

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 317**

21 Número de solicitud: 201131161

51 Int. Cl.:

C07C 37/82 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

08.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.02.2013

Fecha de la concesión:

09.04.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

16.04.2014

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (66.0%)
SERRANO 117
28006 MADRID (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (34.0%)**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN, Juan;
RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, Guillermo;
LAMA MUÑOZ, Antonio;
SENENT RUBIO, Fatima;
FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN, José María;
MAYA CASTILLA, Inés;
LÓPEZ LÓPEZ, Óscar y
MARSET CASTRO, Azucena**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE HIDROXITIRO SOL, EXTRACTO
MEZCLA DE HIDROXITIRO SOL Y 3,4-DIHIDROXIFENILGLICOL, Y EXTRACTO DE ACETATO
DE HIDROXITIRO SILO, A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL OLIVO Y SU PURIFICACIÓN.**

ES 2 395 317 B1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 317**

21 Número de solicitud: 201131161

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de extracto de hidroxitirosol, extracto mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol, y extracto de acetato de hidroxitirosilo, a partir de subproductos del olivo, y su purificación.

Procedimiento para la obtención de un extracto que comprende hidroxitirosol, bien como producto acetilado o como mezcla con 3,4 dihidroxifenilglicol y la purificación de todos ellos, que comprende al menos una cromatografía en columna de una fuente de hidroxitirosol como subproductos de la aceituna y del olivar, utilizando una mezcla de al menos dos resinas iónicas, preferentemente una resina aniónica con una resina catiónica. Preferentemente en una primera fase se obtiene una fuente líquida rica en fenoles como materia prima para la extracción y purificación de compuestos fenólicos, una segunda fase permite obtener un extracto enriquecido en hidroxitirosol (HT), una mezcla hidroxitirosol con 3-4-dihidroxifenilglicol (DHFG) y se produce acetato de hidroxitirosilo, obteniendo en la tercera fase hidroxitirosol muy puro, el DHFG, su mezcla, y acetato de HT. Cada fase comprende extracción, reacción, concentración, adsorción y desorción, utilizando mezclas de resinas de intercambio iónico, adsorción en resinas no iónicas y una fracción fenólica polimérica, membranas de ósmosis inversa y/o evaporadores.

ES 2 395 317 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de extracto de hidroxitirosol, extracto mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol, y extracto de acetato de hidroxitirosilo, a partir de subproductos del olivo, y su purificación

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La técnica objeto de la presente patente está dirigida a un amplio sector industrial que abarca no sólo al agrícola sino también al cosmético, al de la alimentación, al nutracéutico y al farmacológico. En general su uso estará condicionado por las propiedades que derivan en gran medida del potencial como antioxidante natural del hidroxitirosol (HT), su acetato y su mezcla con el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) y a su alta actividad biológica para la prevención dentro de la formulación de alimentos funcionales o fármacos de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer u
10 otras relacionadas con su actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, etc.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Estudios epidemiológicos indican que la dieta Mediterránea está asociada a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y ciertos tipos de cánceres (piel, pecho, próstata y colon) (López-Miranda y col., 2010). Se trata de una dieta rica en frutas y vegetales frescos, con una relativa baja proporción de grasa animal y
15 teniendo al aceite de oliva como principal fuente de grasa. Estos efectos beneficiosos se los han atribuido no solo a una baja proporción ácidos grasos saturados/monoinsaturados del aceite de oliva, sino también a otras moléculas adicionales presentes en menor concentración, en particular a los compuestos fenólicos antioxidantes.

El interés en los antioxidantes naturales se está incrementando hoy en día porque crecen las evidencias que indican que son capaces de contrarrestar los efectos geno y citotóxicos de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que se producen en casos de stress oxidativo y, que están implicadas en varios procesos patológicos, tales como enfermedades renales y hepáticas, en procesos inflamatorios y en cáncer (Menéndez y col., 2008). Es por eso que a
20 partir de la aceituna se aíslan varios de ellos destacando entre todos el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol).

Según la "European Olive Oil Medical Information Library", el hidroxitirosol (HT) es un compuesto fenólico de una reconocida especial eficacia antioxidante. Sus propiedades antioxidantes se atribuyen especialmente a la presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto, es decir un grupo ortodifenol, característico de los biofenoles. Además de su capacidad de donar electrones y de neutralizar radicales libres, su elevada eficacia antioxidante radica en su capacidad de secuestro o quelación de iones metálicos de Fe o Cu, entre otros, responsables de la formación de radicales libres durante procesos redox.
25

En los últimos años, se ha comprobado que este antioxidante natural HT posee además importantes propiedades biológicas. Hay evidencias que sugieren su potencial neuroprotector, protegiendo células cerebrales de ratones. También presenta un rango de funciones que están relacionada con la protección cardiovascular tales como estimulación del sistema de defensa de detoxificación y transcripción antioxidante, alteración de la expresión de genes relacionados con el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y/o la protección cardiovascular, mejora del perfil lipídico, incremento de efectos antitrombóticos y descenso de marcadores antiinflamatorios (ciclooxigenasa-2, tromboxeno, proteínas reactiva C, etc). Además se ha demostrado la capacidad de estos compuestos de permanecer enlazados a las proteínas LDL protegiéndolas frente a la oxidación. También se ha demostrado que el HT induce un amplio rango de efectos antitumorales incluyendo supresión de proliferación e inducción de apoptosis en células de carcinoma de colon.
30
35

Actualmente, son, por tanto, numerosas las investigaciones que intentan demostrar la actuación de este compuesto en la prevención y tratamiento de gran número de enfermedades. Previene contra la degeneración macular y mejora de la visión, el ictus cerebral isquémico y el envejecimiento de la piel. Todos estos antecedentes sugieren además el uso del HT como componente funcional en alimentos, así como su empleo para la prevención del deterioro de los mismos debido a su demostrada capacidad para inhibir la oxidación de los lípidos insaturados.
40

Se han desarrollado y patentado diversos métodos y sistemas encaminados a la obtención de extractos ricos en HT y aquellos que tratan de aislar y purificar el componente HT desde la aceituna y sus subproductos, así como desde la hoja de olivo.
45

En muchos casos se utilizan técnicas de extracción con disolvente o procedimientos de separación y concentración selectiva por ultrafiltración, osmosis inversa, evaporación, separación cromatográfica y extracción con fluidos supercríticos, a partir tanto de las aguas de vegetación separadas del alperujo, como de las aguas de procesado de la aceituna de mesa. Estas técnicas pueden ser usadas individualmente o de modo integrado. Así después de efectuar una ultrafiltración de las aguas generadas en el procesado de la aceituna de mesa se procedía a efectuar un proceso de adsorción en resina no iónica (tipo XAD) para obtener un extracto rico en hidroxitirosol (ES 2.186.467). También se han descrito técnicas de separación por membrana de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, seguido de un proceso de purificación en columna (US 2006/0070953).
50

Por otro lado también se obtienen extractos de hidroxitirosol a partir de las aguas de vegetación de la aceituna mediante fluidos supercríticos, tal como el dióxido de carbono (US 2002/0198415).

