

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 177 457**

21 Número de solicitud: 200100346

51 Int. Cl.7: **C07C 39/11**

B01D 15/04

B01D 15/08

12

ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **15.02.2001**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2002**

Fecha de la concesión: **03.08.2004**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.2004**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.09.2004

61 Número de solicitud de la patente principal:
200002422

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Fernández-Bolaños Guzmán, Juan;
Heredia Moreno, Antonia;
Rodríguez Gutiérrez, Guillermo;
Rodríguez Arcos, Rocio;
Jiménez Araujo, Ana y
Guillén Bejarano, Rafael**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Mejoras introducidas en la patente principal Nº 200002422 relativa a un procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo.**

57 Resumen:

Mejoras introducidas en la patente principal Nº 200002422 relativa a un Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo.

El objeto del presente certificado de adición es un procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo mediante tratamiento cromatográfico en dos pasos. Se utiliza un método cromatográfico sobre resina de intercambio iónico, no activada, seguido de un segundo tratamiento sobre resina adsorbente, no iónica, del tipo XAD que permite la concentración y total purificación del hidroxitirosol tras una elución con una disolución metanol o etanol: agua (del 30 al 33%).

El procedimiento objeto de la presente invención es también aplicable a orujos de dos fases, orujos de tres fases y huesos tras ser sometidos a un proceso de explosión al vapor.

ES 2 177 457 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Mejoras introducidas en la patente principal N° 200002422 relativa a un Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo.

Sector de la técnica

La presente solicitud de certificado de adición está dirigida, al igual que la patente principal P200002422 al sector de la alimentación, farmacéutico, de la cosmética y de la agricultura.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un perfeccionamiento del procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo.

El hidroxitirosol es un antioxidante natural de alto valor, con propiedades antimicrobianas y fitotóxicas, que puede ser utilizado en la conservación de alimentos, en la agricultura para la protección de los olivos, y además se puede aprovechar su acción profiláctica en ciertas enfermedades humanas inducidas por radicales. En este sentido puede emplearse en diversas preparaciones tópicas, antienvjecimiento, antiinflamatorias, etc.

Los perfeccionamientos introducidos consisten en la sustitución de la columna de la primera etapa del procedimiento por otra más económica y con posibilidad de reutilización y en la eliminación de la tercera etapa de purificación.

Estado de la técnica

La pulpa de aceituna contiene numerosos compuestos fenólicos, casi todos en forma de glucósido o sus ésteres, cuyo porcentaje pueden alcanzar hasta el 5% de su peso seco. Entre todas las sustancias fenólicas destaca la oleuropeína el glucósido más abundante, constituido por el éster heterósido del ácido elenólico e hidroxitirosol, responsable de su sabor amargo. También están presente, ligustrósido (glucosa - ácido elenólico - tirosol), verbascósido (ácido caféico - glucosa - (ramnosa) - hidroxitirosol), flavonoides como la rutina y en los frutos maduros, colorantes antocianícos, derivados de la cianidina.

Todas estas sustancias tienen gran importancia en los procesos tecnológicos a los que son sometidos estos frutos, ya sea para la elaboración de aceituna de mesa (p.e. para eliminar el sabor amargo, desarrollo del color negro, etc) (Brenes, M., Rejano, L., García, P., Sánchez, A.H. y Garrido, A., 1995. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2702-2795) o para la obtención del aceite de oliva, ya que de acuerdo con su coeficiente de reparto ciertos fenoles pasan al aceite, siendo responsables de la estabilidad frente a la oxidación (Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G. Y Montedoro, G.F 1996 *J. Am Oil Chem. Soc.* 73: 1589-1593), de las características sensoriales (Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A. y Gutiérrez, F. 1999 *J. Agric. Food Chem.* 47: 3531-3534) y de los efectos beneficiosos para la salud humana (Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A y Zappia, V. 1997. *J. Nutr.* 127: 286-292), y parte pasan a la fase acuosa.

El hidroxitirosol, que es el fenol más activo de los encontrados de forma natural en el aceite de oliva virgen y fundamentalmente en sus

aguas de vegetación o alpechines, se obtiene espontáneamente por la hidrólisis química y/o enzimática de la oleuropeína, durante la molienda y batido de las pastas. También se encuentra en cantidades muy importantes en las lejías y aguas de lavados, dada la hidrólisis química que se produce en este caso, durante la elaboración de las aceitunas de mesa. Es un compuesto muy interesante por sus propiedades antioxidantes, que debe su actividad fundamentalmente al grupo funcional o-difenol, característico de los biofenoles, y que presenta ciertos aspectos muy importantes sobre la salud humana y la conservación de los alimentos, además de presentar un papel importante en los mecanismos de defensa contra patógenos e insectos en las aceitunas (Bianco, A.D., Muzzalupo, I., Piperno, A., Romeo, G. Y Ucella, N. 1999. *J. Agric. Food Chem* 47: 3531-3534).

