicol (E) con un porcentaje en  
15 peso del 5%, como entrecruzante; **(B)** copolímero comparativo (1) obtenido por polimerización de vinilpirrolidona (VP), metacrilato de metilo (MMA) y ácido 4-vinilfenilborónico (BOR) con una relación molar 47,5:47,5:5, respectivamente, y con dimetacrilato de etilenglicol (E) con un porcentaje en peso del 0,1%; **(C)** copolímero comparativo (2) obtenido por polimerización de metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de metilo, con una  
20 relación molar de 45:45:10, respectivamente y con dimetacrilato de etilenglicol (E) con un porcentaje en peso del 5%, como entrecruzante. Se introdujo cada una de las membranas preparadas en cada uno de los recipientes con una disolución agua:DMF (90:10 v/v) durante 90 minutos. Una vez transcurridos 90 minutos las membranas fueron retiradas del recipiente y lavadas con DMF. Los copolímeros se representan de manera esquemática, por lo que no  
25 es indicativa de la distribución de las diferentes unidades monoméricas.

Los modos de realización de la invención preferentes y ejemplos descritos a continuación tienen carácter ilustrativo y muestran diferentes maneras de poner en práctica la invención, pero no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

30 **EJEMPLO 1. Realización preferente de un copolímero de fórmula (I) entrecruzado con capacidad de extraer selectivamente compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo de acuerdo con la presente invención.**

Mediante copolimerización en bloque se preparó un copolímero, en forma de membrana, con la composición que se indica a continuación. Monómeros: ácido 4-vinilfenilborónico,

metacrilato de metilo, metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo y acrilato de 2-hidroxietilo, con una relación molar 5:10:42.5:42.5, respectivamente. Iniciador térmico azobisisobutironitrilo, con un porcentaje en peso del 1%. Entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol con un porcentaje en peso del 5%.

- 5 La disolución de copolímero resultante se inyectó en un molde de cristales silanizados, de 100  $\mu\text{m}$  de espesor, en ausencia de oxígeno, y se colocó en una estufa a 60°C durante toda una noche obteniéndose dicho copolímero en forma de membrana.

La membrana fue sumergida en HCl acuoso al 4% durante 5 minutos para protonar los grupos metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo, y después fue lavada con agua destilada hasta conseguir

- 10 pH neutro en las aguas de lavado.

**EJEMPLO 2. Realización preferente de un copolímero de fórmula (I) lineal con capacidad de extraer selectivamente compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo de acuerdo con la presente invención.**

- 15 Mediante copolimerización en disolución se preparó un copolímero, con la composición que se indica a continuación. Monómeros: ácido 4-vinilfenilborónico, metacrilato de metilo, metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo y acrilato de 2-hidroxietilo, con una relación molar 5:10:42.5:42.5, respectivamente. Iniciador térmico azobisisobutironitrilo, con un porcentaje en peso del 1%. Disolvente dimetilformamida. Concentración total de monómeros 2M. La
- 20 disolución se agitó 60°C durante toda una noche, y posteriormente fue precipitada en éter, obteniéndose dicho copolímero en forma de polvo.

El polímero fue disuelto en metanol, y se añadió 1 equivalente de HCl con respecto a los grupos fenilborónico presentes en el polímero, para protonar así los grupos dimetilamino laterales. Finalmente, la disolución fue precipitada en éter nuevamente, obteniéndose dicho

- 25 copolímero en forma de polvo.

**EJEMPLO 3. Caracterización de la interacción de los copolímeros de fórmula (I) lineales obtenidos en el ejemplo 2, con distintos tipos de polifenoles y polialcoholes, a través de calorimetría de titulación isotérmica.**

- 30 Las mediciones de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se realizaron utilizando un microcalorímetro (VP-ITC MicroCal Inc., Malvern, Reino Unido) equipado con dos celdas, una celda para la muestra (copolímero lineal obtenido en el ejemplo 2 a una concentración de 0,6 mM de grupos fenilborónico) y otra de referencia, con volúmenes de 1.436 ml. La jeringa del

inyector se llenó con 280  $\mu\text{L}$  de soluciones 9 mM de catecol (1,2-dihidroxibenceno), resorcinol (1,3-dihidroxibenceno), hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno), D-glucosa, D-fructosa y D-maltosa, que se fueron añadiendo en pequeñas alícuotas a la celda de muestra (alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  cada 30 min).

- 5 Todas las soluciones se desgasificaron durante 10 min a  $25,0 \pm 0,1$  °C en una bomba de vacío antes de los experimentos para evitar la formación de burbujas en la jeringa o en las celdas calorimétricas durante el experimento. Las medidas calorimétricas se realizaron a  $25,000 \pm 0,001$  °C, con agitación constante a 307 rpm en la celda de muestra.

10 Tal y como se muestra en las Figura 1 y 2, los resultados indicaron interacción únicamente con 1,2-dihidroxibenceno (catecol), por lo tanto, una reacción altamente específica entre los copolímeros de fórmula (I) descritos en la presente invención y ese tipo de estructuras químicas.

15 En la figura 2 se ha marcado con un símbolo ✕ los casos (figuras 2b, 2c, 2d, 2e y 2f) en los que no existe tendencia alguna al representar los valores de calor de reacción obtenidos frente a la fracción molar y, por lo tanto, los valores calculados para la constante de reacción (K), el incremento de la entalpía ( $\Delta H$ ) y el incremento de entropía ( $\Delta S$ ) no son válidos. Tal como se aprecia, solamente los datos de calor de reacción obtenidos con catecol (figura 2a marcada con el símbolo ✓) presentan una tendencia clara al representarlos frente a la fracción molar de catecol utilizada, indicando la existencia de la interacción entre el polímero de fórmula (I) y el catecol.

20

**EJEMPLO 4. Caracterización de la interacción de las membranas de fórmula (I) obtenidas en ejemplo 1 con distintos tipos de fenoles a través de ensayos de difusión/permeación.**

25 En un sistema de vasos comunicantes, se instala un trozo del copolímero en forma de membrana sintetizado en el ejemplo 1. El área de la superficie de contacto de la membrana con la disolución es de 2  $\text{cm}^2$ . El volumen a cada lado de la membrana es de 200 ml. En uno de los lados se coloca agua destilada, y en el otro una disolución del compuesto fenólico a una concentración de 5000 ppm en agua destilada. La concentración del compuesto fenólico se mide a lo largo del tiempo en el vaso que inicialmente se llenó con agua destilada.

30

Los fenoles utilizados en el ensayo fueron: fenol (hidroxibenceno), catecol (1,2-dihidroxibenceno), resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) e hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno).

Los ensayos realizados con fenol (1-hidroxibenceno), resorcinol (1,3-dihidroxibenceno) e hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno) dieron lugar a valores de tiempos necesarios para lograr un flujo de permeación constante,  $\theta$ , de 622, 967, y 449 segundos, respectivamente. Sin embargo, en el caso de catecol se obtuvo un valor de 7470 segundos, lo que claramente indica una interacción fuerte del copolímero de fórmula (I) con este derivado fenólico de forma particular y específica (ver Figura 4 y la tabla 1 a continuación). Del mismo modo, el coeficiente de permeación obtenido para el catecol es de 1 orden de magnitud menor que en el resto de los casos:

	$\theta$ / s	Coef. Dif. (D) / ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )	Coef. Perm. (P) / ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )	K(P/D)
Fenol	622	2,68E-08	5,91E-07	22,1
Catecol	7470	2,23E-09	2,84E-07	128,0
Resorcinol	966	1,72E-08	5,25E-07	30,5
Hidroquinona	449	3,71E-08	6,36E-07	17,1

**Tabla 1:** resultados de los ensayos de interacción con diferentes alcoholes. La tabla muestra los resultados del parámetro  $\theta$ , el coeficiente de difusión (D), el coeficiente de permeación (P), y la constante de partición (P/D).

**EJEMPLO 5: Uso de las membranas de fórmula (I) obtenidas en el Ejemplo 1 en la extracción de polifenoles derivados del 1,2-dihidroxifenol en muestras de miel, de acuerdo con la presente invención.**

En el presente ejemplo se llevó a cabo una comparación con el método utilizado hasta ahora [Huidobro et al., (2005)], que utiliza una membrana de diálisis comercial.

