



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 341 635**

⑫ Número de solicitud: 200803639

⑬ Int. Cl.:

C11B 1/04 (2006.01)

C11B 13/00 (2006.01)

B01D 11/00 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **22.12.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

Fecha de la concesión: **27.04.2011**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **10.05.2011**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.05.2011

⑲ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 70 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
AGRO SEVILLA ACEITUNAS SCA (Titular al 30 %)

⑳ Inventor/es: **Brenes Balbuena, Manuel;**
García Borrego, Aránzazu;
Castro Gómez-Millán, Antonio de;
Romero Barranco, Concepción;
Medina Pradas, Eduardo y
Rejano Zapata, Luis

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Procedimiento para la obtención de extracto rico en ácidos triterpénicos a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la obtención de extracto rico en ácidos triterpénicos a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa.

Procedimiento de obtención de un extracto con una elevada proporción de ácido triperpénicos, preferiblemente de ácido oleanólico y maslínico, a partir de las soluciones obtenidas en el proceso de elaboración de aceitunas de mesa. Además, la invención se refiere al extracto obtenido mediante dicho procedimiento y a su aplicación en las industrias de alimentación, cosmética o farmacéutica.

ES 2 341 635 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de extracto rico en ácidos triterpénicos a partir de soluciones del proceso de elaboración de aceitunas de mesa.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto con una elevada proporción de ácido triterpénicos, preferiblemente de ácido oleanólico y maslínico, a partir de las soluciones obtenidas en el proceso de elaboración de aceitunas de mesa.

Estado de la técnica anterior

La presencia de ácidos triterpénicos, en particular ácido oleanólico, en las hojas y frutos del olivo se conoce desde principios del siglo XX, cuando se descubrió la presencia y obtención a nivel de laboratorio de los ácidos oleanólico y maslínico, también conocido este último como cratególico, en pulpa de aceitunas, orujos del proceso de extracción del aceite de oliva y lejjás del aderezo de aceitunas verdes (Bianchi *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2003, 105, 224-243).

Asimismo, se ha descrito como estos ácidos triterpénicos se encuentran sobre todo en el epicarpio de las aceitunas, detectándose en aceite de oliva virgen extra cantidades menores de 100 ppm; aunque superiores a 300 ppm en aceites de orujo. Recientemente, se ha descrito una acumulación significativa de estos ácidos en los aceites de alpeorujo debido a su enriquecimiento en la fase oleosa durante el almacenamiento de la pasta al aire durante meses.

De otra parte, se le ha atribuido desde hace años un gran número de propiedades beneficiosas para la salud humana a estos ácidos triterpénicos. Los ácidos oleanólico y maslínico pueden ejercer una acción hepatoprotectora y antimicrobiana. De hecho, se ha propuesto el ácido maslínico como aditivo en alimentación animal debido a que mejora la función hepática de truchas. Ambos ácidos, oleanólico y maslínico, poseen además efectos terapéuticos sobre dietas hiperlipidémicas debido a la inhibición de la absorción de colesterol. También, poseen actividad hipoglucémica, antiinflamatoria y anticancerígena. Esta actividad antitumoral es sobre la que más estudios científicos se han llevado a cabo recientemente ya que se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediante experimentación animal, que ambos ácidos, oleanólico y maslínico, pueden inhibir la proliferación de células cancerosas y podrían, por tanto, ser útiles para la prevención de dicha enfermedad o incluso para su tratamiento.

Es por ello, que existen un gran número de publicaciones tanto para la obtención de estos ácidos triterpénicos, oleanólico y maslínico, y su empleo en la industria de alimentación, cosmética, farmacéutica y otras. De hecho, se han publicado solicitudes de patente que describen la utilización de estas sustancias obtenidas a partir de productos de la oliva para su uso en el enriquecimiento de aceites, bebidas y alimentos funcionales (EP 1013752 A1, ES 2 264 880 B1, ES 2267 403 A1).

Además, se han publicado diferentes métodos para la obtención de estos ácidos triterpénicos a partir de diversas fuentes relacionadas con el olivo y sus aceitunas. Así, se ha propuesto la obtención de ácido oleanólico y maslínico de los orujos y alpeorujos producidos durante el proceso de obtención de aceite de oliva (ES 2111 498 A1, US 30171613 A1) y de la hoja del olivo (ES 2160 553 B1, GR 911 00047, WO 2005 5075614 A1).

