

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 609**

51 Int. Cl.:

C11B 9/02 (2006.01)

B01D 11/04 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2015** **PCT/EP2015/072296**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016** **WO16050712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2015** **E 15771578 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 3201299**

54 Título: **Fraccionamiento de resina de franquinciense usando dióxido de carbono supercrítico**

30 Prioridad:

30.09.2014 EP 14187216

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.06.2018

73 Titular/es:

PHYTOVATION LTD (100.0%)
Unit 8/9, Zone 6 Cibyn Industrial Estate
Caernarfon, Gwynedd LL55 2BD, GB

72 Inventor/es:

MARRIOTT, RAYMOND

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 673 609 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Fraccionamiento de resina de franquincienso usando dióxido de carbono supercrítico

5 Campo de la invención

Esta invención divulga un procedimiento para extraer sucesivamente varios compuestos de resina de franquincienso.

10 Breve descripción de la técnica anterior

El franquincienso es una resina aromática obtenida de árboles del género *Boswellia*. Se ha utilizado en ceremonias religiosas y culturales durante siglos. Además, tiene varias propiedades médicas bien definidas y documentadas, como, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones inflamatorias, en afecciones cancerosas. También acelera la curación de heridas y tiene actividad antimicrobiana.

El franquincienso contiene de 3 a 8 % en peso de aceite volátil, 60 a 70 % en peso de resina, 27 a 35 % en peso de goma y algunos otros ingredientes. En los últimos años, se han desarrollado varios procedimientos para extraer los principios activos de la resina.

Los procesos convencionales incluyen destilación tal como se describe, por ejemplo, por Dekebo y col. (Dekebo, Aman, Medihn Zewdu y Ermias Dagne (1999). Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia 13.1. 93-96) y, extracción con disolvente tal como se describe, por ejemplo, por Büchele y col. (Büchele, B., Zugmaier, W., y Simmet, T. (2003). Journal of Chromatography B, 791(1), 21-30), pero tales procedimientos pueden requerir la etapa adicional de separar el extractante en el caso de extracción con disolvente, o puede experimentar el inconveniente de degradación térmica en el caso de destilación.

Para superar estos inconvenientes, se han desarrollado procedimientos de extracción usando dióxido de carbono tanto líquido como supercrítico. El dióxido de carbono es seguro, no tóxico, no combustible, de bajo costo y su temperatura y presión críticas son respectivamente 31,06 °C y 7,3825 MPa, por ello, razonablemente bajas.

Además, muchos compuestos son fácilmente solubles en dióxido de carbono tanto líquido como supercrítico.

En una publicación reciente, Marongiu y col. (Marongiu B., Piras A., Porcedda S., Tuveri E., en Flavour Fragr. J. 2006, 21, 718-724) han descrito la extracción de *Santalum album* y aceite volátil *Boswellia carterii* Birdw. usando dióxido de carbono supercrítico. Han comparado la eficiencia de su procedimiento con la extracción tradicional de hidrodestilación y han mostrado la mejor eficiencia del dióxido de carbono supercrítico.

En otra publicación de Zhou y col. (Zhou J., Ma X., Qiu B., Chen J., Bian L., Pan L., en J. Sep. Sci., 2013, 36, 383-390) los autores han utilizado la metodología de superficie de respuesta para optimizar los parámetros de temperatura, presión y tiempo en la extracción del franquincienso con dióxido de carbono supercrítico.

Sin embargo, hay espacio para el progreso y la mejora en la extracción eficiente de otros compuestos a partir de la resina de franquincienso.

45 Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es separar secuencialmente varios compuestos de la resina de franquincienso.

Un objetivo, también, de la presente invención es fraccionar la resina de franquincienso usando un proceso estrictamente "verde".

Otro objetivo de la presente invención es usar tanto dióxido de carbono líquido como dióxido de carbono supercrítico como disolvente en el fraccionamiento de la resina de franquincienso.

Otro objetivo más de la presente invención es usar tanto dióxido de carbono líquido como dióxido de carbono supercrítico junto con un codisolvente como disolvente en el fraccionamiento de la resina de franquincienso.

Un objetivo adicional de la presente invención es producir aceite esencial, derivados de incensol y ácido boswélico a partir de la resina de franquincienso usando un procedimiento "verde".

Los objetivos anteriores se han realizado como se describe en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas se describen en las reivindicaciones dependientes.

65 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa un cromatograma de gases típico de un extracto completo de *Boswellia carteri* con los

principales componentes indicados.

La Figura 2 representa el cromatograma de gases de la fracción de aceites esenciales.

5 La Figura 3 representa el cromatograma de gases de la fracción de incensol.

La Figura 4 representa el cromatograma de gases de la fracción de ácido boswélico.

10 La Figura 5 representa el cromatograma de gases de un extracto completo de *Boswellia serrata* con los principales componentes indicados.

La Figura 6 representa el cromatograma de gases de las fracciones ésteres de *Boswellia serrata*.