Se tomaron 3 mieles diferentes, y se realizó el proceso de purificación de acuerdo con los siguientes métodos:

A) De acuerdo con el método actualmente utilizado, utilizando una membrana de diálisis comercial de Sigma Aldrich [sacos de diálisis de ancho horizontal medio de 25 mm, MWCO 12,000Da; <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/product/sigma/d6191>]. Se pesan 7,5 gramos de miel y se disuelven en 4 ml de tampón fosfato pH 7 (0,015M), se transfiere al interior de la membrana y se añaden otros 8,5 ml de tampón fosfato pH 7 (0,015M) usados para enjuagar el vaso de disolución. Se cierra la membrana y el conjunto se sumerge en 3 litros de tampón fosfato pH 7 durante 12 horas a 4°C. Después, se renueva el sistema con otros 3 litros de tampón fosfato pH 7, y se espera otras 12 horas.

B) Utilizando la membrana obtenida en el Ejemplo 1. Se disuelven 7,5 gramos de miel en 12,5 ml de tampón fosfato pH 7, y se sumerge una membrana de 1 gramo de peso en dicha disolución. El sistema se mantiene a 25 °C durante 90 minutos, y finalmente se extrae la membrana.

5 Una vez purificadas las mieles con ambos métodos, se midió en cada una de ellas las actividades de catalasa y glucosa oxidasa siguiendo los siguientes protocolos:

### **5.1. Protocolo determinación actividad Catalasa**

#### Reactivos

- 10
  - Peróxido de hidrogeno 90% p/v
  - Permanganato potásico
  - Di-sodio hidrogenofosfato anhidro
  - Dihidrogenofosfato de sodio monohidrato
  - Tabletas de o-dianisidina
- 15
  - Peroxidasa 2500 U/frasco
  - Ácido clorhídrico concentrado
  - Tampón fosfato pH 7,0 (0,6M)
  - Tampón fosfato pH 7,0 (0,015M)
  - Tampón fosfato pH 7,0 (1M)
- 20
  - Tampón fosfato pH 6,1 (0,2M)

#### Concentración de soluciones

- Solución de permanganato potásico 0,1N.
- Solución de peróxido de hidrogeno 3mM
- 25
  - Solución de o-dianisidina: Se disuelven 2 tabletas en 5,7ml de tampón fosfato pH 6,1 (0,2M)
  - Solución de peroxidasa: peroxidasa (Sigma product No. P8375) se diluye todo el contenido en 1,25ml de tampón fosfato 0,2M (pH 6,1)
  - Solución de HCl 6N.

30

#### Procedimiento

1. *Curva patrón con peróxido de hidrógeno*

Partiendo de la solución de peróxido de hidrógeno 3mM en tampón fosfato a pH 7,0 (0,6M) se preparan los siguientes tubos para el calibrado [Huidobro et al., (2005)], tal como se muestra en la siguiente tabla 2:

Tubo	Tampón fosfato		o-Dianisidina	Peroxidasa	$\mu\text{l H}_2\text{O}_2$ 3 mM añadidos	$\mu\text{g H}_2\text{O}_2$ añadidos	HCl 6N ( $\mu\text{l}$ )
	pH 6,1 0,2M (ml)	pH 7,1 0,6M ( $\mu\text{l}$ )	( $\mu\text{l}$ )	( $\mu\text{l}$ )			
1	6,4	200	200	100	0	0,00	100
2	6,4	175	200	100	25	2,57	100
3	6,4	150	200	100	50	5,14	100
4	6,4	125	200	100	75	7,71	100
5	6,4	100	200	100	100	10,29	100
6	6,4	75	200	100	125	12,86	100
7	6,4	50	200	100	150	15,43	100
8	6,4	25	200	100	175	18,00	100
9	6,4	0	200	100	200	20,57	100

**Tabla 2:** tubos de calibrado para realizar una curva patrón

- 5 El volumen de ácido clorhídrico se añade a cada tubo tras 15 minutos, es decir, se mezclan todos los reactivos y tras 15 minutos de incubación en oscuridad se añade el volumen de ácido clorhídrico para detener la reacción. Se mide la absorbancia en un espectrofotómetro (400Bio UV-visible Varian, Mulgrave, Vic., Australia) a 400nm.
- 10 2. *Determinación de la actividad catalasa*
- La reacción se lleva a cabo en oscuridad y a 37°C. Para cada muestra de miel se usan 5 tubos de los cuales 2 tubos son de la muestra, y 3 tubos son los blancos:
- 2 tubos de muestra ( $M_u$ ): ambos contienen 0,8 ml de tampón fosfato 0,6M de pH 7,0 y 6 ml de la solución dializada de miel. (se realizada el ensayo por duplicado)
- 15 - 3 tubos de blancos:
1. Blanco con miel ( $B_M$ ): 1 ml de tampón fosfato 0,6M y 6 ml de la solución de miel dializada.
  2. Blanco de peróxido de hidrógeno ( $B_P$ ): 6,8ml de tampón fosfato con pH 7,0.
  3. Blanco de reactivos ( $B_R$ ): 7ml de tampón fosfato 0,6M a pH 7,0.

Los 5 tubos se incuban 10 minutos a 37°C.

Pasado ese tiempo exactamente, se añaden 200µl de una solución de peróxido de hidrógeno 105 mM a los tubos de muestra (Mu) y al blanco de peróxido de hidrógeno (Bp) y se agita en un vórtex.

- 5 Posteriormente, todos los tubos se incuban por un tiempo de 30 minutos a 37°C. Durante ese tiempo de incubación, en intervalos de 5 o 10 minutos (a los 5, 10, 15, 20 y 30 minutos desde el inicio de la incubación) se pipetea 200µl del contenido de cada uno de los tubos.

10 Cada alícuota de 200µl extraída de cada tubo se añade, respectivamente, en un nuevo tubo de reacción que ha de contener 6,4ml de tampón fosfato 0,2M a un valor de pH de 6,1; 200µl de o-dianisidina y 100µl de la solución de peroxidasa.

15 Cada una de las reacciones debe detenerse con HCl 6N a los 15 minutos, es decir, a cada uno de los tubos de reacción con la alícuota de 200µl + los reactivos comentados anteriormente, se les añade 100µl de HCl 6N. Una vez detenida la reacción y una vez se han dejado enfriar a temperatura ambiente (15 minutos), se mide la absorbancia de cada uno de los tubos de reacción a 400nm en cubetas de vidrio frente al blanco B<sub>R</sub>.

### Cálculos

20 Los resultados obtenidos con los 2 tubos de muestra (Mu) deben ser normalizados con los resultados obtenidos con el blanco de la miel (B<sub>M</sub>). Es decir, la absorbancia del tubo correspondiente al blanco de la miel debe sustraerse a la absorbancia obtenida en cada tubo de muestras de miel (Absorbancia neta) antes de calcular la concentración de peróxido de hidrógeno de las 2 muestras usando la curva de calibrado.

25 Posteriormente, la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (g\*10<sup>-3</sup>) en los 7ml de mezcla de reacción se pueden calcular primero sustituyendo la absorbancia neta en la curva de calibrado o patrón realizada previamente y posteriormente multiplicando los valores obtenidos por un valor de 0,035 resultado del siguiente cálculo:

$$\text{cantidad de H}_2\text{O}_2 = \frac{7}{(0,2 * 1000)}$$

en donde:

- 7 representa los ml totales obtenidos en la mezcla de reacción
- 30 - 0,2 representa los ml de la alícuota añadida inicialmente al tubo de reacción

La descomposición del peróxido de hidrógeno por parte de la enzima catalasa sigue una reacción de primer orden y  $k = \ln(X_0/X)$  donde  $X_0$  es la concentración sustrato inicial, calculada

a partir del blanco de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B<sub>P</sub>), y donde  $X$  es la concentración del sustrato a tiempo  $t$ . Representando  $\ln(X_0/X)$  frente al tiempo  $t$ , se obtiene una recta con una pendiente  $k$ .

Una vez representada la ecuación y obtenida la ecuación de la recta, se puede calcular la actividad de la enzima catalasa ( $K_f$ , min<sup>-1</sup>) utilizando la siguiente ecuación:

$$K_f = k * \frac{50}{6} * \frac{1}{W}$$

en donde:

- $k$  es la pendiente de la recta  $\ln(X_0/X)$  vs.  $t$
- 50 ml es el volumen total de la muestra inicial (miel dializada)
- 6 ml es el volumen de miel dializada de la muestra (M) inicial transferido a la primera mezcla de reacción
- $W$  son los gramos de miel pesados al inicio del experimento; los gramos introducidos en la membrana de diálisis o usados con nuestro material.

Con esta ecuación se calcula la actividad de la enzima catalasa por peso, es decir (min<sup>-1</sup>\*g<sup>-1</sup>)

## 15 **5.2. Protocolo determinación actividad Glucosa oxidasa**

### Reactivos

Los mismos que en el caso de la medida de la actividad de la catalasa, a excepción de la D(+) glucosa.