Como se ha indicado anteriormente, diversos autores han identificado oleanólico y maslínico en las lejjás del proceso de elaboración de aceitunas verdes, y se describió como al acidificar estas soluciones con ácido sulfúrico se producía un precipitado rico en estos ácidos triterpénicos (Vázquez y Janer, *Grasas y Aceites*, 1969, 20, 133-137). Debido a la importancia de estos ácidos triterpénicos en diferentes campos de la técnica, existe la necesidad de obtener procedimientos alternativos para la obtención de dichos compuestos.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de extractos ricos en los ácidos triterpénicos, preferiblemente ácido maslínico y oleanólico, a partir de las distintas soluciones resultantes del proceso de elaboración de aceitunas de mesa. Estas soluciones serán las lejjás alcalinas, producidas en un solo tratamiento o reutilizadas varias veces, y las aguas de lavado de la elaboración tanto de aceitunas verdes estilo español como negras oxidadas, junto con los precipitados formados en los fermentadores de aceitunas.

El procedimiento de la invención comprende diferentes etapas tales como centrifugación, acidificación, secado, extracción con solvente orgánico, evaporación y liofilización. El resultado del procedimiento consiste en un polvo blanquecino con un porcentaje del 70-85% en ácidos triterpénicos, enriquecido particularmente en ácido maslínico, y que puede ser empleado por la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, entre otras.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de extractos muy ricos en ácidos triterpénicos, preferiblemente maslínico y oleanólico a partir de soluciones del aderezo de aceitunas. Se han identificado varias soluciones de estos procesos industriales como fuentes de una gran concentración en estos ácidos triterpénicos. Las lejjás del procesamiento de aceitunas verdes estilo español poseen entre 800-1200 ppm y las de negras oxidadas unas 300-800 ppm; sin embargo, las soluciones con mayor cantidad de estas sustancias son las lejjás reutilizadas tanto del proceso de elaboración de aceitunas verdes estilo español como de negras oxidadas. El contenido en estos ácidos

ES 2 341 635 B1

triterpénicos puede ser superior a 10000 ppm, esto es superior a 10 g/l. De otra parte, otra fuente importante identificada de estas sustancias son las aguas de lavado tanto del proceso de verdes estilo español como negras oxidadas (300-700 ppm) y los precipitados que se producen durante los primeros meses en los fermentadores donde se procesan las aceitunas verdes estilo español (300-1500 ppm).

Todas estas soluciones son vertidos contaminantes, con pH alcalino, que representan un problema medioambiental para las industrias y, sin embargo, son una fuente importante de ácidos triterpénicos como maslínico y oleanólico.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un extracto que contiene ácidos triterpénicos caracterizado porque se emplean soluciones del aderezo de aceitunas, que comprende las siguientes etapas:

- a. acidificación a pH inferior a 4 de la solución inicial;
- b. centrifugación y secado del sólido obtenido en la etapa (a);
- c. extracción de los ácidos triterpénicos del sólido obtenido en la etapa (b) con un solvente orgánico;
- d. centrifugación de la suspensión obtenida en (c) y dilución mediante la adición de agua;
- e. eliminación del solvente orgánico del sobrenadante obtenido en la etapa (d) mediante evaporación;
- f. congelación y liofilización de la suspensión obtenida en la etapa (e) o secado de la suspensión obtenida en la etapa (e).

Por "soluciones inicial" ó "solución de aderezo de aceitunas" se refiere a las soluciones de hidróxido sódico (lejías) del proceso de elaboración de aceitunas de mesa, preferiblemente verdes y/o negras, con o sin reutilización, aguas de lavado de los procesos de elaboración de aceitunas verdes y/o negras, y precipitados formados en los fermentadores de aceitunas.

Por "ácidos triterpénicos" se entiende en la presente invención, sobre todo, a los ácidos maslínico y oleanólico.

Cuando la solución inicial son lejías de aceitunas verdes y/o negras reutilizadas, el procedimiento de la invención comprende las siguientes dos primeras etapas:

- a. centrifugación de la solución inicial;
- b. acidificación a pH inferior a 4 del sólido húmedo obtenido en la etapa (a).

