

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 774**

21 Número de solicitud: 201930815

51 Int. Cl.:

B01D 11/02 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

A23L 33/11 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

20.09.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.03.2021

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

08.03.2022

Fecha de concesión:

26.07.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.08.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Pabellón de Brasil - Paseo de las Delicias s/n
41013 SEVILLA (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN, José M^a;
MAYA CASTILLA, Inés;
LÓPEZ LÓPEZ, Óscar y
BEGINES AGUILAR, Paloma**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN EN HOJA DE OLIVO DE OLEUROPEÍNA EN UNA FRACCIÓN FENÓLICA, COMPOSICIÓN ALIMENTARIA FUNCIONAL Y USO**

57 Resumen:

Procedimiento para la extracción en hoja de olivo de oleuropeína en una fracción fenólica, composición alimentaria funcional y uso.

La presente invención es un procedimiento para la extracción en hoja de olivo de una fracción fenólica que contiene oleuropeína, que comprende calentar una mezcla de hoja seca de olivo pulverizada y un disolvente eutéctico profundo de azúcares naturales comestibles y agua, y filtrar para obtener un precipitado y una fase acuosa en que dicha fase acuosa contiene la fracción fenólica con la oleuropeína. La invención también comprende una composición alimentaria funcional con un contenido en oleuropeína del 80% - 85% en peso con respecto al peso del extracto fenólico total, y su uso en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica.

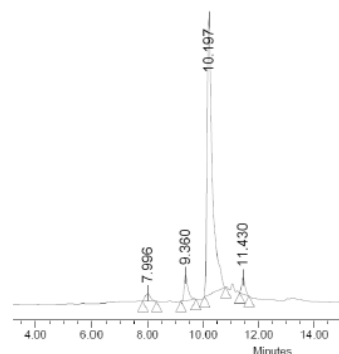


Figura 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 813 774 B2

DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN EN HOJA DE OLIVO DE
OLEUROPEÍNA EN UNA FRACCIÓN FENÓLICA, COMPOSICIÓN ALIMENTARIA
FUNCIONAL Y USO**

5

Sector de la técnica

La presente invención es de aplicación en la industria de alimentación, cosmética y farmacéutica. En la industria de alimentación como alimento funcional formado por polifenoles y azúcares; en la industria cosmética en cremas antienvjecimiento por su capacidad de captación de radicales libres; y en la industria farmacéutica en medicamentos contra el estrés oxidativo o para la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas como cáncer y Alzheimer.

Antecedentes de la invención

15 Los hábitos alimentarios en la cuenca mediterránea abundantes en frutas, verduras y aceite de oliva virgen extra, son ricos en polifenoles. Esta es la principal razón de la baja incidencia de varias patologías degenerativas; por ejemplo, la reducción del riesgo cardiovascular y el descenso del riesgo de desarrollar tumores. Documentos de patente como la WO 2000038541 A1 describen una dieta saludable en la que los alimentos han sido enriquecidos con antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos del olivo.

El compuesto fenólico mayoritario en el fruto del olivo y la hoja es la oleuropeína, con concentraciones de 2 a 134 mg g⁻¹ de materia seca. Numerosos estudios demuestran la importante actividad biológica de la oleuropeína. Es un importante antioxidante y antibacteriano, el principal responsable del efecto antiinflamatorio de los extractos de hoja de olivo, muestra actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de mama y de hígado, actúa contra la diabetes, previene la obesidad ya que ha demostrado efectos hipocolesterolemicos en ratas, y protege contra la osteoporosis y la osteoartritis. Además, ayuda a prevenir enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y Alzheimer por sus propiedades neuroprotectoras y a minimizar el avance de la fibrosis pulmonar.

En los últimos años se han aplicado tecnologías de alta presión, fluido supercrítico o destilación molecular para extraer estos componentes e incluirlos en matrices alimentarias. El interés en los alimentos funcionales, alimentos enriquecidos y

suplementos alimenticios actuales es ofrecer efectos protectores frente a enfermedades de elevada incidencia, como obesidad, trastornos cardiovasculares y cáncer, entre otras.

