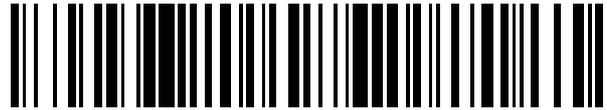


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 109**

21 Número de solicitud: 201430192

51 Int. Cl.:

C07C 37/72 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.02.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.08.2015

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (100.0%)
Vicerrectorado de Investigación, Transferencia e
Innovación Avda. de Elvas, s/n
06006 Badajoz ES**

72 Inventor/es:

**GODOY CABALLERO, María Del Pilar;
GALEANO DÍAZ, María Teresa y
ACEDO VALENZUELA, María Isabel**

54 Título: **Procedimiento de extracción de compuestos polares**

57 Resumen:

La presente invención es un procedimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de una muestra no polar o hidrofóbica, que comprende poner en contacto una cantidad de dicha muestra no polar con una mezcla de disolventes que comprende etanol/agua y 1,4-dioxano, homogeneizar la mezcla obtenida para obtener una emulsión, centrifugar dicha emulsión para obtener una fase no polar y una fase inferior acuosa, y obtención final de la fase acuosa que va a contener los compuestos fenólicos de interés.

ES 2 543 109 A1

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS POLARES**CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se encuadra en el sector químico, dentro del área de la química analítica. La
5 preconcentración y extracción de compuestos polares de matrices no polares o hidrofóbicas
es de aplicación en la extracción de fenoles en muestras de la industria alimentaria, industria
de productos naturales, industria farmacéutica o medicina para el tratamiento de
enfermedades crónicas y neurodegenerativas así como enfermedades coronarias y cáncer,
puesto que a los compuestos fenólicos se les asocian todas estas propiedades.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Debido a la complejidad de una matriz de naturaleza no polar o hidrofóbica y a la baja
concentración en la que se encuentran los compuestos fenólicos en algunos casos, el
desarrollo de procedimientos simples y fiables para su extracción y preconcentración no se
15 ha conseguido en la técnica de forma satisfactoria.

Se han propuesto diferentes procedimientos siendo los más ampliamente empleados los de
extracción líquido-líquido con mezclas hidroalcohólicas en distintas proporciones, también
conocidos como LLE (*Liquid-Liquid Extraction*), y los de extracción en fase sólida también
20 conocido como SPE (*Solid Phase Extraction*) con cartuchos Diol (Ouni Y. et al.
"Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils
according to their geographical origin by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method",
2011, Food Chem. 127; 1263-1267).

Los principales inconvenientes de estos procedimientos son la gran cantidad de tiempo y de
disolventes tóxicos que se requieren. Para salvar estos inconvenientes se han ideado
procedimientos de microextracción que derivan de los anteriores. Un ejemplo de ello es la
microextracción dispersiva líquido-líquido, también conocida como DLLME (*Dispersive
Liquid-Liquid Microextr action*) de Rezaee (Rezaee M. et al., "Determination of organic
30 compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction", 2006, J. Chromatogr. A
1116; 1-9). La DLLME se puede considerar como una versión miniaturizada de la LLE,
basada en el equilibrio de distribución del analito de interés entre la disolución de la muestra
y el disolvente extractante, y que requiere volúmenes de disolventes orgánicos del orden de
microlitros.

Las principales ventajas de los procedimientos de microextracción con respecto a los de LLE y de SPE son la disminución en el volumen de disolventes empleados, un tiempo de extracción menor como consecuencia del rápido alcance del estado de equilibrio, alto factor de enriquecimiento a consecuencia de la alta relación de fase, la simplicidad de operación, necesidad de poca cantidad de muestra y bajo coste.

La DLLME convencional consiste en la formación de un sistema ternario de disolventes constituido por la muestra acuosa que contiene los analitos, un disolvente extractante hidrofóbico de mayor densidad que la muestra y un disolvente dispersante hidrofílico, que actúa de “puente”, puesto que a su vez es miscible con el disolvente extractante.

Cuando se utiliza DLLME convencional se emplean disolventes orgánicos para llevar a cabo la extracción de los analitos de interés de una muestra acuosa. Sin embargo, una fase extractante orgánica no suele ser compatible por ejemplo con un sistema de separación por cromatografía en fase inversa, por lo que en la mayoría de los casos se tiene que llevar a cabo la evaporación del disolvente extractante y la reconstitución en un disolvente compatible con el sistema de separación y/o determinación.

