



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 346 628**

② Número de solicitud: 200930075

⑤ Int. Cl.:

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 33/03 (2006.01)

A23D 9/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.04.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2010**

Fecha de la concesión: **29.08.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **08.09.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.09.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Roca López-Cepero, María;**
Gallardo Guerrero, Lourdes y
Gandul Rojas, Beatriz;

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceites vegetales.**

㉓ Resumen:

Procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceites vegetales.

La presente invención se refiere a un método de detección de complejos cúpricos de clorofila en aceites vegetales y más específicamente en aceite de oliva. Este método es de especial interés para la industria alimentaria porque permite detectar en el aceite la presencia de aditivos no permitidos por la legislación.

ES 2 346 628 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceites vegetales.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceites, especialmente en aceite de oliva.

Estado de la técnica anterior

10 Debido al éxito comercial del aceite de oliva, éste se constituye en un producto susceptible, económicamente, de ser adulterado. Varios tipos de adulteraciones han sido descritas para el aceite de oliva en la literatura, para las cuales se han desarrollado métodos específicos de control (Dionisi, Prodolliet & Tagliaferri, *Assesment of olive oil adulteration by reversed-phase high-performance liquid chromatography amperometric detection of tocopherols and tocotrienols.* Journal of the American Oil Chemists Society, 1995; 72 (12), 1505-1511; Baeten, Meurens, Morales & Aparicio, *Detection of Virgin Olive Oil Adulteration by Fourier Transform Raman Spectroscopy.* Journal of the Agricultural Food Chemistry, 1996; 44 (8), 2225-2230).

20 El aceite de oliva por definición es mezcla de aceite de oliva virgen y aceite de oliva refinado. Éste último experimenta un proceso de refinación para eliminar defectos organolépticos, que incluye entre otras, una operación de decoloración. Si el aceite de oliva virgen con el que se va a mezclar procede de una variedad de aceituna de baja pigmentación o de frutos maduros, el aceite de oliva resultante tendrá una coloración muy débil. En general, el consumidor identifica aceite coloreado con aceite de oliva virgen, mientras que aceites de oliva poco pigmentados recuerdan a los aceites de semilla refinados. A esto hay que añadir que cada mercado tiene sus propias preferencias, por ejemplo, Japón demanda aceites muy coloreados. Todo ello ha conducido a que ciertos industriales refuercen la coloración de sus aceites vegetales, especialmente los de oliva, con aditivos colorantes verdes.

30 Según la normativa europea (94/35/CE) no está permitida la adición de colorantes a aceites y grasas de origen animal o vegetal. Sin embargo, para otros productos alimentarios existen dos colorantes naturales autorizados relacionados estructuralmente con las clorofilas, son los denominados E-140 y E-141. Por el hecho de ser naturales (pigmentos obtenidos de una materia prima animal o vegetal) y a pesar de estar sometidos a exámenes muy minuciosos, por norma no deben obligatoriamente responder a criterios de pureza específicos. El E-140 se corresponde con derivados clorofílicos tal cual, y se comercializa según su solubilidad, como el E-140i, liposoluble, que se corresponde con las clorofilas y el E-140 ii, hidrosoluble compuesto por clorofilinas. El E-140 i se obtiene a partir de fuentes naturales, alfalfa, ortigas, y otras materias vegetales comestibles, mediante una extracción con solvente y durante este proceso, parte de las clorofilas pueden transformarse en sus derivados libres de magnesio: las feofitinas. Este hecho supone un cambio drástico en la coloración del colorante que pasa de verde a marrón. El producto final puede contener otros pigmentos (como carotenoides), aceites y ceras, por lo que el aspecto final del colorante es ceroso. El colorante E-140 ii (también conocido como clorofilinas sódicas o potásicas) se obtiene por saponificación de los productos extraídos por solventes a partir de material vegetal comestible. La saponificación rompe el enlace éster con el fitol e incluso puede llegar a romper el denominado anillo isocíclico. Tras la saponificación los ácidos son neutralizados para formar las sales de potasio y/o sodio. Este colorante se comercializa en polvo o solución acuosa a diferencia del E140i.

45 El colorante E-141 se compone de complejos cúpricos de derivados clorofílicos, es decir, el correspondiente derivado cúprico del E-140. Paralelamente, existe en el mercado el E-141i, liposoluble, llamado "clorofilas de cobre" y el E-141ii, hidrosoluble, conocido como "clorofilinas de cobre", resultantes ambas de adicionar sales de cobre a las respectivas soluciones de pigmentos.

50 Además existe un colorante verde artificial (E-142), autorizado en Europa, aunque no en Estados Unidos, que al ser artificial, debe pasar estrictos controles toxicológicos. La FDA, en materia de colorantes verdes en alimentos, sólo permite el uso del E-141 en bebidas basadas en cítricos, siempre y cuando no exceda el 2%.

55 En casos de adulteración del color en aceites de oliva el colorante generalmente utilizado es el E-141i, es decir, la forma liposoluble del derivado cúprico de clorofilas, que facilita la disolución del mismo en el aceite. Los cupro-derivados son preferentemente utilizados porque son mucho más estables que la clorofila original, ya que la inserción del ion Cu^{+2} en el macrociclo de la clorofila, genera un complejo muy estable que mantiene su coloración verde a pesar del procesado y almacenamiento del alimento. A diferencia, el magnesio que de forma natural se encuentra quelado en el macrociclo (clorofila), durante el almacenamiento o procesamiento es sustituido fácilmente por hidrógeno generando otros derivados clorofílicos de coloración no verdosa (feofitinas).

60 La fracción clorofílica del aceite de oliva viene determinada principalmente por feofitinas (*a* y *b*). Durante el proceso de extracción del aceite de oliva, las clorofilas originales (presentes en la aceituna) se transforman en feofitinas cuando el ión magnesio del anillo de porfirina es sustituido por H^+ . Esta reacción está mediatizada por la liberación de ácidos que ocurre durante la molienda y batido de las pastas de aceitunas y es visualmente muy llamativa porque afecta directamente al grupo cromóforo de la clorofila, cambiando el color del verde brillante al marrón oliva. En

algunos aceites pueden quedar trazas de las clorofilas originales. El contenido en feofitinas ($a+b$) supone más del 90% de la fracción clorofílica de un aceite de oliva. Incluso en un aceite de oliva virgen, a los 3-4 meses de almacenamiento todas las clorofilas se han transformado en feofitinas (Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, Roca & Mínguez-Mosquera, 2005).