Las siguientes etapas, (c) a (f), son las descritas anteriormente.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la etapa de acidificación se lleva a cabo con un ácido inorgánico, como por ejemplo pero sin limitarse al ácido fosfórico, sulfúrico, nítrico o clorhídrico. Más preferentemente el pH en esta etapa es menor a 2.8.

Otra relajación preferida del procedimiento de obtención, comprende la centrifugación a 2000-6000 rpm, durante 5-15 minutos a 5-25°C.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, las soluciones empleadas se concentran antes de la etapa de extracción. Se pueden concentrar estas soluciones previamente mediante tecnologías de evaporación, concentración por membranas o cualquier otro método conocido por un experto en la materia.

Normalmente antes de la etapa de extracción, las soluciones tratadas se pueden someter a secado a temperatura de entre 50°C y 120°C durante un tiempo aproximado de entre 10 horas y 48 horas, preferentemente a 105°C durante 20 horas.

Otra realización preferida de la presente invención, comprende un disolvente orgánico de extracción seleccionado de la lista que comprende etanol, metanol, acetato de etilo o cualquiera de sus combinaciones. Preferentemente el disolvente orgánico es etanol y más preferiblemente se mantienen en contacto durante 5-60 minutos.

Después de la extracción con un disolvente orgánico se lleva a cabo otra centrifugación de la solución resultante, preferiblemente este proceso es a 2000-6000 rpm, durante 5-15 minutos a 5-25°C y se adiciona agua en una proporción del 5-30% en volumen al sobrenadante.

Posteriormente a la etapa de centrifugado se elimina el solvente orgánico del sobrenadante mediante evaporación, preferiblemente evaporación a vacío o cualquier otro sistema de eliminación de solvente orgánico de una mezcla con agua conocido por cualquier experto en la materia.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la etapa de congelación se lleva a cabo a una temperatura inferior a 5°C, preferiblemente a una temperatura de entre -20°C y -60°C, y posteriormente se liofiliza con lo que se obtiene un polvo blanquecino rico en los ácidos maslínico y oleanólico. De manera alternativa a la etapa de congelación, la suspensión acuosa puede secarse a temperatura de entre 50°C y 120°C o incluso concentrarse antes de llevar a cabo el proceso de secado.

Mediante el procedimiento de la invención se consigue recuperar entre un 85-95% del contenido inicial de las soluciones en dichos ácidos triterpénicos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un extracto con un alto contenido, entre un 70% y un 85% en peso del extracto total, en ácidos triterpénicos, más concretamente en ácidos maslínico y oleanólico. Más preferiblemente el extracto contiene un porcentaje de ácido maslínico superior al 50%, más preferiblemente entre un 60% y un 80% en peso del contenido total de ácidos triterpénicos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del extracto de la invención en las industrias de alimentación, cosmética, farmacéutica, entre otras, debido a su alto contenido en ácidos triterpénicos, en particular ácido maslínico.

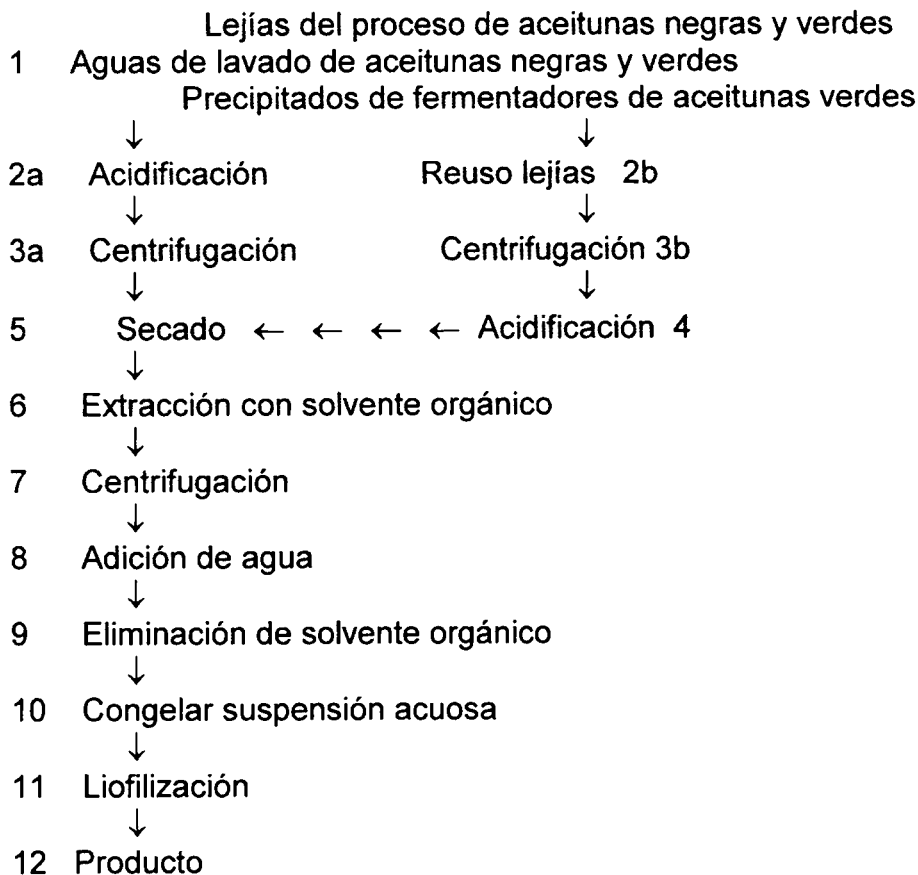
A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción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