Hashemi aplicó la DLLME a la determinación de oleuropeína en aguas residuales procedentes del procesamiento de las aceitunas y en extractos de las hojas del olivo (Hashemi P. et al. “Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein”, 2010, Talanta 80; 1926-1931). El procedimiento comprende una primera extracción con acetato de etilo en ambas materias primas. A continuación, mezclar este extracto con agua a pH ligeramente ácido que actuó como disolvente extractante e inyectar esta mezcla en ciclohexano. Tras la formación de la emulsión y la correspondiente centrifugación para la separación de las fases recogieron la fase acuosa inferior. Después de la primera extracción de la muestra acuosa con acetato de etilo los autores siguen con un procedimiento que denominan RP-DLLME (*Reverse Phase-DLLME*). Sin embargo, si se atiende al carácter polar de las muestras de las se parte, esta denominación no es del todo correcta, ya que el procedimiento se aplica en origen en una muestra polar, de la que se obtienen los componentes de interés aplicando dicha extracción previa con dicho acetato de etilo.

El procedimiento se aplicó también a la extracción y determinación de los alcoholes fenólicos tirosol e hidroxitirosol en muestras de aceite de oliva virgen (Hashemi P. et al. “Reversed-Phase Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Multivariate Optimization for

sensitive HPLC Determination of Tyrosol and Hydroxytyrosol in Olive Oil”, 2011, Anal Sci 27; 943-947). En aceite de oliva virgen disuelto en ciclohexano añadieron acetato de etilo como disolvente dispersante y agua a pH básico como extractante, para recoger la fase. Esta publicación se considera el documento más cercano de la técnica. El inconveniente principal de este procedimiento es que no consigue evitar el uso de ciclohexano o hexano en el procedimiento, que son disolventes tóxicos y contaminantes.

Utilizar además un medio básico como disolvente extractante es también un inconveniente. Se ha descrito que la extracción de los compuestos fenólicos se favorece cuando se emplea medio ácido o neutro, pero en ningún caso básico, puesto que en medio básico pueden tener lugar reacciones de hidrólisis de los compuestos fenólicos. Para conseguir la extracción del mayor número de compuestos fenólicos habría que evitar además las reacciones de oxidación de los compuestos fenólicos con grupos hidroxilo en posición *orto*, favorecidas por el medio básico. La presente invención evita el medio básico en el disolvente extractante consiguiendo así la máxima eficiencia en la extracción (Zafra A. et al. “Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography–mass spectrometry”, 2006, Talanta. 213-218).

La presente invención supone un procedimiento mejorado a la DLLME sobre muestras hidrofóbicas.

El problema de la técnica es por tanto encontrar un método de extracción de compuestos fenólicos a partir de muestras hidrofóbicas que evite el empleo de disolventes tóxicos. La solución propuesta en la presente invención es inyectar una mezcla formada por etanol/agua como disolvente extractante y 1,4-dioxano como disolvente dispersante.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento para la extracción de compuestos fenólicos y polares de muestras no polares o hidrofóbicas mediante la utilización de un procedimiento de microextracción dispersiva líquido-líquido en fase inversa (RP-DLLME).

La invención es un procedimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de una muestra no polar o hidrofóbica, que comprende:

- a) poner en contacto una cantidad de dicha muestra no polar con una mezcla de disolventes que comprende etanol/agua en una proporción de entre 50:50 y 70:30 v/v, preferiblemente 60:40 v/v, y 1,4-dioxano,

- b) homogeneizar dicha mezcla obtenida en el paso a) para obtener una emulsión,
- c) centrifugar la emulsión del paso b) para obtener una fase no polar y una fase inferior acuosa,
- 5 d) recuperar la fase acuosa obtenida en el paso c).

En una realización preferible, la cantidad de etanol/agua es de entre 120 y 170 μl , más preferiblemente aún 150 μ . En una realización preferible más, la cantidad de 1,4-dioxano es de entre 900 y 1100 μl , más preferiblemente aún 1000 μl .

10

En la mezcla de disolventes, el etanol/agua actúa como disolvente extractante y el 1,4-dioxano como disolvente dispersante.