### Concentración de soluciones

20 Las mismas que en el caso de la medida de la catalasa a excepción de:

- Solución de glucosa 3,5 M
- Solución de peróxido de hidrogeno 1,50 mM

### Procedimiento

#### *1. Curva patrón con peróxido de hidrógeno*

25 El procedimiento es idéntico al realizado en la sección 5.1 anterior (ver "Protocolo determinación actividad Catalasa") a excepción que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la que se parte es de 1,5 mM en vez de 3 mM.

2. *Determinación de la actividad de la glucosa oxidasa*

La reacción se lleva a cabo en oscuridad y a 37°C. Para cada muestra de miel se usan 5 tubos que son 2 tubos de muestra (Mu) y 3 tubos de blancos (B<sub>G</sub>, B<sub>M</sub> y B<sub>R</sub>)

- Tubos de muestra (Mu): Ambos contienen 3,4ml de tampón fosfato 0,2M de pH 6,1, 3 ml de glucosa 3,5M, 200µl de o-dianisidina y 100µl de peroxidasa. (2 tubos porque se hace por duplicado el ensayo).
- Tubos de blancos:
  - o Blanco de glucosa (B<sub>G</sub>): 3,6ml de tampón fosfato 0,2M de pH 6,1, 3 ml de glucosa 3,5M, 200µl de o-dianisidina y 100µl de peroxidasa.
  - o Blanco de miel (B<sub>M</sub>) 6,4ml de tampón fosfato 0,2M de pH 6,1, 200µl de o-dianisidina y 100µl de peroxidasa.
  - o Blanco de reactivos (B<sub>R</sub>): 6,6ml de tampón fosfato 0,2M de pH 6,1, 200µl de o-dianisidina y 100µl de peroxidasa.

Después de incubar los cinco tubos durante 5 minutos a 37°C, se añaden 200µl de muestra de miel dializada a los dos tubos de muestra (Mu) y al blanco de miel (B<sub>M</sub>), se agitan y se incuban 15 minutos a 37°C. Después de los 15 minutos se para la reacción con 100µl de HCl 6N, se agitan todos los tubos y se mide la absorbancia a 400 nm con cubetas de vidrio en un espectrofotómetro UV-visible frente al blanco B<sub>R</sub>.

Cálculos

La actividad de la glucosa-oxidasa se expresa como la cantidad de peróxido de hidrogeno en µg que se obtiene durante 1 hora bajo el efecto de la glucosa-oxidasa que contiene un gramo de miel.

Se calcula la diferencia entre el promedio de las absorbancias obtenidas para el triplicado de los tubos de la muestra y la suma de las absorbancias obtenidas para los blancos (B<sub>G</sub> y B<sub>M</sub>).

El contenido en µg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> perteneciente al valor de absorbancia medido se obtiene con la ayuda de la recta de calibrado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para expresar los mg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por gramos de miel y por hora hay que realizar el siguiente cálculo:

$$\frac{\mu\text{g de H}_2\text{O}_2}{\text{g de miel}} \cdot \frac{1}{h} = \frac{\mu\text{g de H}_2\text{O}_2 \times 50 \times 60}{0,2 \times 15 \times P}$$

donde:

- 50 corresponde a los ml de la solución de miel

- 0,2 se refiere a los ml de la solución de miel sometidos a ensayo
- 60 es la hora expresada en minutos
- 15 son los minutos de ensayo
- *P* son los gramos de muestra

5 La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en un ensayo realizado de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 5. Se realizaron un total de 9 medidas, en 3 muestras de miel (3 réplicas por muestra). La purificación se llevó a cabo con los dos métodos y los resultados de actividad enzimática se muestran en la siguiente tabla 3:

Muestra de miel	Actividad Catalasa $K_F \cdot 10^{-3} \text{ (min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1})$		Actividad glucosa-oxidasa $(\mu\text{g H}_2\text{O}_2 / \text{g miel} / \text{h})$	
	Método purificación A	Método purificación B	Método purificación A	Método purificación B
1 (réplica 1)	14.87	20.65	825.12	790.22
1 (réplica 2)	19.45	16.88	789.41	845.11
1 (réplica 3)	12.15	11.76	800.20	786.33
2 (réplica 1)	87.16	85.74	1001.23	1005.73
2 (réplica 2)	95.23	99.36	1025.98	999.08
2 (réplica 3)	96.12	82.15	1007.52	1002.47
3 (réplica 1)	23.85	21.66	1023.45	1072.30
3 (réplica 2)	24.03	28.56	1085.77	1068.88
3 (réplica 3)	26.13	29.01	1045.03	1024.55
<b>PROMEDIO 1</b>	15.49	16.43	804.91	807.22
<b>PROMEDIO 2</b>	92.84	89.08	1011.58	1002.43
<b>PROMEDIO 3</b>	24.67	26.41	1051.42	1055.24

**Tabla 3:** Resultados de los ensayos de actividad de catalasa y glucosa oxidasa

10 Tal y como puede apreciarse al final de la tabla 3, los valores medios obtenidos son significativamente parecidos y, por lo tanto, el método de la invención (método de purificación B) es un sustituto eficaz y válido del método de purificación A actualmente utilizado.

15 **Ejemplo 6: comparación de la actividad de los copolímeros de fórmula (I) con la de otros copolímeros que comprenden grupos ácido borónico.**

Se evaluó la capacidad de unión a moléculas con grupos 1,2-hidroxifenilo, de copolímeros de fórmula (I) y, en particular, de la membrana sintetizada en el ejemplo 1, frente a la de otros

copolímeros. Para ello, se llevaron ensayos comparativos de unión a quercetina [2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona] de tres copolímeros diferentes:

Copolímero de fórmula (I): membrana sintetizada de acuerdo a lo descrito en el ejemplo 1, como ejemplo particular de los copolímeros de fórmula (I) obtenida por polimerización de metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo (NNDA), acrilato de 2-hidroxietilo (A2HE) y metacrilato de metilo (MMA), con una relación molar de 42,5:42,5:10:5, respectivamente, y con dimetacrilato de etilenglicol (E) con un porcentaje en peso del 5%, como entrecruzante. La membrana fue sumergida en HCl acuoso al 4% durante 5 minutos para protonar los grupos metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo (NNDA<sup>+</sup>), y después fue lavada con agua destilada hasta conseguir pH neutro en las aguas de lavado

Copolímero comparativo (1): membrana obtenida por polimerización de vinilpirrolidona, metacrilato de metilo y ácido 4-vinilfenilborónico con una relación molar 47,5:47,5:5, respectivamente. Iniciador térmico azobisisobutironitrilo, con un porcentaje en peso del 1%. Entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol con un porcentaje en peso del 0,1%. La disolución de copolímero resultante se inyectó en un molde de cristales silanizados, de 100 µm de espesor, en ausencia de oxígeno, y se colocó en una estufa a 60°C durante toda una noche obteniéndose dicho copolímero en forma de membrana.

Copolímero comparativo (2): membrana obtenida por polimerización de metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo, acrilato de 2-hidroxietilo y metacrilato de metilo, con una relación molar de 45:45:10, respectivamente. Iniciador térmico azobisisobutironitrilo, con un porcentaje en peso del 1%. Entrecruzante dimetacrilato de etilenglicol con un porcentaje en peso del 5%. La disolución de copolímero resultante se inyectó en un molde de cristales silanizados, de 100 µm de espesor, en ausencia de oxígeno, y se colocó en una estufa a 60°C durante toda una noche obteniéndose dicho copolímero en forma de membrana.

Para los ensayos, se prepararon 3 recipientes con una disolución de 100 ppm de quercetina en una mezcla de DMF:H<sub>2</sub>O en proporción 10:90 (v/v). Dicha disolución tiene un color amarillo marcado debido a su contenido en quercetina.

A continuación, se introdujo cada una de las membranas preparadas en cada uno de los recipientes con dicha disolución durante 90 minutos. Una vez transcurridos 90 minutos las membranas fueron retiradas del recipiente y lavadas con DMF (ver figura esquemática 5 con el procedimiento). Solamente la membrana sintetizada en el ejemplo 1, con fórmula (I), presentaba color amarillo (visto como gris oscuro en la figura 5, en blanco y negro) como resultado de la unión entre los grupos ácido fenilborónico y la quercetina.