Ejemplos

Mediante el esquema siguiente se proponen las posibles etapas del procedimiento que se tendrán en cuenta para ilustrar el ejemplo.

Esquema 1

Esquema del proceso de obtención de un extracto rico en ácidos maslínico y oleanólico a partir de soluciones del aderezo de aceitunas



ES 2 341 635 B1

Se partió de 1 litro de lejía reutilizada del proceso de elaboración de aceitunas negras oxidadas (2b) con un contenido inicial de ácido maslínico y oleanólico de 13,9 g. Se centrifugó (3b) a 3500 rpm durante 5 minutos a 20°C y el sólido resultante se acidificó (4) con ácido fosfórico del 85% hasta pH 2.8. A continuación, se secó (5) a 105°C durante 20 horas y se resuspendió (6) en 200 ml de etanol durante 10 minutos. La solución alcohólica se centrifugó (7) a 3500 rpm durante 5 minutos a 20°C y se le añadieron 30 ml de agua (8) al sobrenadante, el cual se sometió a evaporación a vacío (9) hasta eliminación del solvente orgánico. La suspensión acuosa se congeló (10) a -30°C y se liofilizó (11). Se obtuvieron 11.8 g de un polvo blanquecino (12) con un contenido del 85% en ácidos maslínico y oleanólico, representando el contenido de ácido maslínico el 70% del total de ácidos triterpénicos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un extracto que contiene ácidos triterpénicos **caracterizado** porque se emplean soluciones del aderezo de aceitunas, y porque comprende las siguientes etapas:

- a. acidificación a pH inferior a 4 de la solución inicial;
- b. centrifugación y secado del sólido obtenido en el paso (a);
- c. extracción de los ácidos triterpénicos con un solvente orgánico;
- d. centrifugación de la suspensión y dilución en agua;
- e. eliminación del solvente orgánico del sobrenadante mediante evaporación;
- f. congelación y liofilización de la suspensión obtenida en (e) o secado de la suspensión obtenida en (e).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde las soluciones del aderezo de aceitunas son las soluciones de hidróxido sódico (lejías) del proceso de elaboración de aceitunas verdes y/o negras, con o sin reutilización, aguas de lavado de los procesos de elaboración de aceitunas verdes y/o negras, o precipitados formados en los fermentadores de aceitunas.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde los ácidos triterpénicos son ácidos maslínico y oleanólico.

4. Procedimiento según la reivindicación 2, donde si se emplean soluciones de lejías de aceitunas verdes y/o negras reutilizadas la etapa (a) de acidificación es posterior a la etapa (b) de centrifugación.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las soluciones iniciales pueden ser concentradas antes de la etapa (c) de extracción.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la dilución del paso (d) se lleva a cabo mediante la adición de agua en una proporción de entre el 5% y el 30% en volumen con respecto al sobrenadante.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la acidificación se lleva a cabo con un ácido inorgánico seleccionado de la lista que comprende ácido fosfórico, sulfúrico, nítrico o clorhídrico.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la centrifugación y secado del sólido es a una temperatura entre 50°C y 120°C.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el disolvente orgánico de extracción se selecciona de entre la lista que comprende etanol, metanol, acetato de etilo o cualquiera de sus combinaciones.

