

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 870 081**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185	(2006.01)	A23P 10/40	(2006.01)
A61K 9/16	(2006.01)		
A61K 9/19	(2006.01)		
A61K 31/12	(2006.01)		
A23L 33/105	(2006.01)		
C07H 1/08	(2006.01)		
C07H 17/02	(2006.01)		
C07D 211/90	(2006.01)		
A61P 3/06	(2006.01)		
A23L 2/08	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2008** **PCT/US2008/001418**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2008** **WO08094705**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2008** **E 08725107 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021** **EP 2114424**

54 Título: **Composiciones de betalaína sólidas y métodos**

30 Prioridad:

31.01.2007 US 898766 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2021

73 Titular/es:

VDF FUTURECEUTICALS, INC. (100.0%)
819 Dixie Highway
Momence, IL 60954, US

72 Inventor/es:

PIETRZKOWSKI, ZBIGNIEW y
THRESHER, WAYNE CARL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 870 081 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de betalaína sólidas y métodos

5 **Campo de la invención**

El campo de la invención es composiciones nutricionales y métodos para las mismas, especialmente en lo que se refiere a composiciones de betalaína secas de flujo libre altamente concentradas con solubilidad sustancialmente completa.

10

Antecedentes de la invención

La remolacha ha sido durante mucho tiempo una fuente habitual de diversos nutrientes, y en particular de azúcar y betaina. Otros compuestos útiles obtenidos de la remolacha incluyen las betalaínas, que representan un grupo químicamente diverso de betacianinas de color rojo a violeta (por ejemplo, amarantina, isoamarantina, etc.) y betaxantinas habitualmente de color amarillo (por ejemplo, vulgaxantina), que han encontrado uso como agentes farmacéuticos y colorantes alimentarios y como antioxidantes.

15

Se conocen numerosas formas de producir preparaciones de betalaína, y habitualmente comienzan con la molienda de remolacha o cáscaras de raíz. Otros materiales de partida conocidos incluyen cultivo de suspensión celular de raíz, chumbera, y hongos superiores seleccionados. Aunque las betalaínas se preparan a partir de zumo de remolacha o macerados de raíz, las preparaciones tendrán habitualmente un contenido de betalaína menor o igual que un 1 % en peso e incluirán generalmente cantidades significativas de azúcares y otros componentes. Por ejemplo, el documento de Patente WO 98/26792 describe diversos métodos para preparar extractos de betalaína a partir de pulpa de raíz que se procesa adicionalmente usando cromatografía de dextrano reticulado. Alternativamente, puede usarse remolacha liofilizada como material de partida como se describe en el documento de Patente US 2003/0036565, que posteriormente se muele, se extrae en disolvente, y se somete a cromatografía de dextrano reticulado para producir distintas fracciones de betalaína. Los procesos conocidos habituales que emplean secado por pulverización de un concentrado de zumo de remolacha producirán un polvo que comprende aproximadamente un 0,4 % en peso de betalaínas. Por consiguiente, aunque la mayoría de estos procesos son conceptualmente sencillos, la concentración de betalaínas es generalmente inferior a un 1 % en peso. Además, están presentes cantidades sustanciales de material que no es betalaína y se requiere purificación adicional u otro procesamiento para su retirada.

20

25

30

35

En otros métodos conocidos (por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.238.518 o el documento de Patente GB 1.559.275), se preparan extractos de betalaína estabilizados usando cromatografía de intercambio iónico en la que, entre otros compuestos, se retiran betaxantinas para producir una preparación de pigmento concentrada que a continuación se deshidrata, se redisuelve, y se combina con una gente estabilizante para formar un polvo de pigmento térmicamente estable. Tal método permite ventajosamente la producción de una forma seca relativamente concentrada de pigmentos de remolacha aunque, sin embargo, retira partes significativas de las betaxantinas y ciertas betacianinas. Del mismo modo, Garin *et al.* describen en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.409.254 un proceso en el que se somete extracto de remolacha a un pH muy bajo a cromatografía usando una resina no iónica para producir de ese modo un eluido concentrado que está concentrado en betanina y otros sólidos adsorbidos. Tales líquidos concentrados pueden comprender un 4,5 % en peso de betanina y pueden secarse hasta un contenido de betanina de aproximadamente un 25 % en peso. Desafortunadamente, tales preparaciones son generalmente higroscópicas, se aglutinan fácilmente, y tienden a deteriorarse de forma relativamente rápida.

40

45

En un esfuerzo por reducir el contenido de azúcar de una preparación de betalaína, von Elbe *et al.* describen en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.027.042 un proceso en el que se somete zumo de remolacha o pulpa de remolacha a fermentación con levadura para reducir la concentración de sacarosa. Aunque tal proceso proporciona una preparación de pigmento concentrada y elimina con éxito la sacarosa, se introducen otros productos secundarios de fermentación, que no están identificados químicamente y suponen un 25 % en peso (o incluso más) del producto final.

50

Desafortunadamente, la composición y almacenamiento de las preparaciones de betalaína conocidas actualmente se ven afectadas negativamente por los componentes que no son betalaína. Por ejemplo, las betalaínas preparadas a partir de zumo de remolacha liofilizado a menudo se aglutinan y son altamente higroscópicas. Por lo tanto, es muy difícil pesar y alicuotar tales preparaciones, especialmente cuando se distribuyen en cantidades relativamente pequeñas. Peor aún, la mayoría de las preparaciones de betalaína secas conocidas actualmente se limitan a concentraciones de betalaína de aproximadamente un 1 % en peso (betalaínas totales), y casi todos los intentos de aumentar la concentración de betalaína por extracción u otros medios también conducen a un aumento de la higroscopicidad y aglutinación. En otras preparaciones conocidas, y particularmente en aquellas con un contenido de betalaína relativamente alto, los componentes que no son betalaína conducirán generalmente a una pérdida sustancial de estabilidad en ausencia de un agente estabilizante. Además, y a menudo independientemente del contenido de betalaína, los componentes que no son betalaína están asociados generalmente a la resistencia de las betalaínas a disolverse completamente en medios acuosos.

55

60

65

Por lo tanto, aunque se conocen en la técnica numerosas composiciones y métodos de preparaciones de betalaína sólidas, todas o casi todas adolecen de desventajas. Por consiguiente, aún existe la necesidad de proporcionar composiciones y métodos mejorados para preparaciones de betalaína sólidas.

5 Otros antecedentes en la técnica incluyen:

- LEE Y N *et al.*, "Purification and Concentration of Betalaines by Ultrafiltration and Reverse Osmosis", JOURNAL OF FOOD SCIENCE, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, (19820101), vol. 47, n.º 2, doi: 10.1111/J.1365-2621.1982.TB 10105.X, ISSN 0022-1147, páginas 465 - 471,475.

