

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 004**

21 Número de solicitud: 201630209

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

24.02.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.08.2017

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GUINDA GARÍN, Angeles;
RADA, Mirela y
CASTELLANO OROZCO, José María**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE OLEUROPEÍNA**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de oleuropeína.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de oleuropeína a partir de hojas de olivo que comprende las siguientes etapas: a) secado de las hojas de olivo; b) peletizado de las hojas secas obtenidas en la etapa (a); y c) extracción sólido/líquido de los pellets obtenidos en la etapa (b) con un disolvente seleccionado de agua, metanol, etanol y cualquiera de sus mezclas.

ES 2 631 004 A2

Procedimiento de obtención de oleuropeína

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de oleuropeína, por lo tanto, se puede encuadrar en el campo técnico de la extracción de productos naturales del olivo.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

La oleuropeína es un componente fenólico presente en la pulpa de las aceitunas y también en las hojas de olivo (*Olea europea*).

15

Las propiedades farmacológicas del aceite de oliva, de las aceitunas y las hojas de olivo han sido reconocidas en medicina y en una dieta sana debido a su contenido en fenoles.

20

Numerosos estudios han demostrado que la oleuropeína posee una amplia gama de propiedades farmacológicas y promotoras de la salud, incluyendo sus efectos como antioxidante, antiinflamatorio, anti-aterogénico, anti-cancerígeno, antimicrobiano y antiviral. Se han publicado revisiones específicas sobre los efectos farmacológicos de los biofenoles del olivo y de la acción protectora del secoiridoide oleuropeína en estudios preclínicos sobre enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Bulotta *et al. J. Transl. Med.* 2014, 12, 219; Obied *et al. Pharmacology of olive biophenols. In: J. C. Fishbein, & J. M. Heilman (Eds.), Advances in molecular toxicology* 2012, 195-223, Amsterdam: Elsevier).

25

Por los motivos anteriormente expuestos, la oleuropeína es un complemento alimenticio muy valorado.

30

Existen diversos procedimientos de obtención de oleuropeína en el estado del arte, que principalmente son procedimientos de extracción por maceración de partes del olivo que comprenden oleuropeína, principalmente de las aceitunas verdes. Sin embargo, también se han descrito procedimientos de extracción de oleuropeína a partir de hojas de olivo. Por ejemplo, Job Nexar-QH (*An Fac med.* 2013, 74(4), 285-290) describe la preparación de un extracto hidroalcohólico de hojas de *Olea europea*.

35

Para ello, las hojas se secan a temperatura ambiente y se pulverizan, posteriormente se añade etanol al 96% y agua y se deja macerar 8 días. Por su parte, el documento WO2005075614A1 resume las características comunes de los procedimientos de extracción de los compuestos presentes en las hojas de olivo: se suele secar y/o
5 moler la hoja, se extrae con un disolvente orgánico, con agua o con mezclas disolvente orgánico/agua, y en algunos casos se utiliza extracción Soxhlet, finalmente el extracto obtenido se suele concentrar o desecar mediante evaporación o liofilización.

10 Sin embargo, se siguen necesitando procedimientos efectivos de extracción de oleuropeína de las diferentes partes del olivo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de oleuropeína.

La presente invención presenta las siguientes ventajas:

- 20 - presenta un método eficaz para la extracción de oleuropeína de hoja de olivo, por lo tanto, da valor añadido a una materia prima que no tiene tanto valor como las aceitunas;
- el uso de pellets en la extracción hace más efectiva la extracción de oleuropeína ya que permite obtener una mayor cantidad del compuesto;
- el uso de pellets además tiene la ventaja de que hace más fácil el manejo y
25 transporte de la materia prima; y
- la oleuropeína obtenida por el procedimiento de la invención presenta alta pureza.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de oleuropeína a partir de hojas de olivo que comprende las siguientes
30 etapas:

- a) secado de las hojas de olivo;
- b) peletizado de las hojas secas obtenidas en la etapa (a); y
- c) extracción sólido/líquido de los pellets obtenidos en la etapa (b) con un disolvente
35 seleccionado de agua, metanol, etanol y cualquiera de sus mezclas.

Sorprendentemente, se ha comprobado que cuando la extracción se hace sobre pellets de hojas secas se obtienen más mg de oleuropeína por g de hoja seca que cuando se utiliza la hoja picada (ver ejemplos 1 y 2).