5

En algunos aceites de oliva, se han detectado trazas de derivados clorofílicos oxidados en el carbono-13 (OH-feofitinas y lactona-feofitinas), cuya presencia puede ser debida a la actividad de enzimas oxidativas del fruto y a las condiciones inherentes al proceso de extracción (Roca & Mínguez-Mosquera, 2003). En aceites de frutos con alta actividad clorofilasa, como en el caso de la variedad Arbequina, también se encuentran clorofilidas y feoforbidas. Estos compuestos son productos de la reacción de desesterificación del alcohol fitol de las moléculas de clorofilas y feofitina, respectivamente (Roca & Mínguez-Mosquera, 2003). Si el aceite de oliva lleva un tiempo almacenado se puede formar también pirofeofitina a . Este compuesto se forma por la demetoxicarbonilación de C-13². La aparición de este compuesto en alimentos ha estado siempre relacionada con tratamientos térmicos fuertes como la esterilización. Sin embargo, Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, Roca & Mínguez-Mosquera (2005) han demostrado la formación de dicho compuesto durante el almacenamiento del aceite de oliva virgen a 15°C durante un año, aunque nunca más de 3%. Consecuentemente, el aceite de oliva debe contener sólo los pigmentos presentes en el fruto más los derivados asociados al proceso de extracción y almacenamiento: específicamente, feofitinas (a y b), trazas de clorofilas y feofitinas oxidadas y pirofeofitina a , y, en ciertos casos, derivados clorofílicos desesterificados.

20

Por tanto, sería de gran interés para el control de calidad de la industria alimentaria poder disponer de un procedimiento de detección de pigmentos que hayan sido añadidos fraudulentamente al aceite de oliva.

25 Descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceite, especialmente indicado para controlar la adición fraudulenta en aceite de oliva de colorantes que contienen estos complejos.

30

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofila en aceites vegetales que comprende los siguientes pasos:

35

- a) extracción en fase líquida de los complejos cúpricos,
- b) separación de los complejos extraídos en el paso a) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y
- c) detección de los complejos separados en el paso b) por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS).

40

En la presente invención el término “complejo de clorofila” se refiere a un compuesto coloreado con estructura química de clorofila, es decir, formado por un anillo porfirínico sustituido y una cadena terpénica denominada fitol. La estructura básica es el anillo de porfina que esta formado por cuatro anillos de pirrol enlazados por puentes metálicos que forman un nuevo sistema aromático planar muy estable que es la porfina. En el caso de la clorofila, en el centro del anillo porfirínico se encuentra un átomo de Mg²⁺ unido a los nitrógenos de los grupos pirrol, pero este átomo de Mg²⁺ puede sustituirse por Zn²⁺, Cu²⁺ o 2H⁺ para formar otros pigmentos químicamente estables.

50

En la presente invención el término “aceite vegetal” se refiere a un lípido que es líquido a temperatura ambiente y que se obtiene de las plantas, principalmente de sus semillas. Ejemplos de aceites vegetales, sin limitarse a, son aceite de oliva, de palma, de girasol, de colza, de coco, de lino, de sésamo, de pepitas de uva o de almendra.

55

En una realización preferida, el complejo cúprico de clorofila se selecciona entre Cu-feoforbida a , Cu-feofitina b , Cu-feofitina b' , Cu-13²-OH-feofitina b , Cu-13²-OH feofitina a , Cu-13²-OH-feofitina a' , Cu-15¹-OH-lactona-feofitina a , Cu-feofitina a , Cu-feofitina a' , Cu-piro-feofitina b y Cu-piro-feofitina a o combinaciones de los mismos.

60

65

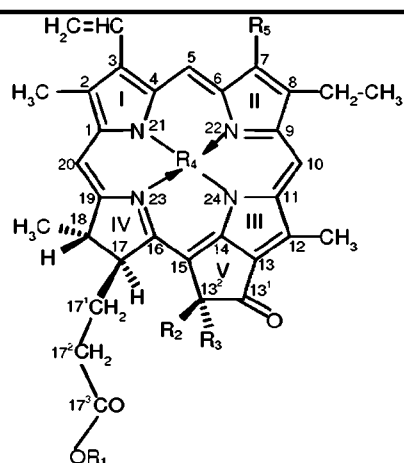
ES 2 346 628 B1

Los mencionados complejos clorofílicos con cobre, junto con otros derivados clorofílicos no cúpricos, están presentes en el colorante E141i y tienen la siguiente fórmula general:

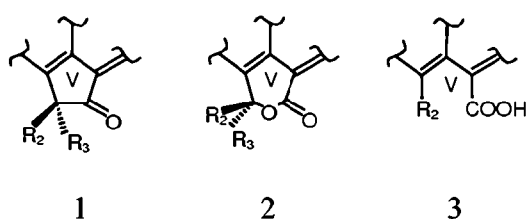
TABLA 1

Sustituyentes de la estructura clorofílica para los distintos complejos clorofílicos presentes en el colorante E-141i

Complejo clorofílico	Pico n° (en fig 2)	Anillo isocíclico	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Feofitina b	1-1'	1	Fitol	H	COOCH ₃	2H	CHO
Feofitina a	2-2'	1	Fitol	H	COOCH ₃	2H	CH ₃
Pirofeofitina a	3	1	Fitol	H	H	2H	CH ₃
Cu-feoforbida a	4	1	H	H	COOCH ₃	Cu	CH ₃
15-ácido glioxílico feo b	5	3	Fitol	COCOOH		2H	CHO
Cu- feofitina b	6-6'	1	Fitol	H	COOCH ₃	Cu	CHO
13 ² -OH- feofitina b	7-7'	1	Fitol	OH	COOCH ₃	2H	CHO
Cu-13 ² -OH-feo b	8	1	Fitol	OH	COOCH ₃	Cu	CHO
Cu-13 ² -OH-feo a	9-9'	1	Fitol	OH	COOCH ₃	Cu	CH ₃
Cu-15 ¹ -lactona feo a	10	2	Fitol	OH	COOCH ₃	Cu	CH ₃
Pirofeofitina b	11	1	Fitol	H	H	2H	CHO
Cu- feofitina a	12-12'	1	Fitol	H	COOCH ₃	Cu	CH ₃
Cu-pirofeofitina b	13	1	Fitol	H	H	Cu	CHO
Cu-pirofeofitina a	14	1	Fitol	H	H	Cu	CH ₃



Tipo de anillo isocíclico (anillo V)



donde las características estructurales específicas se recogen en la tabla 1.