10 **Sumario de la invención**

La presente invención se expone en las reivindicaciones anexas. Las realizaciones, aspectos y ejemplos de la presente descripción que no entran dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona una composición sólida que comprende al menos diez betalaínas químicamente distintas con una concentración total de betalaína de al menos un 5 % en peso y una proporción de betalaína con respecto a azúcar de al menos 0,3, en donde la composición es un sólido de flujo libre en forma de polvo que es al menos un 90 % soluble cuando se disuelve en agua a una concentración de al menos 50 mg/ml.

La presente invención se refiere a preparaciones de betalaína sólidas, de flujo libre, y fácil disolución en las que la concentración de betalaína es relativamente alta. La concentración total de betalaína es al menos un 5 % en peso, más preferentemente al menos un 10 % en peso, e incluso más preferentemente al menos un 20 % en peso con una proporción de betalaína con respecto a azúcar de al menos 0,3, más preferentemente al menos 1,0, y lo más preferentemente al menos 2,0. Las preparaciones de betalaína de acuerdo con la materia objeto de la invención se disolverán de forma fácil y sustancialmente completa en agua a altas concentraciones (habitualmente al menos un 90 %-98 % a 50-100 mg/ml).

En aspectos preferentes de la materia objeto de la invención, las betalaínas químicamente distintas de la preparación de betalaína tienen una composición casi natural y/o tienen una concentración de al menos un 10-20 % en peso. En otros aspectos preferentes, la proporción de betalaína con respecto a azúcar está entre 0,5 y 4,0, y lo más preferentemente al menos 1,0. Aunque no de forma limitante para la materia objeto de la invención, las preparaciones contempladas en el presente documento tendrán un contenido de agua residual de menos de un 15 % en peso.

Las composiciones sólidas contempladas particularmente son de flujo libre, que se caracteriza por que la composición permite la molienda hasta un tamaño adecuado para permitir que al menos un 90 % de la composición pase a través de un tamiz de malla 30, y más habitualmente incluso a través de un tamiz de malla 60. Sorprendentemente, la fluidez de las composiciones contempladas se mantiene durante periodos prolongados, incluso cuando las composiciones se almacenan en condiciones ambientales. Por lo tanto, en ciertos aspectos el flujo libre está caracterizado por la capacidad de la composición, después de moler la composición hasta un tamaño adecuado, de permitir que al menos un 90 % de la composición pase a través de un tamiz de malla 60, para permitir que al menos un 50 %, y más habitualmente al menos un 80 % de la composición fluya a través de un tamiz de malla 60 después de almacenamiento durante al menos 2 semanas a 75 °F y 50 % de humedad relativa. Por consiguiente, ahora pueden formularse o componerse suplementos nutricionales que proporcionen entre 20 y 500 mg de betalaínas totales en una dosis diaria de menos de 1000 mg.

Visto desde una perspectiva diferente, se contemplan composiciones particuladas sólidas que incluyen un extracto casi natural de betalaínas en una cantidad de al menos un 5,0 % en peso acoplado a un vehículo nutricionalmente aceptable, en donde el vehículo está presente en una cantidad menor o igual que un 98,0 % en peso de la composición, y en donde al menos un 95 % en peso de la composición es soluble en menos de 2 minutos en agua a una concentración de al menos 50 mg/ml. En tales composiciones, la concentración de betalaínas es preferentemente al menos de un 10,0 a un 20,0 % en peso, el vehículo nutricionalmente aceptable es un polisacárido, en la composición es de flujo libre.

Alternativamente, el vehículo está presente en una cantidad entre un 10 % en peso y un 40 % en peso, y el extracto casi natural de betalaínas está presente en una cantidad de al menos un 8,0 % en peso. Además, es generalmente preferente que las partículas de las composiciones contempladas tengan un tamaño adecuado para permitir que al menos un 90 % de la composición pase a través de un tamiz de malla 60, y que la composición se formule de modo que al menos un 50 % de la composición fluya a través de una malla 60 después de almacenamiento durante al menos 2 semanas a 75 °F y 50 % de humedad relativa. Por lo tanto, las composiciones contempladas pueden formularse como suplemento nutricional que se formula para proporcionar entre 20 y 500 mg de betalaínas totales en una dosis diaria de menos de 100 mg.

En otros aspectos contemplados, un método para producir un suplemento nutricional incluye una etapa de componer

las composiciones contempladas con un vehículo nutricionalmente aceptable para formar el suplemento, en donde las betalaínas están presentes en una cantidad entre 5 mg y 200 mg por ingesta diaria recomendada de suplemento; y una etapa de proporcionar información de que las betalaínas son eficaces en un sujeto humano para reducir la concentración sérica de triglicéridos, inhibir NF-kB, y/o estimular SIRT en el sujeto humano cuando se administran al sujeto. En otros aspectos preferentes, las betalaínas están presentes en el suplemento a una concentración eficaz para reducir la oxidación de LDL colesterol, aumentar HDL colesterol, y/o disminuir LDL colesterol, en una cantidad entre 5 mg y 200 mg por ingesta diaria recomendada del suplemento.

Diversos objetos, características, aspectos y ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferentes de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que representa parámetros séricos seleccionados de voluntarios humanos tratados con una composición a modo de ejemplo de la materia objeto de la invención.

La Figura 2A es un gráfico que representa la inhibición dependiente de concentración de NF-kB *in vitro* usando una composición a modo de ejemplo de la materia objeto de la invención.

La Figura 2B es un gráfico que representa la estimulación dependiente de concentración de SIRT *in vitro* usando una composición a modo de ejemplo de la materia objeto de la invención.

La Figura 2C es un gráfico que representa el cambio dependiente de concentración en los valores de ORAC de suero humano tratado con dos composiciones a modo de ejemplo de la materia objeto de la invención.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto que pueden prepararse diversas composiciones de betalaína secas (es decir, no líquidas) a partir de zumo de remolacha u otro medio que contenga betalaína líquida concentrando en primer lugar las betalaínas en ciertas resinas modificadas hidrófobamente. Inesperadamente, las resinas modificadas parecen retirar una fracción significativa de componentes que no son betalaína que de otro modo conducirían a aglutinación, inestabilidad, y/o resistencia a la disolución completa en disolventes acuosos. Las composiciones obtenidas de ese modo exhiben notablemente altas concentraciones de betalaínas (por ejemplo, mayor de un 20 % en peso) con una estabilidad química significativamente aumentada mientras que al mismo tiempo permiten formar un polvo de flujo libre que mantiene la fluidez durante periodos prolongados de tiempo, incluso cuando se almacena en condiciones ambientales. Además, las composiciones de betalaína de acuerdo con la materia objeto de la invención se disolverán de forma sencilla y sustancialmente completa en un disolvente acuoso, incluso a altas concentraciones.