Descripción detallada de la invención

15 Según esto, la presente invención describe un procedimiento para extraer secuencialmente aceite esencial, derivados de incensol y ácido boswélico a partir de resina de franquincienso, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 20 a) triturar la resina de franquincienso;
- b) separar una primera fracción de aceite esencial con dióxido de carbono líquido a una primera temperatura que varía entre 0 °C y 30 °C y una primera presión que varía entre 40 bar y 73,8 bar o con dióxido de carbono supercrítico suave, y con un primer caudal que varía entre 10 g y 400 g/kg de material triturado/min hasta que ya no se puede recuperar más aceite esencial o el rendimiento del
- 25 extracto es inferior al 0,1 % de la masa inicial por hora;
- c) recuperar aceite esencial del separador;
- d) separar una segunda fracción de incensol con dióxido de carbono supercrítico a una segunda temperatura que varía entre 31 °C y 100 °C y a una segunda presión de al menos 72,8 bar y a un segundo caudal que varía entre 10 g y 400 g/kg de material triturado/min hasta que ya no se puede recuperar más incensol ni sus derivados o el rendimiento del extracto es inferior al 0,1 % de la masa
- 30 inicial por hora;
- e) recuperar derivados de incensol del separador;
- f) opcionalmente, continuar el proceso de separación con dióxido de carbono supercrítico a otros conjuntos de temperatura y/o presión crecientes hasta que se separan las fracciones más deseadas;
- 35 g) separar una fracción adicional de ácido boswélico con dióxido de carbono supercrítico a una temperatura de al menos 31 °C y una presión de al menos 72,8 bar y un caudal que varía entre 10 g y 400 g/kg de material triturado/min usando un codisolvente a nivel que varía entre 0,05 % en volumen y 50,0 % en volumen del caudal de CO₂ hasta que se logra la separación completa de ácidos boswélicos o se determina que no se pueden extraer más materiales o el rendimiento del extracto es
- 40 inferior al 0,1 % de la masa inicial por hora;
- h) recuperar ácido boswélico del separador y eliminar el codisolvente por evaporación o destilación;
- i) opcionalmente, continuar el proceso de separación con dióxido de carbono supercrítico a otro conjunto de temperatura y presión y codisolvente hasta que se separan todas las fracciones deseadas;
- 45 j) recuperar los restos no separados restantes.

Si la primera extracción de la etapa b) se lleva a cabo en condiciones supercríticas suaves, la temperatura y/o la presión son inferiores a las utilizadas en la etapa d).

50 En la etapa g), se determina que no se puede extraer ningún material más por recogida y análisis del codisolvente usando inyección directa en cromatografía líquida-espectroscopía de masas (LC-MS), tardando dicho proceso aproximadamente 2 minutos. La extracción termina cuando el rendimiento del extracto es inferior al 0,1 % de la masa inicial por hora.

55 El material inicial de resina de franquincienso se obtiene de cualquier especie de *Boswellia*, que incluye, pero no exclusivamente, *B. ameero*, *B. boranensis*, *B. bricchettii*, *B. bullata*, *B. carteri*, *B. chariensis*, *B. dalzielii*, *B. dioscoridis*, *B. elegans*, *B. elongata*, *B. frereana*, *B. globosa*, *B. hildebrandtii*, *B. holstii*, *B. madagascariensis*, *B. microphylla*, *B. multifoliolata*, *B. nana*, *B. neglecta*, *B. occidentalis*, *B. ogadensis*, *B. ovalifoliolata*, *B. papyrifera*, *B. pirottae*, *B. popoviana*, *B. rivaie*, *B. sacra*, *B. serrata* y *B. socotrana*.

60 El proceso de trituración se lleva a cabo utilizando cualquier molino adecuado, preferiblemente con un tamiz de 3-5 mm.

65 El dióxido de carbono líquido utilizado en la primera separación se utiliza a una temperatura que varía entre 0 y 30 °C, preferiblemente entre 5 y 20 °C, a una presión que varía entre 50 y 73 bar, preferiblemente entre 60 y 70 bar con un caudal que varía entre 10 g y 400 g/kg de material triturado/min, preferiblemente entre 50 y 100 g/kg de material triturado/min y un período de tiempo que varía entre 5 minutos y 300 minutos, preferiblemente entre 30 y

120 minutos.

Para las separaciones posteriores que usan dióxido de carbono, la temperatura y la presión se seleccionan para separar los compuestos deseados, usando condiciones cada vez más polares.

Por encima del punto supercrítico, la temperatura y la presión se seleccionan y ajustan para fraccionar el intervalo deseado de moléculas. En el presente procedimiento, la temperatura se selecciona preferiblemente entre 30 y 50 °C, la presión entre 200 y 500 bar y el caudal entre 50 y 100 g/kg de material triturado/min.

El dióxido de carbono supercrítico puede incluir adicionalmente un porcentaje de codisolvente, preferiblemente etanol. Esto conduce a productos de separación claramente diferentes. El porcentaje de codisolvente añadido varía entre el 0,05 % en volumen y el 50,0 % en volumen del caudal de CO₂, preferiblemente entre el 5 y el 15 % en volumen del caudal de CO₂.

Otra ventaja del uso de dióxido de carbono supercrítico como disolvente de fraccionamiento y extracción es que puede eliminarse fácilmente debido a su tensión superficial "cero", produciendo de ese modo productos exentos de disolvente.

Los disolventes 'verdes' se seleccionan de agua, etanol y dióxido de carbono.

La presente invención describe, también, los productos obtenidos por el procedimiento de la presente invención. Debido a que los presentes productos se han obtenido sin disolventes, no presentan la desventaja de contener trazas de disolventes.