Uno de los procedimientos más simple, práctico y económico de los descritos es el que permite obtener un hidroxitirosol con alto grado de pureza a partir de cualquier fuente acuosa (alpechín, fase acuosa del proceso hidrotérmico del alperujo, agua de lavado de la elaboración de las aceitunas de mesa, etc.) mediante una cromatografía en dos pasos, una primera con una resina de intercambio iónico y una segunda con una resina adsorbente del tipo XAD (US 2004/0102657).

También se ha descrito la extracción del HT a partir del alpechín mediante una mezcla de acetato de etilo y etanol o acetato de etilo, etanol y agua para posteriormente llevar a cabo tratamientos de la fase orgánica con una resina del tipo XAD, que permite obtener unos extractos con una alta concentración de HT (ES 2311401).

De los métodos de síntesis que existen, el descrito por Capaso et al. (Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S. Y Solla, 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). El hidroxitirosol se sintetiza a partir del ácido 3,4-dihidroxifenilacético por reducción con LiAlH_4 en tetrahidrofurano, bajo reflujo, durante 2 horas.

Bai et al. (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 con trimetilsildiazometano y posterior reducción del éster obtenido con NaBH_4 . Más recientemente se obtiene por reducción del metiléster del ácido fenilacético con borohidruro sódico (WO2007/009590) o por oxidación de tirosol en presencia de peróxido de hidrógeno y trióxido de metileno (US2009/0023815).

Por vía enzimática, se obtiene a partir del tirosol usando como catalizador una tirosinasa de hongo (ES2170006).

Además del HT, también su derivado monoacetilado, acetato de hidroxitirosilo es un compuesto natural que ha sido detectado en el aceite de oliva virgen. Se trata de un compuesto que es bastante lipófilo con un efecto antioxidante similar al HT con lo que tendría mucha aplicación como aditivo funcional en alimentos grasos. Se ha descrito un procedimiento de obtención de monoésteres de hidroxitirosilo a partir del HT mediante una reacción regioselectiva de esterificación sobre el hidroxilo alifático (ES1541544). Se ha demostrado que este compuesto ejerce un efecto antiagregante plaquetario en humanos superior al HT y similar al efecto ejercido por el ácido acetilsalicílico (González Correa et al., 2009). También se ha descrito un proceso para producir triacetilhidroxitirosol mediante una mezcla acilante de ácido perclórico y anhídrido acético que lo vuelve químicamente más estable que el HT y más fácilmente miscible con preparaciones lipofílicas, farmacéuticas y cosméticas (WO2007/074490).

Similar al HT y bastante menos estudiado está el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) cuya estructura es como la del HT con un grupo hidroxilo adicional en la posición bencílica. Su eficacia antioxidante en agua es de dos a tres veces más alta que la del ácido ascórbico o el HT mientras que en medio lipídico es el doble que la del HT y similar a la vitamina E en ensayos *in vitro* (Rodríguez et al., 2007). Actualmente se ha demostrado que muestra un importante efecto sinérgico con el HT para la inhibición de la agregación plaquetaria, y cuya mezcla iguala al efecto que ejercen todos los fenoles presentes en un extracto que contiene los principales compuestos fenólicos del alperujo (de Roos et al., 2011). Actualmente no existe este nuevo fenol en el mercado, suponiendo por su potencial bioactivo un importante avance el llegar a su obtención, principalmente mezclado con el HT, para aprovechar sus posibles propiedades sinérgicas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un extracto que comprende hidroxitirosol ya sea como tal, como producto acetilado o como mezcla con DHFG y la posterior purificación de todos ellos caracterizado porque dicho procedimiento comprende la realización de al menos una cromatografía en columna, de una fuente de hidroxitirosol, utilizando una mezcla de al menos dos resinas iónicas, preferentemente una resina aniónica con una resina catiónica.

En el caso de no disponer de una fuente líquida de los compuestos buscados, o de que sea importante aumentar su concentración se lleva a cabo una preparación previa de la fuente de hidroxitirosol. Obteniendo una fuente líquida con alto contenido en fenoles, principalmente en hidroxitirosol y DHFG tratada antes de realizar su paso por la columna. La preparación de la fuente ha de proveer un líquido con bajo contenido en sólidos en suspensión y grasas que permita la percolación de la misma a través de las resinas alargando además la vida útil de las resinas. También podrán ser usadas fuentes que carezcan de DHFG obteniéndose en tal caso un extracto de HT, otro de su acetato y dichos compuestos purificados.

De acuerdo con lo anterior, si la fuente de hidroxitirosol es sólida o semisólida la preparación de la fuente comprende la realización de una extracción en fase líquida y separación de la fase líquida mediante filtración, centrifugación y/o decantación.

5 Opcionalmente, si la fuente de hidroxitirosol es líquida la preparación de la misma comprende la realización de una hidrólisis.

Las fuentes de hidroxitirosol pueden ser subproductos de la aceituna y del olivar, tales como alpechín, orujo, alperujo, hojas, poda, hueso, aguas de proceso de aderezo, plantas de la familia de oleáceas, y combinaciones de las mismas.

10 Según el procedimiento de la invención, las resinas pueden ser catiónicas, aniónicas o combinaciones de ambos tipos. De modo preferente según la invención se usa una mezcla de resina aniónica con catiónica, y de modo más preferente aún dicha mezcla comprende al menos 2% en peso del total de la mezcla, en resina catiónica. Cualquier porcentaje superior al 2% en peso produce un resultado óptimo. El uso de al menos una resina catiónica favorece la adsorción de los fenoles simples y alarga la vida útil de la resina.

Como resinas útiles para poner en práctica el procedimiento de la invención se pueden usar las siguientes, entre otras:

15 Resinas catiónicas entre las que se encuentran toda la serie de Imac HP, toda la serie de las Amberlite FPC, Amberlite IRP, Amberlite CR, Amberlite IR, Amberlite SR, Amberlite IRC, Amberlite PWC; toda la serie de Amberjet 1000, 1200, 1500, 4200, 4600 ó 252; toda la serie Dowex, Dowex Monosphere, Dowex HCR, Dowex SBR catónicas; resina tipo, Lewatit de la series monoplus, IRA o S, Ambersep o Amberlyst catiónicas.

20 Resinas aniónicas entre las que se encuentran toda la serie Amberlite, Amberlite IRA, Amberlite FPA; toda la serie de Amberjet 4200, 4400 ó 4600; toda la serie Dowex, Dowex Monosphere, Dowex HCR, Dowex SBR aniónicas; resina tipo Lewatit, Ambersep o Amberlyst aniónicas; toda la serie de Duolite A, AP.

En el caso de realizar una activación parcial de la mezcla de resinas, dicha activación se puede realizar con soluciones ácidas, soluciones básicas o con disoluciones salinas. Dicha mezcla de resinas puede ser calentada a temperaturas de al menos 50°C durante la regeneración.

25 Según el procedimiento de la invención para la realización de la cromatografía, la fuente de hidroxitirosol se hace pasar por la columna y se vacía, o no, una vez que ha terminado dicha carga de la fuente. Tras la carga de la fuente sobre la columna, opcionalmente se puede vaciar la fuente que aún permanece impregnando la resina. En el caso de vaciar la fuente se facilita más su transporte y también se obtendrán los primeros lavados con un mayor grado de pureza en los compuestos buscados, principalmente del DHFG por cuya naturaleza más polar eluye en los primeros lavados.