**REFERENCIAS:**

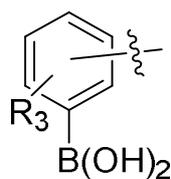
- Auzinger, A. Über Fermente im Honig und den Wert ihres Nachweises für die Honigbeurteilung. Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände 19, 65–83 (1910).
- 5 Bogdanov, S. Bee Product Science. in Honey composition (from <http://www.bee-hexagon.net>; Retrieved November 10, 2020, 2017).
- Gillette, C. C. Honey Catalase. J. Econ. Entomol. 24, 605–606 (1931).
- Huidobro, J., Sánchez, M. P., Muniategui, S. & Sancho, M. T. Precise Method for the Measurement of Catalase Activity in Honey. J. AOAC Int. 88, 800–804 (2005).
- 10 Krauze, A. & Krauze, J. Changes in chemical composition of stored honeydew honeys. Acta Aliment. Pol. 17(41), 119–126 (1991).
- Moreau, E. Identification et dosage des substances protéiques dans les miels. Anns. Falsif. Fraud. 4, 36–41 (1911).
- Pal, S., Dey, S. K. & Saha, C. Inhibition of Catalase by Tea Catechins in Free and Cellular State: A Biophysical Approach. PLoS One 9, e102460 (2014).
- 15 Schepartz, A. I. Honey Catalase: Occurrence and Some Kinetic Properties. J. Apic. Res. 5, 167–176 (1966).
- Schepartz, A. I. & Subers, M. H. Catalase in Honey. J. Apic. Res. 5, 37–43 (1966).

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un copolímero de fórmula (I) para la extracción selectiva de compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo presentes en una composición o mezcla que comprende también sacáridos;
- 5 en el que dicho copolímero de fórmula (I) comprende:
- al menos una primera unidad monomérica que contiene al menos un grupo de fórmula (II):
- $$-R_1-B(OH)_2$$
- 10 (II)
- en el que  $R_1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  cicloalquilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  heterocicloalquilo y un grupo  $C_1-C_{12}$  alquilo; y
- al menos una segunda unidad monomérica que contiene un grupo catiónico; y
  - al menos una tercera unidad monomérica con un grupo hidroxilo;
- 15 y en el que la proporción de las unidades monoméricas que contienen dicho grupo de fórmula (II) en dicho copolímero de fórmula (I) representa al menos 0,1% (p/p) del número total de unidades monoméricas.
- 20 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición o mezcla que comprende también sacáridos es un producto que se selecciona de entre el grupo que consiste en frutas, hortalizas, cacao, café, té, miel, zumos, néctares, vinos, especias, cereales, mostos concentrados, agave, exudados vegetales y bebidas de extractos vegetales, de infusiones o de especias; o una mezcla de los mismos.
- 25 3. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la composición o mezcla que comprende también sacáridos, es miel.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha extracción selectiva de compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo se lleva a cabo en disolución acuosa tamponada a pH 7.
- 30

5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proporción de la unidad monomérica que comprende un grupo de fórmula (II) representa entre 0,1% a 10% (p/p) del número total de unidades monoméricas.

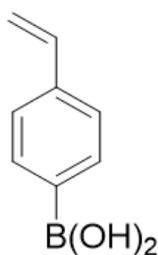
5 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho grupo de fórmula (II) tiene una fórmula (IIa):



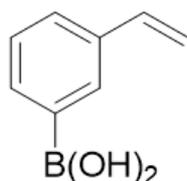
(IIa)

10 en donde cuatro de los carbonos del anillo fenólico se encuentran sustituidos con un resto  $R_3$  seleccionado cada uno de manera independiente de entre el grupo que consiste en H,  $C_1-C_{12}$  alquilo, halógeno,  $C_3-C_{12}$  cicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $-SO_2R_4$ ,  $-OR_4$ ,  $-C(O)R_4$ ,  $-NR_5R_6$ ,  $-C(O)NR_5R_6$  y  $-C(O)OR_5$ , en el que cada uno de los restos  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  se seleccionan de manera independiente de entre el grupo que consiste en H, y  $C_1-C_{12}$  alquilo; o en el que dos de dichos restos  $R_3$  se encuentran en carbonos fenólicos consecutivos y se encuentran unidos formando un grupo arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros.

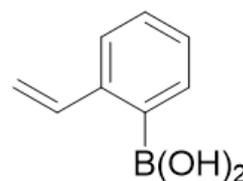
20 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que al menos la primera unidad monomérica que contiene al menos un grupo de fórmula (II) deriva, por polimerización, de un monómero vinílico seleccionado de entre el grupo que consiste en:



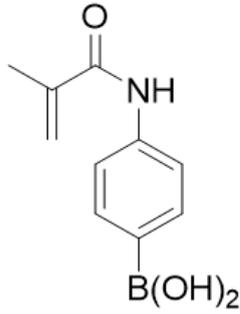
ácido 4-vinilfenilborónico



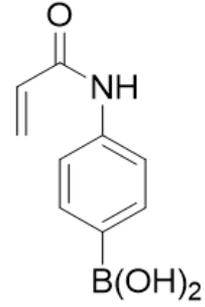
ácido 3-vinilfenilborónico



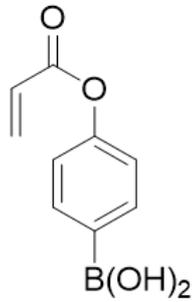
ácido 2-vinilfenilborónico



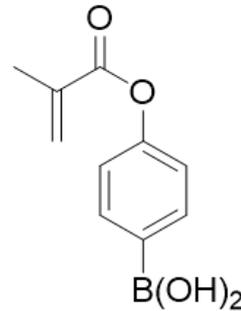
ácido (4-metacrilamidofenil)borónico



ácido (4-acrilamidofenil)borónico



ácido (4-(acrililoixi)fenil)borónico



y, ácido (4-(metacrililoixi)fenil)borónico.

5

8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho copolímero de fórmula (I) comprende unidades monoméricas derivadas, por polimerización, de ácido vinilfenilborónico, metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo, metacrilato de metilo y acrilato de 2-hidroxietilo, y en el que dicho copolímero de fórmula (I) se encuentra reticulado con monómeros de etilenglicol.

10

9. Método de extracción selectiva de compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo presentes en una composición o mezcla que comprende también sacáridos, en el que dicho método comprende

15

(a.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

(a.ii) sumergir en la disolución obtenida en (a.i) una membrana que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I); y

(a.iii) extraer la membrana de la disolución después de al menos 1 hora;

20 o

(b.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

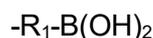
(b.ii) pintar o aplicar un recubrimiento a un artículo con una pintura o un recubrimiento que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I);

5 (b.ii) sumergir dicho artículo en la disolución de dicha composición o mezcla obtenida en (b.i); y

(b.iii) extraer el artículo de la disolución después de al menos 1 hora;

en el que dicho copolímero de fórmula (I) comprende:

10 - al menos una primera unidad monomérica que contiene al menos un grupo de fórmula (II):



(II)

15 en el que  $R_1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  cicloalquilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  heterocicloalquilo y un grupo  $C_1-C_{12}$  alquilo; y

- al menos una segunda unidad monomérica que contiene un grupo catiónico; y

- al menos una tercera unidad monomérica con un grupo hidroxilo;

20 y en el que la proporción de las unidades monoméricas que contienen dicho grupo de fórmula (II) en dicho copolímero de fórmula (I) representa al menos 0,1% (p/p) del número total de unidades monoméricas.

10. Método de determinación de la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de una composición o mezcla que comprende compuestos que comprenden uno o más grupos 1,2-dihidroxifenilo y también sacáridos, en el que dicho método comprende:

25 (a.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente o mezcla de disolventes para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

(a.ii) sumergir en la disolución obtenida en (a.i) una membrana que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I);

(a.iii) extraer la membrana de la disolución después de al menos 1 hora; y

30 (a.iv) determinar la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de la disolución;

o

(b.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente o mezcla de disolventes para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

5

(b.ii) pintar o aplicar un recubrimiento a un artículo con una pintura o un recubrimiento que comprende o consiste en un copolímero de fórmula (I);

(b.ii) sumergir dicho artículo en la disolución de dicha composición o mezcla obtenida en (b.i);

(b.iii) extraer el artículo de la disolución después de al menos 1 hora; y

(b.iv) determinar la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de la disolución;

10 o

(c.i) disolver la composición o mezcla en un disolvente o mezcla de disolventes para obtener una disolución de dicha composición o mezcla;

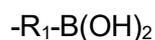
(c.ii) disolver en la disolución obtenida en el paso (c.i) un copolímero de fórmula (I); y

15

(c.iii) determinar la actividad enzimática de catalasa y glucosa oxidasa de la disolución después de al menos 1 hora desde la disolución de dicho copolímero de fórmula (I);

en el que dicho copolímero de fórmula (I) comprende:

- al menos una primera unidad monomérica que contiene al menos un grupo de fórmula (II):



20

(II)

en el que  $R_1$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en un grupo arilo, un grupo heteroarilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  cicloalquilo, un grupo  $C_3-C_{12}$  heterocicloalquilo y un grupo  $C_1-C_{12}$  alquilo; y

- al menos una segunda unidad monomérica que contiene un grupo catiónico; y

25

- al menos una tercera unidad monomérica con un grupo hidroxilo;

y en el que la proporción de las unidades monoméricas que contienen dicho grupo de fórmula (II) en dicho copolímero de fórmula (I) representa al menos 0,1% (p/p) del número total de unidades monoméricas.