Se ha de entender especialmente que, según el mejor conocimiento de los inventores, las ventajas interiores no se han conseguido en las composiciones de betalaína conocidas hasta la fecha tales como composiciones que habitualmente tenían un contenido de betalaína relativamente bajo (habitualmente inferior a un 1 % en peso) y una inestabilidad química significativa o, cuando la concentración era relativamente alta, no podían pulverizarse y/o mantenerse en forma de polvo seco con carácter de flujo libre. Casi invariablemente, las composiciones de betalaína conocidas con un contenido relativamente alto de betalaína se aglutinaban con facilidad y no se disolvían rápidamente, lo que en este caso evitaba la distribución medida de composiciones de betalaína secas en cantidades pequeñas y controladas.

En un aspecto del aspecto inventivo de la materia objeto de la invención, los inventores han descubierto que puede prepararse una composición de betalaína sólida de flujo libre que incluye al menos diez betalaínas químicamente distintas a una concentración total de betalaína de al menos un 5 % en peso y una proporción de betalaína con respecto a azúcar de al menos 0,3. Tales composiciones son composiciones sólidas que son solubles al menos en un 90 % en peso (más habitualmente al menos un 95 %, y lo más habitualmente al menos un 98 %) cuando se disuelven en agua a una concentración de al menos 50-100 mg/ml. La expresión "de flujo libre", como se usa en el presente documento, significa que al menos un 90 % de una pluralidad de partículas separadas e individuales permanecerán separadas e individuales en un recipiente voluminoso cuando se almacenan durante un período de 24 horas a temperatura y humedad ambientales (75 °F y 50 % de humedad relativa). De ese modo, un polvo de partículas pequeñas de flujo libre puede verse desde un recipiente en un flujo continuo en el que sustancialmente la misma masa abandona el recipiente en el mismo intervalo de tiempo. Por el contrario, los materiales sin flujo libre se aglutinarán conjuntamente para formar agregados de tamaño y peso indefinidos y por lo tanto no pueden verse desde el recipiente en un flujo continuo en el que sustancialmente la misma masa abandona el recipiente en el mismo intervalo de tiempo.

En ejemplos más habituales de acuerdo con la materia objeto de la invención, la composición de betalaína seca tiene una concentración total de betalaína de al menos un 4,0 % en peso, más habitualmente al menos un 10,0 % en peso, incluso más habitualmente al menos un 15,0 % en peso, y lo más habitualmente al menos un 20,0 % en peso. Se ha de observar que la composición química de las preparaciones de betalaína de acuerdo con la materia objeto de la invención es una composición compleja que incluye al menos diez betalaínas químicamente distintas. De ese modo,

la preparación compleja incluirá tanto betaxantinas como betacianinas. Lo más preferentemente, las preparaciones de betalaína presentadas en el presente documento tienen una composición casi natural (es decir, ninguna betacianina o betaxantina individual presente originalmente en la remolacha está concentrada o reducida más de un 30 % [y más habitualmente más de un 15-20 %] con respecto a la composición natural). Puede realizarse un análisis de betalaínas y composiciones complejas como se describe en Corke *et al.* (J Chromatogr Sci. Oct. 2005; 43(9):454-60) o Pourrat *et al.* (Journal of Food Science 53(1), 294-295). De ese modo, las preparaciones habituales incluirán al menos diez, más habitualmente al menos veinte, y lo más habitualmente al menos 25 betalaínas químicamente distintas.

Dependiendo del material de origen particular y los disolventes usados, se ha de observar que la proporción de betalaína con respecto a azúcar en las composiciones contempladas es al menos 0,3, más habitualmente al menos 0,5, incluso más habitualmente al menos 1,0, y lo más habitualmente al menos 2,0. Visto desde una perspectiva diferente, las preparaciones más preferentes tendrán una proporción de betalaína con respecto a azúcar entre 1,0 y 5,0, e incluso más habitualmente entre 2,5 y 4,5. Con respecto a los azúcares remanentes en las composiciones contempladas, debería reconocerse que la naturaleza química variará dependiendo del material de partida y el procesamiento. Sin embargo, los azúcares remanentes más habituales incluidos pueden ser mono, oligo, y/o polisacáridos, alditoles, y pectinas. De ese modo, se ha de entender que cuando se ha de reducir la concentración de oligo, y/o polisacáridos, pueden usarse procesos enzimáticos o de fermentación para conseguir tal reducción. Además, o alternativamente, pueden retirarse monosacáridos residuales usando diversas formas conocidas en la técnica, incluyendo ultrafiltración, tamizado molecular, y/o conversión enzimática.

Con respecto al contenido de agua residual de las composiciones contempladas, es generalmente preferente que el contenido de agua sea suficientemente bajo para permitir que el producto sea de flujo libre en forma de polvo o molido de otro modo. Para ello, se consideran adecuados numerosos métodos de secado e incluyen secado con aire, liofilización, secado en tambor, etc. Habitualmente, el contenido de agua residual es menor o igual que un 20 % en peso, más habitualmente menor o igual que un 15 % en peso, y lo más habitualmente menor o igual que un 10 % en peso. Además, se ha de observar que, dependiendo de la forma particular de secado, las composiciones contempladas pueden molerse o pulverizarse de otro modo para formar un producto pulverizado que se compone, mezcla, o dispensa de otro modo fácilmente. Tal forma molida tendrá preferentemente un tamaño similar de partícula, y es especialmente preferente que al menos un 60 %, y más habitualmente al menos un 80 % de las partículas tenga una variación de tamaño de menos de un 20 % medida en la mayor dimensión. Por ejemplo, pueden procesarse composiciones preferentes de modo que al menos un 50 % (y más preferentemente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, e incluso más) de la composición fluya a través de un tamiz de malla 18, más preferentemente malla 30, y lo más preferentemente malla 60 (malla US, indicando el numeral el número de tamiz). Por lo tanto, el procesamiento contemplado especialmente incluye corte, trituración, y molienda. Por otra parte, y especialmente cuando el proceso de secado incluye secado por pulverización, se contempla que el producto producido de ese modo tenga un tamaño medio de partícula de 20-800 micrómetros, más habitualmente 50-500 micrómetros, y lo más habitualmente 100-300 micrómetros.