5 Así, la solicitud WO 2017032722 A1 describe una bebida de un extracto de hojas de olivo con derivados secoiridoides obtenido por calentamiento en agua y aditivos enzimáticos; y la JP 2016079127 A, describe un antioxidante compuesto de dihidroquercetina y extracto de hoja de olivo que contiene oleuropeína e hidroxitirosol, con aplicación como aditivo alimentario.

10 En la WO 2008108817 A1 se describe un suplemento nutricional saludable donde el sabor amargo de la oleuropeína se enmascara al formar complejo con ciclodextrinas ayudado con monoésteres de glicerina. De acuerdo con US 20090061031 A1, la oleuropeína y sus principales metabolitos, incluyendo el aglicón de la oleuropeína, el hidroxitirosol y el ácido elenólico son útiles para tratar la obesidad, así como para inhibir la infectividad del VIH.

15 La patente ES 2288123 B1 protege una composición alimentaria funcional a base de extractos de olivo y cítricos para la prevención o tratamiento de problemas relacionados con el exceso de colesterol y triglicéridos en sangre. Las extracciones se llevan a cabo por mezclas hidroalcohólicas.

20 Todos estos métodos de extracción de la oleuropeína requieren de disolventes orgánicos (MeOH/H₂O, EtOH/H₂O o MeCN/H₂O) que son tóxicos y hay que eliminar en la elaboración de un producto alimenticio.

Frente a este inconveniente, los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) evitan la necesidad de reducir o eliminar el extractante. Los NADES son de gran interés, ya que son una alternativa verde frente a los disolventes convencionales tóxicos.

25 NADES basados en glicerol y glicina, es decir en compuestos no azúcares, han sido usados para extraer polifenoles de las hojas de olivo (Athanasiadis, V. *et al. Waste Biomass Valor.*, **2018**, 9, 1985–1992); en el documento no se sugiere el uso de azúcares como extractante. También se ha descrito el papel de la metil β-ciclodextrina como coadyuvante en la extracción de polifenoles de la hoja del olivo con disolventes eutécticos profundos (Athanasiadis, V. *Biomass Convers. Biorefin.*, **2018**, 8, 345-355), y
30 el uso de disolventes eutécticos profundos basados en colina en la extracción asistida por microondas de compuestos fenólicos de la hoja de olivo (Alañón, M.E. *et al. Arab. J. Chem.*, **2018**, en prensa, <https://doi.org/10.1016/j.arabic.2018.01.003>); donde junto con colina como aceptor de enlace de hidrógeno, se utiliza ácido acético, ácido oxálico, ácido

tartárico, butano-1,4-diol, etilenglicol, xilitol, propano-1,2-diol, maltosa o urea como donador de enlace de hidrógeno.

En resumen, no hay antecedentes en la técnica del uso de azúcares como únicos componentes de un NADES para extraer polifenoles de la hoja de olivo.

- 5 El problema de la técnica es conseguir un procedimiento de extracción de oleuropeína de la hoja del olivo más sencillo y evitando disolventes tóxicos. La solución que propone la presente invención es un procedimiento que sustituye los disolventes orgánicos típicos por azúcares o miel actuando como NADES.

10 Descripción de la invención

La presente invención es un procedimiento para la extracción en hoja de olivo de una fracción fenólica que contiene oleuropeína, que comprende calentar una mezcla que comprende hoja seca de olivo pulverizada en un disolvente eutéctico profundo de azúcares naturales comestibles y agua, y filtrar para obtener un precipitado y una fase acuosa donde la fase acuosa contiene la fracción fenólica con la oleuropeína.