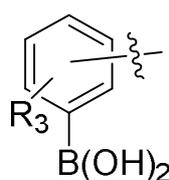
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la composición o mezcla que comprende también sacáridos es un producto que se selecciona de entre el grupo que consiste en frutas, hortalizas, cacao, café, té, miel, zumos, néctares, vinos, especias, cereales, mostos concentrados, agave, exudados vegetales y bebidas de extractos vegetales, de infusiones o de especias; o una mezcla de los mismos.

12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la composición o mezcla que comprende también sacáridos, es miel.

13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque la disolución se encuentra tamponada a pH 7.

14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que la proporción de la unidad monomérica que comprende un grupo de fórmula (II) representa entre 0,1% a 10% (p/p) del número total de unidades monoméricas.

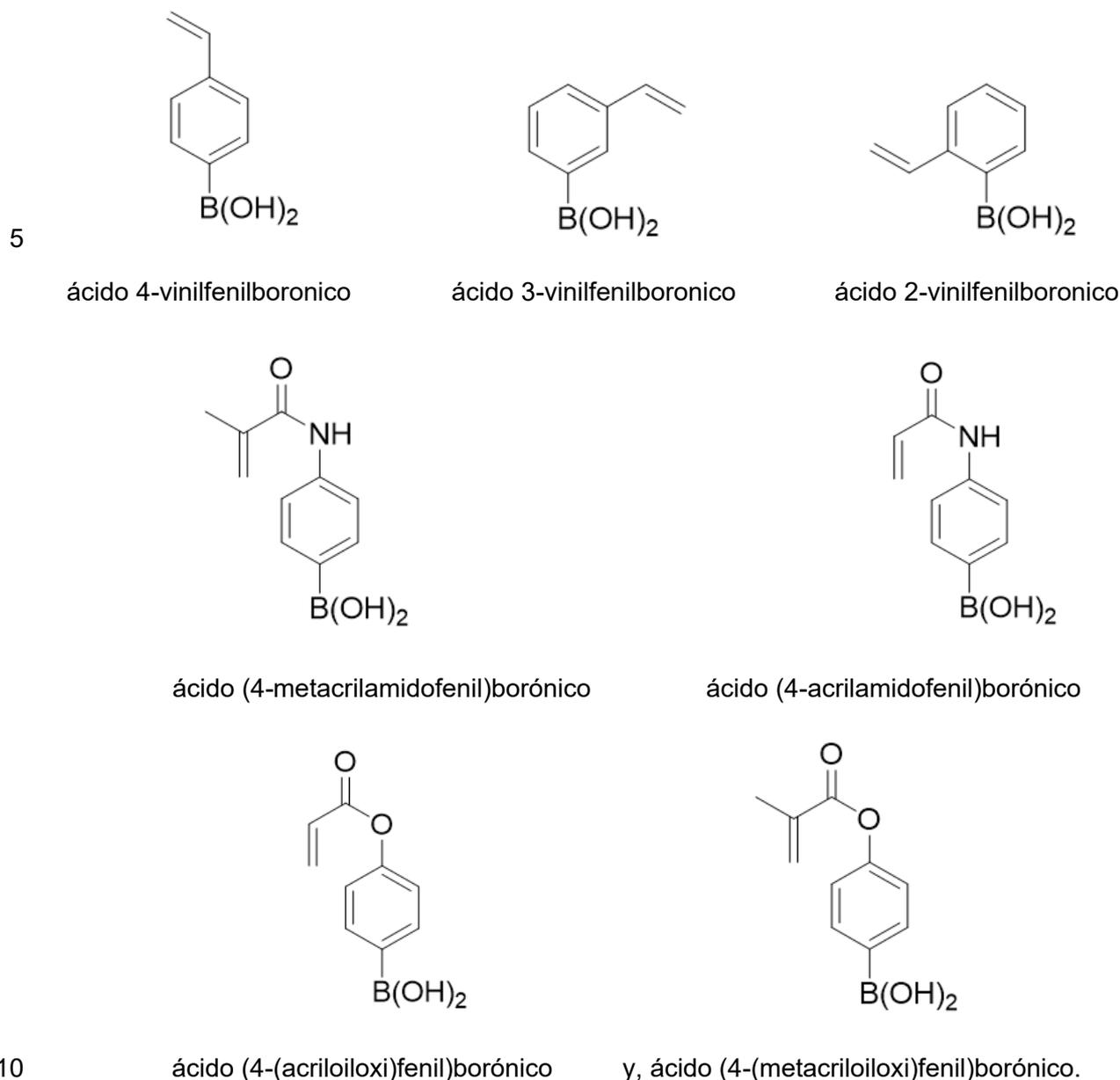
15. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que dicho grupo de fórmula (II) tiene una fórmula (IIa):



(IIa)

en la que cuatro de los carbonos del anillo fenólico se encuentran sustituidos con un resto  $R_3$  seleccionado cada uno de manera independiente de entre el grupo que consiste en H,  $C_1$ - $C_{12}$  alquilo, halógeno,  $C_3$ - $C_{12}$  cicloalquilo, arilo, heteroarilo,  $-\text{SO}_2\text{R}_4$ ,  $-\text{OR}_4$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}_4$ ,  $-\text{NR}_5\text{R}_6$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_5\text{R}_6$  y  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}_5$ , en el que cada uno de los restos  $R_4$ ,  $R_5$  y  $R_6$  se seleccionan de manera independiente de entre el grupo que consiste en H, y  $C_1$ - $C_{12}$  alquilo; o en el que dos de dichos restos  $R_3$  se encuentran en carbonos fenólicos consecutivos y se encuentran unidos formando un grupo arilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros.

16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en el que la al menos primera unidad monomérica deriva, por polimerización, de un monómero vinílico seleccionado de entre el grupo que consiste en:



17. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, en el que dicho copolímero de fórmula (I) comprende unidades monoméricas derivadas, por polimerización, de ácido vinilfenilborónico, metacrilato de 2-(dimetilamino) etilo, metacrilato de metilo y acrilato de 2-hidroxietilo, y en el que dicho copolímero de fórmula (I) se encuentra reticulado con monómeros de etilenglicol.