En particular, se debe entender que las composiciones y métodos de acuerdo con la materia objeto de la invención permiten inesperadamente la producción de una composición de betalaína que tiene y mantiene carácter de flujo libre durante periodos prolongados de tiempo, incluso cuando tales composiciones complejas se almacenan en condiciones ambientales. Aunque sin el deseo de quedar unidos a ninguna teoría o hipótesis, los inventores contemplan que el uso de los soportes cromatográficos modificados hidrófobamente específicos en la composición de los extractos de betalaína permite retirar la mayoría de, o incluso todos, los compuestos que de otro modo conducirían a aglutinación, alto contenido de agua residual, higroscopicidad, carencia de estabilidad química, y otros efectos indeseados asociados a las composiciones de betalaína complejas conocidas, y especialmente las composiciones de betalaína concentradas (por ejemplo, al menos un 2 % en peso, más habitualmente al menos un 10 % en peso).

Entre las numerosas modificaciones hidrófobas que no produjeron parámetros de producto deseados, ciertas modificaciones hidrófobas produjeron inesperadamente parámetros de producto deseados. Estas modificaciones incluyen aquellas en las que el grupo modificador tiene múltiples anillos con configuración generalmente plana y en los que al menos un anillo tiene carácter aromático (lo más preferentemente un grupo benzoquinona o una estructura benzoquinoides en el que un átomo de oxígeno está reemplazado con un grupo en el que pueden deslocalizarse electrones pi del anillo). Notablemente, otras estructuras hidrófobas aparente y estrechamente relacionadas inmovilizadas en una resina (por ejemplo, polímero orgánico o sílice) no proporcionaron productos con parámetros deseables. Nuevamente, aunque sin imitar la materia objeto de la invención, los inventores contemplan que las betalaínas se asociarán con las modificaciones de resina mediante "apilamiento pi" mientras que permitirán el paso de compuestos indeseables. En otros aspectos de la materia objeto de la invención, la modificación hidrófoba se acopló covalentemente a la resina (sílice o estireno, activado apropiadamente cuando fue necesario [por ejemplo, usando gamma-aminopropilsilano para sílice o estireno clorometilado o activado anhídrido]), preferentemente mediante un resto conector que tiene una longitud equivalente a al menos 3 enlaces carbono-carbono.

Por ejemplo, y usando tales soportes cromatográficos modificados hidrófobamente, las composiciones preparadas como se describe adicionalmente con posterioridad pueden almacenarse durante periodos prolongados en condiciones ambientales controladas (75 °F y 50 % de humedad relativa) durante al menos 2 días, más habitualmente entre 2 días y dos semanas, y lo más habitualmente entre 2 semanas y 2 meses (e incluso más) sin pérdida del carácter de flujo libre ni degradación aparente. Tales composiciones tienen un contenido de betalaína habitualmente

de un 2-5 % en peso, más habitualmente de un 5-10 % en peso, y lo más habitualmente de un 10-40 % en peso. Notablemente, incluso después de almacenamiento prolongado, al menos un 60-70 %, más habitualmente al menos un 80 %, y lo más habitualmente al menos un 90 % fluirán a través del mismo filtro de malla. Además, la solubilidad (al menos un 90 % de la composición de betalaína, más habitualmente al menos un 92 %, incluso más habitualmente al menos un 95 %) de las composiciones de betalaína preparadas de ese modo exhibió una solubilidad en agua notable, habitualmente al menos entre 0,1 mg/ml y 1 mg/ml, más habitualmente al menos entre 1 mg/ml y 10 mg/ml, incluso más habitualmente al menos entre 10 mg/ml y 50 mg/ml, y lo más habitualmente al menos entre 50 mg/ml y 100 mg/ml, e incluso más.

En otro ejemplo, los inventores también han descubierto que puede prepararse una composición de betalaína que es una composición particulada que comprende un extracto casi natural de betalaínas a una concentración de al menos un 5 % en peso donde las betalaínas están asociadas físicamente a un vehículo a una concentración menor o igual que un 98,0 % en peso (y más habitualmente menor que un 95 % en peso), en donde la composición es una composición sólida que es soluble en al menos un 90 % en peso (y más habitualmente al menos un 95 % en peso) cuando se disuelve en agua. Habitualmente, tales preparaciones son de flujo libre y mantienen el carácter de flujo libre durante al menos 2 semanas cuando se almacenan en condiciones ambientales. Con respecto a concentraciones de betalaína preferentes y la naturaleza químicamente compleja de las preparaciones de betalaína, se aplican las mismas consideraciones que se han indicado anteriormente.

En aspectos particularmente preferentes, el vehículo es un vehículo nutricional y/o farmacéuticamente aceptable con un porcentaje en peso relativamente alto. Lo más habitualmente (pero no necesariamente), el vehículo es un vehículo soluble y presente en una concentración entre un 10 % en peso y un 40 % en peso, y el extracto casi natural de betalaínas está presente en una concentración de al menos un 8,0 % en peso. Por ejemplo, el vehículo puede ser (basarse en) un sacárido soluble en agua nutricionalmente aceptable, y lo más habitualmente un polisacárido. Vehículos alternativos pueden ser insolubles y orgánicos (por ejemplo, almidón modificado) o inorgánicos (por ejemplo, sílice). En tales preparaciones, generalmente es preferente que la preparación de betalaína provenga de una mezcla, pasta, o suspensión que a continuación se seca por pulverización al producto de flujo libre final.

De forma similar a las preparaciones anteriores, habitualmente es preferente que la composición tenga un contenido de agua residual de menos de un 20 % en peso (más habitualmente menos de un 15 % en peso, e incluso más habitualmente menos de un 10 % en peso), y que la preparación se formule de modo que al menos un 50 % de la composición fluya a través de una malla 60 después de almacenamiento durante al menos 2 días a 75 °F y 50 % de humedad relativa. Sin embargo, más preferentemente, al menos un 60 %, 70 %, 80 %, o incluso un 90 % y más fluirán a través de tal malla (que puede ser incluso más fina). Del mismo modo, y especialmente cuando la concentración de betalaína es superior a un 5 % en peso, es generalmente preferente que las características de flujo anteriores se mantengan durante más de 2 días de almacenamiento, incluyendo tiempos de almacenamiento entre 2 días y 2 semanas, y lo más preferentemente tiempos de almacenamiento entre 2 semanas y 2 meses (e incluso mayores). Por lo tanto, las partículas de la composición particulada tendrán habitualmente un tamaño que es adecuado para permitir que al menos un 90 % de la composición pase a través de un tamiz de malla 60, y la composición se formula de modo que al menos un 50 % (y más habitualmente al menos un 60 %, 70 %, 80 %, o incluso un 90 % y más) de la composición fluya a través de una malla 60 después de almacenamiento durante al menos 2 semanas a 75 °F y 50 % de humedad relativa (los tamaños de malla US estándares se proporcionan, por ejemplo, en ASTM E-11-1987).