En el ámbito de la presente invención se entiende por hoja seca “pulverizada” la hoja seca sometida a un proceso de pulverización en molinillo con tamaño de partícula de 0.05 a 1.0 mm.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento que consiste en las etapas anteriores. Otro aspecto más es que la mezcla consista en hoja seca de olivo pulverizada y un disolvente eutéctico profundo.

Otro aspecto preferible de la invención es que dichos azúcares que forman el NADES son glucosa, fructosa y sacarosa. En este caso, el calentamiento se produce a una temperatura de entre 30 y 120°C, preferiblemente entre 50°C y 100°C porque por encima existe cierto grado de descomposición de la oleuropeína y por debajo de 50°C el rendimiento es menor, y aún más preferiblemente de 80°C.

En un aspecto más preferible aún la glucosa, fructosa y sacarosa están en una relación molar en agua de 1:1:1:11.

Un aspecto muy preferible de la presente invención es que dicho disolvente eutéctico profundo constituido por azúcares naturales comestibles sea miel. En este caso, el calentamiento debe ser a una temperatura de entre 35 y 50°C para no desnaturalizar la miel, preferiblemente de 40°C.

La mezcla de azúcares va a enmascarar el amargor propio de la oleuropeína en el producto alimentario en que se incorpore.

Otro aspecto preferible de la invención es que dicho calentamiento se produce durante un tiempo entre 20 y 240 min, preferiblemente entre 50 y 90 min para evitar cierta
5 descomposición de la oleuropeína especialmente a tiempos y temperaturas altos, y aún más preferiblemente 60 min.

Un aspecto preferible de la invención comprende una dilución con agua previa a la etapa de filtración para mejorar el rendimiento del filtrado.

El filtrado puede ser en vacío sobre filtro de papel con un tamaño de poro de entre 2,5 -
10 25 μm . La toma la fracción líquida, que seguidamente se puede extraer con una fase orgánica, preferiblemente acetato de etilo, y concentrarse en rotavapor.

En la presente invención se describe la extracción de oleuropeína de la hoja de olivo por un método respetuoso con el medio ambiente enmarcado dentro de la química verde, en que el extractante formado por una mezcla de azúcares o por miel permite obtener
15 directamente un alimento funcional.

La ventaja principal del procedimiento de la invención es que evita el uso de disolventes orgánicos convencionales, que resultan tóxicos e implican etapas de purificación que complican el procedimiento.

La oleuropeína, en tanto que compuesto fenólico con importante bioactividad resulta un
20 potente antioxidante, ayuda a preservar alimentos, evitando el enranciamiento, la pérdida de color y el deterioro de aroma y sabor; además, presenta interesantes propiedades farmacológicas antiinflamatorias, antiaterogénicas, anti-cancer, hipolipidémicas e hipoglicémicas.

La composición obtenida puede ayudar a la defensa del daño oxidativo en las células,
25 previniendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer.

De modo que un aspecto muy preferible de la invención es una composición alimentaria funcional que comprende un extracto fenólico con oleuropeína en un porcentaje de entre 80% - 85% en peso con respecto al peso del extracto fenólico total.

Otro aspecto preferible más es el uso de la composición de la invención como
30 ingrediente en productos alimentarios como caramelos o gominolas, bebidas carbonatadas, zumos, productos de panadería, productos energéticos o lácteos.

Otro aspecto preferible es el uso de la composición de la invención como complemento dietético, más preferiblemente aún un complemento dietético antioxidante y antienvjecimiento.

5 En la industria cosmética la miel enriquecida en polifenoles del olivo podría utilizarse en la fabricación de cremas antienvjecimiento por su capacidad de captación de radicales libres; y en la industria farmacéutica el contenido en polifenoles permitiría su utilización frente al estrés oxidativo y para la prevención de enfermedades cardiovasculares y degenerativas como cáncer y Alzheimer.

10 De forma que otro aspecto preferible de la invención es el uso de la composición en la prevención o tratamiento de una enfermedad tumoral, neurodegenerativa, infecciosa, inflamatoria o cardiovascular, o cualquier otra para la que la oleuropeína o el extracto fenólico de la hoja del olivo resulte beneficiosa.

