

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
18 de Agosto de 2005 (18.08.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2005/075614 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C11B 9/02,  
B01D 11/04, A61K 35/78

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2005/070013

(22) Fecha de presentación internacional:  
8 de Febrero de 2005 (08.02.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200400293 9 de Febrero de 2004 (09.02.2004) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo  
US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ SERRANO, 117, E-28006  
MADRID (ES). UNIVERSIDAD AUTONOMA DE  
MADRID [ES/ES]; Ctra. Colmenar Viejo, KM 15,  
Pabellón C, 2ª planta, E-28049 MADRID (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): TABERA  
GALVÁN, J., Javier [ES/ES]; UNIVERSIDAD AU-  
TONOMA DE MADRID, Ctra. Colmenar Viejo, KM 15,  
Pabellón C, 2ª planta, E-28049 MADRID (ES). RUIZ  
RODRÍGUEZ, Alejandro [ES/ES]; UNIVERSIDAD  
AUTONOMA DE MADRID, Ctra. Colmenar Viejo,  
KM 15, Pabellón C, 2ª planta, E-28049 MADRID (ES).  
SEÑORÁNS RODRÍGUEZ, Francisco, Javier [ES/ES];  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID, Ctra.

Colmenar Viejo, KM 15, Pabellón C, 2ª planta, E-28049  
MADRID (ES). IBÁÑEZ EZEQUIEL, Elena [ES/ES];  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID, Ctra.  
Colmenar Viejo, KM 15, Pabellón C, 2ª planta, E-28049  
MADRID (ES). REGLERO RADA, Guillermo, J.  
[ES/ES]; UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID,  
Ctra. Colmenar Viejo, KM 15, Pabellón C, 2ª planta,  
E-28049 MADRID (ES). ALBI VIRELLA, Tomás  
[ES/ES]; INSTITUTO DE LA GRASA, Consejo Supe-  
rior Investig. Científicas, Avda. Padre Garcia Tejero,  
4, E-41012 SEVILLA (ES). LANZÓN REY, Augusto  
[ES/ES]; INSTITUTO DE LA GRASA, Consejo Supe-  
rior Investig. Científicas, Avda. Padre Garcia Tejero,  
4, E-41012 SEVILLA (ES). PÉREZ CAMINO, M<sup>a</sup>,  
Carmen [ES/ES]; INSTITUTO DE LA GRASA, Consejo  
Superior Investig. Científicas, Avda. Padre Garcia Tejero,  
4, E-41012 SEVILLA (ES). GUINDA GARÍN, M<sup>a</sup>,  
Ángeles [ES/ES]; INSTITUTO DE LA GRASA, Consejo  
Superior Investig. Científicas, Avda. Padre Garcia Tejero,  
4, E-41012 SEVILLA (ES). RADA RADA, Mirella  
[ES/ES]; INSTITUTO DE LA GRASA, Consejo Superior  
Investig. Científicas, Avda. Padre Garcia Tejero, 4,  
E-41012 SEVILLA (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,  
para toda clase de protección nacional admisible): AE,  
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,  
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD OF OBTAINING HIGH-VALUE-ADDED COMPOUNDS FROM OLIVE LEAVES

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA OBTENER COMPUESTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO A PARTIR DE HOJA DE  
OLIVO

(57) Abstract: The invention relates to a method of obtaining high-value-added compounds from olive leaves. The inventive method comprises the following steps, namely: a first step in which the leaves are subjected to solid-liquid extraction with organic solvents, preferably hexane or ethanol, and the crude extract thus obtained is vacuum concentrated; and a second step in which the crude extract is fractionated by means of supercritical CO<sub>2</sub> countercurrent column extraction and separation into two cells with different fixed pressure and/or temperature conditions which alter the dissolving power of the CO<sub>2</sub>, thereby precipitating different compounds. The invention can be used to extract natural products of interest from olive leaves for the food, pharmaceutical and cosmetic industries, such as waxes, squalene, β-carotene, α-tocopherol, oleuropein, hydroxytyrosol and other phenolic compounds, β-sitosterol, α- and β-amyrin, erythrodiol, uvaol and other terpenic alcohols, oleanolic acid, ursolic acid and maslinic acid, among others.