Sin embargo el hidroxitirosol es un producto, que no está disponible comercialmente, a pesar de que se han desarrollado diversos procedimientos cromatográficos para su purificación a partir del aceite de oliva, del alpechín y hojas de olivos, y que se han desarrollado, asimismo, diversos procedimientos de síntesis para su producción.

Diversos autores italianos y japoneses han descrito la recuperación de compuestos activos, masa de fenoles a partir de alpechines, hojas de olivo y frutos, con diversos procedimientos de extracción líquido-líquido y líquido-sólido (Visioli, F., Vinceri, F.F. Y Galli, C. 1995. *Experientia* 51: 32-34)(patente japonesa JP-09078061). Sin embargo el poder antioxidante de los extractos depende de su grado de purificación, siendo los más activos los extractos que contienen fenoles de bajo peso molecular (Violi, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vinceri, F.F. y Galli, C. 1999. *J. Agric. Food Chem* 47: 3397-3401).

En relación a la purificación del hidroxitirosol a partir de los extractos de alpechín obtenidos con acetato de etilo. Capasso et al. 1999 (Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S. Y Solla, F. 1999, *J. Agric. Food Chem.* 47 1745-1748) presentan un nuevo método cromatográfico usando columnas de silica gel a presión media (20 bar), a diferencia de otros métodos anteriores de extracción y cromatografía a normal y baja presión (Capasso, R., Evidente, A. y Visca, C. 1994. *Agrochimica* 38: 164-171), y que se completan con una cromatografía preparativa en capa fina.

Otros autores españoles (patente española ES-2051238) obtienen distintos tipos de fenoles, entre ellos el hidroxitirosol utilizando una extracción en contracorriente a partir de la solución acuosa del alpechín. Una vez extraído el alpechín, como tal o concentrado, mediante un disolvente o mezcla de disolventes poco miscible con agua, la fase orgánica es sometida a una extracción líquido-líquido en contracorriente.

El hidroxitirosol que también ha sido purificado a partir del aceite de oliva, ha sido patentado para su uso en preparaciones tópicas y de baño, dado que inhibe la formación de melanina y de peróxidos lipídicos (patente japonesa JP - 08119825).

De los métodos de síntesis que existen el descrito por Capasso et al. (Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S. Y Solfa, F. 1999 *J. Agric. Food*

Chem. 47 1745-1748), es según el propio autor el más conveniente respecto a los otros descritos en la literatura (Baraldi, P. G., Simoni, D., Manfredini, S. Y Menziani, E. 1983. Liebigs Ann. Chem. 684-689) e incluso, señala que dicho método es aún más conveniente que la recuperación cromatográfica que realizan los mismos autores a partir del alpechín, dado los bajos rendimientos de estos últimos y resultar mucho más caro que los de síntesis. El hidroxitirosol se sintetiza en dicho trabajo a partir del ácido 3,4 dihidroxifenilacético por reducción con LiAlH_4 en tetrahydrofurano, bajo reflujo, durante 2 horas.

Bai et al. 1998 (Bai, C., Yan, X., Takenaka, M., Sekiya, K. Y Nagata, T. 1998. J. Agric. Food Chem. 46: 3998-4001), también lo sintetizaron con alto rendimiento, a escala de gramos, y con alta pureza. La síntesis se realiza a partir del mismo ácido, 3,4 dihidroxifenilacético, pero utilizando un sistema de metilación rápida con trimetilsildiazometano y posterior reducción de los productos de reacción con NaBH_4 .

Sin embargo, el ácido puro (pureza analítica), que se utiliza como materia prima en los métodos de síntesis, es un producto químico con un precio actual de alrededor de 4000 pts/gramo lo que constituye un precio demasiado elevado para ser producido a nivel industrial.

En dos solicitudes de patente anteriores (ES-9800413 y ES-9800668) se muestran un procedimiento de obtención de manitol a partir de pulpa extractada (ES-9800413) procedente de la extracción del aceite de oliva por el sistema de tres fases y sometida a un proceso de explosión al vapor y también un procedimiento de obtención de hidroxitirosol a partir de hueso de aceituna (ES-9800668) que se ha sometido a un proceso de autohidrólisis rápida.