Ejemplos

Las resinas de Boswellia se obtuvieron a partir de Asli Maydi Exports para el ejemplo 1 y a partir de Juniper Global Ltd para el ejemplo 2, y el CO₂ líquido se obtuvo a partir de BOC. El etanol utilizado era etanol absoluto de calidad fermentación obtenido de Fisher.

Las pruebas de extracción se llevaron a cabo en una plataforma de extracción Thar SFC-1000 usando un extractor de 100 ml. Las pruebas posteriores se realizaron utilizando un extractor de 2 x 16 litros fabricado por Separex SA para obtener muestras más grandes de las fracciones.

La extracción se llevó a cabo de la siguiente manera: los enfriadores se ajustaron a una temperatura de 0 °C para la bomba de CO₂ y a una temperatura de +5 °C para la trampa fría. Aproximadamente 60 g de la resina Boswellia triturada se cargaron en el extractor de 100 ml y se presionaron firmemente hacia abajo. La presión de entrada del cilindro se ajustó a 50-52 bar utilizando el regulador de contrapresión manual (BPR) en la línea de entrada de CO₂, se conectaron el calentador en línea y el calentador del extractor, y el separador se calentó a 35 °C.

La primera extracción se llevó a cabo con CO₂ líquido a 10 °C y 65 bar con un caudal de 10 g/min. Una vez que se alcanzó la presión, el separador se ajustó a 15 bar de contrapresión y las muestras se recogieron cada 15 minutos, hasta que el peso de la fracción a los 15 minutos era inferior a 0,1 g. Cuando se recogió la última muestra, se drenó la trampa fría.

En la extracción posterior con CO₂ Supercrítico, el regulador automático de contrapresión (ABPR) se ajustó a 400 bar y la temperatura del extractor se aumentó a 50 °C. Una vez que se alcanzó la temperatura, se conectó CO₂ a un caudal de 10 g/minuto y una vez que se alcanzó la presión, el separador se ajustó a 15 bar de contrapresión y las muestras se recogieron cada 15 minutos hasta que el peso de la fracción a los 15 minutos era inferior a 0,5 g. El incensol es un líquido viscoso por lo que la temperatura del separador se aumentó a 45 °C para permitir que se drenara sin retención en el separador. Cuando había finalizado, se desconectó la bomba de CO₂, se liberó la contrapresión y se lavó el separador con alcohol desnaturalizado industrial (IMS, en inglés) para garantizar que no quedaba incensol que pudiera contaminar la fracción siguiente. Una vez secos, la trampa y el separador se volvieron a ensamblar.

La siguiente extracción se llevó a cabo con CO₂ supercrítico con etanol como codisolvente. La bomba de codisolvente se preparó, la válvula se abrió entonces lentamente para permitir que la presión se equilibrara con el flujo de scCO₂. La configuración de ABPR se redujo lentamente a 300 bar y la temperatura del extractor se disminuyó a 40 °C. Una vez que se habían alcanzado la temperatura y la presión, se conectó el flujo de CO₂ a un caudal de 9 g/minuto y una vez que se había alcanzado la presión, el separador se ajustó a 15 bar de contrapresión y la bomba del codisolvente se abrió a un caudal de 1 g/minuto de etanol correspondiente a 10 % en volumen. Las muestras se recogieron cada hora durante 3 horas, pero el separador y la trampa se drenaron cada 30 minutos en el mismo matraz. Después de 3 horas, la bomba del codisolvente se desconectó, pero la bomba de CO₂ se ejecutó durante otros 30 minutos y esto se añadió a la última fracción.

Al final de la operación, la instalación se limpió a fondo de la siguiente manera: la instalación se despresurizó y todos

los calentadores se apagaron. Los contenidos del extractor se vaciaron en un vaso de precipitados de plástico y el extractor se limpió con una aspiradora. El extractor, las tuberías y el separador se limpiaron con IMS y se dejaron secar. Luego, la instalación se volvió a ensamblar.

- 5 La identificación de los compuestos se basó en el índice de retención de Kovats calculado, comparación con los espectros de masas de la biblioteca (NIST y Adams) y comparación con componentes patrón. El uso de una columna VF-5 (equivalente a DB-5 o HP-5) permitió una correlación más precisa con la extensa base de datos Adams.

10 Ejemplo 1

La prueba se llevó a cabo con resina de *Boswellia carteri*. En el extractor, se cargaron 60 g de resina y se extrajeron secuencialmente como se ha descrito anteriormente. La Figura 1 muestra la composición de esta resina y las proporciones de las fracciones presentes.

- 15 Fracción de dióxido de carbono líquido.

La Figura 2 muestra el cromatograma de esta fracción que indica que los componentes principales son hidrocarburos mono y sesquiterpénicos. El rendimiento de esta fracción era de 2,79 g a partir de 60 g de resina (4,65 %). El aceite era característico del franquinciense, pero con un mejor aroma y de mayor duración en comparación con el aceite destilado.