15

FIGURA 1

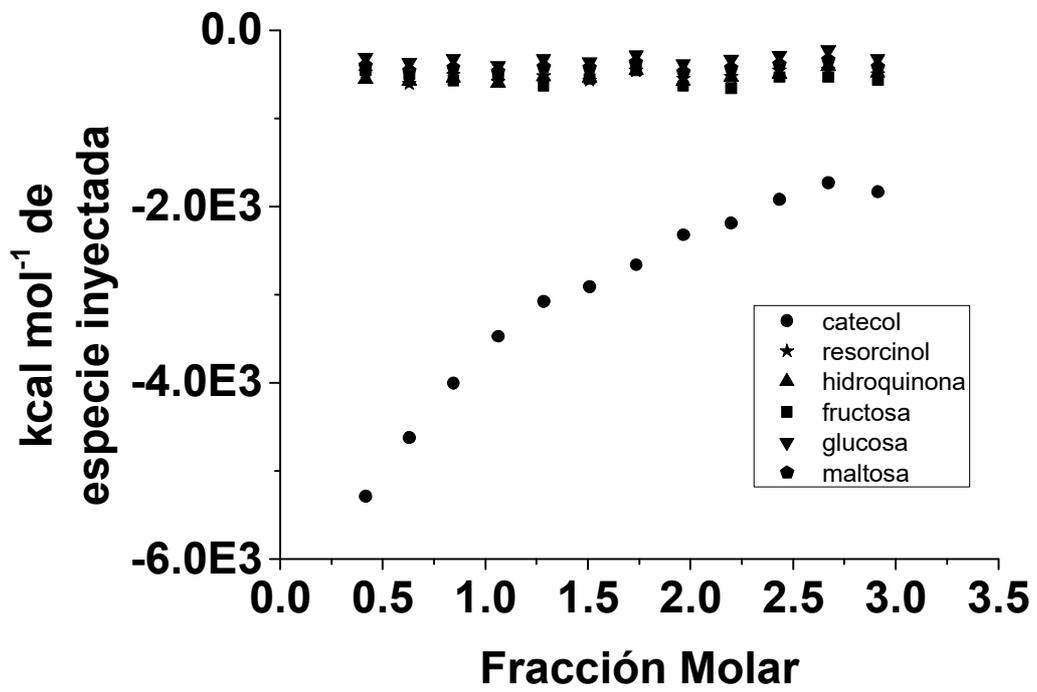


FIGURA 2

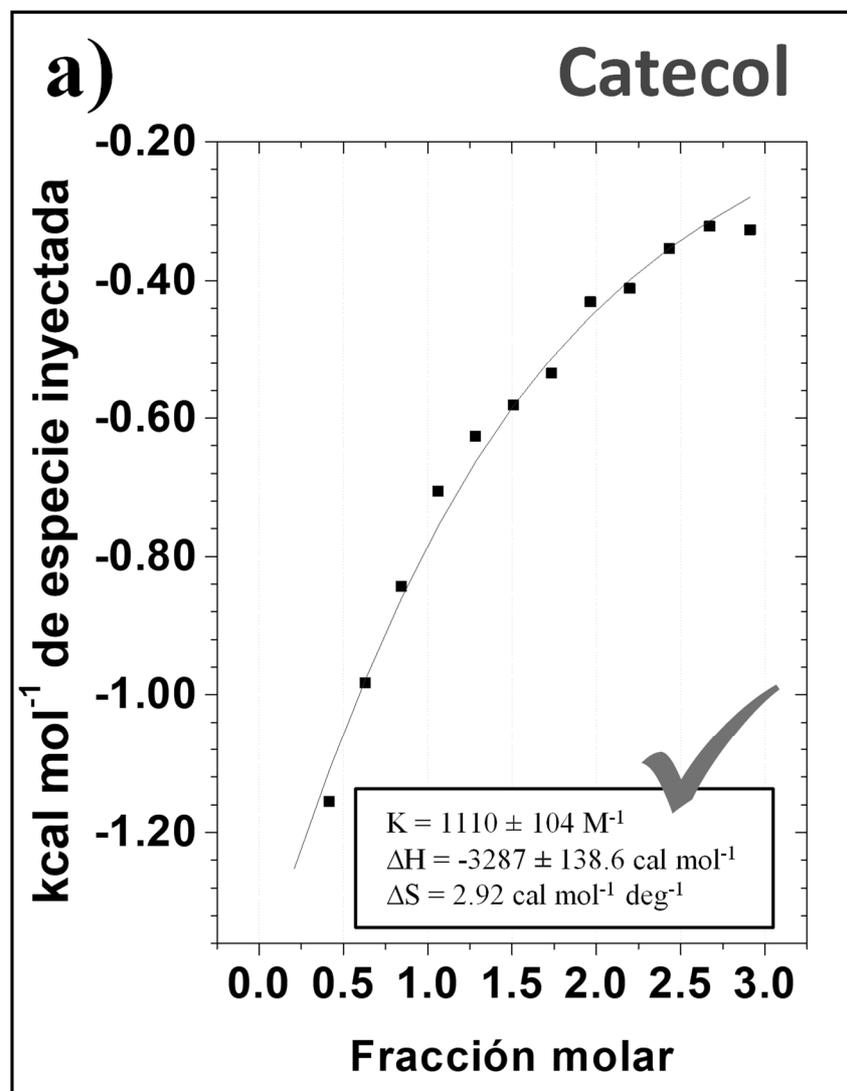


FIGURA 2 (cont.)

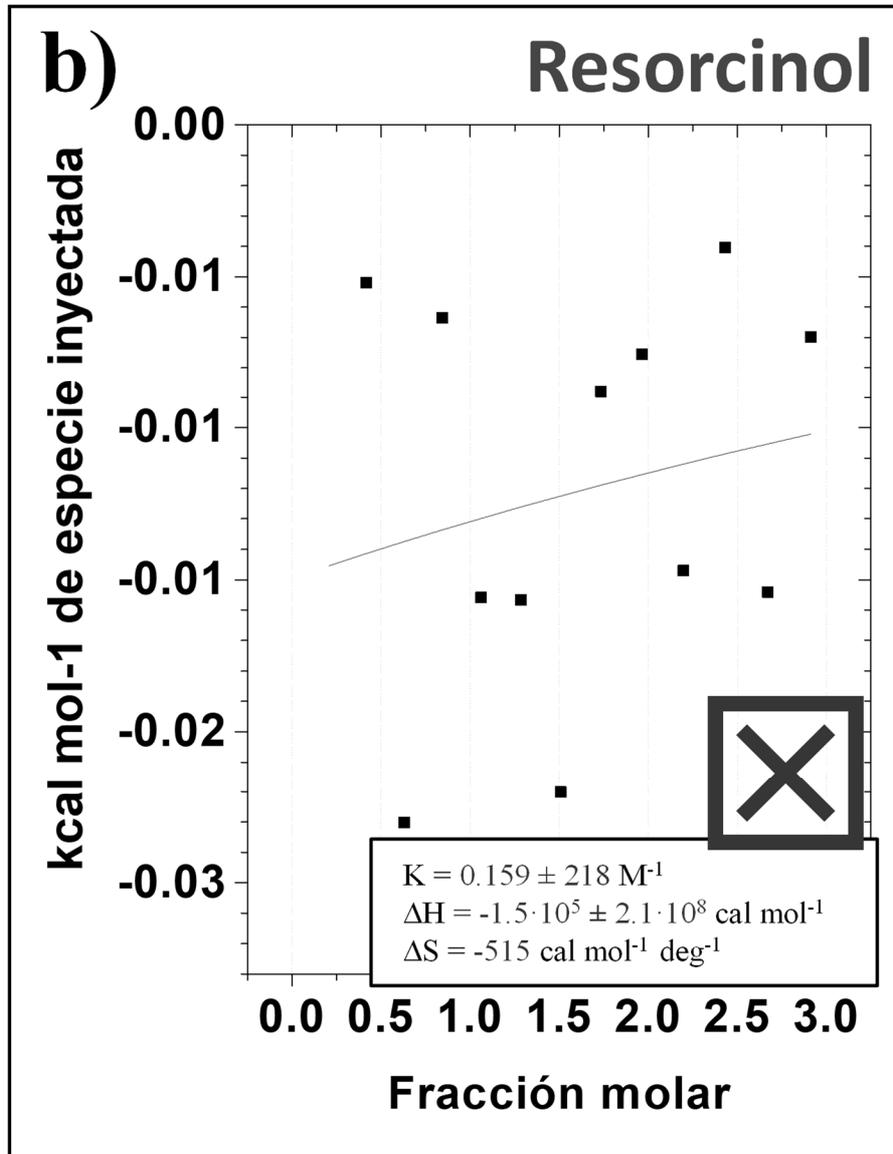


FIGURA 2 (cont.)