(57) Resumen: Mediante el procedimiento de la invención se obtienen compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo. En una primera etapa se someten las hojas a extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos, preferentemente hexano o etanol, y se concentra a vacío el extracto bruto obtenido. En una segunda etapa se realiza un fraccionamiento de ese extracto bruto por extracción en contracorriente en columna con CO<sub>2</sub> supercrítico y separación en dos celdas en que se fijan diferentes condiciones de presión y/o temperatura que cambian el poder disolvente del CO<sub>2</sub>, precipitando diferentes compuestos. El procedimiento de la invención permite extraer de la hoja de olivo productos naturales de interés para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, como ceras, escualeno, β-caroteno, α-tocoferol, oleuropeína, hidroxitiroso y otros compuestos fenólicos, β-sitosterol, α y β-amirina, eritrodioleol, uvaol y otros alcoholes terpénicos, ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido maslínico, entre otros.

WO 2005/075614 A1



NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(84) Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,

**Publicada:**

— *con informe de búsqueda internacional*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

**TÍTULO****PROCEDIMIENTO PARA OBTENER COMPUESTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO A PARTIR DE HOJA DE OLIVO.****5 OBJETO DE LA INVENCION**

El objeto de la presente invención es un procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo mediante extracción sólido-líquido con disolventes y posterior fraccionamiento con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico. En una primera etapa se someten las hojas a extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos, preferentemente hexano o etanol, y se concentra a vacío el extracto bruto obtenido. En 10 una segunda etapa se realiza un fraccionamiento de ese extracto bruto por extracción en contracorriente en columna con CO<sub>2</sub> supercrítico y separación en dos celdas en que se fijan diferentes condiciones de presión y/o temperatura que cambian el poder disolvente del CO<sub>2</sub>, precipitando diferentes compuestos.

15 El procedimiento de la invención permite extraer de la hoja de olivo productos naturales de interés para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, como ceras, escualeno, β-caroteno, α-tocoferol, oleuropeina, hidroxitirosol y otros compuestos fenólicos, β-sitosterol, α y β-amirina, eritrodiol, uvaol y otros alcoholes terpénicos, ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido maslínico, entre otros.

20

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

El presente invento es relativo a la obtención de compuestos naturales de alto valor añadido a partir de hoja de olivo, subproducto del olivar que entra en las almazaras en cantidades considerables (alrededor de un 10% sobre el peso de la aceituna) y del que 25 actualmente se obtiene escasa rentabilidad. Los compuestos obtenidos son, entre otros: ceras, escualeno, β-caroteno, α-tocoferol, oleuropeina, hidroxitirosol y otros compuestos fenólicos, β-sitosterol, α y β-amirina, eritrodiol, uvaol y otros alcoholes terpénicos, ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido maslínico. Algunos de ellos (escualeno, β-caroteno, α-tocoferol, hidroxitirosol y otros compuestos fenólicos) 30 presentan actividad antioxidante, por lo que encuentran aplicación tanto en la prolongación de la vida útil de los alimentos como en la disminución del estrés oxidativo del organismo humano. Con este segundo propósito pueden usarse como ingredientes de alimentos funcionales o de fármacos. También se utilizan en farmacia,

parafarmacia y cosmética en preparados de uso tópico protectores y regeneradores de la piel. Como consecuencia de la disminución del estrés oxidativo del organismo se han descrito estos compuestos como antiateromatosos (la oxidación de las LDL inicia la formación de placas de ateroma), anticancerígenos (algunos radicales libres pueden ser mutagénicos) y protectores frente a las cataratas (la agregación de proteínas en el cristalino está muy relacionada con fenómenos oxidativos). También presentan efectos antitumorales el ácido oleanólico y el  $\beta$ -sitosterol que, a su vez, reduce el nivel de colesterol LDL en sangre. Otras actividades farmacológicas descritas son la antiinflamatoria (ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido maslínico, eritrodiol y uvaol) y la bactericida (escualeno, oleuropeina y ácido oleanólico). El ácido ursólico se utiliza también en preparados cosméticos contra las arrugas de la piel. Actualmente, se estudia el ácido maslínico como inhibidor de las proteasas responsables del poder infectivo del VIH.(ES2140329) y de parásitos intestinales del género *Cryptosporidium* (ES2131467). La infección por estos protozoos es de alto riesgo en paciente inmunodeprimidos y para ella no existe terapia específica.