Independientemente de la formulación particular, los inventores han descubierto además que las composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención tienen diversas actividades notables, deseables y desconocidas hasta la fecha cuando se administran un ser humano. Entre otros efectos, los inventores han descubierto que las composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención reducen los niveles séricos de triglicéridos, aumentan la proporción HDL/LDL colesterol, reducen la concentración de LDLox, y/o reducen y normalizan la glucosa en sangre (en ayunas y en condiciones de estimulación). Además, las composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención también inhibieron significativamente y de forma dependiente a la concentración la actividad de NF- κ B (*in vitro*). En otros efectos observados, las composiciones de betalaína contempladas también aumentaron significativamente la expresión de SERT (desacetilasa dependiente de NAD: homólogo mamífero de Sir2 [regulador de información silente 2]). Lo más notablemente, la estimulación de SIRT se consiguió a concentraciones que fueron varios órdenes de magnitud inferiores que la estimulación de SIRT comparable usando resveratrol.

Por lo tanto, las composiciones contempladas pueden usarse en profilaxis y/o tratamiento de diversas afecciones, especialmente las asociadas a niveles séricos de triglicéridos elevados, bajo nivel de HDL/LDL colesterol, oxidación de LDL colesterol, glucosa en sangre aumentada, tolerancia a la glucosa reducida, y/o disfunción mitocondrial. Afecciones y enfermedades adecuadas adicionales que responderán positivamente a la administración de las composiciones contempladas incluyen dislipidemia, hipercolesterolemia, enfermedad arterial coronaria, síndrome metabólico, obesidad, y efectos degenerativos debidos al envejecimiento. Aunque sin limitar la materia objeto de la invención, los inventores han descubierto que las composiciones de betalaína, cuando se administran a voluntarios humanos a dosis relativamente bajas (por ejemplo, 3 veces, 100 mg por día, composición con un contenido de betalaína de aproximadamente un 30 % en peso), inhibieron significativamente la actividad de CETP en el torrente sanguíneo. Por consiguiente, los compuestos contemplados pueden administrarse para controlar el tamaño de las partículas de HDL y para aumentar la concentración sérica de HDL.

En otros aspectos contemplados, pueden combinarse agentes nutricionales y/o farmacéuticos adicionales con las preparaciones de betalaína, y particularmente incluyen los que afectan positivamente a al menos uno de glucosa en sangre y lípidos en sangre. Existen numerosos de tales agentes conocidos en la técnica, y todos ellos se consideran adecuados para su uso en el presente documento. Sin embargo, agentes adicionales especialmente preferentes incluyen agentes insulínотrónicos, vitaminas, minerales, y otros extractos y preparaciones vegetales (por ejemplo, extracto de brotes, extracto de cereza café, etc.). Por ejemplo, pueden combinarse composiciones que contienen 4-hidroxiisoleucina o cromo con las composiciones de betalaína contempladas, en donde la 4 hidroxiisoleucina puede ser sintética o, más preferentemente, aislada o enriquecida a partir de extracto de semillas (por ejemplo, semillas de fenogreco), y en donde el cromo está preferentemente en una matriz compleja soluble en agua.

De ese modo, un método para ayudar a un sujeto humano a reducir la concentración de triglicéridos puede incluir una etapa de proporcionar una composición que comprende una betalaína (o mezcla de betalaínas) a una concentración eficaz para reducir la concentración sérica de triglicéridos. Tal composición, lo más preferentemente, reduce además la oxidación de LDL colesterol en el sujeto humano, aumenta el HDL colesterol y/o disminuye el LDL colesterol. En métodos especialmente preferentes, las betalaínas están presentes en una cantidad entre 5 mg y 200 mg por dosis diaria recomendada.

Por consiguiente, se contemplan kits, suplementos nutricionales, y artículos alimenticios que comprenden un componente comestible que incluye preferentemente las composiciones contempladas en el presente documento e instrucciones asociadas al componente comestible que informan a una persona que el consumo oral del artículo alimenticio estimula SIRT, inhibe NF-kB, reduce la concentración sérica total de triglicéridos, y/o reduce la oxidación de LDL colesterol en un sujeto humano. Cuando sea deseable, también pueden asociarse al producto un kit de autoevaluación o instrucciones para el mismo para permitir que un usuario ensaye diversos parámetros fisiológicos (por ejemplo, LDLox, HDL, LDL, colesterol total, estrés oxidativo, triglicéridos, glucosa en sangre, etc.). Aunque los artículos contemplados pueden formularse de numerosas formas, generalmente es preferente que el artículo se formule en forma de un comprimido, una cápsula, una formulación lista para mezclar o una gragea. Formulaciones alternativas también incluyen infusiones de aceite, geles blandos, revestimientos para cápsulas, y tinturas líquidas. Lo más preferentemente, las composiciones de betalaína contempladas se formulan en forma de un suplemento nutricional que proporciona entre 20 y 500 mg de betalaínas totales en una dosis diaria recomendada, y donde el suplemento es una cápsula, comprimido, gragea, u otra formación compacta en la que los 20 a 500 mg de betalaínas totales son administrables en una cantidad total de menos de 1000 mg.

Además, las composiciones contempladas pueden incluir la composiciones de betalaína desveladas en el presente documento, en combinación con al menos un ingrediente nutricionalmente beneficioso adicional. Por ejemplo, y cuando sea apropiado, está presente un agente insulínотrónico (por ejemplo, 4-OH-leu) en una cantidad entre 20 mg y 500 mg por dosis diaria recomendada. Otros ingredientes incluyen compuestos químicamente definidos (por ejemplo, vitaminas, cofactores, minerales, fibras solubles e insolubles, agentes que aumentan el anabolismo o catabolismo), pero también mezclas químicamente complejas y especialmente extractos vegetales. Entre otros extractos contemplados, son especialmente preferentes preparaciones de cereza de café en el presente documento.