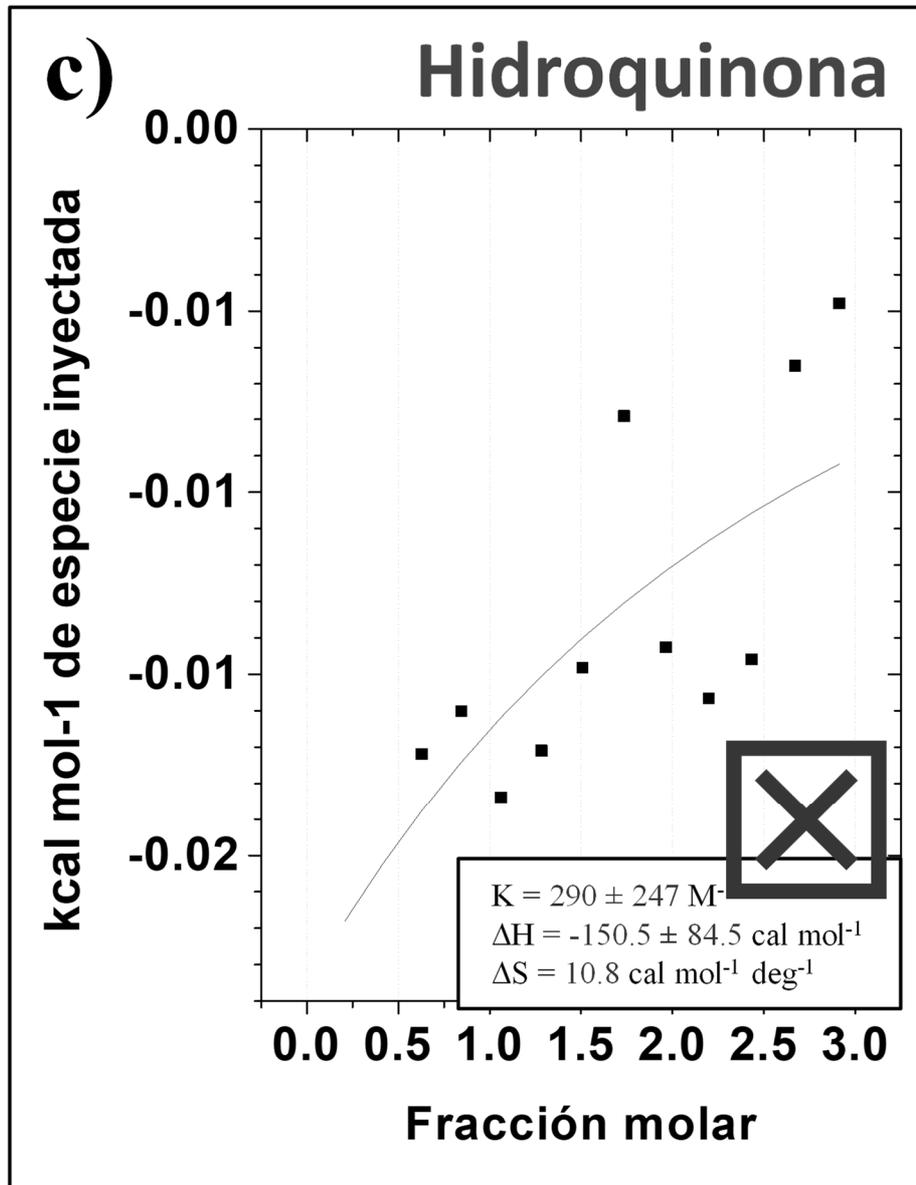


FIGURA 2 (cont.)

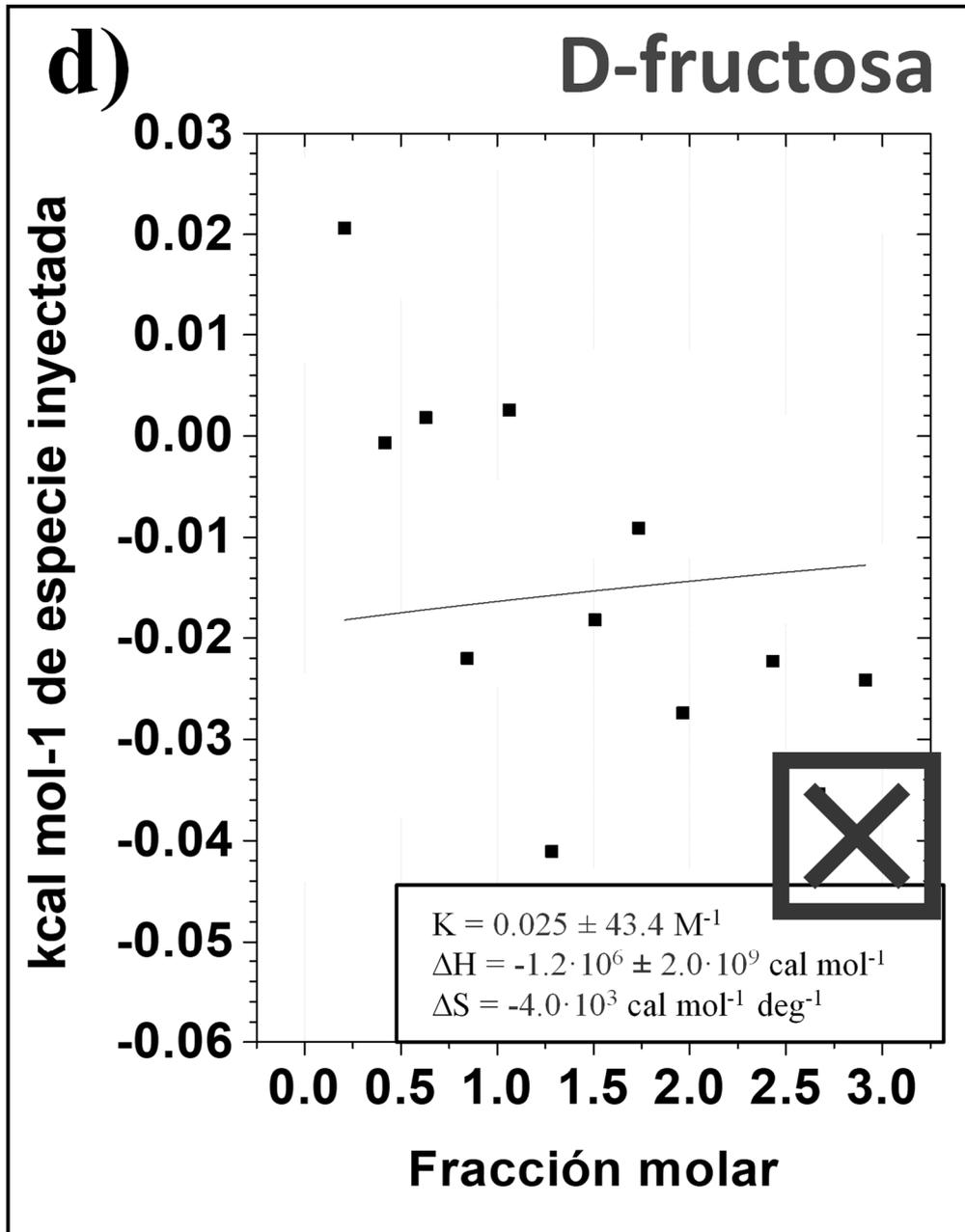


FIGURA 2 (cont.)

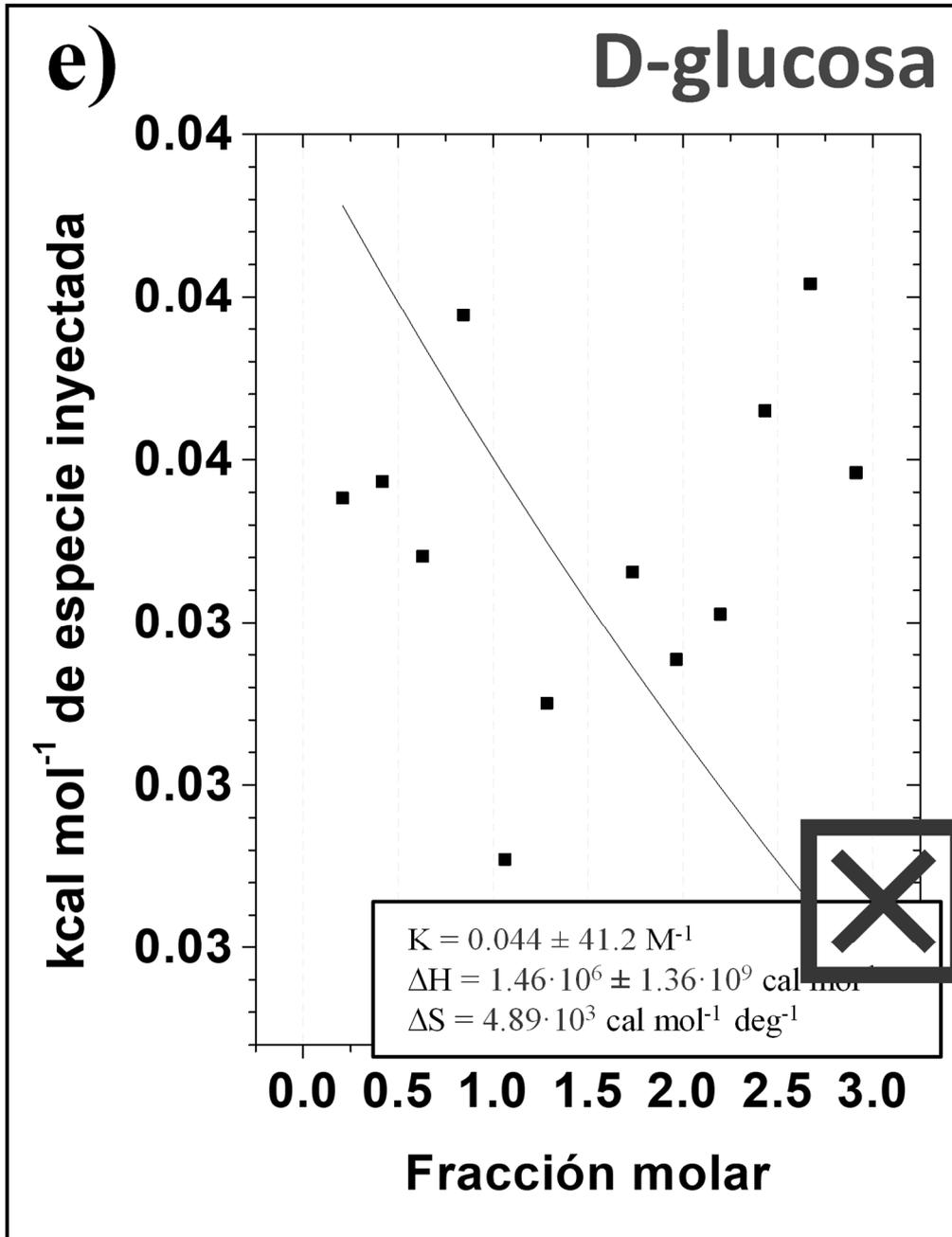


FIGURA 2 (cont.)