El interés por los compuestos de alto valor añadido presentes en la hoja de olivo ha dado lugar a numerosos desarrollos tecnológicos para su extracción y purificación, muchos de ellos dirigidos al aprovechamiento de sus propiedades en el ámbito alimentario y de la salud.

Algunos de estos desarrollos (US6338865, EP1157701, FR2588159, ES2056745) se proponen mejorar la conservación de los alimentos, principalmente a través de la actividad antioxidante de los compuestos extraídos, así como algunas propiedades funcionales que resultan beneficiosas para la salud tras la ingestión de esos alimentos o ingredientes. Otros (US2003185921, US5714150) se dirigen al aislamiento y caracterización de los compuestos extraídos y a la evaluación *in vitro* de sus diversas actividades farmacológicas. Finalmente, la mayor parte (DE10213032, DE10213019, DE10213031, US2003152656, US2002054927, FR2810887, FR2830195, EP1213025, FR2815852, DE3901286) utiliza los compuestos extraídos de la hoja como principios activos de formulaciones cosméticas o dermatológicas para el cuidado de la piel y el cabello, que van desde su uso como productos desodorantes o anticaspa hasta la fotoprotección o el tratamiento del acné.

En los procedimientos de extracción se suele secar y/o moler la hoja (US2003152656, US2002054927, FR2810887, EP1157701), extraerla con algún disolvente orgánico

(US2003185921, US2003152656, FR2810887, EP1157701), con agua (US2002054927, ES2056745), o con mezcla etanol-agua (US5714150); en algunos casos se utiliza el extractor Soxhlet (DE10213032, DE10213019, DE10213031, EP1213025). El extracto obtenido se suele concentrar o desecar mediante evaporación o liofilización  
5 (US2003152656, US2002054927, FR2810887, EP1157701, US5714150, ES2056745). El extracto obtenido por cualquiera de los procedimientos anteriores o similares puede ser concentrado y fraccionado mediante extracción con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico ( $P > 7,3$  MPa y  $T > 31,1$  °C), en las que posee propiedades de solvatación similares a las de los líquidos y viscosidades y difusividades similares a las de los gases, por lo que  
10 resulta un extractante ideal. La capacidad de extracción del dióxido de carbono supercrítico puede hacerse selectiva hacia un determinado grupo de compuestos modificando su densidad, lo que puede conseguirse en una misma instalación con ligeros ajustes de la presión y la temperatura. Además, el CO<sub>2</sub> supercrítico no es tóxico, se libera de los productos extraídos por simple paso al estado gaseoso, y produce  
15 extracciones eficaces a temperaturas suaves y, obviamente, en atmósfera no oxidante. No se ha encontrado ninguna aplicación de la extracción con fluidos supercríticos para concentrar, fraccionar y/o purificar los compuestos extraídos de la hoja de olivo. Sí existe un precedente (GB644917) en que se usa CO<sub>2</sub> para crear una atmósfera inerte protectora contra la oxidación de los compuestos extraídos mediante disolventes de  
20 diferentes aceites vegetales y animales; pero, a diferencia del presente invento, se usa es estado gaseoso y a baja presión, por lo que no tiene ningún efecto extractivo.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

El presente invento implica un proceso para la extracción y fraccionamiento de  
25 compuestos de alto valor añadido presentes en la hoja de olivo, de aplicación en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

El proceso comprende una extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos, preferentemente hexano o etanol, de la hoja de olivo, una extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico del extracto bruto anterior concentrado y un fraccionamiento de este último  
30 extracto. Se utiliza hoja de olivo lavada si procede de la poda del olivo o sin lavar si procede de la separación de las aceitunas de la almazara.

Cuando se va a utilizar hexano, la hoja de olivo se seca mediante aire forzado a una temperatura comprendida entre 30 y 40 °C durante al menos 24 horas y se pica en picadora de cuchillas.

Cuando se va a utilizar etanol, la hoja de olivo se extrae entera y sin secar.