- Fracción de dióxido de carbono supercrítico

- 25 La fracción de CO₂ supercrítico está compuesta casi por completo de incensol y el cromatograma de esta fracción se muestra en la figura 3. Esta fracción es un aceite transparente y muy viscoso casi desprovisto de cualquier aroma característico de franquinciense lo que confirma la separación completa a partir de la fracción de aceites esenciales obtenida por extracción con CO₂ líquido. El rendimiento de esta fracción era a partir de 11,4 g de 60 g de resina (18,99 %).

- 30 Dióxido de carbono supercrítico con 10 % en volumen de fracción de etanol

- La fracción de CO₂ supercrítico con 10 % de etanol añadido era claramente diferente. La fracción es una resina ámbar semisólida inodora compuesta por una mezcla compleja de ácidos boswélicos característicos de *Boswellia carteri*. La Figura 4 muestra el cromatograma de esta fracción y demuestra que está casi desprovisto de incensol lo que indica un claro fraccionamiento a partir de incensol. El rendimiento de esta fracción era de 29,07 g (48,45 %).

- Residuo de extracción

- 40 El análisis del residuo mostró que la separación del aceite esencial, incensol y ácidos boswélicos era completa. El peso era de 16,5 g dando un balance de masa del 99,6 %.

Ejemplo 2

- 45 La prueba se llevó a cabo con resina *Boswellia serrata*. Se cargaron 60 g de resina en el extractor y se extrajeron secuencialmente como se ha descrito anteriormente, excepto que la primera etapa de extracción se llevó a cabo utilizando CO₂ supercrítico a baja presión (85 bar/35 °C) en lugar de CO₂ líquido. La Figura 5 muestra la composición de esta resina y las proporciones de las fracciones presentes.

- 50 Fracción de dióxido de carbono supercrítico a baja presión

- En este ejemplo, el objetivo es obtener una fracción rica en acetato de incensilo. La Figura 6 muestra el cromatograma de esta fracción recogida en la primera hora (fracción 1) y en la segunda hora (fracción 2), que indican los componentes ésteres principales. El rendimiento de la fracción 1 era de 0,75 g a partir de 60 g de resina (1,25 %) y el rendimiento de la fracción 2 era de 1,1 g a partir de 60 g de resina (1,83 %). La fracción 1 es predominantemente acetato de octilo y podría separarse del acetato de incensilo mediante una etapa de destilación simple, la fracción dos es en su mayor parte acetato de incensilo.

- Fracción de dióxido de carbono supercrítico

- 60 La fracción de CO₂ supercrítico está compuesta de una mezcla de incensol y acetato de incensilo, el rendimiento de esta fracción era de 2,43 g a partir de 60 g de resina (4,05 %).

- Dióxido de carbono supercrítico con 10 % en volumen de fracción de etanol

- 65 La fracción de CO₂ supercrítico con 10 % de etanol añadido produjo una fracción que era una resina de ámbar

ES 2 673 609 T3

oscuro semisólida inodora compuesta de una mezcla compleja de ácidos boswélicos característicos de *Boswellia serrata*. El rendimiento de esta fracción era de 31,55 g (48,45 %).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para extraer secuencialmente aceite esencial, derivados de incensol y ácido boswélico a partir de resina de franquinciense, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) triturar la resina de franquinciense;

- b) separar una primera fracción de aceite esencial con dióxido de carbono líquido a una primera temperatura que varía entre 0 °C y 30 °C y una primera presión que varía entre 40 bar y 73,8 bar o con dióxido de carbono supercrítico suave, y con un primer caudal que varía entre 10 g y 400 g/kg de material triturado/min hasta que ya no se puede recuperar más aceite esencial o el rendimiento del extracto es inferior al 0,1 % de la masa inicial por hora;

- c) recuperar aceite esencial del separador;

- d) separar una segunda fracción de derivados de incensol con dióxido de carbono supercrítico a una segunda temperatura que varía entre 31 °C y 100 °C y a una segunda presión de al menos 72,8 bar y a un segundo caudal que varía entre 10 g y 400 g/kg de material triturado/min hasta que ya no se puede recuperar más incensol ni sus derivados o el rendimiento del extracto es inferior al 0,1 % de la masa inicial por hora;

- e) recuperar derivados de incensol del separador;

- f) opcionalmente, continuar el proceso de separación con dióxido de carbono supercrítico a otros conjuntos de temperatura y/o presión crecientes hasta que se separan las fracciones más deseadas;

- g) separar una fracción adicional de ácido boswélico con dióxido de carbono supercrítico a una temperatura de al menos 31 °C y a una presión de al menos 72,8 bar y a un caudal que varía entre 10 g y 400 g/kg de material triturado/min usando un codisolvente a un nivel que varía entre 0,05 % en volumen y 50,0 % en volumen del caudal de CO₂ hasta que se logra la separación completa de ácidos boswélicos o se determina que no se pueden extraer más materiales o el rendimiento del extracto es inferior al 0,1 % de la masa inicial por hora;

- h) recuperar ácido boswélico del separador y eliminar el codisolvente por evaporación o destilación;

- i) opcionalmente, continuar el proceso de separación con dióxido de carbono supercrítico a otro conjunto de temperatura y presión y codisolvente hasta que se separan todas las fracciones deseadas;