Descripción de las figuras

15 **La figura 1** muestra el cromatograma obtenido después de la extracción de la fracción fenólica de la hoja de olivo con el NADES según el Ejemplo 1. Muestra la presencia de oleuropeína con una pureza del 85% acompañado de hidroxioleuropeína, ligustrósido y dos isómeros de oleuropeína (deducido de UHPLC-MS), como compuestos minoritarios. Los valores se encuentran multiplicados por un factor de 1000.

20

Ejemplos

Ejemplo 1:

Ingredientes:

	Agua	27,2 g
25	Glucosa.....	2,0 g
	Fructosa.....	2,0 g
	Sacarosa.....	3,8 g
	Hoja de olivo seca y pulverizada.....	10,0 g

30 Se calentaron 10 g de hoja seca de olivo pulverizada con NADES (10 g, 2,0 g de glucosa, 2,0 g de fructosa, 3,8 g de sacarosa, 2,2 g de agua) a 80 °C durante una hora. Pasado

ese tiempo se diluyó con 25 g de agua y se filtró en embudo Büchner a vacío a través de filtro de papel. Se extrajo entonces la fracción líquida obtenida con 25 mL de acetato de etilo y seguidamente se concentró esa fracción líquida en rotavapor.

El ¹H RMN del extracto muestra que se obtuvo oleuropeína como producto mayoritario.

5 El cromatograma obtenido de la fracción fenólica se muestra en la Figura 1.

El extracto cuantificado por HPLC contuvo 90 mg de una fracción fenólica, de la cual el 85% es oleuropeína.

Ejemplo 2:

10 Ingredientes:

Agua 25,0 g

Miel..... 10,0 g

Hoja de olivo seca y pulverizada.....10,0 g

15 Se calentaron 10 g de hoja seca de olivo pulverizado con miel natural (10 g) a 40 °C durante una hora. Pasado ese tiempo se diluyó con 25 g de agua y se filtró en embudo Büchner a vacío a través filtro de papel.

El extracto cuantificado por HPLC contuvo 45 mg de una fracción fenólica, de la cual la oleuropeína constituye el 83%.

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la extracción en hoja de olivo de una fracción fenólica que contiene oleuropeína, caracterizado por que dicho procedimiento comprende:
- 5 - calentar una mezcla que comprende hoja seca de olivo pulverizada y un disolvente, en que dicho disolvente es un disolvente eutéctico profundo que consiste en glucosa al 20% en peso, fructosa al 20% en peso y sacarosa al 38% en peso, con tres partes de agua (p/v), todo respecto de una parte en peso de hoja de olivo, a una temperatura de entre 50°C y 100°C durante un tiempo de 50 a 90 min;
- 10 o
 calentar una mezcla que comprende hoja seca de olivo pulverizada y un disolvente eutéctico profundo que consiste en una parte de miel (p/p) con tres partes de agua (p/v), ambos respecto de una parte en peso de hoja de olivo, a una temperatura de entre 35° y 50°C durante un tiempo de 50 a 90 min,
- 15 - diluir con agua, y
 - filtrar para obtener un precipitado y una fase acuosa, en que dicha fase acuosa contiene la fracción fenólica y la oleuropeína.
- 20
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha temperatura con el disolvente eutéctico constituido por glucosa, fructosa y sacarosa es de 80°C.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha temperatura con miel como disolvente eutéctico profundo es de 40°C.
- 25
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicho tiempo de calentamiento son 60 min.
5. Composición alimentaria funcional obtenida por el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que comprende un extracto fenólico con oleuropeína, en que dicha oleuropeína está presente en una proporción de 80% - 85% en peso con respecto al peso del extracto fenólico total.
- 30
6. Uso de la composición de la reivindicación 5, como ingrediente en un producto alimentario, en que dicho producto alimentario está seleccionado del grupo que consiste en un caramelo o una gominola, una bebida carbonatada, un zumo, un producto de panadería, un producto energético o un lácteo.
- 35

7. Uso según la reivindicación 6, caracterizado por que dicho producto alimentario es un complemento dietético.
8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado por que dicho complemento dietético es un complemento dietético antioxidante o antienvjecimiento.
- 5 9. Uso de la composición de la reivindicación 5, en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad tumoral, neurodegenerativa, infecciosa o inflamatoria.