- 5 Para la extracción sólido-líquido las hojas se extraen mediante contacto prolongado (maceración) con el disolvente orgánico, hexano o etanol, en una proporción hoja/disolvente comprendida entre 1/4 – 1/20 peso / volumen y a una temperatura comprendida entre 20°C y 40°C. Si el disolvente es hexano, la maceración transcurre durante un periodo comprendido entre 30 y 60 horas. Si el disolvente es etanol la maceración transcurre durante un periodo comprendido entre 100 y 160 horas.

10 A continuación se procede a la clarificación, mediante filtración o centrifugación, del extracto y posteriormente a la concentración del clarificado mediante evaporación a vacío del disolvente ( $T \leq 40^\circ\text{C}$ ), hasta conseguir un volumen de extracto bruto comprendido entre el 20 % y el 50 % del volumen de macerado inicial.

- 15 El extracto bruto así obtenido se extrae en contracorriente con  $\text{CO}_2$  supercrítico en una columna rellena en un intervalo de temperaturas comprendido entre 35 y 50 °C y en un intervalo de presiones comprendido entre 15 y 35 Mpa obteniéndose un extracto supercrítico en el cual existe menor concentración de disolvente orgánico que en el extracto bruto.

- 20 El efluente de esta columna, extracto supercrítico, se lleva a una primera celda de separación donde, por disminución de la presión a valores inferiores a los 20 MPa, preferentemente comprendidos entre 10 y 15 Mpa, y/o cambio de la temperatura se modifica el poder disolvente del  $\text{CO}_2$ , precipitando los compuestos no solubles en estas nuevas condiciones.

- 25 El efluente de esta primera celda se lleva a una segunda celda de separación, donde se vuelve a reducir la presión a valores inferiores a 2 MPa, preferentemente comprendidos entre 1 y 2 MPa, llevando al dióxido de carbono al estado gaseoso y produciéndose la precipitación de todos los compuestos que venían disueltos en él.

- 30 Al final del proceso se recogen las dos fracciones, de composición distinta, obtenidas en las dos celdas. Una tercera fracción (refinado), constituida principalmente por el disolvente orgánico y los compuestos no solubles en  $\text{CO}_2$  supercrítico, se recoge de la columna de extracción.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

El procedimiento objeto de la presente invención consiste en la extracción de la hoja de olivo con disolventes orgánicos, preferentemente hexano o etanol. Las hojas, obtenidas de la poda del olivo o separadas de las aceitunas en las almazaras, se lavan o no, según su procedencia, se secan con aire forzado a 30-40 °C y se pican con picadora de cuchillas si se van a extraer con disolventes como el hexano o se extraen enteras y sin secar con disolventes como el etanol. La extracción se realiza mediante contacto prolongado (maceración) durante un tiempo comprendido entre 30 y 60 horas si se emplea hexano o entre 100 y 160 horas si se emplea etanol, en una proporción hoja/disolvente comprendida entre 1/4-1/20 (peso/volumen) y a una temperatura comprendida entre 20 y 40 ° C. A continuación se concentra el extracto a vacío (10-20 mm de presión), manteniendo la temperatura por debajo de 40 °C, hasta conseguir un volumen comprendido entre el 20 % y el 50 % del inicial. Finalmente se clarifica mediante filtración con placa filtrante o centrifugación.

El extracto bruto obtenido según se acaba de describir se alimenta a una columna rellena de extracción, capaz de soportar presiones superiores a los 40 MPa, recorrida en sentido contrario por dióxido de carbono en estado supercrítico, preferentemente a presión comprendida entre 15 y 35 MPa y temperatura comprendida entre 35 y 50 °C, en una cantidad (medida en condiciones atmosféricas) comprendida entre 5 y 40 veces el caudal de alimentación de extracto bruto, preferentemente 12 veces. Cuando interese, puede favorecerse la solubilidad de los compuestos más polares añadiendo a la corriente de CO<sub>2</sub> una pequeña proporción de un disolvente polar (modificador o cosolvente).

Cuando la extracción se realiza con hexano un modificador adecuado es el etanol que se añadiría en proporción de hasta el 10% sobre el caudal de CO<sub>2</sub>, mientras que cuando la extracción se lleva a cabo con etanol, el modificador adecuado es agua que se añade en igualmente en proporción de hasta el 10% sobre el caudal de CO<sub>2</sub>.