- j) recuperar los restos no separados restantes.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el material inicial de franquinciense se obtiene a partir de especies de *Boswellia* seleccionadas de *B. ameero*, *B. boranensis*, *B. bricchettii*, *B. bullata*, *B. carteri*, *B. chariensis*, *B. dalzielii*, *B. dioscoridis*, *B. elegans*, *B. elongata*, *B. frereana*, *B. globosa*, *B. hildebrandtii*, *B. holstii*, *B. madagascariensis*, *B. microphylla*, *B. multifoliolata*, *B. nana*, *B. neglecta*, *B. occidentalis*, *B. ogadensis*, *B. ovalifoliolata*, *B. papyrifera*, *B. pirottae*, *B. popoviana*, *B. rivaie*, *B. sacra*, *B. serrata* y *B. socotrana*

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el proceso de trituración se lleva a cabo con un tamiz que varía entre 3 y 5 mm.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde durante la etapa de extracción g), el codisolvente se recoge y analiza por inyección directa en cromatografía líquida-espectroscopía de masas hasta que el rendimiento de extracción es inferior al 0,1 % de la masa inicial por hora.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en la etapa b), la temperatura varía entre 5 y 20 °C, la presión varía entre 60 y 70 bar y el caudal varía entre 50 y 100 g/kg de material triturado/min.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en la etapa d), la temperatura varía entre 30 y 50 °C, la presión varía entre 100 y 400 bar y el caudal varía entre 50 y 100 g/kg de material triturado/min.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en la etapa g) el codisolvente se añade a un nivel que varía entre 5 y 15 % en volumen del caudal de CO₂.