15

El disolvente extractante es el parámetro que más influencia tiene en el procedimiento. Debe poseer densidad mayor que la muestra para hacer posible su separación por centrifugación, buena capacidad de extracción de los compuestos de interés y baja solubilidad en la muestra.

20

El disolvente dispersante debe ser miscible tanto con la muestra como con el disolvente extractante para permitir la dispersión de éste último formando una emulsión de muestra / disolvente dispersante / disolvente extractante.

25

El hecho de evitar etapas con disolventes tóxicos y necesitar un volumen muy pequeño de disolvente conlleva una extracción simple y rápida de los compuestos polares de muestras hidrofóbicas. Se obtiene un extracto acuoso que es compatible con los sistemas convencionales de separación y detección, por ejemplo la cromatografía en fase inversa. El desarrollo de forma rápida y eficiente de un método de extracción y análisis sobre muestras orgánicas que de otra manera serían difíciles de tratar supone una ventaja tecnológica definitiva respecto de la técnica.

30

Para aplicar el procedimiento se introduce en un tubo de ensayo una cantidad de muestra. A continuación se inyecta en el interior de la muestra y preferiblemente de forma rápida la mezcla de disolventes. Inmediatamente tras la inyección se forma la emulsión muestra / disolvente dispersante / disolvente extractante. Posteriormente, la mezcla formada se agita en un vortex y se centrifuga para sedimentar las pequeñas gotas del disolvente extractante en la parte inferior del tubo, que resulta la fase de interés.

35

Mediante este procedimiento se extraen compuestos polares de muestras no acuosas, es decir, aquellos que se encuentran presentes en la fracción hidrofílica del aceite o de la muestra no acuosa en estudio.

5 En el procedimiento de la invención se emplea como disolvente extractante una mezcla etanol/agua de pH neutro o ligeramente ácido, lo que favorece la extracción de los compuestos fenólicos. Además, se evita la necesidad de llevar a cabo la evaporación del disolvente extractante y la reconstitución en un disolvente compatible con el sistema de separación y/o determinación. Así, se puede aplicar a la extracción de muestras orgánicas
10 de bajo contenido acuoso con un disolvente extractante polar adecuado.

La presente invención resultaría efectiva con cualquier disolvente extractante que presente densidad mayor que la muestra de la que se pretenda obtener los compuestos de interés, baja solubilidad y pH neutro o ácido, mientras que el disolvente dispersante debe ser
15 miscible tanto con el disolvente extractante como con la muestra. Por ejemplo, en otra realización de la invención se pueden utilizar metanol o acetonitrilo también como disolventes extractantes. Los requerimientos de un disolvente para poder ser utilizado como disolvente dispersante según la presente invención son que sea miscible tanto con la muestra como con el disolvente extractante seleccionado y además que sea posible separar
20 por centrifugación en la extracción el disolvente extractante de la muestra de una forma limpia. En este sentido, además de 1,4-dioxano, podría utilizarse también tetrahidrofurano para la extracción de compuestos fenólicos de aceite de oliva empleando etanol/agua como disolvente extractante.

25 **BREVE EXPLICACIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1:

A: Inyección de la mezcla constituida por el disolvente extractante y dispersante en el interior de la muestra. La emulsión se consigue de forma prácticamente instantánea a
30 medida que la mezcla de disolvente extractante y dispersante entra en contacto con la muestra.

B: Emulsión homogeneizada tras agitación.

C: Recogida de la fase extractante de interés. Fase inferior más densa que la muestra y de pequeño volumen, lo que permite obtener un alto factor de enriquecimiento.

35

EXPLICACIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCION

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo, aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

5

Ejemplo 1: Extracción de alcoholes y ácidos fenólicos, secoiridoides, flavonoides y lignanos a partir de una muestra de aceite de oliva virgen.

Se inyectó una mezcla de disolventes constituida por 1 mL de 1,4-dioxano como disolvente dispersante y 150 μ L de etanol:agua (60:40, v/v) como disolvente extractante en el interior de 2 g de aceite de oliva. Se agitó la emulsión que se forma en un vortex durante 1 min y centrifugó a 4000 r.p.m. durante 15 min. Se consiguió así la sedimentación de todas las pequeñas gotas del disolvente extractante en la parte inferior del tubo empleado. Seguidamente se extrajo la fase acuosa inferior con una jeringa y éste extracto se inyectó directamente en un cromatógrafo de líquidos para su análisis mediante RRLC-DAD-MS. Los resultados de cuantificación obtenidos se muestran en la Tabla 1.