En otra realización preferida, el aceite vegetal es aceite de oliva.

En la presente invención el término cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se refiere a una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en el caso de la HPLC es un líquido o mezcla de varios líquidos que se introduce en la columna

por bombeo a alta presión. La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico que se encuentran disponibles en el mercado. Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza sobre el soporte sólido que otros, lo que provocará su separación. Las sustancias que permanecen libres más tiempo en la fase móvil, avanzan más rápidamente con el fluir de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir.

En la presente invención el término “espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis)” se refiere a una técnica instrumental basada en el análisis espectral que permite detectar la absorción o emisión de radiación electromagnética a ciertas longitudes de onda, y relacionar éstas con los niveles de energía implicados en una transición cuántica. En el caso de la espectroscopia UV-Vis se utiliza radiación electromagnética de las regiones visible, ultravioleta cercana e infrarroja cercana. La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

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 y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1: Espectros de los derivados clorofílicos presentes en el colorante E 141i. (a) feofitina *b* (línea continua) y Cu-feofitina *b* (línea discontinua), (b) feofitina *a* (línea continua) y Cu-feofitina *a* (línea discontinua), (c) 15-ácido glioxílico feofitina *b*, (d) Cu-15^l-OH lactona feofitina *a*. Picos como en tablas 2 y 3.

Figura 2: Cromatogramas (430 nm) de aceite de oliva (a, b) y mezcla de aceite de oliva y colorante 141i (c). Ampliación del cromatograma del recuadro de la figura 2a para aceite de oliva (b) y mezcla de aceite de oliva y colorante 141i (c). Picos como en tablas 2 y 3.

Figura 3: Cromatogramas a 430 nm de cuatro muestras diferentes de colorantes naturales E-141i, obtenidos tal y como se describe en materiales y métodos. Picos como tabla 2 y 3.

Figura 4: Espectro directo de una solución de hexano del colorante E 141i (línea continua), aceite de oliva (línea punteada) y muestra adulterada (línea discontinua).

(Tabla pasa a página siguiente)

Complejo clorofílico	Pico nº	I		II		III		IV		V		VI			
		Kc	Soret	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	
Feofitina <i>b</i>	1 (fig. 1a)	11.50	435	412	2.27	524	13.62	(558)	20.42	598	16.33	654	3.83		
Feofitina <i>b'</i>	1' (fig. 1a)	11.96	435	412	2.27	524	13.62	(558)	21.80	595	17.63	654	4.87		
Feofitina <i>a</i>	2 (fig. 1b)	12.46	409	(400)	1.07	(376)	1.31	505	8.78	537	9.62	609	10.63	666	1.85
Feofitina <i>a'</i>	2' (fig. 1b)	12.98	409	(400)	1.07	(376)	1.31	505	9.18	537	10.10	609	11.22	666	2.35
Piro-feofitina <i>a</i>	3 (fig. 1b)	14.41	409	(400)	1.07	(376)	1.31	505	8.78	537	9.62	609	10.63	666	1.85

Tabla 2: Propiedades cromatográficas y espectroscópicas de los complejos clorofílicos presentes en el aceite de oliva.

Complejo clorofílico	Pico nº	I		II		III		IV		V		VI			
		Kc	Soret	R	M	R	M	R	M	R	M	R	M	R	
Cu-feoforbida <i>a</i>	4 (fig. 1b)	4.17	424	(384)	1.65	400	1.02	506	20.11	548	12.07	606	3.29	654	1.00
Glioxi-feoforbida <i>b'</i>	5 (fig. 1c)	7.77	426	350	7.00	(408)	2.85	(530)	15.31	(570)	14.41	(596)	17.50	651	6.45
Cu-feofitina <i>b</i>	6 (fig. 1a)	9.75	443			540	15.53				590	6.47	633	2.38	
Cu-feofitina <i>b'</i>	6' (fig. 1a)	10.15	443			540	17.36				590	7.36	633	2.89	
1 ³ -OH-feofitina <i>b</i>	7 (fig. 1a)	9.82	435			412	2.27	524	13.62	(558)	20.42	598	16.33	654	3.83
1 ³ -OH-feofitina <i>b'</i>	7' (fig. 1a)	10.18	435			412	2.27	524	13.62	(558)	21.80	595	17.63	654	4.87

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Cu-13 ² -OH- feo b	8 (fig. 1a)	11.27	443		540	15.53		590	6.47	633	2.38
feofitina b	1 (fig. 1a)	11.50	435	412	2.27	13.62	(558)	598	16.33	654	3.83
Cu-13 ² -OH feofitina a	9 (fig. 1b)	12.07	424	(384)	1.65	20.11	548	12.07	606	654	1.00
Cu-13 ² -OH feofitina a'	9 (fig. 1b)	12.38	424	(384)	1.65	20.11	548	12.07	606	654	1.00
Cu-15 ¹ -OH-lac- feo- a**	10(fig.1d)	12.26	411	392	1.20	16.50	(540)	599	7.75	645	1.75
Piro- feofitina b	11(fig.1a)	12.94	435	412	2.27	13.62	(558)	598	16.33	654	3.83
Cu - feofitina a	12(fig.1b)	13.35	424	(384)	1.65	20.11	548	12.07	606	654	1.00
Cu- feofitina a'	12'(fig.1b)	14.02	424	(384)	1.65	20.11	548	12.07	606	654	1.00
Cu-piro- feofitina b	13 (fig. 1a)	13.60	443			15.53		590	6.47	633	2.38
Piro- feofitina a	3 (fig. 1b)	14.41	409	(400)	1.07	8.78	537	9.62	10.63	666	1.85
Cu-piro- feofitina a	14(fig.1b)	16.54	424	(384)	1.65	20.11	548	12.07	606	654	1.00

Tabla 3: Propiedades cromatográficas y espectroscópicas de los complejos clorofílicos presentes en las muestras de colorantes 141i. (*gloxil-feoforbida b es 15-ácido glixílico feoforbida b, **Cu-15¹-OH-lac-feo-a es Cu-15¹-OH-lactona- feofitina a)

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del procedimiento descrito en la presente invención.

Materia prima. La muestra de aceite de oliva fue comprada en un supermercado, y las muestras de colorantes fueron suministradas por diferentes empresas dedicadas a la producción y comercialización de colorantes alimentarios. El aceite problema (adulterado) se obtuvo mezclando el aceite de oliva con uno de estos colorantes E-141i.

Extracción de pigmentos. Muestras de 15 g de aceite de oliva se disuelven con N, N-dimetilformamida (DMF) saturado con $MgCO_3$. Los extractos se combinan en un embudo de decantación y son repetidamente tratados con hexano (5 x 50 ml). Clorofilas, derivados clorofílicos y xantofilas se retienen en la fase DMF. La fase de hexano contiene lípidos y carotenos. La fase DMF es tratada con 400 mL de una solución 10% (p/v) NaCl a 0°C y las clorofilas y xantofilas se transfieren a 100 ml de una mezcla de éter dietílico/hexano (1:1 v/v). La fase acuosa se lava con éter dietílico y es finalmente descartada, eliminando polifenoles y otros compuestos hidrosolubles. Las fases orgánicas combinadas se filtran a través de Na_2SO_4 anhidro y evaporado a sequedad bajo vacío con temperatura inferior a 30°C. El residuo seco se disuelve en 1.5 ml de acetona previo a HPLC. Para los colorantes (E-141i), diferentes alícuotas se disuelven en acetona. Los análisis se realizan inmediatamente o tras el almacenamiento a -20°C durante no más de 18 h. Los datos son media de un análisis por triplicado.

Patrones de pigmentos para HPLC. Clorofila a y b se compraron a Sigma. Se obtuvo clorofilida mediante una desesterificación enzimática con clorofilasa. La mezcla de reacción contiene: tampón 100 mM Tris-HCl (pH 8.5) que lleva 0.24% (w/v) Tritón X-100, clorofila a disuelta en acetona y el extracto enzimático crudo de hojas de *Ailanthus altissima* (Mill.), en una proporción 5:1:5. Los epímeros en C-13 de clorofila a y b se prepararon con un tratamiento con cloroformo. La 13²-OH-clorofila a y b se obtuvo mediante una oxidación con dióxido de selenio (37 mg, 0.34 mmol) a partir de clorofila a con reflujo y calor durante 4 h, en una solución con piridina (5 ml) bajo argón. 15¹-OH-lactona clorofilas a y b se obtuvieron mediante una oxidación alcalina en medio acuoso. Para ello, clorofila (a o b) sólida y cromatográficamente pura se disolvió en acetona y se mezcló con 0.5% NaOH y se expuso a oxígeno atmosférico a temperatura ambiente durante 10 min. Los productos de oxidación resultantes fueron transferidos a éter dietílico adicionando agua saturada con NaCl, y 15¹-OH-lactona clorofilas se aislaron por NP-TLC y HPLC semi-preparativa. Pirofeofitina a y b se obtuvieron de sus respectivas feofitinas disueltas en colidina mediante calentamiento a 100°C y reflujo. Todos los derivados libre de magnesio se obtuvieron de los correspondientes precursores clorofílicos disueltos en éter dietílico mediante una acidificación con 2-3 gotas de 5 M HCl. La 15-ácido glioxílico feofitina b se obtuvo por tratamiento alcalino en medio acuoso (0.5% NaOH). Los complejos de cobre se prepararon disolviendo los pigmentos en acetona para la reacción de quelación con iones cobre (II) y con ácido ascórbico para minimizar los cambios oxidativos.

Análisis de pigmentos clorofílicos por HPLC. La separación y cuantificación de pigmentos se llevaron a cabo por HPLC utilizando un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard HP 1100 equipado con un inyector automático de HPLC HP1100. Se utilizó una columna de acero inoxidable (20 x 0.46 cm i.d.), empaquetada con 3 μm C₁₈ Mediterránea Sea (Teknokroma, Barcelona, Spain). La columna se protege con una precolumna (1 x 0.4 cm d.i.) empaquetada con el mismo material. La separación se lleva a cabo utilizando un gradiente de elución (flujo 1.250 mL min⁻¹) con las fases móviles: agua/par iónico/metanol (1/1/8, v/v/v) y metanol/acetona (1/1, v/v). El par iónico es tetrabutilamonio 0.05 M y acetato de amonio 1 M en agua. La columna se guarda en metanol/agua (1/1, v/v). El gradiente es inicialmente 75%A y 25%B, luego cambia a 25%A en 8 minutos, isocrático 2 min., cambio a 10%A en 8 min., luego a 100%B en 5 minutos, isocrático 15 minutos, y vuelta a las condiciones iniciales en 5 min. Se lleva a cabo una detección secuencial con un detector de fotodiodo a 430 nm. Los datos se procesan con un LC HP ChemStation (Rev.A.05.04). Los pigmentos son identificados por co-cromatografía con muestras auténticas y por sus características espectroscópicas. El espectro UV-Vis on-line se registra desde 350 a 800 nm con el detector de fotodiodo.

Espectro directo. Las muestras (aceites y colorante) se disolvieron en 25 mL de hexano y se realizó el espectro de absorción electrónica con un espectrofotómetro de diodo HP 8452A.

La tabla 2 y la figura 1 (a-b) muestran las principales características espectroscópicas de los derivados clorofílicos presentes en el aceite de oliva. En la figura 2a se representa un cromatograma típico a 430 nm de aceite de oliva. A esta longitud de onda, el pico de mayor área se corresponde con luteína, carotenoide mayoritario del aceite de oliva, lo que dificulta la visualización de la zona cromatográfica objeto de interés (tiempos de retención superiores a 22 minutos). Si esta zona se amplía (figura 2b), se observan con más claridad los derivados clorofílicos mayoritarios en un aceite de oliva. La presencia de otros derivados clorofílicos distintos de los descritos (feofitinas (a y b), trazas de clorofilas y feofitinas oxidadas y pirofeofitina a, y, en ciertos casos, derivados clorofílicos desesterificados), indica que el aceite de oliva ha sido adulterado con la adición de un compuesto o mezcla colorante.

En la figura 3 se muestra el perfil de cuatro ejemplos reales de colorantes E-141i que se comercializan bajo diferentes marcas, como colorantes alimentarios autorizados (para otro tipo de alimentos). La composición clorofílica y carotenoide varía entre muestras dependiendo de la materia prima de partida y del proceso de obtención, ya que la norma no recoge un protocolo uniforme. Dentro de la fracción carotenoide, predomina luteína y β -caroteno, acompañados de otras xantofilas minoritarias. En la tabla 3 se recogen las propiedades cromatográficas y espectroscópicas de todos los derivados clorofílicos presentes en las cuatro muestras de colorantes E-141i analizadas. La inserción del

ión cobre en el macrociclo clorofílico induce un desplazamiento batocrómico de la banda Soret (entre 3 y 15 nm, dependiendo del pigmento) y un desplazamiento hipsocrómico de la banda VI (entre 12 y 30 nm, dependiendo del pigmento), como puede verse en la tabla 3. A diferencia, las modificaciones de la molécula de clorofila que no afectan al sistema de doble enlaces conjugados del macrociclo, no modifican el espectro de absorción. En este sentido, la hidroxilación del C13 (13²-OH), la pérdida de la cadena de fitol, los epímeros, y la demetoxicarbonilación que conduce a la formación de los piroderivados, no modifican el espectro de absorción del pigmento precursor correspondiente, aunque sí la polaridad y, consecuentemente, los tiempos de retención (tabla 3 y figura 3).

De la fracción clorofílica, lo más llamativo es que el 99.59±0.52% de los pigmentos clorofílicos presentes en las diferentes muestras del colorante E141i, no son propios de un aceite de oliva. Por tanto, la simple detección de uno de estos compuestos en un aceite de oliva desconocido permite detectar la adulteración. Las tres primeras muestras de colorantes E-141i son bastantes parecidas entre sí, tan sólo la cuarta (figura 3d) presenta un cromatograma más complejo. Pero en cualquier caso, en todas ellas el derivado clorofílico mayoritario es Cu-pirofeofitina *a* (pico 14) que supone, dependiendo de la muestra, entre el 39-91% de la fracción clorofílica. Por otro lado, entre el 76-100% de los derivados clorofílicos son complejos cúpricos de clorofilas. Como se ha visto anteriormente (figura 2a-b), en los aceites de oliva están ausentes los derivados cupro-clorofílicos, por lo que la detección de la adulteración es relativamente fácil, entre otras cosas porque la inserción de la molécula de cobre en un complejo clorofílico modifica su polaridad, permitiendo así una elución cromatográfica separada del complejo original entre 1-2 min. La identificación también se ve facilitada por el hecho de que los espectros de absorción de los derivados cupro-clorofílicos se diferencian sustancialmente del derivado clorofílico del que proceden, tal y como se ha comentado anteriormente. Este hecho permite incluso a veces detectar la adulteración directamente a partir de un espectro de absorción del aceite disuelto en hexano, observando la zona entre 600-700 nm. A modo de ejemplo, se muestra en la figura 4 el espectro de un aceite de oliva, donde el máximo de absorción se encuentra a 666 nm por ser el propio de la feofitina *a*, derivado clorofílico mayoritario del aceite de oliva. El espectro del colorante E-141i exhibe su máximo a 654 nm, propio del Cu-piro-feofitina *a* (pico 14), al ser el mayoritario en el colorante. Cuando se realiza el espectro directo a la muestra problema (aceite de oliva puro más colorante E-141i) se produce una modificación de los máximos de absorción. Específicamente, en la zona 600-700 nm se produce un plateau, suma de los máximos de absorción del aceite de oliva (666 nm) y del colorante (654 nm). Por tanto, si la absorbancia del aceite a 654 nm es mayor que a 666 nm, nos indica una adulteración del aceite de oliva.

En la figura 2c se muestra el perfil cromatográfico del extracto de complejos obtenido de una muestra de aceite de oliva adulterado con colorante E-141i. Se ha ampliado el cromatograma en la zona más apolar donde se concentran los derivados cupro-clorofílicos. Se observa claramente cómo el método cromatográfico propuesto permite separar los complejos inherentes al aceite de oliva (picos 1-3, figura 2c) de los derivados clorofílicos procedentes del colorante (picos 9, 11, 13 y 14). Como se comentó anteriormente, la presencia de complejos cúpricos de clorofilas en la muestra problema implica que el aceite de oliva ha sido adulterado. Así pues, teniendo en cuenta la separación cromatográfica y las características espectroscópicas (tabla 3 y figura 2) se puede garantizar el control de la adulteración del aceite de oliva con aditivos colorantes tipo “complejo cúprico de clorofila” (E-141i). En el sistema cromatográfico se recomienda, además de la detección general a 430 nm, la detección simultánea a las longitudes de onda específicas de los complejos cúpricos mayoritarios, 654 nm para Cu-pirofeofitina *a* y 633 nm para Cu-pirofeofitina *b*.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceites vegetales que comprende los siguiente pasos:

- d) extracción en fase líquida de los complejos cúpricos de clorofila,
- e) separación de los complejos extraídos en el paso a) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y
- f) detección de los complejos separados en el paso b) por espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS).

15 2. Procedimiento según la reivindicación 1 donde el complejo cúprico de clorofila se selecciona entre Cu-feoforbida *a*, Cu-feofitina *b*, Cu-feofitina *b'*, Cu-13²-OH-feofitina *b*, Cu-13²-OH feofitina *a*, Cu-13²-OH-feofitina *a*, Cu-15¹-OH-lactona-feofitina *a*, Cu-feofitina *a*, Cu-feofitina *a'*, Cu-piro-feofitina *b* y Cu-piro-feofitina *a* o combinaciones de los mismos.