Figura 1

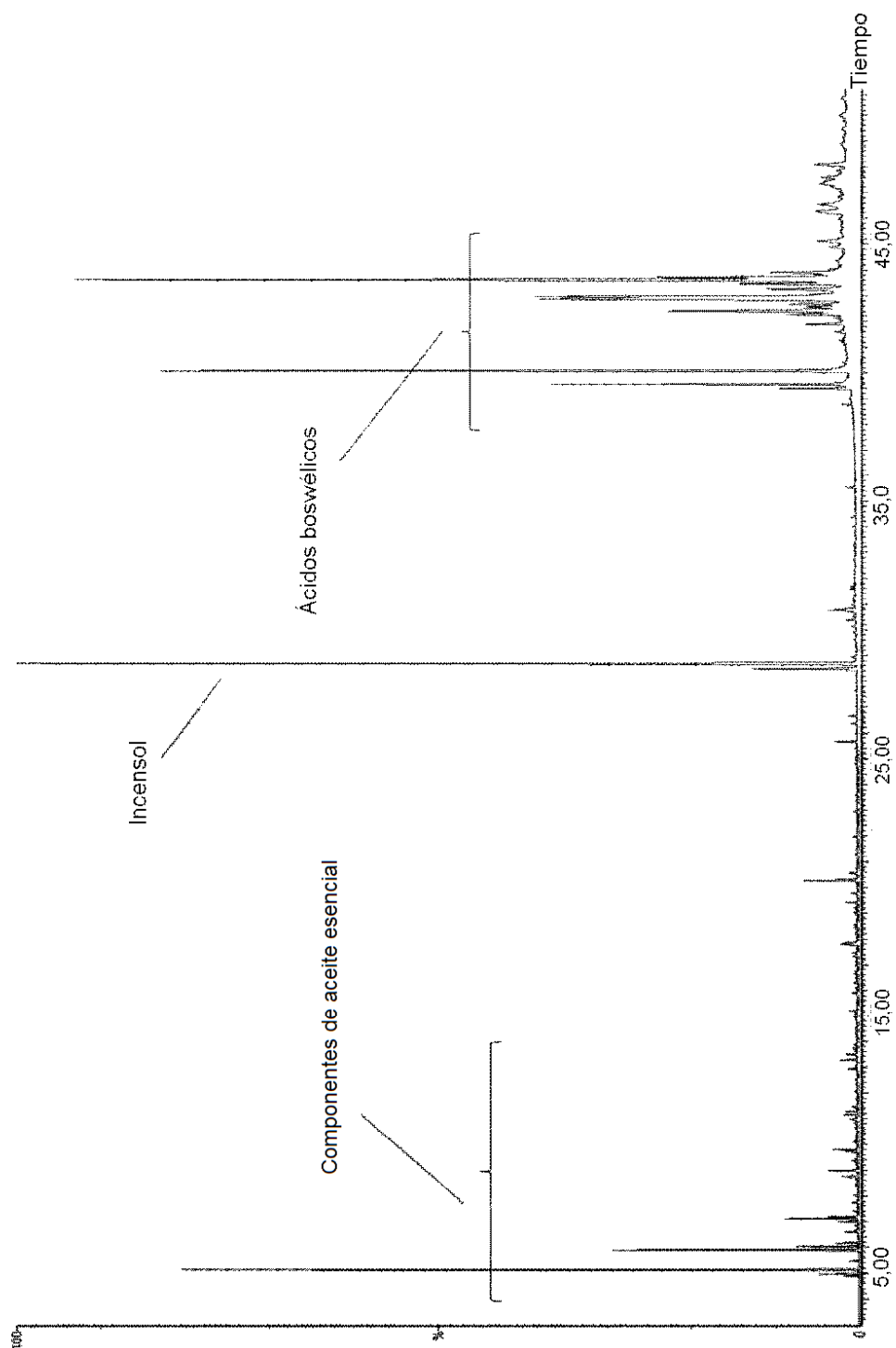


Figura 2

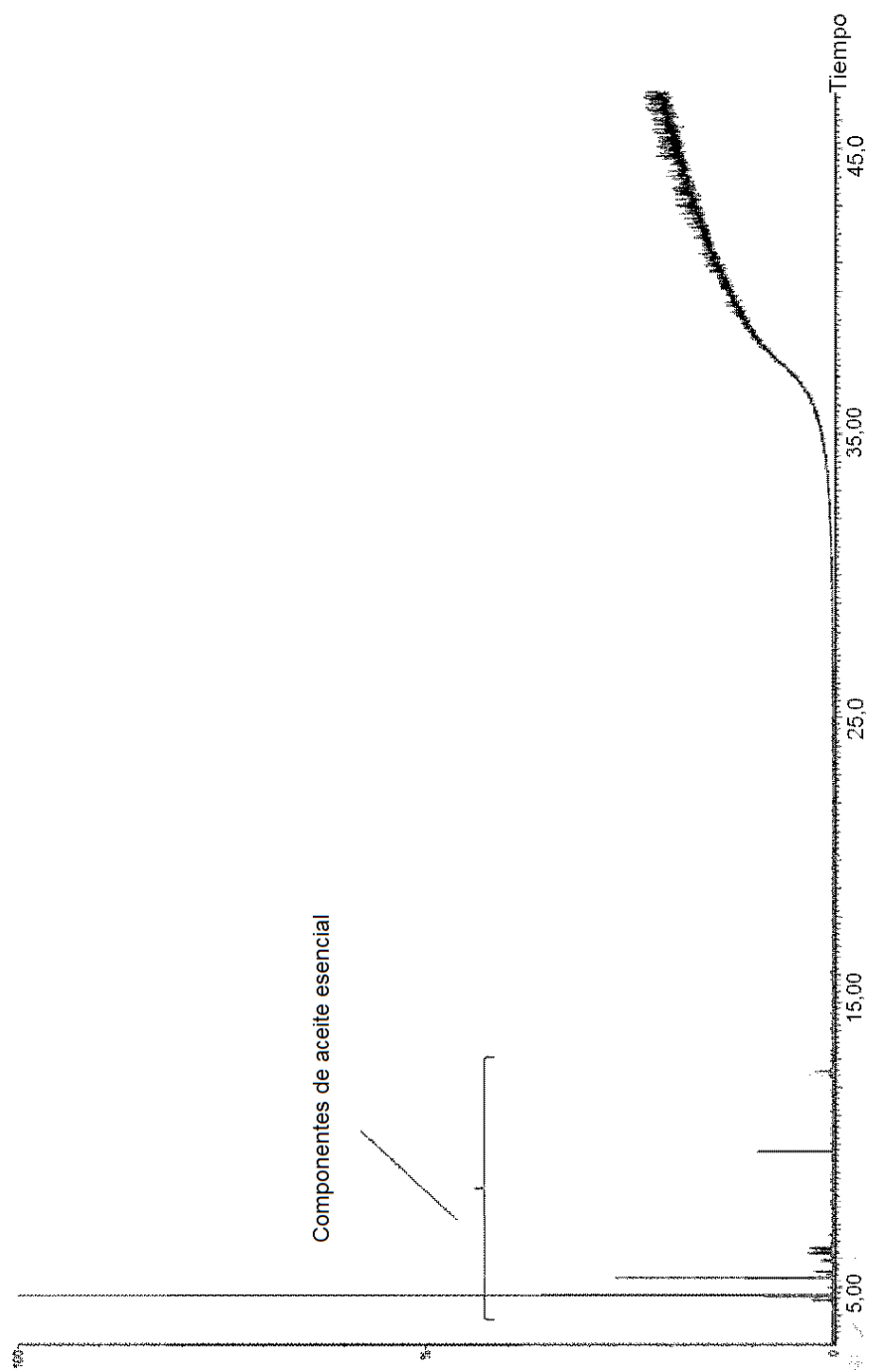