15

Resultado de eficiencia: Se validó el procedimiento propuesto empleando el procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos Diol ampliamente utilizado y descrito (García-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., Oliveras-Ferraos C., Vázquez-Martín A., Menéndez J.A., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., "Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method" J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 416-429.) y se obtuvieron resultados muy similares en todos los casos (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos en la validación del procedimiento de RP-DLLME empleando

Diol-SPE

Analito ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Diol-SPE	RP-DLLME
Hidroxitirosol	29,9 (3,8)	29,7 (3,3)
Tirosol	27,2 (3,4)	28,1 (3,4)
Luteolina	1,12 (0,13)	1,58 (0,27)
Apigenina	0,586 (0,031)	0.47 (0,18)
Ácido gálico	n.d.	n.d.
Ácido 3,4-dihidroxifenilacético	n.d.	n.d.
Ácido gentísico	n.d.	n.d.
Ácido 4-hidroxibenzoico	56,3 (3,6)	69,3 (4,0)

Ácido 4-hidroxifenilacético	159 (10)	145 (21)
Ácido vanílico	267 (30)	231 (11)
Ácido cafeico	n.q.	16,3 (4,4)
Ácido siríngico	n.d.	n.d.
Ácido <i>p</i> -cumárico	97 (13)	65 (11)
Ácido ferúlico	13,3 (7.4)	16,0 (3,4)
Ácido <i>m</i> -cumárico	n.d.	n.d.
Ácido <i>o</i> -cumárico	n.d.	n.d.
Ácido cinámico	121 (14)	96 (14)