5 El secado de las hojas de olivo es conocido para cualquier experto en la técnica. Las hojas se pueden secar al aire a temperatura ambiente, al sol, o con aire soplado.

10 Por peletizado en el contexto de la invención se entiende formar *pellets*, es decir, pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido. Son sobradamente conocidos por un experto en la técnica. La etapa (b) de peletizado incluye el picado de las hojas secas hasta alcanzar un tamaño final de partícula adecuado y posterior extrusión de las partículas obtenidas empleando un extrusor de pistón o de cilindros a una presión elevada, preferentemente entre 5 bar y 25 bar. De este modo se obtiene una biomasa sólida (*pellets*) que está formada por cilindros muy pequeños, de unos
15 pocos milímetros de diámetro.

Por extracción sólido-líquido o lixiviación se entiende el proceso de disolución de uno o más componentes de un sólido en un disolvente.

20 En una realización del primer aspecto de la presente invención, el secado de la etapa (a) se lleva a cabo al aire a temperatura ambiente.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, el secado de la etapa (a) se lleva a cabo con aire entre 20°C y 75°C, preferiblemente el secado de la etapa
25 (a) se lleva a cabo con aire entre 50°C y 70°C.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, las hojas secas obtenidas en la etapa (a) tienen un contenido en agua inferior al 10% en peso, preferiblemente las hojas secas obtenidas en la etapa (a) tienen un contenido en agua inferior a 5% en peso, más preferiblemente entre un 0,5% y un 5% en peso.
30

En otra realización del primer aspecto de la presente invención la etapa (b) de peletizado comprende un paso previo (b1) de picado. Por picado de la hoja seca se entiende cortar las hojas en una picadora de cuchillas en trozos más pequeños (entre
35 0,3 cm y 3,5 cm). Preferiblemente, en la etapa (b1) el picado se llevará a cabo hasta obtener partículas entre 0,5 cm y 1,5 cm.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen una longitud inferior a los 10 cm, preferiblemente tienen una longitud entre 3 cm y 6 cm.

5

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen un grosor inferior a los 15 mm, preferiblemente tienen un grosor entre 5 mm y los 10 mm.

10

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen una longitud entre 3 cm y 6 cm y tienen un grosor entre 5 mm y 10 mm.

15

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen una densidad aparente entre $0,30 \text{ g/cm}^3$ y $0,60 \text{ g/cm}^3$.

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen una longitud entre 3 cm y 6 cm, tienen un grosor entre 5 mm y 10 mm y tienen una densidad aparente entre $0,30 \text{ g/cm}^3$ y $0,60 \text{ g/cm}^3$.

20

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la extracción sólido/líquido de la etapa (c) se lleva a cabo con etanol, preferiblemente con etanol con una pureza superior al 90% en volumen, más preferiblemente con etanol con una pureza superior al 95% en volumen. La extracción con etanol favorece la extracción de oleuropeína y minimiza la extracción de azúcares.

25

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, la extracción sólido/líquido de la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura entre 20°C y 95°C , preferiblemente en la extracción se emplea una temperatura entre 25°C y 80°C .

30

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, tras la etapa (c) de extracción hay una filtración, preferiblemente la filtración se lleva a cabo a través de un filtro con un diámetro de poro entre $0,45 \mu\text{m}$ y $0,20 \mu\text{m}$.

35

En otra realización del primer aspecto de la presente invención, tras la etapa (c) de extracción hay una etapa (d) de adición de agua, preferiblemente destilada. La adición

de agua al extracto etanólico obtenido en la etapa (c) provoca la precipitación de terpenos. Preferiblemente, se añaden entre 0,2 litros y 0,6 litros de agua por cada litro de disolvente utilizado en la etapa (c).

5 En otra realización del primer aspecto de la presente invención, tras la etapa (d) hay una etapa de filtración y/o una etapa de evaporación del disolvente. Se puede llevar a cabo una evaporación del disolvente parcial, obteniendo así un extracto de oleuropeína en disolución o se puede llevar el extracto a sequedad, obteniendo así un polvo.

10

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

EJEMPLOS

20 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1. Procedimiento de extracción de oleuropeína.

25 2 kg de hojas de olivo se secaron al aire durante una semana, extendidas sin superar una altura de 60 cm hasta que el contenido en agua fue inferior al 5%.