Figura 3

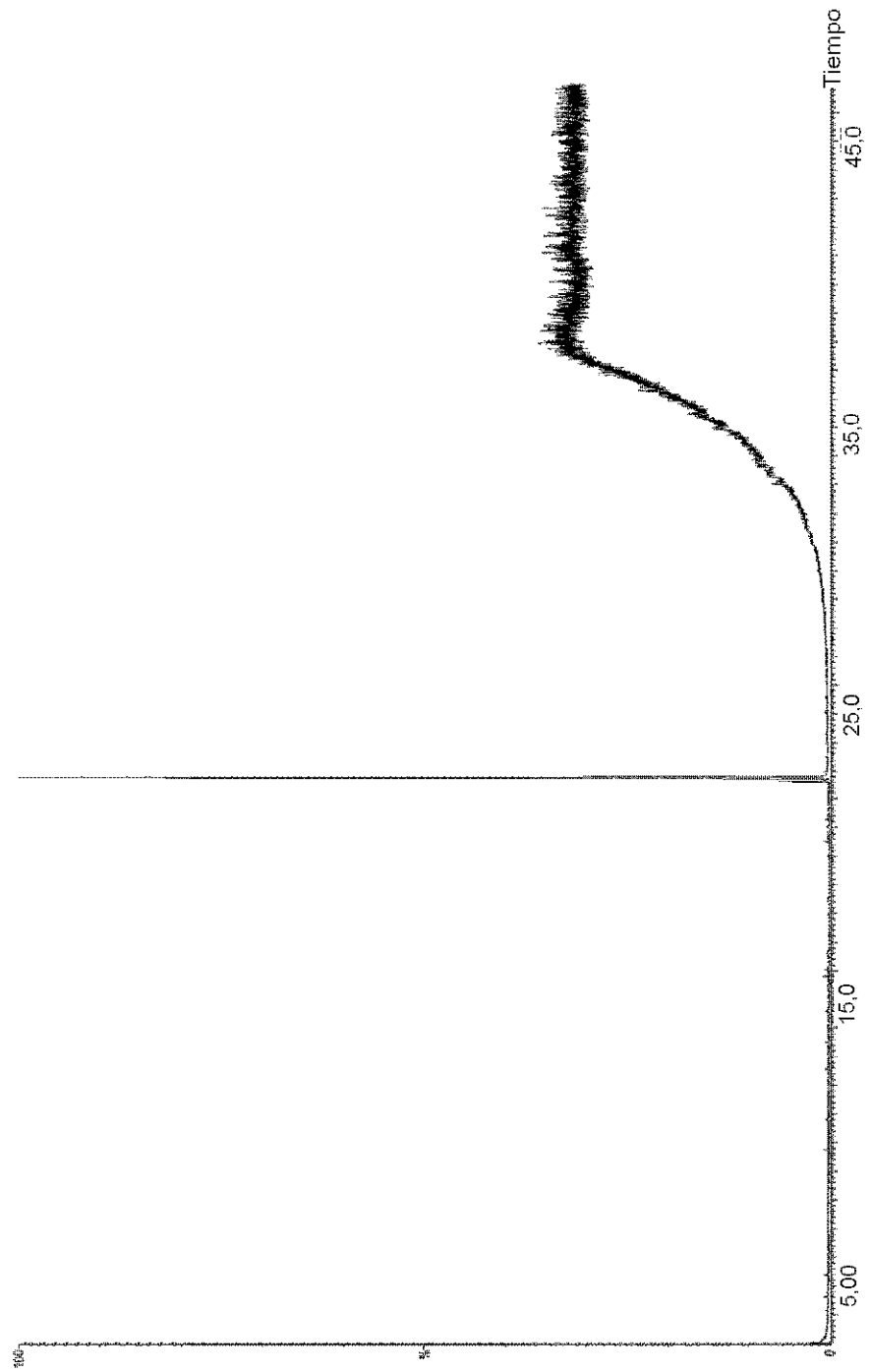


Figura 4