30 Según realizaciones concretas del procedimiento para la realización de la columna, la fuente de hidroxitirosol se carga en el lugar donde se genera la misma fuente a través de columnas móviles, o en planta.

De acuerdo con el procedimiento de la invención la elución del extracto obtenido de la columna se realiza, según realizaciones preferidas, de modo secuencial: primero con agua neutra o acidificada en una primera serie de eluciones en un primer paso de descarga, de nuevo con agua neutra o acidificada en una segunda serie de eluciones en un segundo paso de descarga, usándose en ambas series preferentemente agua acidificada con un pH entre 2 y 6,5.

35 Alternativamente, la descarga secuencial de la columna puede comprender una reacción de acetilación del HT mediante una fase de reacción en la columna en la que está adsorbido el HT, que comprende después de llevar a cabo la segunda serie de eluciones.

- el vaciado de la columna,

- un secado opcional mediante la introducción de aire caliente,

40 - una posterior inundación de la columna por completo con acetato de etilo cerrando la entrada y salida de la columna y calentando, preferentemente por encima de 50°C,

- y nuevo vaciado de la columna que puede ir acompañado por un último paso de elución con más acetato de etilo para eluir completamente al acetato de hidroxitirosilo formado.

45 Esta realización puede comprender además una evaporación y una cristalización en medio acuoso/orgánico u acuoso, del acetato de hidroxitirosilo.

Según una segunda alternativa para la acetilación del HT ésta comprende:

- realizar la cromatografía en columna obteniendo extracto de hidroxitirosol o el hidroxitirosol ya purificado, poner en contacto la resina catiónica con dicho extracto de hidroxitirosol o el hidroxitirosol purificado, y llevar a cabo una reacción

de acetilación en tanque agitado aplicando una temperatura superior a 50°C en presencia de acetato de etilo. Esta realización puede comprender además una evaporación y una cristalización en medio acuoso/orgánico u acuoso, del acetato de hidroxitirosilo.

5 El extracto obtenido según el procedimiento de la invención se puede purificar de acuerdo con una o varias de las siguientes operaciones:

- realizar una cromatografía de adsorción con resinas no iónicas y posterior desorción con agua neutra o acidificada, o su mezcla con disolventes orgánicos,

10 - una purificación por adsorción sobre una nueva fracción fenólica polimérica (FFP) obtenida a partir de los productos y subproductos de la industria del aceite de oliva, reteniendo dicha fracción al extracto formado por hidroxitirosol y por 3,4-dihidroxifenilglicol, y redisolución de dicho hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol, en medio acuoso u orgánico a temperatura ambiente o superior, de forma conjunta, obteniendo la mezcla más pura, o diferencial obteniendo por una lado HT y por otro DHFG ambos con una mayor grado de pureza en peso. Se puede retener en dicha fracción el extracto de hidroxitirosol el cual se redisuelve en agua para obtener un HT con una pureza de hasta un 100%.

15 - concentración de los extractos purificados mediante evaporación, atomización o concentración por ósmosis inversa obteniéndose los productos secos o parcialmente hidratados.

El DHFG se puede obtener por lo tanto, poniendo en contacto la mezcla HT + DHFG con la FFP y lavando, o realizando una extracción con agua a temperatura ambiente obteniendo en un primer lavado HT, en el segundo HT+ DHFG y en el tercero DHFG, todos ellos con mayor pureza.

20 La presente invención también tiene como objeto un producto seleccionado entre los compuestos hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosilo y 3,4-dihidroxifenilglicol, y combinaciones de dichos compuestos, siendo dicho producto obtenible a través del procedimiento descrito.

Un producto preferido obtenido del procedimiento es una mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol en una relación mínima de 10:1 y máxima de 1:2.

25 La presente invención también tiene como objeto una mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol en una relación mínima de 10:1 y máxima de 1:2, preferentemente en una relación mínima de 5:1 y máxima de 1:1,3.

Un producto obtenido según el procedimiento de la invención está seleccionado entre:

- hidroxitirosol con una pureza entre 80-100%,

- una mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol con una pureza entre 60-100% como suma de las individuales,

30 - 3,4-dihidroxifenilglicol con una pureza del 50-100%, y

- acetato de hidroxitirosilo con una pureza entre 80-100%.

La presente invención también tiene como objeto un extracto fenólico caracterizado porque comprende uno o más de los productos definidos anteriormente

De manera preferida dicho extracto fenólico es obtenible mediante el procedimiento descrito.

35 La presente invención también tiene como objeto adicional el uso del extracto definido anteriormente o del producto definido anteriormente, como agente antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antidegenerativo celular, anticanceroso y secuestrante de radicales libres en formulaciones de alimentos, productos cosméticos y fármacos.

40 La presente invención también tiene como objeto adicional el uso del extracto definido anteriormente o del producto definido anteriormente como agente formando parte de emulsiones, nano y microencapsulaciones o adsorbidos en otras sustancias para mejorar sus propiedades físico-químicas y/o estabilidad.

45 Teniendo en cuenta que hidroxitirosol y DHFG son ambos antioxidantes, siendo el DHFG más potente que el HT, pero más inestable, con lo que la presencia de HT lo estabiliza. Esta combinación de propiedades da lugar a un efecto sinérgico de la mezcla de hidroxitirosol y DHFG que potencia la actividad que cada uno tiene por separado. Así el uso combinado del hidroxitirosol y DHFG, es decir como mezcla, en formulaciones de alimentos, productos cosméticos y fármacos es especialmente ventajoso.

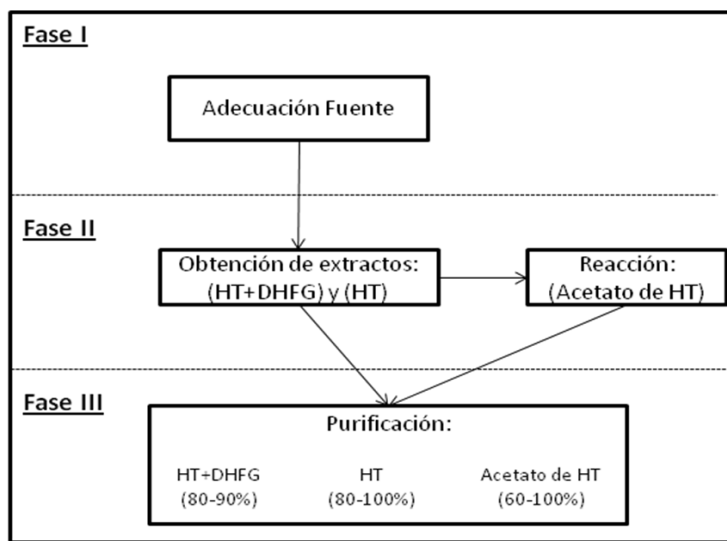
De la misma forma la mezcla HT con el acetato de hidroxitirosilo permitiría el uso de dos antioxidantes con distintas polaridades, lo cual sería muy eficaz para la prevención de estados oxidativos en mezclas de medios hidrófilos y lipófilos que estén o no formando emulsiones en alimentos, productos cosméticos y fármacos.