20 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde el aceite vegetal es aceite de oliva.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

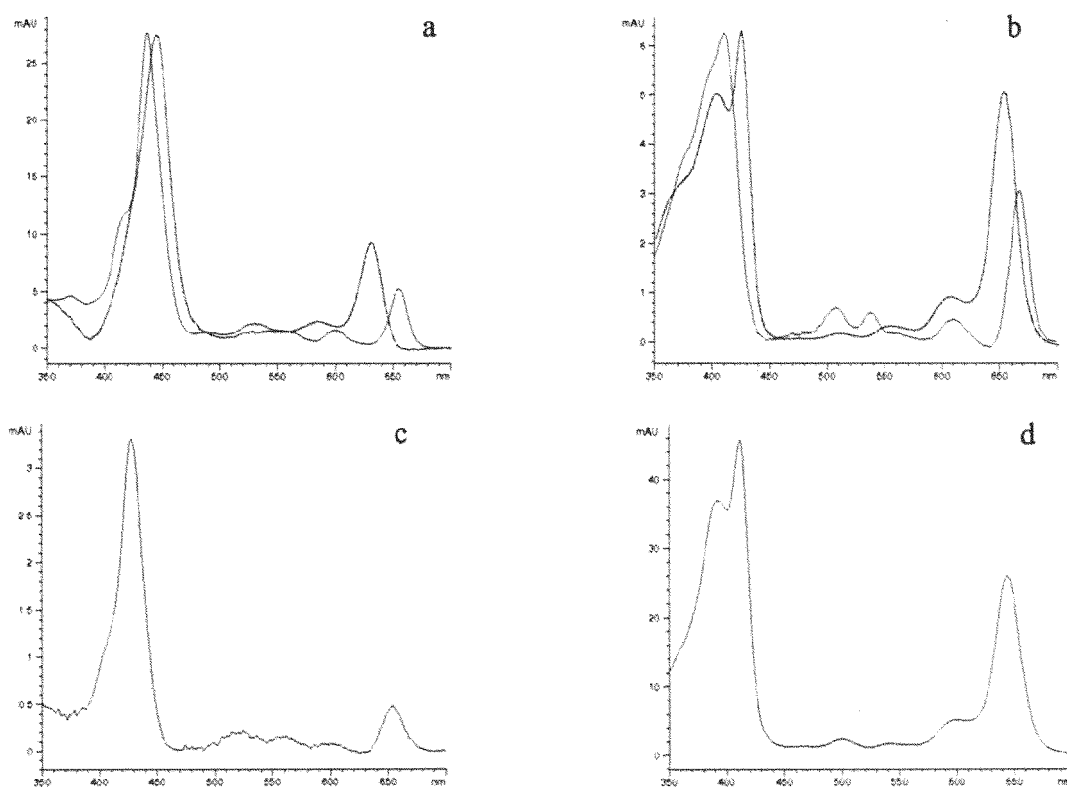
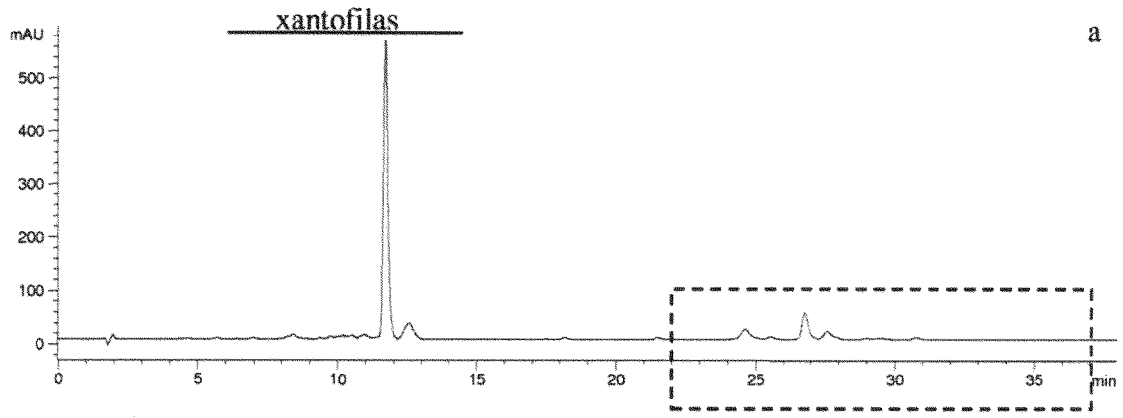
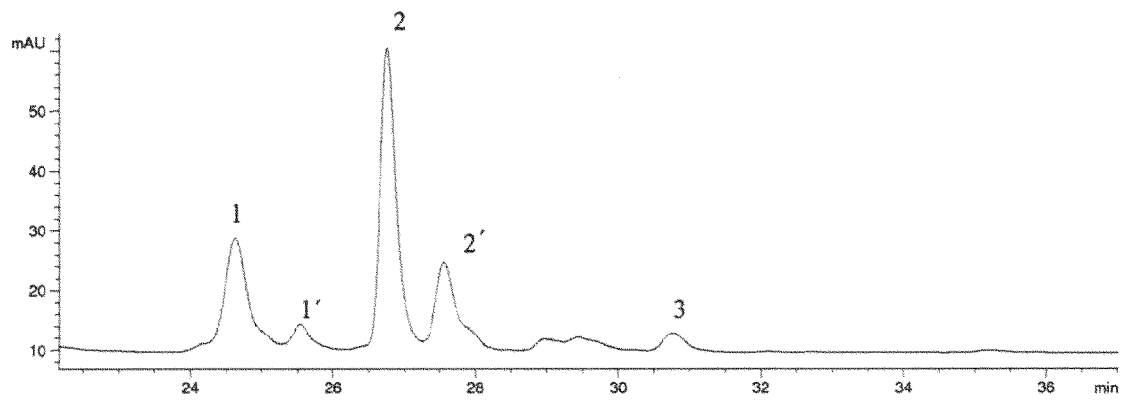