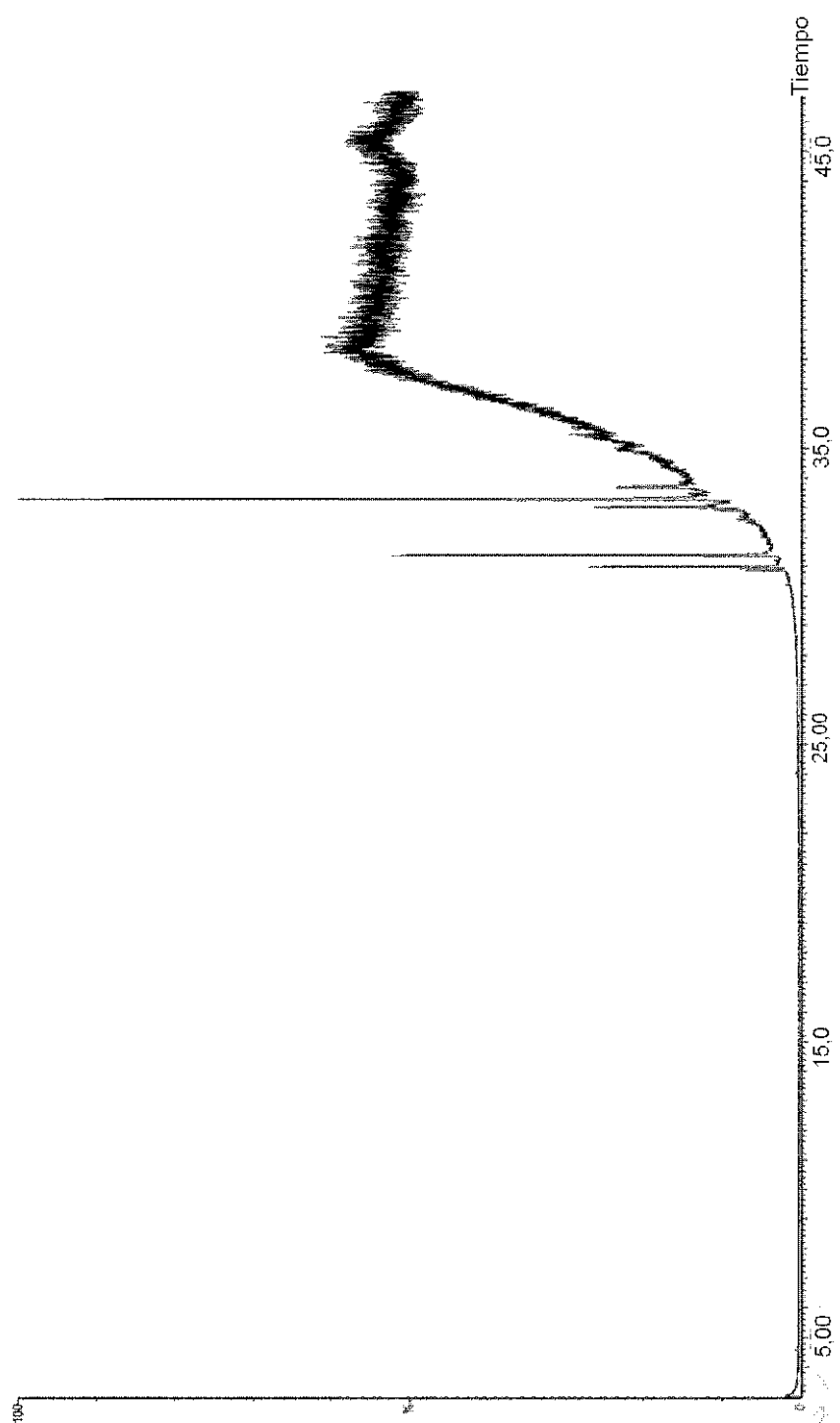


Figura 5

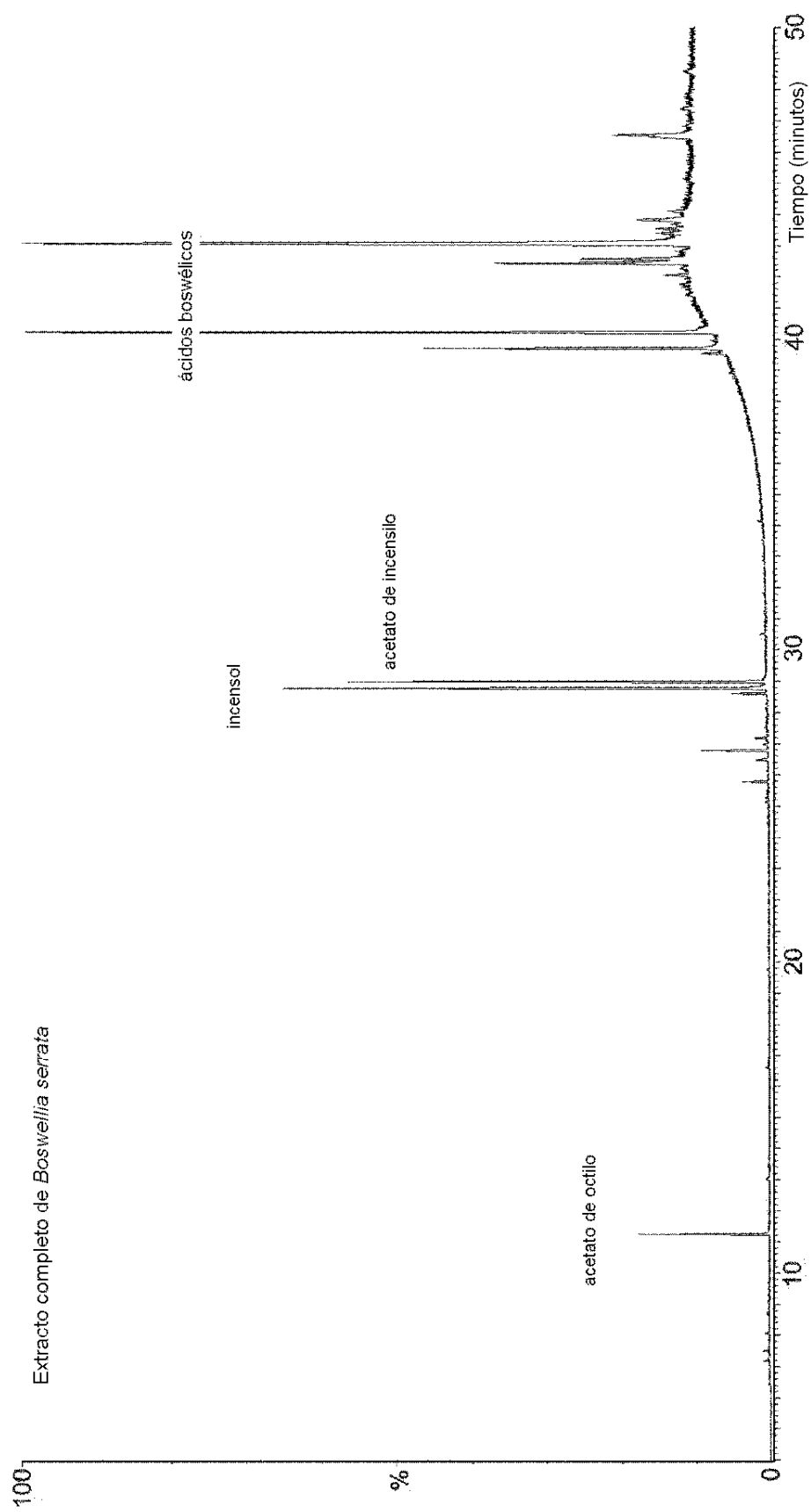


Figura 6