Ejemplos

Procesos de extracción a modo de ejemplo

Opción 1: la extracción comenzó con zumo de remolacha disponible comercialmente (aproximadamente 65 brix; obtenido de SVZ International) que tenía un contenido total de betalaína de aproximadamente un 0,6 % en peso en base seca. El zumo se filtró para retirar los materiales particulados y el filtrado se usó sin ninguna modificación adicional para cromatografía. Se empaquetó una columna con una resina de sílice modificada hidrófobamente (disponible comercialmente como Resina HSI-564 de VDF Futureceuticals; Momenca, IL 60954), y el zumo filtrado se hizo pasar a través de una columna a 1-50 volúmenes de lecho por hora con una carga de 1-20 volúmenes de lecho. Las fracciones pasadas se descartaron, y las betalaínas se eluyeron de la resina usando un tampón suave a pH ligeramente básico (por ejemplo, acetato amónico 0,1-0,2 M en agua, pH 8,2 a 8,4, a una temperatura de 110 °F, o carbonato amónico 0,1-0,2 M en agua a un intervalo de pH de 7,0 a 9,0, misma temperatura). El eluido obtenido de ese modo se liofilizó sin modificación adicional en un producto seco. El análisis cuantitativo del producto reveló un contenido total de betalaína de aproximadamente un 15 % en peso con azúcar total de un 6 % en peso y un contenido de agua residual de aproximadamente un 8 % en peso. El producto seco se molió a continuación usando un molinillo de aspas giratorias para formar un producto en polvo que se paso a través de un tamiz de malla 60. Lo más notablemente, más de un 90 %, y más habitualmente más de un 95 % del producto seco de flujo libre se disolvió en menos de 2 minutos a una concentración entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, más habitualmente a una concentración entre 10 mg/ml y 50 mg/ml, y lo más habitualmente a una concentración entre 50 mg/ml y 100 mg/ml (y en algunos casos mayor, tal como entre 100 mg/ml y 200 mg/ml). Incluso más notablemente, el producto fue estable durante almacenamiento de al menos 2 semanas a 75 °F y 50 % de humedad relativa sin ningún cambio observable en composición, fluidez libre, u otros parámetros, y no se aglutinó en partículas mayores o grumos. De hecho, después de almacenamiento de 2 semanas (y mayor) en las condiciones definidas, sustancialmente la misma cantidad (> 90 %) del polvo seco paso a través de un tamiz de malla del mismo tamaño de malla.

Opción 1: la extracción comenzó como se indicó anteriormente con zumo de remolacha disponible comercialmente (aproximadamente 65 brix; obtenido de SVZ International) que tenía un contenido total de betalaína de aproximadamente un 0,6 % en peso en base seca. El zumo se filtró para retirar los materiales particulados y el filtrado se usó sin ninguna modificación adicional para cromatografía. Se empaquetó una columna con una resina de estireno modificada hidrófobamente (disponible comercialmente como Resina HST-226 de VDF Futureceuticals), y el zumo filtrado se hizo pasar a través de una columna a 1-50 volúmenes de lecho por hora con una carga de 1-20 volúmenes de lecho. Las fracciones pasadas se descartaron, y las betalaínas se eluyeron de la resina usando un tampón suave a pH ligeramente básico (por ejemplo, acetato amónico 0,1-0,2 M en agua, pH 8,2 a 8,4, a una temperatura de 110 °F, o carbonato amónico 0,1-0,2 M en agua a un intervalo de pH de 7,0 a 9,0, misma temperatura). Sin secar como se ha descrito anteriormente, el eluido obtenido de ese modo se mezcló con un polisacárido soluble en agua (por ejemplo, a una concentración final de maltodextrina de un 30 % en peso) como vehículo y se liofilizó en un producto seco que tenía aproximadamente un 10 % en peso de betalaínas con un contenido donde azúcar de un 45 % en peso y un contenido de agua residual de aproximadamente un 5 % en peso. El tamaño medio de partícula del producto liofilizado fue aproximadamente 150 micrómetros (paso a través de un tamiz de malla 60) y más de un 90 % (y más habitualmente más de 95 %) del producto seco de flujo libre se disolvió en menos de 2 minutos a una concentración entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, más habitualmente a una concentración entre 10 mg/ml y 50 mg/ml, y lo más habitualmente a una concentración entre 50 mg/ml y 100 mg/ml (y en algunos casos mayor, tal como entre 100 mg/ml y 200 mg/ml). Como se ha indicado anteriormente, el producto fue estable durante almacenamiento de al menos 2 semanas a 75 °F y 50 % de humedad relativa sin ningún cambio observable en composición, fluidez libre, u otros parámetros, y no se aglutinó en partículas mayores o grumos. Una vez más, después de almacenamiento de 2 semanas (y mayor) en las condiciones definidas, sustancialmente la misma cantidad (> 90 %) del polvo seco paso a través de un tamiz de malla del mismo tamaño de malla.

Análisis de preparaciones de betalaína

Se analizaron diversas preparaciones que contenían betalaína disponibles comercialmente (Comp. 1 a Comp. 4) para concentración de betalaína, concentración de azúcar, e higroscopicidad, y los resultados se enumeran en la siguiente tabla. La higroscopicidad no se determinó para los ejemplos comparativos ya que estaban demasiado aglutinados o eran un líquido.

Composición	% en peso de betalaína UV	% en peso de azúcar	Proporción B/A	Higroscopicidad
Comp. 1: remolacha en polvo secada con aire	0,565 (0,59, 0,54)	54,2 (64,62, 43,72)	0,01 (0,008-0,013)	N/C
Comp. 2: concentrado de zumo de remolacha de 65 brix	0,587 (0,51, 0,48, 0,77)	45,3 (44,36, 46,31)		N/C
Comp. 3: remolacha en polvo secada por pulverización	0,43	32,6 (no comprobado para maltosa)	0,013	N/C
Comp. 4: zumo de remolacha de concentración única	0,14	6	0,06	N/C
Ejemplo de la invención	22 (0,05-45,5)	5-8 (0,0-82,5)	3 (?) (2,75-4,4)	6-12 % de humedad

Métodos de análisis: el % en peso de betalaína se midió mediante espectroscopía UV como se perfila en UV FCCM C.52.1. El contenido de azúcar en % en peso se determinó por HPLC como se perfila en el método 982.14 de AOAC. La higroscopicidad se determinó situando las muestras en cámaras de humedad relativa del 32 % (cloruro de magnesio saturado), 52 % (nitrato de magnesio) y 93 % (nitrato de potasio) a una temperatura de 25 °C y comprobando posteriormente el % en peso de humedad después de 72 horas de equilibrado de la muestra como se perfila en FCCM P.1.1. El ejemplo de la invención se preparó de acuerdo con la Opción 1 anterior y fue un polvo de flujo libre cuando se preparó y almacenó a un 52 % de humedad relativa. El producto tenía un contenido de agua residual de un 10,6 %. Por supuesto, se debería entender que puede emplearse una etapa de filtración de membrana adicional y otras etapas de separación (o usar un material de partida más concentrado) para concentrar adicionalmente las composiciones.

Ensayos con voluntarios humanos

Se completaron dos tratamientos independientes en voluntarios humanos con cuatro y tres individuos,

respectivamente. Cada voluntario recibió una composición de betalaína concentrada en una dosis total de 100 mg que contenía aproximadamente 30 mg de betalaínas totales, tres veces al día, durante tres días consecutivos. No se informó ningún efecto adverso. Los análisis de marcadores en suero incluyeron HDL, LDL, TC, triglicéridos, glucosa, y LDLox. La **Figura 1** representa los resultados (GLC representa glucosa en sangre: el Individuo 7 fue 140/124 (antes/después), Individuo 4: 138/126 (antes/después); TRG representa triglicéridos totales: Individuo 7: 339/238 (antes/después), Individuo 4, 342/260 (antes/después), Individuo: > 650/580 (antes/después), Individuo 3: 463/317 (antes/después)). Por lo tanto, la administración 3 veces al día de 100 mg de la composición de acuerdo con la materia objeto de la invención muestra un efecto significativo, principalmente en triglicéridos pero también en glucosa en sangre.