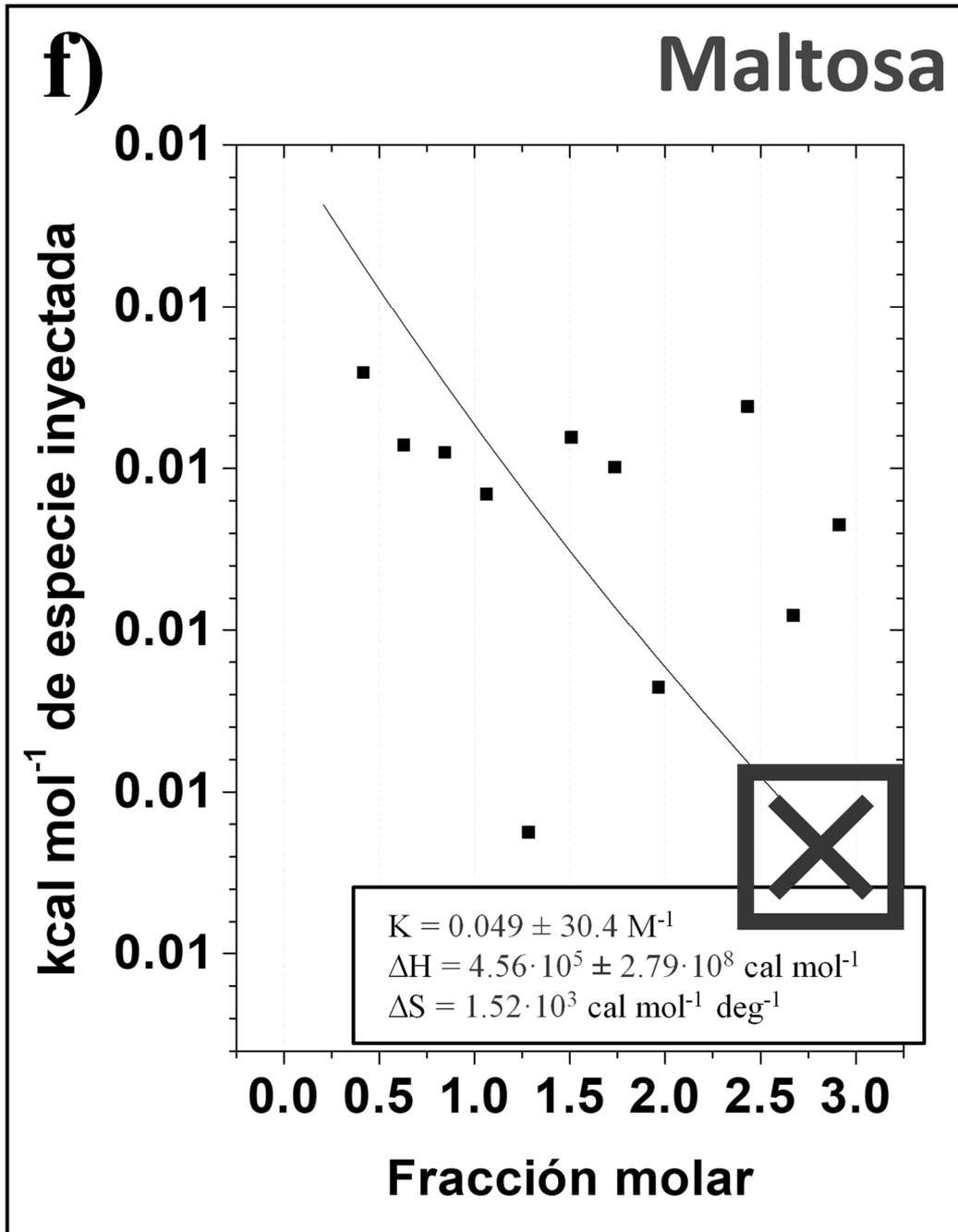
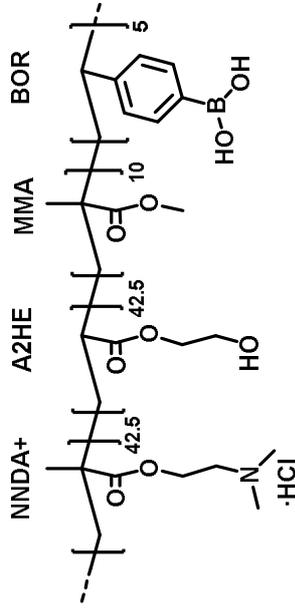


FIGURA 3

**Lineal**



**Entrecruzado**

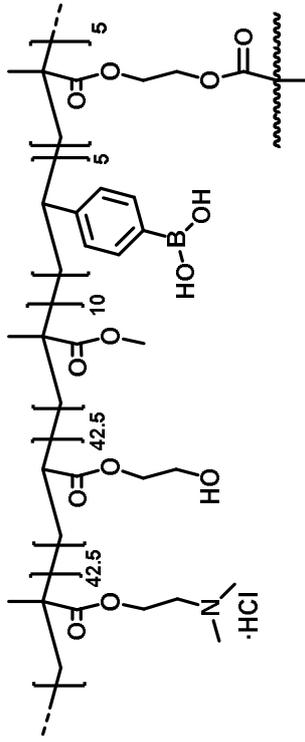


FIGURA 4

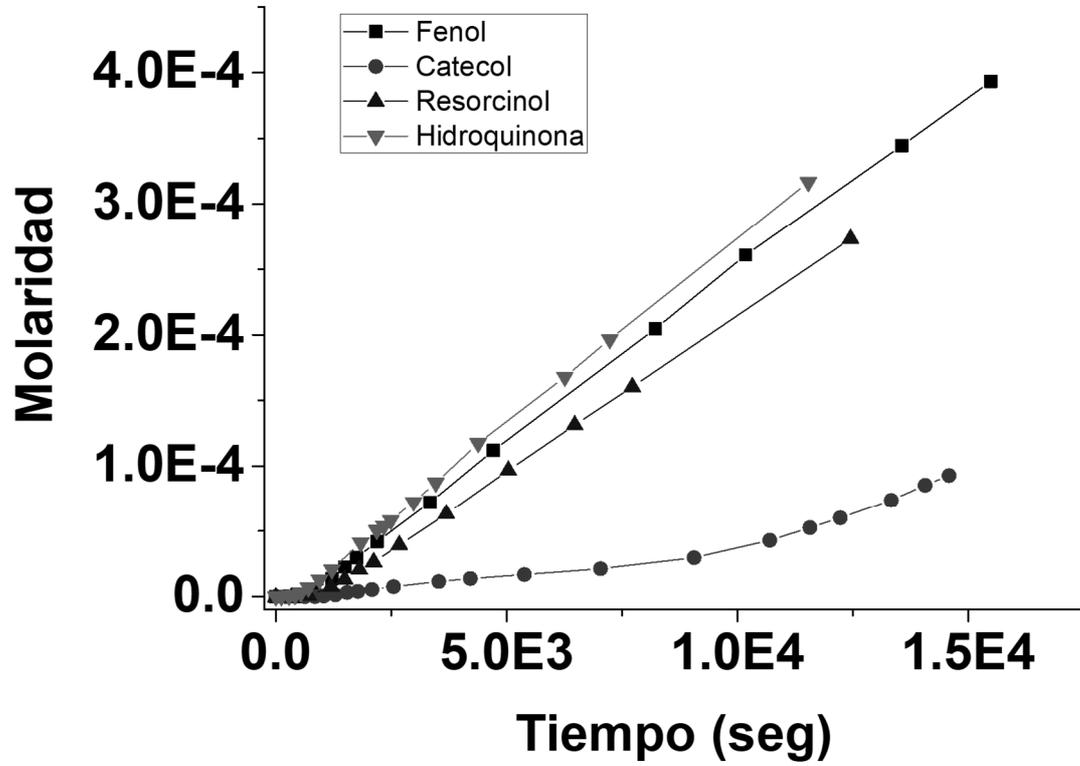


FIGURA 5