5 Por lo tanto la presente invención tiene como objeto adicional el uso combinado por un lado del hidroxitirosol y DHFG y por otro del HT y el acetato de hidroxitirosilo en mezclas de medios hidrófilos y lipófilos que estén o no formando emulsiones en una formulación seleccionada entre formulación de alimentos, de productos cosméticos y de fármacos.

El procedimiento base de la presente invención es aplicable a aquellos productos y subproductos derivados de la aceituna y del olivar que contengan hidroxitirosol, y por tanto que sean susceptibles de ser usados como fuente de dicho antioxidante natural.

10 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN**

En una realización particular de la invención el procedimiento puede comprender tres fases como se indica esquemáticamente en el esquema a continuación:



Esquema básico del procedimiento.

15 Las fases del procedimiento según esta realización son:

1. La preparación de la fuente, que es opcional, puesto que en algunos casos se dispone de fuente líquida con hidroxitirosol que no hace falta pretratar, como es el caso de alpechines que llevan mucho tiempo almacenado o de las aguas de aderezo con gran contenido en hidroxitirosol.

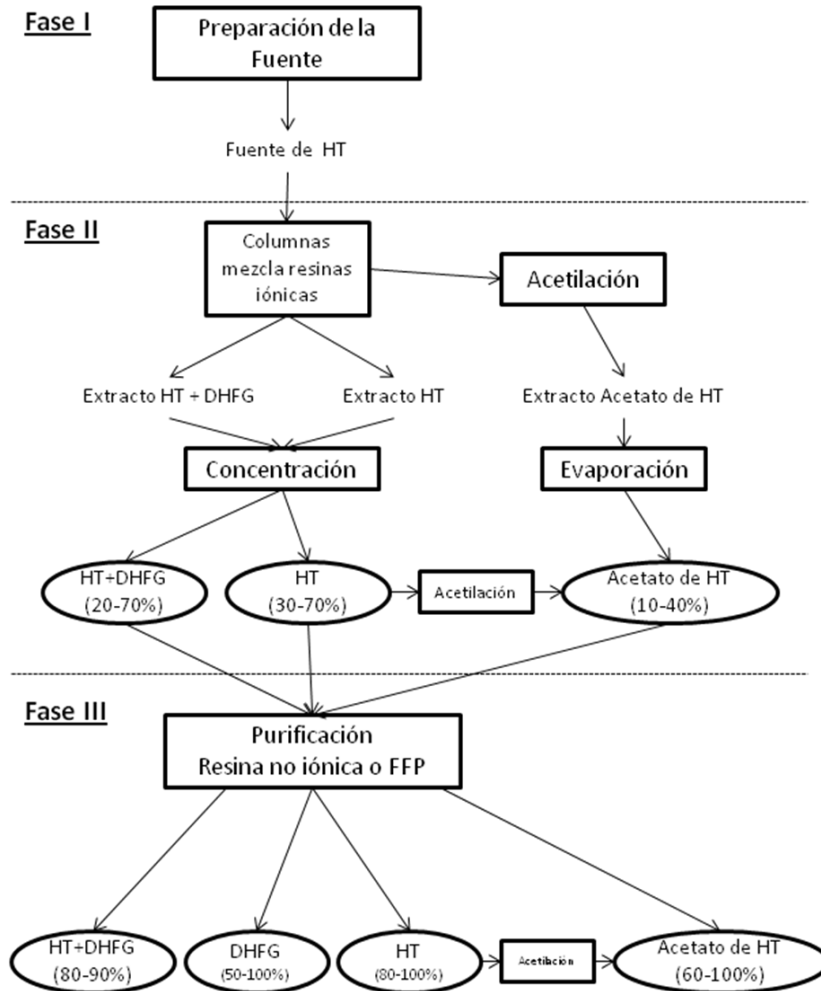
20 En el caso de no disponer de una fuente líquida de HT y DHFG, o de que en dicha fuente estén presentes en baja concentración, se procede a la preparación de la fuente para obtener una disolución líquida que contenga HT y DHFG libres en altas concentraciones. Si se dispone de una fuente líquida que pueda pasar a través de la resina, entonces esta fase será opcional para aumentar su concentración.

2. Obtención de tres extractos: un extracto de HT, un segundo extracto mezcla de HT con DHFG y un tercer extracto rico en acetato de HT.

25 3. Purificación de cada uno de los extractos, obteniendo HT, acetato de HT, DHFG y una mezcla HT y DHFG todos ellos con un alto grado de pureza en peso.

Cada fase permite por sí sola la obtención de productos comercializables como son una fuente de fenoles, extractos y compuestos o mezcla altamente purificados.

30 Cada una de las fases que puede comprender el procedimiento, según esta realización, se divide a su vez en varios pasos que se detallan en el **Esquema 1** y se explican a continuación:



Esquema 1. Esquema detallado de las distintas fases del procedimiento.

FASE I

5 En esta fase se prepara la fuente de hidroxitirosol hasta obtener una fracción líquida que contenga al HT y/o DHFG. Para lo cual:

- En el caso en el que la fuente de hidroxitirosol sea sólida o semisólida (orujos, orujillos, hoja, poda o alperujo) se lleva a cabo una extracción en fase líquida con agua en medio ácido o básico, o con disolvente orgánico como por ejemplo con etanol, o mezcla de ambos. Las condiciones de la extracción pueden estar precedidas por una molienda para maximizar la superficie de contacto. La extracción puede ser favorecida por aplicación de calor.
- 10 Finalmente se separarán las fases por centrifugación, filtración y/o decantación, obteniéndose un líquido con bajo o nulo contenido de sólidos en suspensión y/o materia grasa.
- En el caso en el que la fuente sea líquida pero su contenido en HT y/o en DHFG sea muy bajo en forma libre, pero tenga presente precursores como la oleuropeína, 2''hidroxioleuropeína, el verbascósido o el β -hidroxiverbascósido entre otros, se procederá a una hidrólisis previa, catalizada o no con ácido o con base, que hidrolice dichos compuestos liberando al medio HT y/o DHFG. Posteriormente se realizará o no una sedimentación
- 15 previa o centrifugación para eliminar la posible presencia de sólidos en suspensión y/o materia grasa, que podrá estar favorecida por la adición de ácidos, bases y/o floculantes.

FASE II

En la primera fase se obtiene la materia prima para la extracción y purificación de los fenoles o extractos fenólicos que se obtienen en la segunda fase, como son el HT, acetato de hidroxitirosilo y la mezcla de HT y DHFG. En esta fase II se obtiene un extracto de hidroxitirosol (HT) enriquecido en dicho antioxidante y en otros fenoles simples, una mezcla bioactiva de HT y 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), al mismo tiempo que permite la formación del correspondiente acetato de hidroxitirosilo.

La fuente obtenida en la fase I, o directamente la fuente en forma líquida, ya sea en medio acuoso, orgánico o mezcla de ambos se somete a una columna cromatográfica. La resina empleada es una mezcla de resina de intercambio aniónica con al menos un 2% de catiónica. Con ello se consigue una serie de importantes ventajas en el proceso:

- 5 - Se consigue una mayor especificidad de retención de fenoles simples y favorece las etapas de lavado y regeneración, reduciendo los efluentes producidos en las fases de regeneración.
 - La mezcla de resinas junto, opcionalmente con el uso de agua a pH ácido como eluyente, permite la obtención de un HT con un mayor grado de pureza, y una mezcla HT con DHFG más estable.
 - 15 - Esta mezcla de resinas hace posible la posterior etapa de acetilación en la cual la resina ácida actúa como catalizador evitando el uso de enzimas y/o ácidos.
 - El extracto se enriquece más en hidroxitirosol y fenoles análogos como el DHFG permitiendo obtener un extracto rico en ambos fenoles los cuales presentan actividades sinérgicas.
 - La nueva mezcla de resinas se envenena o absorbe menos compuestos orgánicos, principalmente de origen lipídico, alargando sustancialmente su vida útil y disminuyendo los ciclos de regeneración y los efluentes que de él se producen.
 - 20 - La activación se simplifica a una activación parcial con disoluciones salinas que pueden emplearse en más de un ciclo y cuya acción se favorece por la acción de la temperatura, evitándose regeneraciones frecuentes con ácidos y bases fuertes, y con ello sus efluentes.
 - La nueva mezcla de resinas mejora la opción de poder vaciar o evacuar el líquido que contiene la columna y por tanto que impregna la resina. Este hecho conlleva entre otras, tres importantes ventajas:
 - Evita al inicio de la descarga, o elución de la columna, que los eluyentes se mezclen con la fuente que se haya quedado en el interior de la columna y permite obtener desde las primeras eluciones extractos más purificados.
 - 30 - También se facilita el poder realizar la carga de la fuente "in situ", es decir en el mismo lugar en donde ésta se origina sin necesidad de transportar toda la fuente, o la fracción que quede en la columna, al lugar donde después se desarrollen los siguientes pasos, operando a modo de columnas móviles. Con ello se evita el manejo de la fuente una vez pasado por la columna y que supondría un efluente contaminante a tratar y se reducen sustancialmente los costos de transporte, limitándose éstos al transporte de las propias columnas sin líquido en su interior.
 - 35 - Un mejor vaciado propicia la posterior fase de producción de acetato de hidroxitirosilo, puesto que es importante eliminar la mayor cantidad de agua posible cuya presencia en el medio de reacción de acetato de etilo y HT origina reacciones secundarias que compiten con la producción del acetato de HT.

El modo de operar con la columna comprende varios pasos:

- 40 1. Una primera activación parcial con disolución salina que puede estar favorecida por la temperatura a través de una camisa calefactora, seguida por un lavado con agua o agua ligeramente acidificada, hasta incluso pH 2. Cuando la mezcla de resinas haya sido sometida a muchos ciclos de uso se aplicará conjuntamente un calentamiento por encima de 50°C para la regeneración de la misma o incluso un lavado con ácido y/o base previo.
- 45 2. La carga de la fuente sobre la resina puede realizarse mediante gravedad o por inundación del lecho, dentro de una planta de procesamiento o incluso en la industria donde se genera dicha fuente líquida. El llevar a cabo la carga en la propia industria que genera la fuente tendría las ventajas de evitar los efluentes de la fuente una vez pasada por la columna. Para la industria tendría la ventaja de obtener un licor con una menor carga orgánica disminuyendo la DBO, la DQO y el contenido en compuestos fitotóxicos que dificultan su depuración. Tras la carga puede producirse una evacuación total de la fuente dejando la resina lo más seca posible. Con ello se consigue que los primeros lavados o eluciones con agua no arrastren fuente original y que el DHFG y el HT recogidos se eluyan más fácilmente con agua y con un mayor grado de pureza.
- 50

3. La descarga de la columna se puede realizar en tres pasos, y en cada uno se obtiene un extracto distinto, pudiéndose usar en los dos primeros agua ligeramente acidificada para favorecer la ionización de los compuestos y con ello su mejor elución y una mejor conservación del producto obtenido:

3.1. En una primera serie de eluciones con agua se obtiene una mezcla de HT y DHFG que va desde una relación 10:1 hasta 1:2 de ambos respectivamente.

3.2. En una segunda serie de eluciones con agua se recoge un extracto rico en HT cuya pureza media se encuentra entre el 30-70% en peso seco gracias a la nueva mezcla de resinas y a la elución con agua a pH ácido.

3.3. Tras la segunda serie de eluciones con agua se vacía la columna y se introduce opcionalmente aire caliente con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua posible que haya quedado en la columna. Posteriormente se inunda por completo con acetato de etilo cerrando la entrada y salida de la misma y se calienta mediante una camisa calefactora o un serpentín eléctrico en el interior del lecho para que el HT que aún se encuentra retenido en la columna se acetile gracias a la acción catalítica de la mezcla de resinas. Finalmente se vacía e incluso se puede adicionar más acetato de etilo para la total elución la columna obteniendo un extracto rico en acetato de HT con una pureza media de 10-40% en peso seco.

Los tres extractos obtenidos pueden ser concentrados incluso hasta sequedad empleando equipos de ósmosis inversa, evaporación con o sin vacío, u otro sistema de concentración. Con ello se obtienen extractos finales con una alta actividad biológica. En el caso de la nueva mezcla HT con DHFG el interés reside en el marcado carácter sinérgico de la misma, potenciando ciertas actividades, como es el caso de la inhibición a la agregación plaquetaria además de obtenerse de esta forma un producto final más estable y fácilmente manejable.

FASE III

Una vez obtenidos los extractos se puede proceder a la purificación de los mismos para obtener un HT y su acetato con un alto grado de pureza, ambos en el intervalo de 80-100%. En el caso de la mezcla HT-DHFG se aumenta su pureza hasta en 60-90% e incluso se pueden separar sus componentes mediante la adsorción en una nueva fracción fenólica polimérica (FFP) desarrollada por nosotros. Esta fracción ha sido divulgada en la solicitud de patente con número P201131041. Esta mezcla que consiste en la unión de fenoles condensados con una estructura no determinada permite obtenerlos individualmente puros o en un intervalo de pureza del 80-100% para el HT o del 50-100% para el DHFG. La FFP se llega a obtener a partir de los subproductos de la aceituna (alpechín, orujo, alperujo, poda, hojas o subproductos de la industria de aderezo) tratados térmicamente por encima de los 50°C entre 30 y 180 minutos y posteriormente extractados con acetato de etilo. La FFP forma parte de dicho extracto y puede ser purificado en mayor o menor medida mediante el uso de resinas no iónicas o de filtración por gel entre otros. Esta fracción polimérica presenta una curva en el perfil de HPLC a longitudes de ondas de 254 y 280 nm característico de un entramado estructural complejo que no permite la separación de sus componentes. Su identificación se realiza a través de una elución en C-18 en HPLC con un gradiente acetonitrilo-agua en donde eluye en el intervalo de 20% de acetonitrilo y 80% de agua a 40% de acetonitrilo y 60% de agua.

La purificación puede proceder de diferentes maneras para llegar a un proceso de adsorción:

1.- Purificación en columnas de adsorción: El extracto de HT, de su acetato o la mezcla HT-DHFG obtenidos en la segunda fase se hacen pasar separadamente a través de una columna no iónica o de adsorción tipo XAD, de la cual se eluyen con un gradiente etanol-agua o bien simplemente con agua, en uno u otro caso la fracción acuosa puede estar ligeramente acidificada (pH 2-6.5) para que facilite la ionización de las especies y mejore el rendimiento de desorción del DHFG, HT y su acetato. De esta forma se llega a un HT y un acetato de HT con una pureza comprendida entre el 80-100% en ambos casos. Para aumentar el grado de pureza del acetato de HT puede disolverse en una mezcla de un disolvente orgánico con agua y después eliminar el disolvente orgánico hasta que se produzca la cristalización del acetato.

Alternativamente también se puede obtener el acetato de HT a través del HT ya purificado en la fase tres o incluso el extracto obtenido en la fase dos. Para ello en cualquiera de los dos casos el HT se carga en un tanque agitado en presencia de resina ácida o de intercambio catiónico y se calienta hasta que se produce la acetilación. De esta manera si se parte de HT ya purificado se obtiene un acetato más puro.

2.- Purificación por adsorción sobre una nueva fracción fenólica polimérica (FFP) obtenida por extracción con disolventes a partir de los subproductos de la aceituna. La FFP ha sido recientemente descubierta así como su capacidad de retener a los fenoles simples como los tratados en la presente invención. Los extractos una vez obtenidos se ponen en contacto con el FFP en medio acuoso, orgánico o mezcla de ambos. La forma de operar depende de los disolventes usados:

- Uso de disolventes orgánicos: en este caso se emplea la FFP disuelta en disolventes orgánicos mezclados o no con agua. Es el caso del etanol-agua en donde se redisuelve la FFP y se le añade el extracto a purificar, ya sea de HT,

DHFG o mezcla de ambos. Finalmente se evapora el disolvente y se le añade agua con o sin calentar o agitar, obteniendo una disolución final con un alto nivel de pureza de los fenoles buscados.

- Uso de disoluciones acuosas. En este caso se favorece el contacto mediante calentamiento y agitación tras añadir el extracto a la FFP. Tras el calentamiento se puede retirar inmediatamente la fase acuosa y añadir agua para la desorción de los compuestos con una alta pureza. Este tipo de contacto se puede llevar a cabo en un tanque agitado o en una columna en donde la FFP se encuentre fijada a un soporte sólido que forme parte del relleno de la columna. De esta forma la columna se inunda inicialmente con la disolución a purificar y se puede calentar, o no calentar, el lecho. Finalmente se evacua la columna y se vuelve a cargar con agua para la desorción final de los fenoles buscados: el HT, el DHFG y su mezcla con un mayor grado de pureza en peso.

10 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

A continuación se muestra a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo la obtención a nivel de planta piloto, de HT, acetato de HT e HT mezcla con DHFG, según un procedimiento de tres fases:

Fase I:

Se parte de una fuente líquida de alpechín cuya concentración en HT no supera los 0.8 g/L, y de DHFG de 0.3 g/L, y una gran cantidad de sólidos en suspensión. Para el acondicionamiento de la fuente se acidifica hasta pH de 2.8 con ácido fosfórico y se deja en un decantador para favorecer la precipitación de los finos. El ácido ayuda por una parte a la hidrólisis de los conjugados del HT para aumentar su contenido en forma libre, y por otro a la separación del sólido. Se centrifuga el sobrenadante obteniendo 350 L de una fuente con una concentración de HT de 1.6 g/L y de 0.3 g/L de DHFG.

Fase II:

La fuente ya acondicionada (350 L) se hace pasar a través de una columna de 40 cm de diámetro con una altura de lecho de 115 cm, rellena por una mezcla de resina aniónica tipo A-4200C con catiónica tipo IR-120H al 20%. Previamente la mezcla ha sido parcialmente activada con una disolución saturada salina (NaCl) y lavada con agua acidificada hasta pH 2. La columna dispone además de una camisa calefactora y entrada de aire caliente. Una vez evacuado la fuente de la columna se eluyen y tratan las distintas fracciones de la misma:

- Primera elución: se utilizan 550L agua acidificada (pH 2-6) de forma que la disolución a la salida tenga un pH comprendido entre 6.5 y 7. Se obtiene un extracto rico en la mezcla de HT con DHFG, en una relación aproximadamente 4:3. Dicho extracto se concentra en un equipo de ósmosis inversa hasta obtener 5 L de extracto final (**extracto M**) con una concentración de 22.6 g de HT/L y de 14.6 g de DHFG/L, siendo la pureza total de la mezcla de un 30% en peso.

- Segunda elución: se continúa eluyendo con 300 L de agua ácida, en este caso no se controla el pH de salida puesto que ahora ya no se busca el DHFG. Tras la elución se concentra en el equipo de ósmosis inversa hasta obtener 2 L de **extracto HT** con 90 g de HT/L con una pureza de un 63% en peso seco.

- En tercer paso se seca la columna evacuando toda el agua y haciendo pasar una corriente de aire caliente. La columna seca tiene adsorbido unos 260 g de HT. Se inunda el lecho con acetato de etilo y se calienta la columna a 70 °C con la camisa calefactora. Tras un tiempo de dos a tres horas se evacúa de nuevo la columna y se concentra el acetato de etilo rico en acetato de HT, obteniendo 440 g de un extracto (**extracto Ac-HT**) al 18% de acetato de HT (80g aproximadamente).

Fase III.

La purificación de los extractos obtenidos se lleva a cabo mediante la aplicación de dos métodos de adsorción, por un lado a través de columnas de adsorción no iónicas y por otro a través del nuevo complejo polimérico denominado FFP.

A) Adsorción en resinas: la mitad de cada uno de los tres extractos (mezcla HT con DHFG, HT y acetato de HT) se purifican a través de una columna con resina de adsorción no iónica tipo EXA o XAD de 10 cm de diámetro y 70 cm de altura.

- **Extracto M:** se carga en la columna y se eluye el HT junto con el DHFG con 20 L de un gradiente de un 20-40% de etanol en agua. La mezcla purificada se concentra en el equipo de ósmosis hasta 1 L obteniéndose una mezcla de 127g que contiene 30 g de DHFG y 47 g de HT con una pureza final en peso seco por encima del 60%.

- **Extracto HT:** se carga en la columna y se eluye con 40 L de disolución ácida, obteniendo un extracto de 89g que contienen 82 g de HT con una pureza media del 92%. La elución también puede llevarse a cabo usando junto

con el agua ácida un gradiente de etanol hasta el 35% etanol agua ácida, consiguiéndose de esta forma menos volumen de elución.

5 - **Extracto acetato de HT:** se redisuelve en etanol/agua (1:1) y se hace pasar por la columna y se eluye con un gradiente etanol-agua desde un 10% hasta el 80%, obteniendo una fracción de 12L con 2.7g/L de acetato de HT, que contiene el 85% del cargado en la columna. Se evaporan los 12L y se obtienen 35.8 g que contienen 35 g de acetato de HT con una pureza en peso seco del 97.8%.

10 También se obtiene acetato de HT partiendo del HT ya purificado. Para ello se mezclan 41.7 g de HT purificado que contienen 40 g de HT secos con una pureza por encima del 96% con 150g de resina catiónica tipo IR-120H y 0.5L de acetato de etilo en un recipiente cerrado, con agitación y calor a reflujo. Tras 11 horas el 74% del HT se ha acetilado obteniendo por tanto 37.7 g de acetato de HT.

B) Adsorción sobre FFP: la otra mitad de cada uno de los extractos se purifica mediante adsorción en la nueva fracción fenólica polimérica.

15 -**Extracto M.** Se parte de 152g de extracto que contienen 56.5 g de HT y de 36.5 g de DHFG en 0.5 L de disolución acuosa a la cual se le añaden 600 g de FFP y 0.5L de etanol. Se agita la mezcla y se evapora hasta sequedad. Finalmente se redisuelve en 0.5 L de agua y se separa la FFP insoluble obteniendo una fracción acuosa con 50.8 g de extracto que contiene 20 g de HT y 13 g de DHFG con una pureza del 65%. Se vuelve a lavar con 0.5 L de agua y se obtienen 65.5 g de extracto que contienen 35 g de HT y 22 g de DHFG en mezcla con una pureza del 87% en peso.

20 De forma paralela se realiza otra prueba partiendo de 50g de otro extracto obtenido en otra experiencia que contienen 16.3 g de HT y 14.5 g de DHFG con una pureza de la mezcla del 61.6% en peso seco. Se le añaden 200 g de la FFP y 0.25L de etanol, se agita y evapora hasta sequedad. Se redisuelve esta vez en varios lavados con agua fría obteniendo en el primero 7.8 g de HT al 93% de pureza, en el segundo una mezcla de 8.2 g de HT y 6.7 g de DHFG con una pureza de la mezcla del 82%, y finalmente en el tercer lavado 4.3 g de DHFG con una pureza por encima del 70% en peso seco.

25 -**Extracto de HT.** Se parte de 90 g/L de HT existentes al 63% de pureza en 1L a los que se les adicionan 600 g de FFP y 0.5 L etanol. Se lleva a sequedad y se redisuelve en 1 L agua y se separa la FFP insoluble obteniendo un extracto de 45 g que contienen 36 g de HT con una pureza del 80%. Se vuelve a lavar la FFP con otro litro de agua y se obtienen 52g de HT totalmente puros.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención secuencial de extractos con elevada concentración en hidroxitirosol, en una mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol y en acetato de hidroxitirosilo, caracterizado porque dicho procedimiento comprende la realización de al menos una cromatografía en columna de una fuente de hidroxitirosol, utilizando una mezcla de al menos dos resinas iónicas, preferentemente una resina aniónica con una resina catiónica.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuente de hidroxitirosol es sólida o semisólida y se realiza una etapa a) previa que comprende la realización de una extracción en fase líquida y separación de la fase líquida mediante filtración, centrifugación, decantación o una combinación de centrifugación y decantación.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuente de hidroxitirosol es líquida y se realiza una etapa a) previa que comprende la realización de una hidrólisis.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fuente de hidroxitirosol está seleccionada entre alpechín, orujo, alperujo, hojas, poda, hueso, aguas de proceso de aderezo, plantas de la familia de oleáceas y combinaciones de las mismas.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla de resina aniónica y catiónica comprende al menos 2% en peso del total de la mezcla en resina catiónica.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se lleva a cabo una activación parcial de la mezcla de resinas que se realiza a temperatura ambiente con una solución seleccionada entre una solución ácida, una solución básica y una disolución salina, o bien con una solución seleccionada entre una solución ácida, una solución básica y una disolución salina, y calentando a temperaturas de al menos 50°C durante la regeneración.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para realizar la cromatografía la fuente de hidroxitirosol se hace pasar por la columna y se vacía dicha fuente antes de pasar un eluyente.
8. Procedimiento según la reivindicación 1 o la 7, caracterizado porque para la realización de la cromatografía en columna la fuente de hidroxitirosol se carga en el lugar donde se genera la misma fuente a través de columnas móviles o en planta.
- 25 9. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende posterior a la elución de la columna, una etapa de acetilación de hidroxitirosol.
10. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 9, caracterizado porque la cromatografía en columna comprende una descarga secuencial de dicha columna con agua neutra o acidificada en una primera serie de eluciones en un primer paso de descarga, y con agua neutra o acidificada en una segunda serie de eluciones en un segundo paso de descarga.
- 30 11. Procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado porque en la realización de la cromatografía en columna con mezcla de resinas iónicas la descarga secuencial de la columna comprende en un tercer paso:
- el vaciado de la columna,
 - una posterior inundación de la columna por completo con acetato de etilo cerrando la entrada y salida de la columna y calentando,
 - 35 - y nuevo vaciado de la columna.
12. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 10, caracterizado porque se realiza una acetilación que comprende:
- realizar la cromatografía en columna obteniendo extracto de hidroxitirosol o el hidroxitirosol ya purificado, poner en contacto una resina catiónica con dicho extracto de hidroxitirosol o el hidroxitirosol purificado, y llevar a cabo la reacción de acetilación en tanque agitado aplicado una temperatura superior a 50°C en presencia de acetato de etilo.
- 40 13. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además una etapa de purificación del extracto obtenido que comprende realizar una o varias de las siguientes operaciones:
- realizar una cromatografía de adsorción con resinas no iónicas y posterior desorción,
 - una purificación por adsorción sobre una fracción fenólica polimérica reteniendo dicha fracción el hidroxitirosol o el extracto formado por hidroxitirosol y por 3,4-dihidroxifenilglicol, y redisolución de dicho hidroxitirosol y 3,4-
 - 45 dihidroxifenilglicol de forma conjunta o individual,

- concentración del extracto o de los compuestos purificados mediante evaporación, atomización o concentración por ósmosis inversa obteniéndose un producto seco o parcialmente hidratado.

- 5 14. Un producto seleccionado entre los compuestos hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosilo y 3,4-dihidroxifenilglicol, y combinaciones de dichos compuestos, caracterizado porque es obtenible a través del procedimiento descrito en una de las reivindicaciones 1 a 21.
15. Un producto que es una mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol en una relación mínima de 10:1 y máxima de 1:2.
16. Un producto según la reivindicación 14 caracterizado porque está seleccionado entre:
- hidroxitirosol con una pureza entre 80-100%,
- 10 - una mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol con una pureza entre 60-100% como suma de las individuales,
- 3,4-dihidroxifenilglicol con una pureza entre 50-100%, y
 - acetato de hidroxitirosol con una pureza entre 80-100%.
17. Un extracto fenólico caracterizado porque comprende el producto definido en una de las reivindicaciones 14 a 16.
- 15 18. Un extracto fenólico caracterizado porque es obtenible mediante el procedimiento descrito en una de las reivindicaciones 1 a 13.
19. Uso del extracto definido en una de las reivindicaciones 17 a 18 o del producto definido en una de las reivindicaciones 14 a 16, como agente antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antidegenerativo celular, anticanceroso y secuestrante de radicales libres en formulaciones de alimentos, productos cosméticos y fármacos.
- 20 20. Uso del extracto definido en una de las reivindicaciones 17 a 18 o del producto definido en una de las reivindicaciones 14 a 16, como agente formando parte de emulsiones, nano y microencapsulaciones o adsorbidos en otras sustancias para mejorar sus propiedades físico-químicas y/o estabilidad.
21. Uso combinado del hidroxitirosol y DHFG, o de HT y acetato de hidroxitirosilo en mezclas de medios hidrófilos y lipófilos que estén o no formando emulsiones en una formulación seleccionada entre formulación de alimentos, de productos cosméticos y de fármacos.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131161

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | ES 2341526 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 21.06.2010, descripción; reivindicaciones. | 1-21 |
| A | WO 02064537 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION et al.) 22.08.2002, descripción; reivindicaciones | 1-21 |
| A | WO 2010070168 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION et al.) 24.06.2010, descripción; reivindicaciones | 1-21 |

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
18.09.2012

Examinador
I. Abad Gurumeta

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C37/82 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61K8/97 (2006.01)

A61K36/63 (2006.01)

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

C07C, A23L, A61K

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

INVENES, EPODOC, STN, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA, CRPOU, KOSMET, WIPI, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.09.2012

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-21 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-21 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | ES 2341526 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) | 21.06.2010 |
| D02 | WO 02064537 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION et al.) | 22.08.2002 |
| D03 | WO 2010070168 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION et al.) | 24.06.2010 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere al procedimiento para la obtención secuencial de extractos con elevada concentración en hidroxitirosol, en una mezcla de hidroxitirosol y 3,4-dihidroxifenilglicol, y en acetato de hidroxitirosilo, que comprende al menos una cromatografía en columna de una fuente de hidroxitirosol, utilizando una mezcla de al menos dos resinas iónicas (reivindicación 1). Si la fuente de hidroxitirosol es sólida o semisólida se realiza una etapa previa de extracción y separación en fase líquida y si la fuente es líquida se realiza una etapa previa de hidrólisis (reivindicación 2 y 3). La fuente de hidroxitirosol está seleccionada entre alpechín, orujo, alperujo, hojas, poda, hueso, aguas de aderezo, plantas de la familia de oleáceas y combinaciones de las mismas (reivindicaciones 4). Así mismo se describen otras características del procedimiento (reivindicaciones 5-13), entre las que se destacan que la mezcla de resina aniónica y catiónica comprende al menos 2% en peso del total de la mezcla en resina catiónica (reivindicación 5), que se requiere una activación parcial a temperatura ambiente o a más de 50°C con solución ácida, básica o salina o durante regeneración (reivindicación 6). Que para la realización de la cromatografía en columna primero pasa la fuente de hidroxitirosol y se vacía la columna antes de pasar el eluyente (reivindicación 7) Y también se describen los procedimientos posteriores de acetilación (reivindicación 11 y 12) y purificación del producto (reivindicación 13). Además reivindica el producto seleccionado, la mezcla (reivindicaciones 14-16) y el extracto fenólico (reivindicación 17) obtenidos por este procedimiento y sus usos en alimentación, cosmética y fármacos (reivindicaciones 18-21).

El D01 se refiere a un procedimiento de obtención de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) purificado a partir de un extracto obtenido de un producto inicial procedente de especies vegetales seleccionadas de la familia Oleacea, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Compositae, Lamiaceae, Acanthaceae, Scrophulariaceae o sus combinaciones, caracterizado porque comprende: a) introducir el producto inicial en una columna de resina iónica, y b) eluir el compuesto retenido en la columna del paso (a) (reivindicación 1). La disolución eluida en (b) se hace pasar por una segunda columna que contiene una resina iónica (reivindicación 6), o de adsorción no iónica, por ejemplo del tipo XAD (reivindicaciones 2 y 7), repitiéndose este proceso opcionalmente con otras dos columnas más (reivindicaciones 3-4), eluyendo el compuesto retenido en la columna con agua en todos los casos (reivindicación 5). El número de columnas cromatográficas que se utilizan depende de la pureza con la que se desee obtener el producto final (p.5, l.13-15). El producto inicial de las mencionadas familias puede ser la planta entera, la parte aérea, las hojas, las flores, las semillas o los frutos (reivindicación 8). Concretamente, el producto inicial procede de los productos y/o subproductos obtenidos en la producción del aceite de oliva, tales como el orujo de dos fases, el orujo de tres fases, los huesos de aceitunas, las soluciones del proceso de elaboración de la aceituna para alimentación, las hojas del olivo, etc (reivindicaciones 8-14). Previamente a su utilización en el procedimiento de la invención, el producto inicial se puede someter a un pretratamiento, que puede consistir en un tratamiento térmico (usando vapor de agua u otros líquidos o gases a una temperatura entre 40oC y 200oC) o una extracción con agua o disolventes orgánicos (reivindicaciones 15-17). La regeneración y lavado de las columnas, para su reutilización en el mismo procedimiento, se puede llevar a cabo mediante un lavado con una disolución ácida, precedida o no de un lavado con una disolución básica, o mediante lavado con disoluciones acuosas que contienen disolventes orgánicos (reivindicaciones 18 a 25). Así, se obtiene el extracto de DHFG con una pureza entre 10% y 100% (reivindicaciones 26-27) que se utiliza en alimentos y en composiciones farmacéuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (reivindicaciones 28-33).

El D02 se refiere a un procedimiento de obtención del hidroxitirosol (HT) purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo, que consiste en las siguientes etapas: a) introducción de la fuente de hidroxitirosol en una columna de intercambio iónico en forma no activada, obteniéndose tras eluir con agua una disolución que contiene al menos 85% del hidroxitirosol presente en la fuente de HT introducida en la columna, obteniéndose un hidroxitirosol de un 60-70% de riqueza; y b) introducción de la disolución conteniendo el HT de la etapa anterior en una segunda columna de resina no iónica y posterior elución con mezcla de metanol o etanol y agua (del 30 al 33%), obteniéndose una disolución que contiene al menos el 75% del HT presente en la fuente del hidroxitirosol introducida en la primera etapa y con una pureza mínima mínima del 95%. (reivindicación 1). En dicho procedimiento, previamente al tratamiento en las columnas, la fuente de TH se puede someter a un proceso de explosión al vapor (reivindicación 2); la resina iónica no activada es una resina de intercambio aniónico fuerte y la resina no iónica es una columna de resina Amberlita XAD (reivindicaciones 2-4). Además, la resina de intercambio aniónico se regenera mediante un tratamiento en dos etapas: a) lavado con NaOH al 2%, y b) lavado con ácido fuerte (reivindicación 5).

El D03 publica el procedimiento de obtención de DHFG purificado a partir de especies vegetales introduciendo el producto inicial en una columna de resina iónica y elución del compuesto retenido en la columna del paso (ver reivindicación 1), así como su aplicación en los sectores de la alimentación y farmacéutico.

1. NOVEDAD (ART. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (ART. 8.1 Ley 11/1986)

Los documentos del estado de la técnica D01-D03 reflejan el estado de la técnica más cercano. Todos estos documentos, aunque muestran diversos procedimientos similares al descrito en la invención, sin embargo, en ninguno de ellos se realiza del modo reivindicado en la presenta solicitud.

Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-21 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con el Artículo 6.1 y 8.1 de la Ley 11/1986.