10. Extracto obtenible por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, con un contenido de ácidos triterpénicos entre un 70% y un 85% en peso del extracto total.

11. Extracto según la reivindicación 10, con un porcentaje de ácido maslínico superior al 50% en peso con respecto al contenido de ácidos triterpénicos del extracto.

12. Uso del extracto según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en las industrias de alimentación, cosmética o farmacéutica.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 341 635

⑫ Nº de solicitud: 200803639

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2111498 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 01.03.1998, columnas 3,4,5; reivindicaciones.	1-12
X	EP 1431379 A1 (NISSHIN OILLIO LTD) 23.06.2004, páginas 9,13; reivindicaciones.	1,10-12
X	BIANCHI G . et al. "Pentacyclic triterpene acids in olives". PHYTOCHEMISTRY. 01.01.1994. Vol. 37, Nº 1, páginas 205-207. ISSN 0031-9422.	1,9
X	ES 2301336 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 16.06.2008, reivindicaciones.	10-12

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

05.10.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C11B 1/04 (2006.01)

B01D 11/00 (2006.01)

C11B 1/04 (2006.01)

C11B 13/00 (2006.01)

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

C11B, B01D

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 05.10.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-9, 12	SÍ
	Reivindicaciones	10, 11	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-12	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 ha sido publicada.

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 2111498 A1	01-03-1998
D02	EP 1431379 A1	23-06-2004
D03	BIANCHI G. et al. "Pentacyclic triterpene acids in olives". PHYTO-CHEMISTRY. 01.01.1994. S, GB Vol. 37, N°1, páginas 205 - 207. ISSN 0031-9422	01-01-1994
D04	ES 2301336 A1	16-06-2008

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 solicitud divulga un procedimiento de obtención de un extracto con una elevada proporción de ácidos triterpénicos, preferiblemente de ácido oleanólico y maslínico, a partir de las soluciones obtenidas en el proceso de elaboración de aceitunas de mesa. Además, la invención se refiere al extracto obtenido mediante dicho procedimiento y a su aplicación en las industrias de alimentación, cosmética o farmacéutica.

En concreto la reivindicación 1 caracteriza el procedimiento porque comprende las etapas:

- a) acidificación
- b) centrifugación y secado.
- c) extracción de los ácidos triterpénicos con solvente orgánico.
- d) centrifugación y dilución con agua.
- e) eliminación del solvente por evaporación.
- f) congelación y liofilización o secado de la suspensión obtenida en e).

Se han divulgado diversos métodos de obtención de ácidos triterpénicos a partir de subproductos de molturación de aceitunas. Sin embargo, ninguno de ellos comprende idénticas operaciones a las divulgadas por la presente solicitud. Por tanto, la reivindicación 1 y dependientes, así como la reivindicación 12, serían nuevas según lo mencionado en el art 29.6 de la ley 11/1986.

En cambio, las reivindicaciones 10 y 11, que se refieren a un extracto conteniendo ácidos triterpénicos en porcentajes de 70-85% o 50% para el ácido maslínico, ya han sido divulgados en el estado de la técnica anterior, por ejemplo D1, columna 5, o D2, página 9, lin. 45-50 y página 13, línea 20-25. Así pues, estas reivindicaciones no cumplirían con el requisito de novedad.

Según menciona la solicitud, como resultado del procedimiento se obtiene un producto con un contenido del 70-85% en ácidos triterpénicos. Sin embargo este resultado ya se ha conseguido, por otros procedimientos que incluyen la extracción con solventes orgánicos, por ejemplo en D1, página 5. Así pues, la combinación de las operaciones de la reivindicación 1 y dependientes parecen consistir en una mera alternativa a los procedimientos conocidos del estado de la técnica, considerándose que la reivindicación 1 no contiene características técnicas que, por sí solas o en combinación con otras características de otras reivindicaciones de las cuales dependa la presente reivindicación, cumplan con el requisito de actividad inventiva, según el art. 29. 7 de la ley 11/1986.

Igualmente, la reivindicación 12 carecería de actividad inventiva ya que resultaría obvio para el experto en la materia el uso de productos, ya conocidos en el estado de la técnica, en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica.