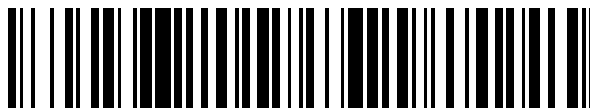


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 366**

21 Número de solicitud: 201300680

51 Int. Cl.:

B01F 17/00 (2006.01)

C11D 1/00 (2006.01)

A23L 1/035 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/899 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.01.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario, s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES

72 Inventor/es:

VECINO BELLO, Xanel;
BARBOSA PEREIRA, Letricia;
CRUZ FREIRE, José Manuel y
MOLDES MENDUIÑA, Ana Belén

54 Título: **Composición detergente que comprende un biosurfactante de origen vegetal**

57 Resumen:

La presente invención reivindica una composición detergente que contiene un biosurfactante de origen vegetal formado por una fracción hidrofóbica constituida por ácidos grasos y una fracción proteica, que le permite ser soluble en agua. Los ácidos grasos presentes en la fracción hidrofóbica están formados por 16 y 18 átomos de carbono. Además se observa que este biosurfactante no forma espuma con lo cual podría utilizarse como surfactante, no espumante, en la elaboración de productos cosméticos, farmacéuticos y alimentarios; así como en numerosos procesos industriales donde se quiera evitar la formación de espuma.

DESCRIPCIÓN**Composición detergente que comprende un biosurfactante de origen vegetal****Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a una composición detergente que contiene un surfactante de origen natural, en donde el surfactante se obtiene más concretamente de maíz. La presente invención hace también referencia a la caracterización físico-química de dicho biosurfactante.

Estado de la Técnica

En la actualidad existen numerosos trabajos y patentes relacionados con la obtención y caracterización de biosurfactantes obtenidos a partir de diferentes microorganismos (WO2012010407, WO2012010405). Existen distintos tipos de biosurfactantes basado en su estructura química: glicolípidos, lipopéptidos, glicopéptidos, glicolipopéptidos fosfolípidos, así como biosurfactantes poliméricos. La mayoría de estos biosurfactantes se obtienen a partir de microorganismos llevando a cabo procesos de fermentación controlada y utilizando diferentes fuentes de carbono. En general, los surfactantes derivados de fuentes de carbono renovables son biodegradables y menos tóxicos que los tenso-activos derivados de sustratos de carácter no renovable (Sachdev, D. P & Cameotra, S. S. Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 1005-1016), (Das, P.; Mukherjee, S.; Sen, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104* (6), 1675-1684).

Existe un gran interés en la utilización de aditivos naturales para la formulación de productos farmacéuticos, cosméticos o alimentarios (Muller M M.; Kugler J H.; Henkel M.; Gerlitzki M.; Hormann B.; Pohnlein M.; Sylatk C.; Hausmann R. Rhamnolipids-Next generation surfactants?. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 366-380), (Marchant, R.; Banat, M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 1597-1605). Entre estos aditivos se encuentran los biosurfactantes. Además cada vez somos más conscientes de la necesidad de utilizar productos que no generen un impacto ambiental negativo cuando son aplicados en el tratamiento de suelos o aguas. Desde este punto de vista cada vez son más los estudios que se están llevando a cabo, con el fin de obtener agentes tenso activos biodegradables y de toxicidad reducida que puedan sustituir a los detergente o agentes tenso activos sintetizados químicamente a partir de materias primas no renovables.

Existen varias patentes y artículos científicos relacionados con la obtención de biosurfactantes utilizando cepas microbianas de *Pseudomona* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp., y *Candida* spp. (WO2013050700), (Shete A.M.; Wadhawa G.; Banat I.M.; Chopade B.A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: a review. *J. Sci. Indust. Res.* 2006, *65*, 91-115.).

Si comparamos la producción mundial de surfactantes sinterizados químicamente con los surfactantes obtenidos biotecnológicamente en los últimos 20 años, se observa que en los años 90 la producción de surfactantes sintetizados químicamente estaba en auge como se desprende de las patentes registradas y de los artículos publicados. Es a partir del año 2000 cuando los surfactantes producidos biotecnológicamente empiezan a ganar terreno sobre los sintetizados químicamente aumentado el número de patentes y publicaciones en comparación con los surfactantes sintetizados químicamente (Muller M M.; Kugler J H.; Henkel M.; Gerlitzki M.; Hormann B.; Pohnlein M.; Sylatk C.; Hausmann R. Rhamnolipids-Next generation surfactants?. *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 366-380

Desde el año 1980 hasta el año 2011 hay 200 patentes registradas sobre la producción de biosurfactantes, correspondiendo 100 a la producción de rhamnolípidos, y 70 relacionadas con la obtención de soforolípidos; mientras que desde el año 1980 hasta el año 2011 existen más de 2300 publicaciones sobre la obtención de biosurfactantes, siendo de nuevo los rhamnolípidos aquellos biosurfactantes más estudiados (Thomson Reuters (2011) ISI web of Knowledge: web of science. <http://apps.webofknowledge.com>; Muller y col., 2012).

Explicación de la invención

1: Breve explicación de la invención

Se demuestra que el biosurfactante presente en los licores de lavado de maíz es un lipopéptido y que este presenta una composición y unas propiedades físicas que lo pueden hacer susceptible de ser utilizado como agente surfactante, no espumante, en numerosos procesos industriales así como en la formulación de productos cosméticos y farmacéuticos y alimentarios.

2: Explicación detallada de la invención

Antes de proceder a la caracterización del biosurfactante, éste se extrajo de los licores de lavado de maíz mediante una extracción líquido-líquido, utilizando cloroformo en un relación 1:2 (licores de lavado de maíz:cloroformo). Posteriormente el cloroformo se evaporó utilizando un rotavapor y el biosurfactante así obtenido se sometió a distintos análisis con el fin de caracterizarlo.

Los usos o aplicaciones de las composiciones que contienen este biosurfactante son amplios; i) puede utilizarse como agente tenso-activo, detergente o surfactante, ii) para mejorar la reología de productos alimenticios, iii) en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos, iv) para la elaboración de medicamentos, v) en formulaciones de herbicidas y pesticidas, vi) como medio nutricional para fermentaciones en procesos industriales o a escala de laboratorio

Caracterización del biosurfactante presente en los licores de lavado de maíz

1) Composición bioquímica

5 El contenido en azúcares del biosurfactante presente en los licores de lavado de maíz se determinó por el método colorimétrico propuesto por Dubois (Dubois M.; Gilles K.A.; Hamilton J.K.; Rebers P.A.; Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350-356), utilizando D-glucosa como patrón. De entre todos los métodos colorimétricos para el análisis de carbohidratos el
10 método del fenol-ácido-sulfúrico es el más fácil y más fiable para determinar contenido torales de azúcares en disolución.

Por otra parte el contenido total de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry O.H; Rosebrough N.J; Farr A.L.; Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275), utilizando como patrón suero
15 bovino. Además para la cuantificación de lípidos totales se aplicó el método propuesto por Folch (Folch J.M.; Lees M.; Stanly H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1956**, 226, 497-509), utilizando colesterol como patrón.

Tras el análisis bioquímico del biosurfactante presente en los licores de lavado de maíz
20 se concluyó que éste estaba compuesto por una fracción hidrofóbica lipídica, mientras que la fracción hidrofílica estaba formada por proteínas. Tras el análisis se observó que el biosurfactante extraído de los licores de lavado de maíz estaba formado por lípidos y proteínas, siendo el contenido en azúcares muy bajo por lo que se deduce que el biosurfactante presente en los licores de lavado de maíz es un lipopéptido.
25

2) Análisis por espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo es una herramienta muy útil para la identificación de grupos funcionales en una muestra de origen desconocido, ayudándonos de esta forma a poder identificar este compuesto cuando se complementa dicho análisis con otros de
30 naturaleza un poco más específica. Para dicho análisis se utilizaron 10 mg de extracto de biosurfactante y se molieron con 100 mg de bromuro potásico en una proporción 10:100 los cuales se prensaron ejerciendo una fuerza de 7,500 Kg por segundo. La muestra así preparada se analizó con un espectrofotómetro de infrarrojo Thermo Scientific, Nicolet 6700 FTIR con una resolución spectral de 4 cm⁻¹.

35 En la **Figura 1** se muestra el espectro de infrarrojo del biosurfactante extraído de los licores de lavado de maíz. En este espectro se puede observar una banda a 3426.6 cm⁻¹ que indica la presencia de grupos peptídicos, resultado de los enlaces O-H y N-H.

La banda de absorbancia entre 2955.8 a 2854.1 cm⁻¹ denota la presencia de los enlaces C-H correspondientes a grupos alifáticos, CH₂ y CH₃. Además, está presente la banda
40 correspondiente a las proteínas a 1739.1 cm⁻¹ (amida primaria) y 1652.6 cm⁻¹ (amida secundaria), y por último, la banda a 1121.8 cm⁻¹ sugiere la presencia de enlaces C-O (Sriram, M.I.; Kalishwaralal, K.; Deepak, V.; Gracerosepat, R.; Srisakthi, K.; Gurunathan, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant

produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloid Surface B* **2011**, 85 (2), 174-181), Sivapathasekaran, C.; Mukherjee, S.; Sen, R.; Bhattacharya, B.; Samanta, R. Single step concomitant concentration, purification and characterization of two families of lipopeptides of marine origin. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **2011**, 34 (3), 339-346).

3) Caracterización de los ácidos grasos

Para la caracterización de los ácidos grasos se tomaron 80 mg de biosurfactante disuelto en metanol, y se le añadieron 500 μL de tert-butil metil éter de con el fin de disolver la muestra. A continuación se añadieron 250 μL de hidróxido de trimetilsufonio y se agitó la muestra unos 30 segundos, pinchándose posteriormente en un cromatógrafo de gases-masas utilizando el siguiente método:

Volumen de inyección: 1 mL

Temperatura de inyección: 250 °C

15 Divisor de flujo: 100 mL \cdot min⁻¹.

Rampa de temperatura: 60 °C durante 2 min., 10 °C \cdot min⁻¹ at a 200 °C, manteniendo esta temperatura 27 min., y 5 °C \cdot min⁻¹ hasta 240 °C, manteniendo esta temperatura durante 20 min.

Temperatura de la línea de transferencia: 250 °C.

20 Velocidad gas portador (He): 1 mL \cdot seg⁻¹.

Columna: ZB-WAX de 60 m de longitud, diámetro interno: 0.25 mm y espesor de la película: 0.25 μm .

Tras el análisis se observó que los lípidos presentes en el biosurfactante evaluado estaban formados por ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono. Así la fracción lipídica está formada por un 20.4 \pm 2 % de ácido palmítico; 5.4 \pm 2 % ácido esteárico; 23.7 \pm 3 % ácido oleico o elaídico y 50.4 \pm 3 % ácido linoleaídico.

En la **Figura 2** se muestra el espectro de los ácidos grasos identificados en este biosurfactante. El cromatograma del biosurfactante nos muestra los picos de los ácidos grasos obtenidos, así como sus tiempos de retención.

A un tiempo de retención de 24.3 min se observa el pico correspondiente al ácido palmítico, a 32.1. min el pico correspondiente al ácido esteárico, a 33.2 min el pico correspondiente a la mezcla de los ácidos elaídico y oleico y finalmente a 36.0 min el pico correspondiente al ácido linoleaídico. Los picos que aparecen a tiempos de retención entre 8 y 15 forman parte de línea base.

4) Otras propiedades fisico-químicas del biosurfactante

La **Tabla 1** recoge otras propiedades físico-químicas del biosurfactante extraído de los licores de lavado de maíz. Este biosurfactante tiene un pH de 4; una densidad de 1.053 mg/mL; así como un color amarillo y una apariencia de líquido viscoso. Por otra parte este biosurfactante es capaz de disminuir la tensión superficial del agua hasta 38 mN/m.

<i>Propiedades físico-químicas</i>	
pH	4
Densidad	1.053 mg/mL
Apariencia	Color amarillo, Líquido viscoso
TS (mN/m)	38

Tabla 1: Propiedades Físico-químicas del biosurfactante presente en los licores de lavado de maíz.

5 *5) Evaluación de la capacidad no espumante del biosurfactante*

Para evaluar si el biosurfactante extraído de los licores de lavado de maíz es capaz de formar espuma, este se disolvió en agua y posteriormente se sometió a una agitación enérgica durante más de 10 minutos observándose la ausencia total de espuma tras el proceso de agitación.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1) Una composición detergente que contiene un biosurfactante de origen vegetal, **caracterizada** porque el biosurfactante se extrae del maíz y tiene estructura lipoproteica que contiene ácidos grasos y proteínas.
- 10 2) Una composición detergente que contiene un biosurfactante de origen vegetal, según reivindicación 1, **caracterizada** porque el biosurfactante se extrae más concretamente de los licores del lavado del maíz y tiene estructura lipoproteica que contiene ácidos grasos y proteínas.
- 15 3) Una composición detergente que contiene un biosurfactante de origen vegetal, según reivindicaciones 1 a 2, **caracterizada** por contener como ácidos grasos; ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y/o eláidico y ácido linoleáidico.
- 4) Una composición detergente que contiene un biosurfactante de origen vegetal, según reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** por contener los siguientes ácidos grasos en las siguientes proporciones; 20.4 ± 2 % de ácido palmítico, 5.4 ± 2 % ácido esteárico, 23.7 ± 3 % ácido oleico y/o eláidico y 50.4 ± 3 % ácido linoleáidico.
- 20 5) La utilización o uso de la composición detergente según reivindicaciones 1 a 4, como agente tenso-activo, detergente o surfactante.
- 6) La utilización o uso de la composición detergente según reivindicaciones 1 a 4, para mejorar la reología de productos alimenticios.
- 7) La utilización o uso de la composición detergente según reivindicaciones 1 a 4, en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos.
- 25 8) La utilización o uso de la composición detergente según reivindicaciones 1 a 4, para la elaboración de un medicamento.
- 9) La utilización o uso de la composición detergente según reivindicaciones 1 a 4, en formulaciones de herbicidas y pesticidas.
- 30 10) La utilización o uso de la composición detergente según reivindicaciones 1 a 4, como medio nutricional para fermentaciones.

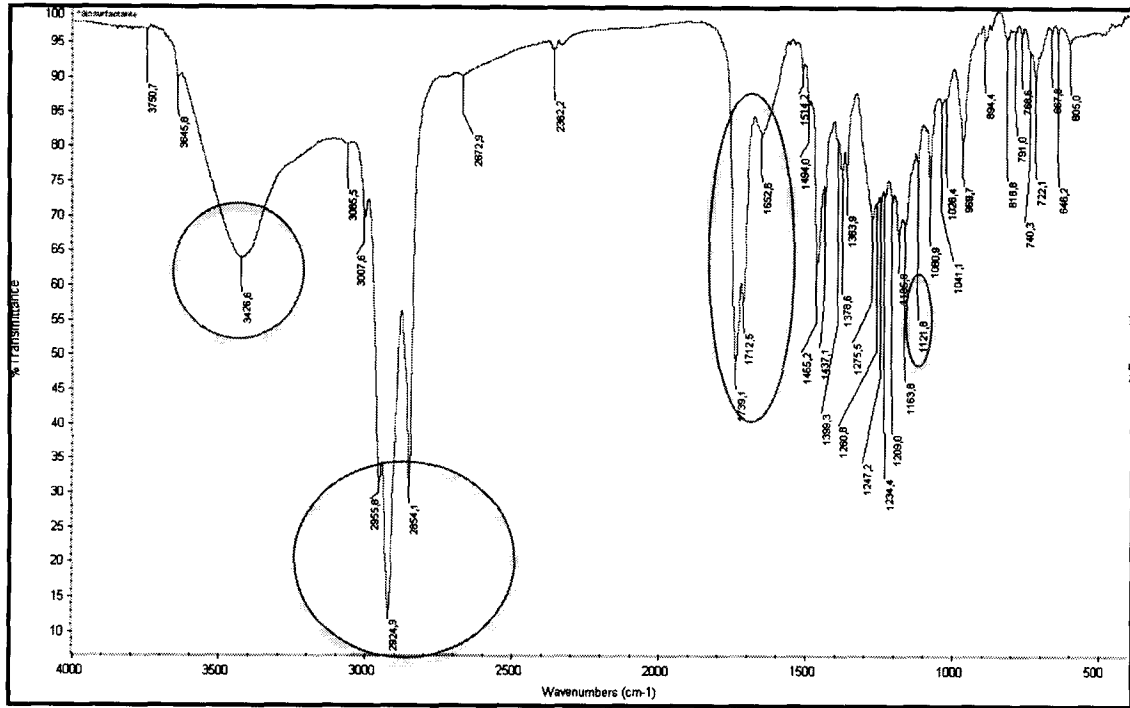


FIGURA 1

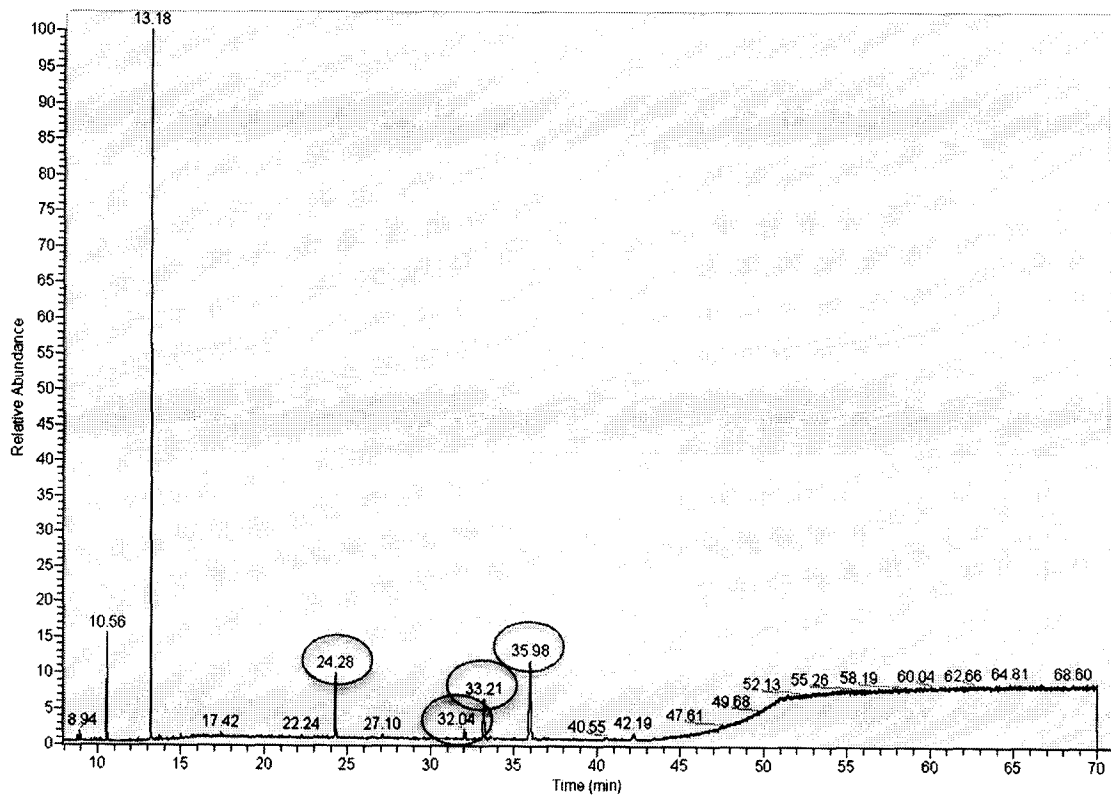


FIGURA 2



②¹ N.º solicitud: 201300680

②² Fecha de presentación de la solicitud: 22.07.2013

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	ES 2435324 A1 (UNIVERSIDADE DE VIGO) 18.12.2013, reivindicaciones.	1-10
X	ZAYAS J F et al. Emulsifying properties of corn germ proteins. Cereal Chemistry 1989, vol. 66 (4), páginas 263-267.	1,5,6
A	ADANI, F. et al. Surfactant properties and tetrachloroethene (PCE) solubilisation ability of humic acid-like substances extracted from maize plant and from organic wastes: a comparative study. Chemosphere, 2010, vol. 78, páginas 1017-1022.	
A	YADAV MADHAV P et al. Corn fiber gum: a potential gum arabic replacer for beverage flavor emulsification. Food hydrocolloids, 2007, vol. 21, páginas 1022-1030.	
A	WU Y VICTOR. Emulsifying activity and emulsion stability of corn gluten meal. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, vol. 81 (13), páginas 1223-1227.	
A	NITSCKE, M. et al. Biosurfactants in food industry. Trends in food science and technology, 2007, vol. 18, páginas 252-259.	

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
13.03.2014

Examinador
A. I. Polo Díez

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

B01F17/00 (2006.01)

C11D1/00 (2006.01)

A23L1/035 (2006.01)

A61K8/97 (2006.01)

A61K36/899 (2006.01)

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

B01F, C11D, 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, WPI, BIOSIS, BDTXTE MEDLINE, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.03.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	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 2435324 A1 (UNIV VIGO)	18.12.2013
D02	ZAYAS J F et al	1989
D03	ADANI, F. et al.	2010
D04	YADAV MADHAV P et al.	2007
D05	WU Y VICTOR	2001

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 invención se refiere, según la primera reivindicación, a una composición detergente que contiene un biosurfactante extraído del maíz que tiene estructura lipoprotéica.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 4 aportan detalles de la procedencia y la composición química del biosurfactante.

También es objeto de la invención la utilización de la composición detergente anterior en diversas aplicaciones (reivindicaciones 5 a 10)

Los documentos siguientes se refieren a distintos productos o extractos obtenidos a partir del maíz, en diversas fases de la molienda húmeda del mismo, y que presentan propiedades emulgentes, tensioactivas o biosurfactantes.

El documento D1 trata sobre un procedimiento de separación de biosurfactantes presentes en los licores de lavados de maíz y sus posibles aplicaciones.

En el documento D2 se estudian las propiedades emulsionantes de la proteína de germen desengrasada (defatted corn germ protein). La capacidad y estabilidad de la emulsión depende del método con el que se desengrasa la proteína de germen que además de proteínas siempre contiene algo de lípidos. Por sus propiedades emulsionantes, esta composición se puede utilizar como aditivo alimentario para emulsionar alimentos.

El documento D3 divulga el procedimiento de obtención de un extracto a partir de unos residuos, no detallados en el documento, de la producción de maíz. Se trata de un extracto con propiedades surfactantes y de composición indeterminada parecida a la del ácido húmico que se extrae del suelo.

El documento D4 describe un producto (corn fiber gum) que se obtiene sometiendo a la fibra desengrasada, a un tratamiento alcalino. El extracto obtenido está compuesto en su mayoría por carbohidratos y tiene propiedades emulsionantes por lo que se puede utilizar en la industria alimenticia.

El documento D5 analiza la influencia del pH y el tamaño de partícula en las propiedades emulsionantes de otro de los productos obtenidos en la molienda del maíz, la harina de gluten (corn gluten meal).

Novedad (art. 6)

El documento D1 es un documento presentado con fecha anterior a la fecha de presentación de la solicitud (18.06.2012) aunque publicado con posterioridad (18.12.2013). Por lo tanto, este documento constituye estado de la técnica en el sentido del artículo 6.3 de la L.P. En este documento se reivindica un procedimiento de separación de biosurfactantes a partir de licores de lavado de maíz (reivindicaciones 1-10).

El procedimiento de obtención descrito en D1 es el mismo que se ha utilizado en la solicitud, es decir, extracción líquido: líquido con cloroformo (relación 1:2) y evaporación del cloroformo. Es decir, en el documento D1 se parte del mismo producto que la solicitud (licores de lavado del maíz) y se siguen los mismos pasos que en la solicitud, por lo que el producto obtenido en D1 y en la solicitud debe ser el mismo. En D1 también se reivindica la utilización del producto obtenido por el procedimiento reivindicado como agente detergente para el tratamiento de aguas, para mejorar la reología de los productos alimenticios, en la formulación de productos farmacéuticos, cosméticos, herbicidas o pesticidas, etc.

Se considera, por tanto, que tanto las composiciones como los usos reivindicados en la solicitud en estudio, están anticipados en el documento D1. En la descripción y en las reivindicaciones de la solicitud se aportan algunas propiedades del biosurfactante (composición proteica y lipídica, ácidos grasos presentes) que no se mencionaban en D1 pero, se considera que añadir nuevas propiedades o caracterizar un producto que ya había sido obtenido anteriormente y del que se conocían sus funciones, no le otorga novedad al producto.

En consecuencia, el documento D1 afecta a la novedad de las reivindicaciones 1 a 10 según el artículo 6.3 de la L.P.

Por otro lado, el extracto descrito en D2 que ha sido obtenido del maíz (concretamente del germen del maíz), contiene proteínas y lípidos, tiene propiedades emulsionantes y puede formar parte de composiciones alimenticias. Esta composición se ajusta a la definición de las reivindicaciones 1, 5 y 6, tal y como éstas han sido redactadas. En consecuencia, el documento D2 afecta a la novedad de las reivindicaciones 1, 5 y 6.

Los documentos D3 a D5 son documentos del estado de la técnica que mencionan extractos con propiedades emulgentes o surfactantes obtenidas a partir de productos de molienda húmeda del maíz: fibra, harina de gluten, etc., pero que no muestran la misma composición de la reivindicación 1 y, por lo tanto, no afectan a su novedad.