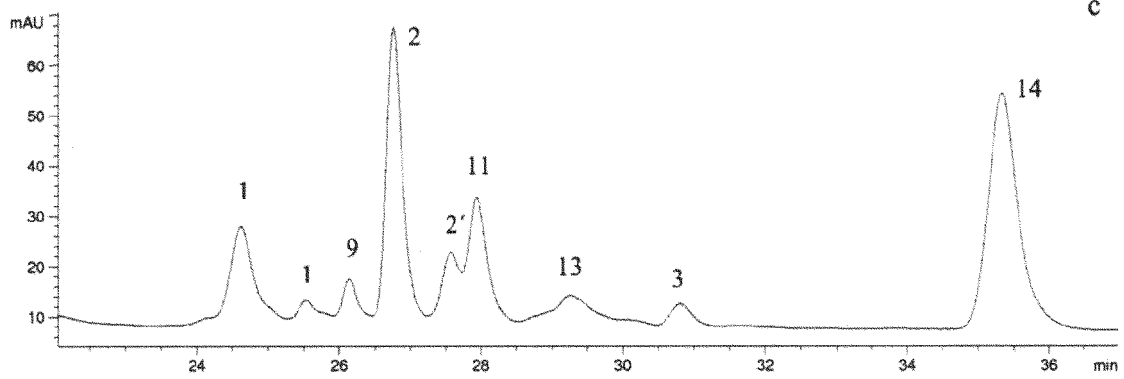
Fig 1



a



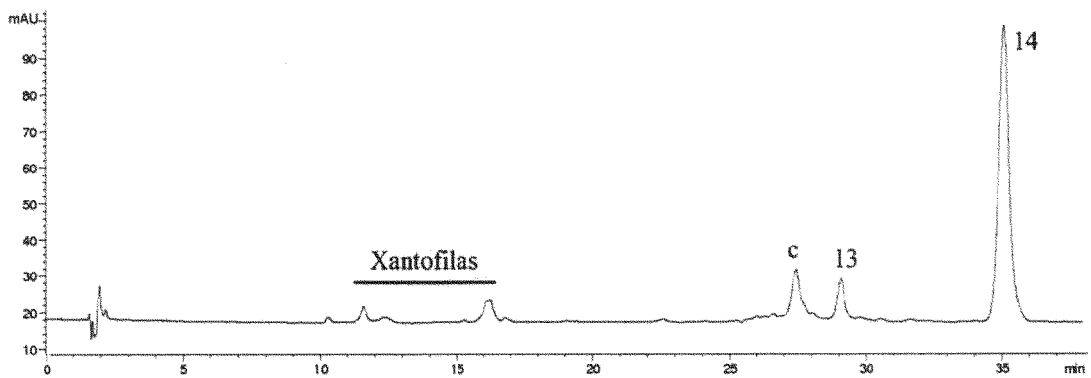
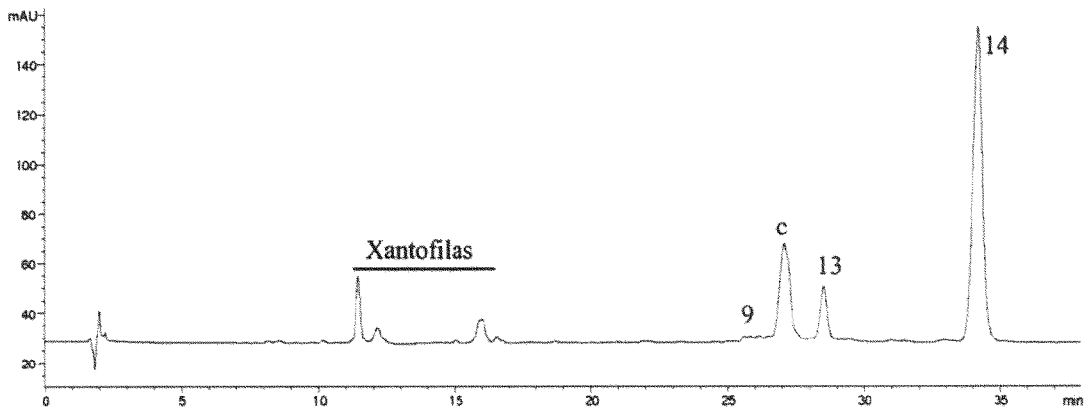
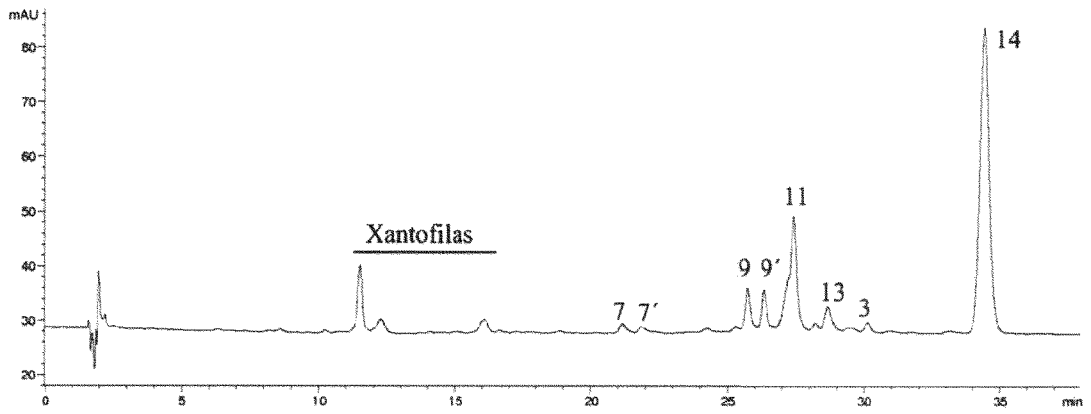
b