El CO<sub>2</sub> supercrítico conteniendo los compuestos solubles en las condiciones de la columna de extracción pasa a una primera celda separadora en la que mediante reducciones en la presión y/o variaciones en la temperatura se disminuye el poder disolvente del CO<sub>2</sub>, de forma que precipitan preferentemente un primer grupo de compuestos, insolubles en las nuevas condiciones. El color de esta primera fracción suele ser amarillo-verdoso. En esta primera celda separadora la presión del dióxido de carbono está comprendida entre 10 y 15 MPa.

A continuación, el dióxido de carbono, conteniendo los compuestos aún solubles en las condiciones de presión y temperatura de la primera celda separadora, se lleva a una segunda celda en la que, mediante una nueva disminución de presión, pasa al estado gaseoso, precipitando todos los compuestos que traía disueltos. En esta segunda celda separadora la presión del dióxido de carbono está comprendida entre 1 y 2 MPa. Esta segunda fracción suele ser incolora o amarilla pálida.

La tercera fracción está constituida por el refinado, el extracto bruto ya extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico que queda en la columna de extracción. Se recoge por gravedad, por la base de la misma, una vez despresurizado el sistema. Queda enriquecida en los compuestos menos solubles en dióxido de carbono a la densidad de éste en la columna de extracción y suele presentar un color marrón-verdoso, más oscuro que el extracto bruto.

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

### 15 Ejemplo 1: Extracción con hexano

Se parte de 1000 g de hojas de olivo, que se lavan con agua y se secan con aire entre 30-40°C durante 6 horas, se pican y se extraen durante 48 horas con 5 litros de hexano. El macerado se filtra en placa filtrante a vacío y se concentra a vacío hasta 1 litro a una temperatura inferior a 40°C.

20 El extracto bruto en hexano así obtenido, conteniendo entre otros compuestos 962,4 µg/g de α-tocoferol, 123,5 µg/g de β-sitosterol y 429,0 µg/g de alcoholes terpénicos se alimenta a razón de 200 mL/h a la columna (de acero inoxidable AISI 316, cilíndrica, de 17,6 mm de diámetro interno y 180 cm de altura), rellena con anillos Fenske, y se extrae en contracorriente con 2500 mL/h de CO<sub>2</sub> a 20 MPa y 35 °C durante 35 minutos, con adición de etanol como modificador (10% sobre el caudal de CO<sub>2</sub>) . El extracto  
25 obtenido se separa parcialmente en la primera celda separadora (de acero inoxidable AISI 316, cilíndrica, de 270 mL de capacidad) reduciendo la presión a 12 MPa, obteniéndose en ella un producto amarillo verdoso conteniendo 105,6 µg/g de α-tocoferol, 57,6 µg/g de β-sitosterol y 103,3 µg/g de alcoholes terpénicos. El efluente de  
30 esta primera se lleva a la segunda celda separadora (de acero inoxidable AISI 316, cilíndrica, de 270 mL de capacidad) donde, por disminución de la presión hasta 1 MPa, se recuperan los compuestos disueltos en el dióxido de carbono, ahora en estado gaseoso, obteniéndose en ella un producto amarillo pálido conteniendo 80,4 µg/g de α-



tocoferol, 474,7  $\mu\text{g/g}$  de  $\beta$ -sitosterol y 1661,6  $\mu\text{g/g}$  de dialcoholes triterpénicos. Tanto el  $\beta$ -sitosterol como los alcoholes terpénicos se concentran en la segunda celda separadora, mientras que el  $\alpha$ -tocoferol queda, en su mayor parte, en el refinado.