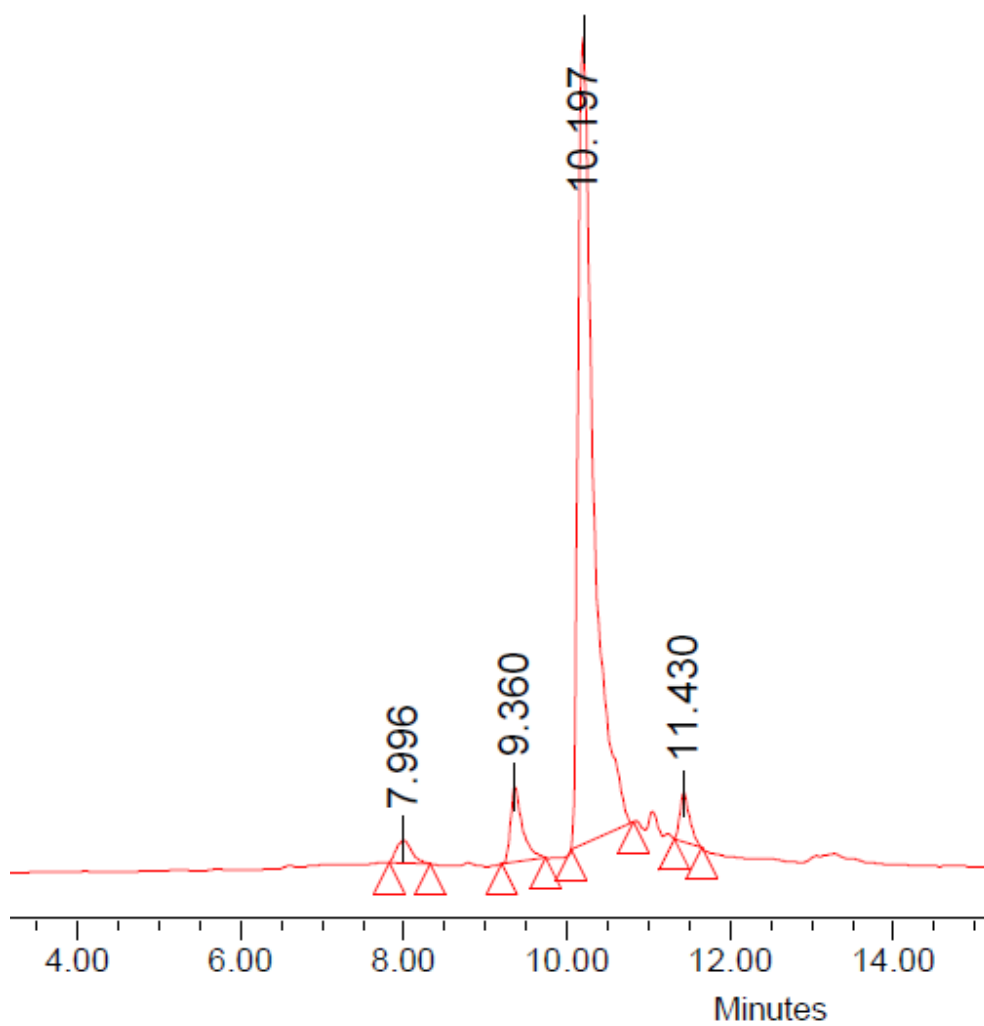


Figura 1