Efectos in vitro de las composiciones contempladas con aproximadamente un 30 % en peso de betalaínas totales

La **Figura 2A** representa resultados a modo de ejemplo de inhibición *in vitro* dependiente de concentración de Nf-kB usando composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención. Aquí, se estimularon células HL-60 con 10 ng/ml de TNF-alfa para aumentar la actividad de Nf-kB y se usaron para establecer valores basales. La adición de una composición de betalaína (indicada mediante % en peso de betalaína en medio) preparada de forma similar a la Opción 1 anterior dio como resultado una inhibición fuerte y significativa de la activación de Nf-kB inducida por TNF-alfa de forma dependiente a la dosis. El nivel de actividad de Nf-kB se midió mediante un kit de ELISA de Cayman Inc., y el cultivo celular siguió protocolos bien conocidos.

La **Figura 2B** representa resultados a modo de ejemplo de estimulación *in vitro* dependiente de concentración de SIRT usando composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención. Más específicamente, se monitorizó la expresión de SIRT1 en células HT-29 después del tratamiento con la misma composición que en el experimento anterior; las células HT-29 se trataron en medio con la composición durante 4 h antes del ensayo de actividad de SIRT, que usó un sustrato fluorescente disponible comercialmente para SIRT (obtenido en Biomol, Inc.). El protocolo experimental siguió básicamente el protocolo proporcionado por el kit de ensayo. Como es claramente evidente, las composiciones de acuerdo con la materia objeto de la invención exhibieron un fuerte y significativo efecto. De hecho, los resultados posteriores demuestran un fuerte efecto estimulador a una concentración que es solo un 2,2 % de la de estimulación con resveratrol.

La **Figura 2C** representa datos a modo de ejemplo que muestran un fuerte y significativo aumento de valores de ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno) en suero humano por parte de las composiciones contempladas. Nuevamente, el aumento en ORAC fue dependiente de la concentración y el aumento de RBE en ORAC se comparó con Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como control.

Parámetro	Extracto de remolacha	
	Tipo 1	Tipo 2
Reducciones de lípidos	+++	+
Reducción de glucosa	++	0
Reducción de TRG	++++	+
Estimulación de SIRT	(+++)	+
Inhibición de Nf-kB	+	+++
Aumento sérico de ORAC	+++	+++
Reducción de CRP	(+)	(+++)
Reducción de LDLox	(+)	(+++)
Betalaínas distintas totales	25	30

REIVINDICACIONES

1. Una composición sólida que comprende al menos diez betalaínas químicamente distintas con una concentración total de betalaína de al menos un 5 % en peso y una proporción de betalaína con respecto a azúcar de al menos 0,3, en donde la composición es un sólido de flujo libre en forma de polvo que es al menos un 90 % soluble cuando se disuelve en agua con una concentración de al menos 50 mg/ml.
2. La composición de la reivindicación 1 en donde el sólido de flujo libre se caracteriza por que la composición permite la molienda hasta un tamaño adecuado que permite que al menos un 90 % de la composición pase a través de un tamiz de malla 30, y más preferentemente a través de un tamiz de malla 60.
3. La composición de la reivindicación 1 en donde el sólido de flujo libre se caracteriza por la capacidad de la composición, después de moler la composición hasta un tamaño adecuado, para permitir que al menos un 90 % de la composición pase a través de un tamiz de malla 60, para permitir que al menos un 50 %, y más preferentemente al menos un 80 % de la composición fluya a través del tamiz de malla 60 después de almacenamiento durante al menos 2 semanas a 23,9 °C [75 °F] y un 50 % de humedad relativa.
4. La composición de la reivindicación 1 en donde la concentración de betalaínas es al menos un 10,0 % en peso.
5. La composición de la reivindicación 1 en donde la proporción de betalaína con respecto a azúcar es al menos 1,0.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición se formula como suplemento nutricional.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde el suplemento se formula para uso para (a) reducir la oxidación de LDL colesterol, (b) aumentar HDL colesterol; y/o (c) disminuir LDL colesterol.
8. La composición de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el suplemento se formula para proporcionar entre 20 y 500 mg de betalaínas totales en una dosis diaria de menos de 1000 mg.
9. Un método para producir un suplemento nutricional que comprende las etapas de:
componer la composición de la reivindicación 1 con un vehículo nutricionalmente aceptable para formar el suplemento, en donde las betalaínas están presentes en una cantidad entre 5 mg y 200 mg por ingesta diaria recomendada del suplemento; y
proporcionar información de que las betalaínas son eficaces en un sujeto humano para reducir la concentración sérica de triglicéridos en el sujeto humano cuando se administran al sujeto.
10. El método de la reivindicación 9 en donde la composición se formula de modo que al menos un 50 %, y más preferentemente al menos un 80 % de la composición fluya a través de una malla 60 después de almacenamiento durante al menos 2 semanas a 23,9 °C [75 °F] y un 50 % de humedad relativa.