En la solicitud de patente principal (P2000-02422; fecha 6/ 10/ 2000) del presente certificado de adición se propone un procedimiento para la purificación de hidroxitirosol obtenido por los métodos referidos o bien a partir de los orujos de dos fases (alperujo) también sometidos al proceso de explosión al vapor. Este procedimiento presenta varios inconvenientes:

- No es capaz de separar totalmente el hidroxitirosol del hidroximetilfurfural compuesto de degradación que aumenta al aumentar la severidad.
- La primera columna se enfrenta con una disolución fuertemente coloreada y muy rica en diversos compuestos que son retenidos, por lo que se hacen necesarias continuas y fuertes regeneraciones al quedarse la mayor parte de estos otros compuestos adsorbidos en la resina. Estas regeneraciones alteran química y mecánicamente a las resina acortando su vida útil. Este problema no lo tiene las demás columnas al enfrentarse a licores decolorados.
- Las resinas utilizadas son relativamente caras, especialmente la de la tercera columna, aunque bastante resistentes.

Explicación de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo, que incluye las siguientes etapas:

- a) introducción de la fuente de hidroxitirosol en una columna con resina de intercambio iónico no activada (preferentemente una aniónica fuerte), obteniéndose tras eluir con agua una disolución que contiene al menos el 85 % del hidroxitirosol contenido en la disolución introducida en la columna.
- b) introducción de la disolución conteniendo el hidroxitirosol procedente de la etapa anterior en una segunda columna de resina no iónica, del tipo XAD, y elución mediante una mezcla de metanol o etanol:agua (desde el 30 al 33 %), obteniéndose una disolución que contiene al menos el 75 % del hidroxitirosol contenido en la fuente de hidroxitirosol introducida en la primera etapa, y con una pureza mínima del 95 %.

Las resinas utilizadas en los ciclos de purificación de hidroxitirosol pueden regenerarse mediante un tratamiento que consta de las siguientes etapas:

- a) en el caso de la resina de intercambio iónico fuertemente aniónica se regenera mediante un lavado con un ácido fuerte, a concentraciones en torno al 2N. En el caso de necesitar una regeneración más fuerte, después de muchos ciclos de purificación, se sometería a un lavado previo con NaOH al 2 % antes del tratamiento ácido.
- b) en el caso de las resinas no iónica del tipo XAD por lavado con metanol o etanol puro, o en el caso de necesitar una regeneración más fuerte un lavado con H_2O_2 al 2 % con un pH ajustado a 11,5 mediante adición de NaOH .

Breve descripción de la figura

Figura 1: Esquema de las etapas del procedimiento de purificación de hidroxitirosol.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método cromatográfico que permite obtener hidroxitirosol con un alto grado de pureza y que ha sido desarrollado a partir de los orujos de dos y tres fases y de los huesos procedentes del procesado de aceitunas, tras ser sometidos a un proceso de explosión a vapor. Al tratarse de un pretratamiento muy severo, donde el material es sometido a altas temperaturas, por inyección de vapor de agua a presión durante un corto período de tiempo, seguido de una descompresión explosiva del producto, se consigue la solubilización de hidroxitirosol y de otros muchos compuestos solubles en agua (presentes en el alpechín, solubilizados del orujo o residuo

sólido, productos de degradación, etc.). El sistema de purificación podría ser también aplicado a otras muchas fuentes, tales como alpechín lejiás y aguas de lavado del aderezo de aceitunas, etc.

El procedimiento de la invención tiene de novedoso la utilización de un sistema cromatográfico en dos fases, utilizándose en la primera una resina de intercambio iónico en forma no activada, que permite la parcial purificación de hidroxitirosol sin que éste sufra alteración alguna, tras su elución simplemente con agua. Estas resinas en base a poliestireno se pueden usar en forma de gel o macroreticular, y son fácilmente regenerables y de gran durabilidad mecánica y funcional. Supone su uso bajos costos de inversión, regeneración y de operación. El segundo paso se realiza sobre resina adsorbente polimérica XAD que permite la total purificación de hidroxitirosol tras eluir con una mezcla metanol o etanol:agua (del 30 al 33%). Esta resina macroreticular, no iónica, en base poliestireno, que adsorbe y libera las sustancias a través de interacciones hidrofóbicas y polares, tiene la ventaja con respecto a otras resinas de que no ocurren procesos de retención ni modificaciones químicas importantes del hidroxitirosol sobre la fase estacionaria. Este tipo de resinas poliméricas, tanto la de intercambio iónico como la adsorbente XAD son estables a ácidos y bases fuertes, a diferencia de los lechos de sílica utilizados en otros procedimientos de purificación de hidroxitirosol, con lo que se pueden usar durante cientos de ciclos de purificación, bien con ácido en el caso de la iónica, o bien metanol o H_2O_2 (pH=11,5) en el caso de la no iónica.