### 5 Ejemplo 2: Extracción con etanol

Se parte de 1000 g de hojas de olivo y se extraen durante 140 horas con 20 litros de etanol del 96%. El macerado se filtra en placa filtrante a vacío y se decolora con 20 g de carbón activo en polvo (CLARIMEX tipo 061C) filtrándose a través de papel de filtro MN 616 (Machery-Nagel). La disolución se concentra a vacío hasta el 20% del volumen original, a una temperatura inferior a 40°C, produciéndose un precipitado (mayoritariamente ácido oleanólico) que se separa por centrifugación o filtración

El extracto bruto en etanol así obtenido, conteniendo entre otros compuestos 78,6  $\mu\text{g/g}$  de hidroxitirosol, 140,2  $\mu\text{g/g}$  de eritrodiol y 70,0  $\mu\text{g/g}$  uvaol se alimenta a razón de 150 mL/h a la columna (de acero inoxidable AISI 316, cilíndrica, de 17,6 mm de diámetro interno y 180 cm de altura), rellena con anillos Fenske, y se extrae en contracorriente con 2500 mL/h de CO<sub>2</sub> a 25 MPa y 35 °C durante 120 minutos, con adición de agua como modificador (5% sobre el caudal de CO<sub>2</sub>) . El extracto obtenido se separa parcialmente en la primera celda separadora (de acero inoxidable AISI 316, cilíndrica, de 270 mL de capacidad) reduciendo la presión a 10 MPa, obteniéndose en ella un producto amarillento conteniendo 34,8  $\mu\text{g/g}$  de hidroxitirosol, 320,2  $\mu\text{g/g}$  de eritrodiol y 240,0  $\mu\text{g/g}$  uvaol. El efluente de esta primera se lleva a la segunda celda separadora (de acero inoxidable AISI 316, cilíndrica, de 270 mL de capacidad) donde, por disminución de la presión hasta 2 MPa, se recuperan los compuestos disueltos en el dióxido de carbono, ahora en estado gaseoso, obteniéndose en ella un producto amarillo pálido conteniendo 29,0  $\mu\text{g/g}$  de hidroxitirosol, 70,2  $\mu\text{g/g}$  de eritrodiol y 50,6  $\mu\text{g/g}$  uvaol. Tanto el eritrodiol como el uvaol se concentran en la primera celda separadora, mientras que el hidroxitirosol queda, en su mayor parte, en el refinado (284,2  $\mu\text{g/g}$ ).

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo mediante extracción sólido-líquido con disolventes orgánicos y posterior fraccionamiento con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 5
- a) obtención de un extracto sólido-líquido de hojas de olivo frescas mediante maceración en disolventes orgánicos, preferentemente hexano o etanol;
  - b) filtración o centrifugación del macerado obtenido en la etapa anterior para clarificarlo;
  - 10 c) concentración del clarificado de la etapa anterior para obtener un extracto bruto de hoja de olivo;
  - d) paso del dióxido de carbono en condiciones supercríticas a través de una columna rellena de extracción supercrítica en contracorriente con el extracto bruto alimentado a la misma;
  - 15 e) conducción del efluente formado, constituido mayoritariamente por algunos de los compuestos de interés disueltos en dióxido de carbono, a una primera celda de separación donde precipitan en mayor cantidad los compuestos menos solubles;
  - f) conducción del efluente de la primera celda de separación a una segunda en la que el dióxido de carbono es transformado en gas, precipitando el resto de los compuestos disueltos en él;
  - 20 g) recogida de los compuestos precipitados en las dos etapas anteriores y del refinado que queda en la columna, con lo que se consiguen tres fracciones del extracto bruto.
- 25
- 2.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza hoja de olivo lavada si procede de la poda del olivo o sin lavar si procede de la separación de las aceitunas de la almazara.
- 30

- 3.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque cuando se utiliza hexano, la hoja de olivo se seca mediante aire forzado a una temperatura comprendida entre 30 y 40 °C durante al menos 24 horas y se pica en picadora de cuchillas.
- 5
- 4.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque cuando se utiliza etanol, la hoja de olivo se extrae entera y sin secar.
- 10
- 5.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque se utiliza una proporción hoja / disolvente comprendida entre 1/4 –1/20 peso / volumen.
- 15
- 6.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 5 caracterizado porque si el disolvente es hexano la maceración transcurre durante un periodo comprendido entre 30 y 60 horas.
- 20
- 7.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1, 2, 4 y 5 caracterizado porque si el disolvente es etanol la maceración transcurre durante un periodo comprendido entre 100 y 160 horas.
- 25
- 8.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque se utiliza una temperatura de maceración comprendida entre 20°C y 40°C.
- 30
- 9.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque se concentra el filtrado, mediante evaporación a vacío del disolvente ( $T \leq 40^\circ\text{C}$ ), hasta conseguir un volumen de extracto bruto comprendido entre el 20 % y el 50 % del volumen de macerado inicial.
- 10.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque la operación de extracción

supercrítica en contracorriente del extracto bruto se realiza en un intervalo de temperaturas comprendido entre 35 y 50 °C.