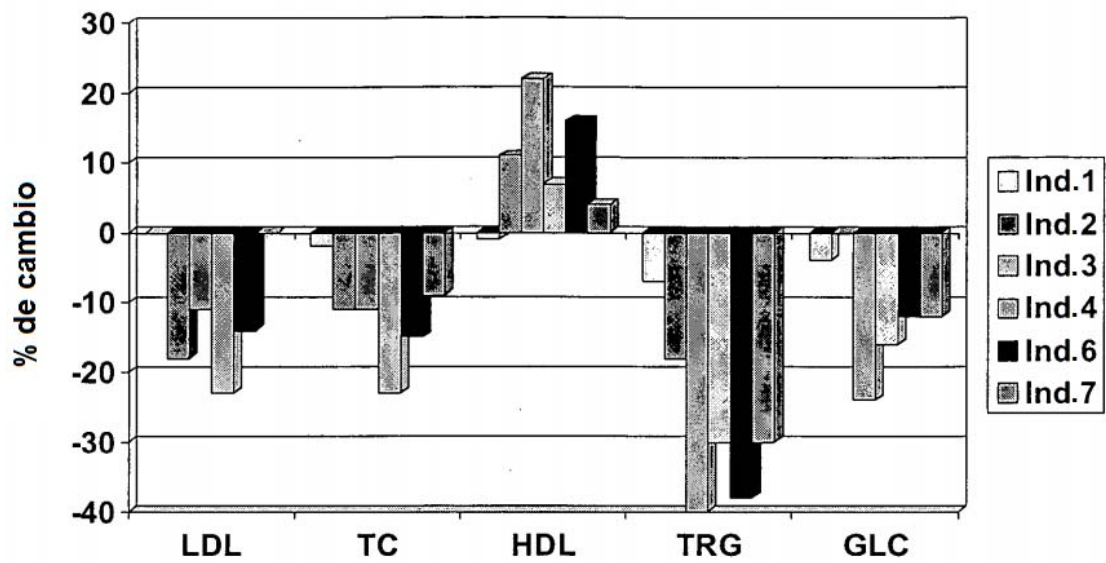


Figura 1

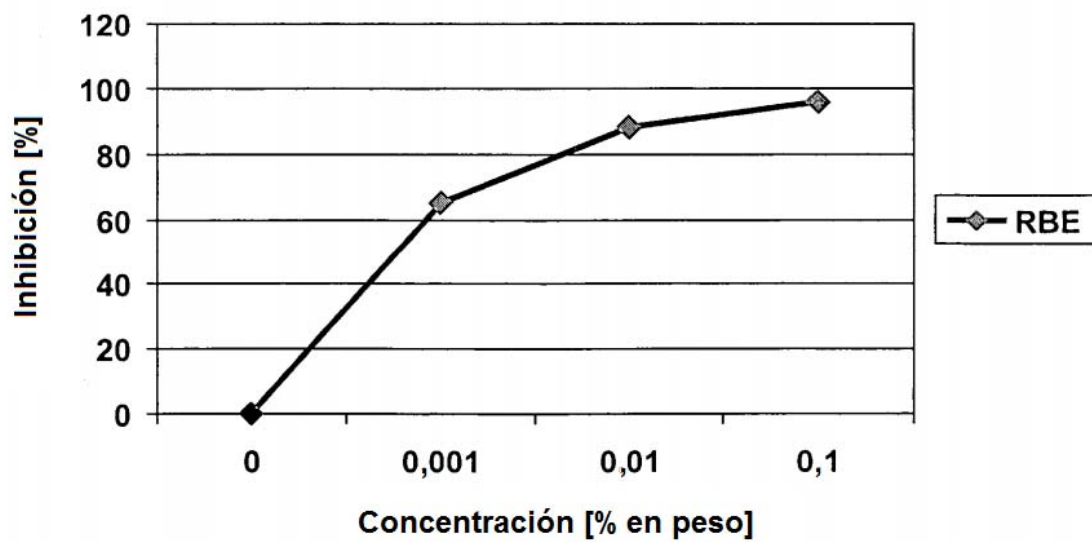


Figura 2A

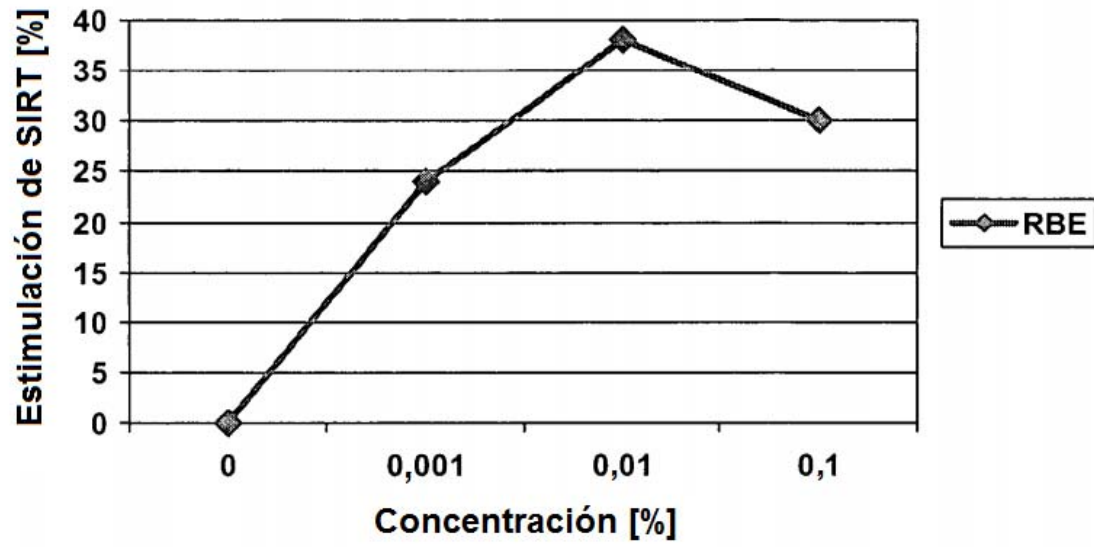


Figura 2B

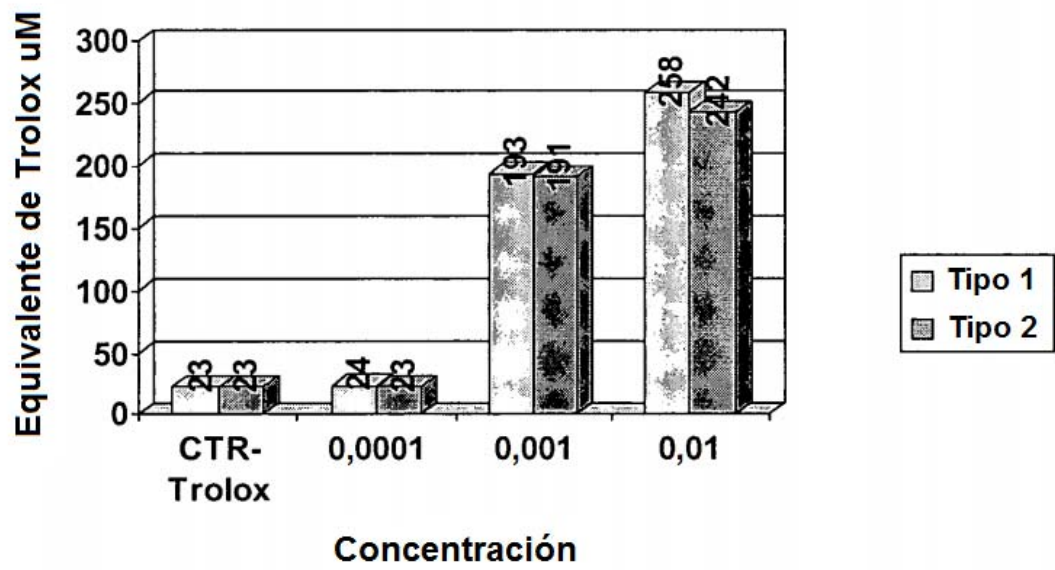


Figura 2C