n.d. no detectable

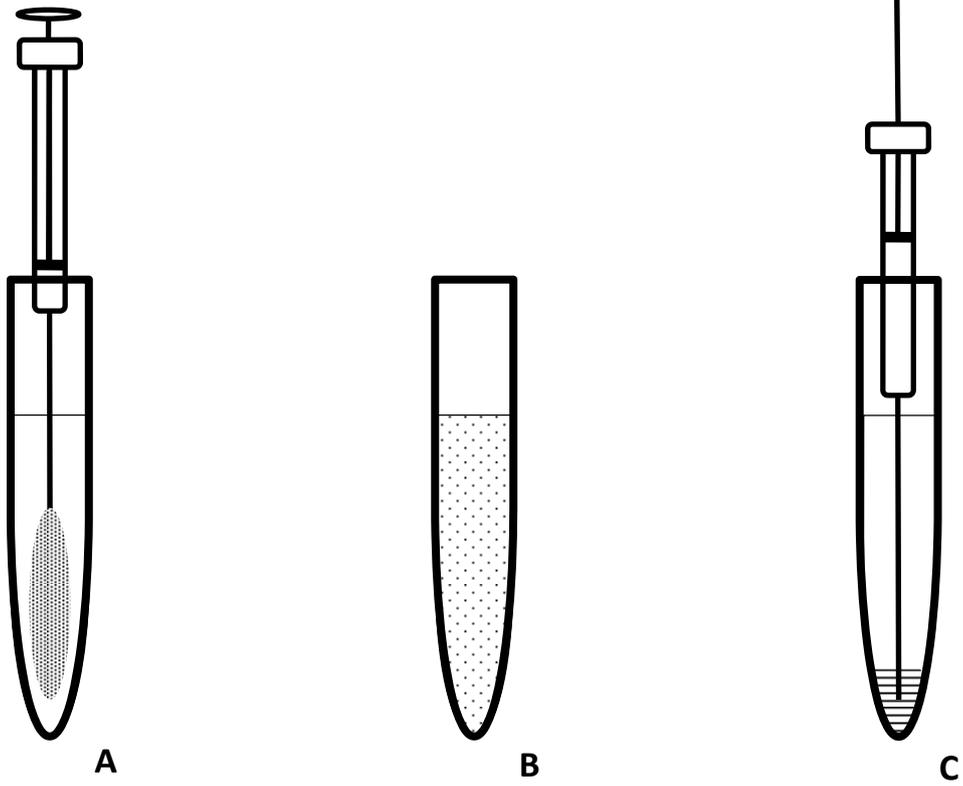
n.q. no cuantificable

5 El análisis de los compuestos fenólicos obtenidos se lleva a cabo por cromatografía líquida de resolución rápida en fase inversa con detección en serie de diodos y espectrometría de masas (RRLC-DAD-MS) por inyección directa de 2 μ L de la disolución extractante obtenida, empleando un cromatógrafo de líquidos (Agilent 1100 series, (Agilent Technologies, compuesto por desgasificador de disolventes 1100, bomba cuaternaria 1100, muestreador automático 1260 Infinity, termostato 1290 Infinity, horno para la columna 1200, detector UV-
10 visible en serie de diodos (DAD) 1100 y detector de espectrometría de masas de simple cuadrupolo 6120 con fuente de ionización por electrospray -ESI). Temperatura de trabajo 15 °C. Este detector consta de nitrógeno como gas nebulizador. Todo el sistema está controlado por el software HP ChemStation para LC/MSD (Rev. B.04.01., Agilent Technologies), que también se utiliza para la adquisición de los datos y su análisis.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de extracción de compuestos fenólicos a partir de una muestra no polar o hidrofóbica, caracterizado por que comprende:
 - 5 a) poner en contacto una cantidad de dicha muestra no polar con una mezcla de disolventes que comprende etanol/agua en una proporción entre 50:50 y 70:30 v/v y 1,4-dioxano,
 - b) homogeneizar la mezcla obtenida en el paso a) para obtener una emulsión,
 - 10 c) centrifugar la emulsión del paso b) para obtener una fase no polar y una fase inferior acuosa,
 - d) recuperar la fase acuosa obtenida en el paso c).
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en que la cantidad de etanol/agua es de entre 120 y 170 μ l.
- 15 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en que la cantidad de 1,4-dioxano es de entre 900 y 1100 μ l.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en que la proporción de etanol / agua es de 60:40 v/v.

Figura 1:





- ②¹ N.º solicitud: 201430192
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 13.02.2014
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C07C37/72** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	P GODOY-CABALLERO et al., Journal of Chromatography A 2013, vol 1313, págs 291-301. "New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection", página 293, apartado 2.3.	1-4
A	P HASHEMI et al., Analytical Sciences 2011, vol 27, págs 943-947. "Reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction with multivariate optimization for sensitive HPLC determination of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil", página 944, experimental.	1-4
A	P HASHEMI et al., Talanta 2010, vol 80, págs 1926-1931. "Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein", página 1927.	1-4

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:

<p>Fecha de realización del informe 27.08.2014</p>	<p>Examinador M. P. Fernández Fernández</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

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

C07C

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, CAS, FSTA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.08.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-4	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	P GODOY-CABALLERO et al., Journal of Chromatography A 2013, vol 1313, págs 291-301. "New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection", página 293, apartado 2.3.	10.2013
D02	P HASHEMI et al, Analytical Sciences 2011, vol 27, págs 943-947. "Reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction with multivariate optimization for sensitive HPLC determination of tyrosol and hydroxytyrosol in olive oil", página 944, experimental.	09.2011

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 extracción de compuestos fenólicos a partir de una muestra no polar (hidrofóbica) que comprende:

- poner en contacto la muestra no polar con una mezcla de disolventes, etanol/agua 60:40 (v/v) y 1,4-dioxano
- emulsionar la mezcla obtenida
- centrifugar la emulsión para obtener una fase no polar y una fase acuosa
- recuperar la fase acuosa fenólica.

El documento D1 divulga, ver página 293 apartado 2.3, un procedimiento para determinar los compuestos fenólicos en una muestra de aceite de oliva utilizando una técnica RP-DLLME (reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction) con etanol/agua 60:40 (v/v) y 1,4-dioxano, centrifugar y aislar la fase polar que contiene los fenoles.

El documento D2 divulga, ver página 944 experimental, un procedimiento similar para aislar fenoles del aceite de oliva, en este caso se utiliza una disolución del aceite en ciclohexano y una mezcla de acetato de etilo y agua para aislar la fase acuosa.

Comparando el procedimiento descrito en la solicitud y el divulgado en D1 se concluye que se trata del mismo proceso, que en D1 se aplica a los fenoles del aceite de oliva. Luego el documento D1 anula la novedad de las reivindicaciones de la solicitud.

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-4 de la solicitud carecen de novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.