Las hojas secas se picaron (tamiz-0,50 mm) y se peletizaron con una peletizadora manual de matriz plana empleando un extrusor de pistón a una presión de 10 bar. De este modo se obtuvieron unos pellets formados por cilindros de 6 mm de diámetro y 4
30 cm de longitud; densidad aparente de 0,46 g/cm³.

1 kg de pellets se extrajeron con 25 litros de etanol al 96%, en Soxhlet a reflujo. Tiempo de extracción de 3 h y número de sifonaciones 4.

35

Tras la extracción, se eliminaron los pellets del extracto etanólico haciendo pasar el extracto a través de un filtro Miracloth (tela filtrante). La concentración de oleuropeína en el extracto etanólico fue de 4,2 mg/mL con una pureza del 56%.

5 Al filtrado se añadieron 10 litros de agua destilada y la mezcla se pasó a través de un filtro de 0,45 μm .

10 El extracto se concentró mediante destilación a vacío ($T \leq 40^\circ\text{C}$) hasta alcanzar un volumen de 5 litros. El concentrado acuoso presentó una concentración en oleuropeína de 20,1 mg/mL con una pureza del 71%.

Ejemplo 2. Ejemplo comparativo de extracción de oleuropeína (sin etapa de peletizado)

15 2 kg de hojas de olivo se secaron con un flujo de aire de 0,7 m/s, a 50°C durante 10 horas, resultando el contenido en agua de la hoja seca inferior al 5%.

Las hojas secas se picaron en trozos de un tamaño inferior a 0,5 cm.

20 1 kg de hoja seca se extrajo con 25 litros de etanol al 96%, en Soxhlet a reflujo. Tiempo de extracción de 3 h y número de sifonaciones 4.

25 La hoja extraída se eliminó del extracto etanólico haciendo pasar el extracto a través de un filtro Miracloth. La concentración de oleuropeína en el extracto etanólico fue de 3,6 mg/mL y su pureza del 60%.

Al filtrado se añadieron 10 litros de agua destilada y la mezcla se pasó a través de un filtro de 0,45 μm .

30 El extracto se concentró mediante destilación a vacío ($T \leq 40^\circ\text{C}$) hasta alcanzar un volumen de 5 litros. El concentrado acuoso así obtenido presentó una concentración en oleuropeína de 17,6 mg/mL con una pureza del 73%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de oleuropeína a partir de hojas de olivo que comprende las siguientes etapas:
- 5
- a) secado de las hojas de olivo;
 - b) peletizado de las hojas secas obtenidas en la etapa (a); y
 - c) extracción sólido/líquido de los pellets obtenidos en la etapa (b) con un disolvente seleccionado de agua, metanol, etanol y cualquiera de sus mezclas.
- 10
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el secado de la etapa (a) se lleva a cabo con aire entre 20°C y 75°C.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde el secado de la etapa (a) se lleva a
- 15
- cabo con aire entre 50°C y 70°C.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las hojas secas obtenidas en la etapa (a) tienen un contenido en agua inferior al 10% en peso.
- 20
5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde las hojas secas obtenidas en la etapa (a) tienen un contenido en agua inferior a un 5%.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la etapa (b) de peletizado comprende un paso previo (b1) de picado.
- 25
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen una longitud inferior a los 10 cm.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde los pellets obtenidos en la etapa (b)
- 30
- tienen una longitud entre 3 cm y 6 cm.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen un grosor inferior a los 15 mm.
- 35
10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen un grosor entre 5 mm y 10 mm.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los pellets obtenidos en la etapa (b) tienen una densidad aparente entre $0,30 \text{ g/cm}^3$ y $0,60 \text{ g/cm}^3$.
- 5 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la extracción sólido/líquido de la etapa (c) se lleva a cabo con etanol.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la extracción sólido/líquido de la etapa (c) se lleva a cabo con etanol con una pureza superior al 90% en volumen.
- 10 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la extracción sólido/líquido de la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura entre 20°C y 95°C .
- 15 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde tras la etapa (c) de extracción hay una filtración.
- 20 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde tras la etapa (c) de extracción hay una etapa (d) de adición de agua.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, donde se añaden entre 0,2 litros y 0,6 litros de agua por cada litro de disolvente utilizado en la etapa (c).
- 25 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, donde tras la etapa (d) hay una etapa de filtración y/o una etapa de evaporación del disolvente.