En el presente procedimiento la regeneración ha consistido en un lavado en las propias columnas con HCl (2N) para la aniónica fuerte, y con metanol para la adsorbente, a la cual le llega una disolución bastante limpia de productos que impurifican al hidroxitirosol, por lo que no hace falta regeneraciones drásticas de ésta.

Las etapas del procedimiento de purificación son las que se recogen en el esquema de la figura 1:

B1: muestra inicial, fuente de hidroxitirosol (fracción acuosa).

C1: columna de resina de intercambio iónica no activada, el hidroxitirosol se obtiene por sucesivos lavados con agua.

A1: muestra inicial ya pasada por la columna C1, y lavados con agua sin apenas hidroxitirosol.

A2: fracción no retenida en la resina XAD, disolución bastante limpia, y que podría emplearse como eluyente en la columna aniónica.

B2: solución con los compuestos, principalmente hidroxitirosol, que se eluyen del primer paso por la resina de intercambio aniónico con agua, y que permite recuperar la mayor parte de éste al tener distinta velocidad de arrastre a través del lecho de resina que el resto de los compuestos que le acompañan.

C2: cromatografía sobre resina adsorbente XAD que permite la concentración y total purificación del hidroxitirosol mediante la elución con una mezcla metanol o etanol:agua (del 30 al 33%).

HT PURO: hidroxitirosol puro.

Modo de realización de la invención

El procedimiento de purificación se ha desarrollado a partir de una muestra de alpeorajo sometida un proceso de explosión al vapor

Unos 2 Kg de alpeorajo (con unos 8.5 g de hidroxitirosol) se someten a un proceso de explosión al vapor. En un reactor se inyecta vapor de agua a presión durante 10 minutos, a una temperatura de 190-220°C en presencia de H_2SO_4 al 2,5% p/v al producirse la descompresión explosiva del material. además de cierta reacción química, sufre una desestructuración importante y parte del mismo se solubiliza. Tras separar las fracciones soluble e insoluble se toma la primera, quedando una concentración de hidroxitirosol de 0,5 g/L, que va a ser purificado en dos pasos:

1er paso: La muestra (B1) se introduce en la primera columna (C1) con 1,25 Kg de resina aniónica fuerte no activada. El licor recogido a la salida de la columna presenta el mismo color que la muestra inicial, por lo que se queda retenido en la columna todo el hidroxitirosol y poco más. Se realizan lavados con agua hasta recuperar hasta un 80% del hidroxitirosol introducido, unos 7 g, llegándose a tener un extracto seco con una riqueza de un 60% de hidroxitirosol.

2º paso: los lavados con agua que han arrasado los 7 g de hidroxitirosol (B2) se introducen en la columna (C2) con 1,5 Kg de resina XAD. El hidroxitirosol se retiene, y se eluye finalmente con una mezcla al 33% metanol y agua. Se consigue de esta forma una disolución de hidroxitirosol concentrado (HT CONC) que contiene 6.5 g de hidroxitirosol con una pureza de al menos del 95% y una concentración de 2.2 g/L. La purificación se puede llevar a cabo de forma más o menos completa según los fines de la materia que se intenta obtener con el procedimiento de la invención.

La fracción que no se retiene en la columna primera, fracción (A1), se puede utilizar para obtener manitol (31 g) y otros azúcares, entre los que destaca la glucosa (82 g).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo, **caracterizado** porque incluye las siguientes etapas:

- a) introducción de la fuente de hidroxitirosol en una columna de resina de intercambio iónico en forma no activada, obteniéndose tras eluir con agua una disolución que contiene al menos el 85 % del hidroxitirosol presente en la fuente de hidroxitirosol introducida en la columna consiguiéndose con ello un hidroxitirosol de un 60-70 % en riqueza.
- b) introducción de la disolución conteniendo hidroxitirosol procedente de la etapa anterior en una segunda columna de resina no iónica y posterior elución con mezcla metanol o etanol:agua (del 30 al 33 %), obteniéndose una disolución que contiene al menos el 75 % del hidroxitirosol presente en la fuente de hidroxitirosol introducida en la primera etapa y con una pureza mínima del 95 %.

2. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque previamente al tratamiento en las columnas de resina, la fuente de hidroxitirosol se somete a un proceso de explosión al vapor.

3. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque la columna de re-

sina de intercambio iónico en forma no activada es una columna con resina de intercambio aniónico fuerte.

4. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque la columna de resina no iónica es una columna de resina Amberlita XAD.

5. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo según la reivindicación 3 **caracterizado** porque, tras los ciclos de purificación, la resina de intercambio aniónico se regenera mediante un tratamiento que consta de las siguientes etapas:

a) lavado con NaOH al 2 %

b) lavado con ácido fuerte.

6. Procedimiento de obtención de hidroxitirosol purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo según la reivindicación 4 **caracterizado** porque, tras los ciclos de purificación, la resina adsorbente XAD se regenera mediante un tratamiento que consta de las siguientes etapas:

a) extracción de todos los compuestos que acompañan al hidroxitirosol retenidos en la resina, con metanol o etanol en la misma columna, o en caliente mediante el empleo de soxhlet.

b) lavado con una disolución de H₂O₂ al 2 % con pH ajustado a 11,5 mediante adición de NaOH.

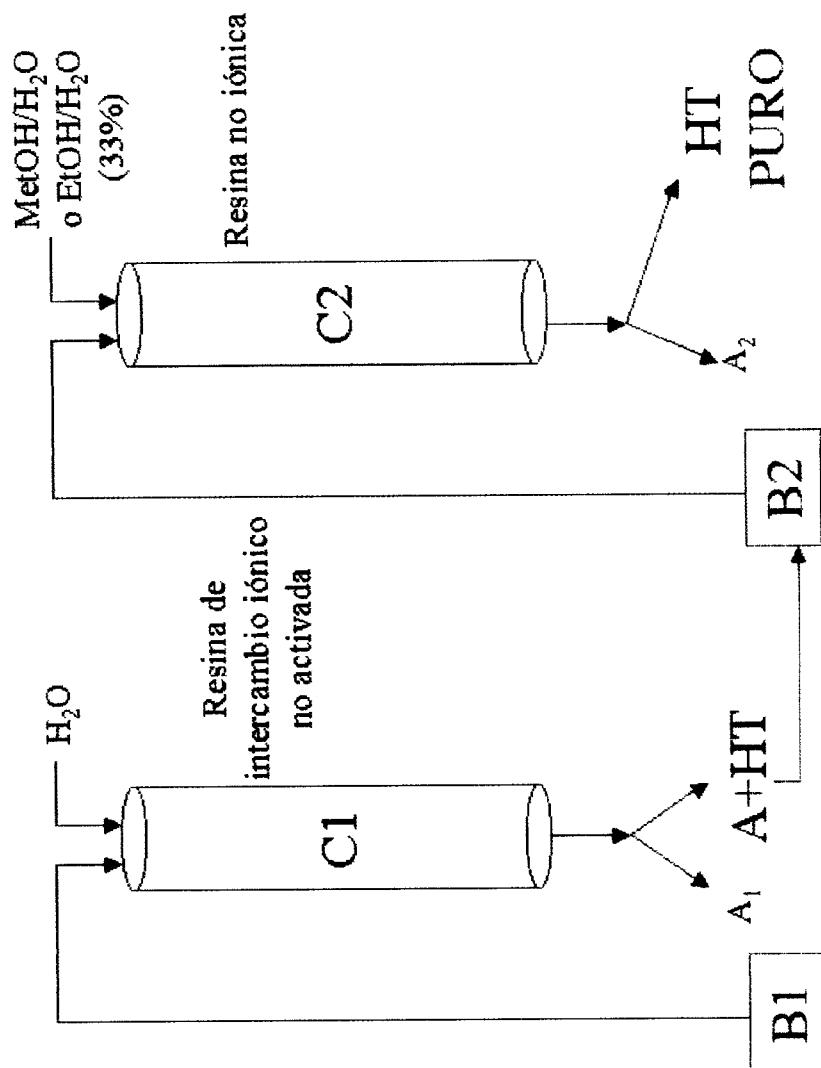


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 177 457

② Nº de solicitud: 200100346

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2001

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C07C 39/11, B01D 15/04, 15/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2145701 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.07.2000, todo el documento.	1-6
A	FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. et al.: "Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of steam-exploded olive stones", 1998, JAOCS, Vol. 75 (11), páginas 1643-1649, ISSN: 0003-021X, todo el documento.	1-6
A	VISIOLI, F. et al.: "Waste waters from olive oil production are rich in natural antioxidants", 1995, Experientia, Vol 51 (1), páginas 32-34, ISSN: 0014-4754, todo el documento.	1-6
A	ES 2143939 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.05.2000, todo el documento.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

04.11.2002

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1