5 11.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque la operación de extracción supercrítica en contracorriente del extracto bruto se realiza en un intervalo de presiones comprendido entre 15 y 35 MPa.

10 12.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque la operación de fraccionamiento en la primera celda separadora de los compuestos de interés presentes en la corriente de CO<sub>2</sub> se realiza por disminución de la presión a valores inferiores a los 20 MPa, preferentemente comprendidos entre 10 y 15 MPa.

15 13.- Procedimiento para obtener compuestos de alto valor añadido a partir de hoja de olivo según las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque la operación de fraccionamiento en la segunda celda separadora de los compuestos de interés presentes en la corriente de CO<sub>2</sub> se realiza por disminución de la presión a valores inferiores a 2 MPa, preferentemente comprendidos entre 1 y 2 MPa.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/070013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <b>IPC<sup>7</sup> C11B9/02, B01D11/04, A61K35/78</b> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>IPC<sup>7</sup> C11B, B01D, A61K</b> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, CA</b>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Le FLOCH, F. et al.: "Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves", Talanta (1998), vol. 46, n° 5, pp.: 1123-1130, ISSN 0039-9140, the whole document	1-13
A	US 2003/0152656 A1 (PINNELL, S.R. et al.) 14.08.2003, the whole document	1-13
A	EP 1157701 A1 (ASAC, COMPAÑIA DE BIOTECNOLOGÍA E INVESTIGACIÓN, S.A.) 28.11.2001, the whole document	1-13
A	US 5714150 A (NACHMAN, L.) 03.02.1998, the whole document	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>30 March 2005 (30.03.05)</b>		Date of mailing of the international search report <b>19 April 2005 (19.04.05)</b>
Name and mailing address of the ISA/ <b>SPTO</b>		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/070013

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003152656 A1	14.08.2003	US 6743449 B	01.06.2004 01.06.2004 01.06.2004
EP 1157701 A1	28.11.2001	WO 0147537 A1 AU 2174001 A ES 2157178 A1 EP 20000985273 US 2003017217 A1 US 6676980 B JP 2003518504 T	05.07.2001 09.07.2001 01.08.2001 21.12.2000 23.01.2003 13.01.2004 10.06.2003
US 5714150 A	03.02.1998	WO 9938383 A1 AU 6045098 A NO 996417 A	05.08.1999 16.08.1999 31.01.2000

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ ES 2005/070013

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> C11B9/02, B01D11/04, A61K35/78

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

CIP<sup>7</sup> C11B, B01D, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, CA

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	Le FLOCH, F. et al.: "Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves", Talanta (1998), vol. 46, nº 5, pp.: 1123-1130, ISSN 0039-9140, todo el documento	1-13
A	US 2003/0152656 A1 (PINNELL, S.R. et al.) 14.08.2003, todo el documento	1-13
A	EP 1157701 A1 (ASAC, COMPAÑIA DE BIOTECNOLOGÍA E INVESTIGACIÓN, S.A.) 28.11.2001, todo el documento	1-13
A	US 5714150 A (NACHMAN, L.) 03.02.1998, todo el documento	1-13

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

30 Marzo 2005 (30.03.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

19 ABR 2005 19.04.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Maquedano Herrero

Nº de teléfono + 34 91 3495474

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/070013

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2003152656 A1	14.08.2003	US 6743449 B	01.06.2004
			01.06.2004
			01.06.2004
EP 1157701 A1	28.11.2001	WO 0147537 A1	05.07.2001
		AU 2174001 A	09.07.2001
		ES 2157178 A1	01.08.2001
		EP 20000985273	21.12.2000
		US 2003017217 A1	23.01.2003
		US 6676980 B	13.01.2004
		JP 2003518504 T	10.06.2003
US 5714150 A	03.02.1998	WO 9938383 A1	05.08.1999
		AU 6045098 A	16.08.1999
		NO 996417 A	31.01.2000