c

Fig 2

ES 2 346 628 B1



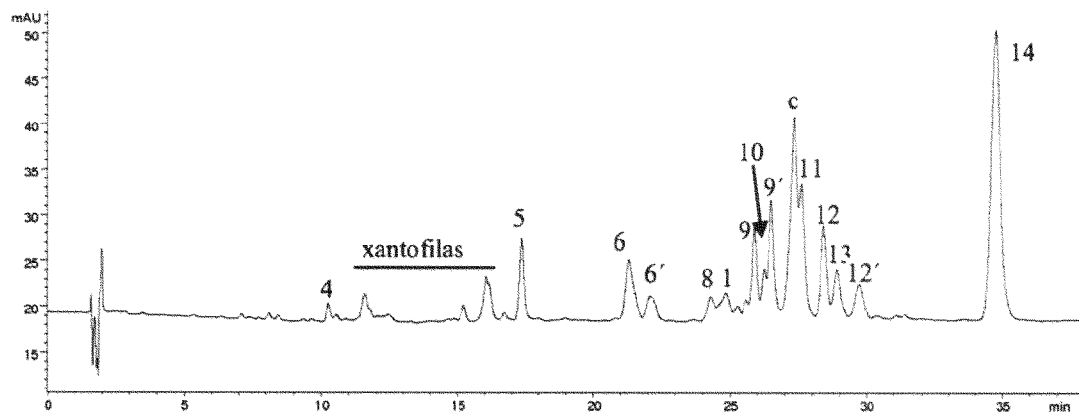


Fig 3

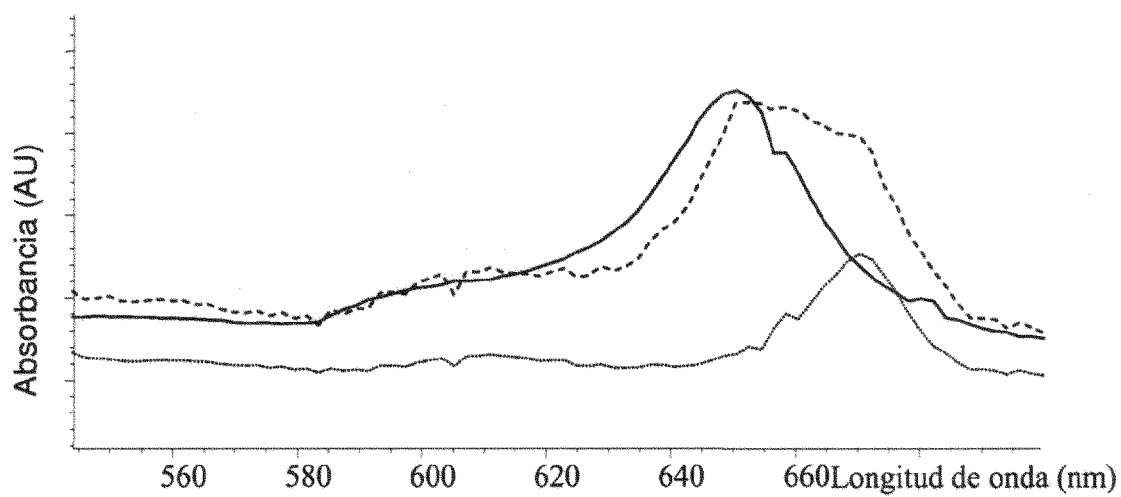


Fig 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 628

② Nº de solicitud: 200930075

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.04.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	INOUE, H. et al. "Determination of copper (II) chlorophyllin by reversed-phase high-performance liquid chromatography". Journal of Chromatography A, 1994, Volumen 679, páginas 99-104. Ver página 99, resumen; páginas 102 y 103, apartados 3.2 y 3.3, tabla 3.	1-3
Y	SCHWARTZ, S. J. "High performance liquid chromatography of zinc and copper pheophytins". Journal of Liquid Chromatography, 1984, Volumen 7, Número 8, páginas 1673-1683. Ver página 1673, resumen; página 1677, párrafos 1 y 2; página 1679, tabla 2.	1-3
Y	MINGUEZ-MOSQUERA, M. I. et al. "Rapid Method of Quantification of Chlorophylls and Carotenoids in Virgin Olive Oil by High-Performance Liquid Chromatography". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, volume 40, páginas 60-63. Ver página 60, columna 2, párrafos 4-7.	1-3
A	DEL GIOVINE, L. & FABIETTI, F. "Copper chlorophyll in olive oils: identification and determination by LIF capillary electrophoresis". Food Control, 2005, Volumen 16, páginas 267-272. Ver página 267, resumen; página 269, apartado 2.3.	1-3
A	SCOTTER, M. J. et al. "Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141[i]) and chlorophyllin (E141[ii]) food colouring materials. Food Additives and Contaminants, 2005, Volumen 22, Número 12, páginas 1163-1175. Ver página 1163, resumen.	1-3

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 17.06.2010	Examinador N. Martín Laso	Página 1/4
-------------------------------------------------------	-------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 33/03 (2006.01)

A23D 9/04 (2006.01)

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

G01N, A23D

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, NPL, XPESP, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-3	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	Journal of Chromatography A, 1994, Volumen 679, páginas 99-104.	1994
D02	Journal of Liquid Chromatography, 1984, Volumen 7, Número 8, páginas 1673-1683.	1984
D03	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, volume 40, páginas 60-63.	1992

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 solicitud se refiere a un procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas en aceites vegetales mediante extracción en fase líquida de dichos pigmentos, separación mediante HPLC y detección mediante espectroscopia UV-VIS.

El documento D01 divulga la puesta a punto de un método para la detección de complejos cúpricos de clorofilas que comprende las etapas de separación de los complejos mediante HPLC en fase reversa y detección de dichos complejos por espectroscopia ultravioleta-visible (página 99, resumen; páginas 102 y 103, apartados 3.2 y 3.3). Entre los complejos cúpricos de clorofilas separados y detectados se encuentra la Cu-feoforbida a (página 103, tabla 2).

El documento D02 divulga un procedimiento de detección de complejos cúpricos de clorofilas (Cu-feofitina a y Cu-feofitina b) que comprende la preparación de dichos complejos, su separación mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con columna en fase reversa y la detección de dichos complejos por espectroscopia visible (página 1673, resumen; página 1677, párrafos 1 y 2; página 1679, tabla 2).

La diferencia entre la invención definida en la solicitud y lo divulgado en cualquiera de los documentos D01 o D02 reside en que la separación e identificación de los complejos cúpricos de clorofilas se lleva a cabo sobre un extracto de complejos cúpricos de clorofilas obtenido de un aceite vegetal, mientras que en los anteriores documentos se lleva a cabo sobre mezclas de dichos complejos preparadas para la puesta a punto de un método de separación.

Dado que la obtención de extractos de clorofilas en aceites vegetales, como aceite de oliva, es conocida en el estado de la técnica (ver documento D03, página 60, columna 2, párrafos 4-7), se considera que un experto en la materia en el ejercicio de una actividad rutinaria podría llevar a cabo la preparación de un extracto de complejos cúpricos de clorofila a partir de un aceite vegetal siguiendo el procedimiento divulgado en el documento D03, para posteriormente llevar a cabo la separación e identificación de dichos complejos según divulgan los documentos D01 o D02, obteniéndose así el procedimiento definido en la solicitud.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 1-3 de la solicitud carece de actividad inventiva a la vista de los documentos D01 o D02 (considerados por separado) junto al documento D03 (Art. 8.1 LP 11/1986).