



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 111 498**

② Número de solicitud: 9601652

⑤ Int. Cl.⁶: B01D 11/00

C07C 62/32

C11B 13/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **25.07.96**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.98**

Fecha de concesión: **23.07.98**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.98**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.09.98

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada**
C/ Santa Lucía, 2, 2ª Planta
18071 Granada, ES

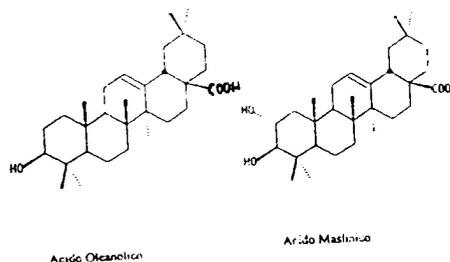
⑱ Inventor/es:
García-Granados López de Hierro, Andrés

⑳ Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

⑳ Título: **Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos oleanólico y maslínico contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna.**

㉑ Resumen:

Se describe un método de aprovechamiento de los ácidos oleanólico y maslínico contenidos en los subproductos resultantes de la molturación y procesamiento de la aceituna o sus partes, ya sean procedentes de prensas, de tres fases o de dos fases. Este método de aprovechamiento conduce a la obtención, por separado y con purezas mayores de 80%, de ambos ácidos, con unos rendimientos comprendidos entre el 0.2 y el 1.5%, dependiendo del producto y la materia prima procesada. Fundamentalmente consiste en extracciones selectivas y fraccionamiento de las mezclas resultantes mediante disolventes.



ES 2 111 498 B1

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

DESCRIPCION

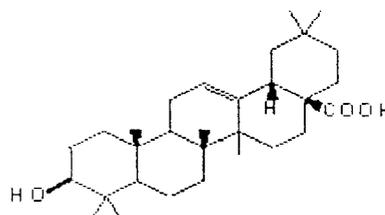
Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos oleanólico y maslínico contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna.

Estado de la técnica

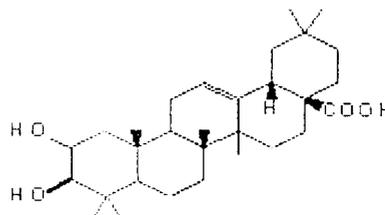
El cultivo de olivo posee una gran importancia en los países templados de casi todo el mundo. Su aprovechamiento principal es el aceite de oliva, del que en España se produce actualmente más de un millón de Tm. Los procedimientos clásicos para la molturación de la aceituna y la producción de aceite son los denominados de "tres fases", tanto en forma continua como discontinua. Mediante estos procedimientos, además del aceite, se obtienen subproductos tales como el alpechín, fracción acuosa de la aceituna con o sin adición de agua, y los orujos de diversos tipos, que son generalmente extraídos para un adicional aprovechamiento de aceite. En la actualidad, además de los procedimientos de tres fases, se utiliza el denominado de "dos fases" en el que, además del aceite, se obtiene una masa que contiene los restos de la pulpa y, usualmente aunque no siempre, el hueso de la aceituna, mezclados con el agua de vegetación, dando lugar a un subproducto que se comienza a conocer con el nombre de "alpeorujo".

El ácido oleanólico (3-beta-hidroxi-28-carboxioleanano) es un ácido triterpénico ubicuamente repartido en el reino vegetal. Así, la base de datos fitoquímica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Dirección Internet <http://probe.nalusda.gov:8300/cgi-bin/browse/phytochemdb>) recoge su presencia en casi un centenar de plantas, entre las que se encuentra la *Olea europaea*, así como una serie de actividades biológicas comprobadas (antiabortivo, anticariogénico, antifertilidad, antihepatotóxico, antiinflamatorio, antisarcómico, preventivo del cáncer, cardiotónico, diurético, hepatoprotector y uterotónico). Son continuas las publicaciones sobre la posible actividad biológica de este ácido y de sus glicósidos. Así, se ha estudiado su actividad como inhibidor de la proliferación de células leucémicas (Essady, D., Najid, A., Simo, A., Denizot, Y., Chulia, A.J. and Delage, C.; *Mediators of Inflammation* (1994) 3, 181-184), como hipoglucemiante (Yoshikawa, M., Matsuda, H., Harada, E., Mukarami, T., Wariishi, N., Murakami, N. And Yamahara, J.; *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, (1994) 42, 1354-1356) antitumoral (Ohigashi, H., Mukarami, A. and Koshimizu, K. *ACS Symposium Series* (1994) 547, 251-261), productor de efectos antagonistas en el shock anafiláctico (Zhang, L.R. and Ma, T.X.; *Acta Farmacológica Simica* (1995) 16, 527-530), hepatoprotector (Liu, J., Liu, Y.P., Parkinson, A. and Klaasen, C.D.; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (1995) 275, 768-774; Connolly, J.D. and Hill, R.A. Natural Product Report 12, 609-638 (1995), antiinflamatorio (Recio, M.D., Giner, R.M., Manez, S. And Rios, J.L.; *Planta Medica* (1995) 61, 182-185. Se ha publicado una revisión específica de la actividad farmacológica del ácido oleanólico (Liu, J. *Journal of Ethnopharmacology* (1995) 49, 57-68). El ácido maslínico (2-alfa, 3-beta-hidroxi-28-carboxioleanano), también denominado ácido

crateológico, es un ácido mucho menos repartido en la naturaleza, habiendo sido detectado en una decena de plantas (Dirección Internet <http://probe.nalusda.gov:8300/cgi-bin/browse/phytochemdb>). Se conoce su actividad como antihistamínico y antiinflamatorio (Dirección Internet <http://probe.nalusda.gov:8300/cgi-bin/browse/phytochemdb>), aunque su escasez hace que no se haya estudiado extensamente. El aislamiento de los ácidos oleanólicos y maslínico de las ceras de la superficie del fruto de la *Olea europaea*, ha sido descrito (Bianchi, G., Pozzi, N. And Vlahov, G. *Phytochemistry* (1994) 37, 205-207) mediante la extracción metanólica de olivas previamente lavadas con cloroformo. La separación de este tipo de ácidos ha sido descrita mediante cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HS-CCC) (Du, Q.Z., Xiong, X.P. and Ito, Y.; *Journal of Liquid Chromatography* (1995) 18, 1997-2004).



Acido oleanólico



Acido maslínico

Descripción de la invención

Las tortas de orujo, procedentes del prensado clásico, el orujo procedente del procesado "en tres fases", el alpeorujo, procedente del sistema conocido como de "dos fases", y en general cualquier residuo del procesado de la aceituna completa o sus partes que contengan los residuos de piel original de la misma, con o sin procesamientos posteriores para aprovechar el aceite que contiene, con o sin lavados previos, secados adecuadamente hasta llegar a un grado de humedad adecuado para su extracción con hexano (u otro disolvente o mezclas de disolventes) en la forma usual de las industrias orujeras, se extraen con un disolvente apolar (preferentemente hexano), obteniéndose el conocido aceite de orujo tras la eliminación del solvente. El aceite así obtenido, o bien diluido con hexano, se deja reposar, apare-

ciendo un precipitado blanco, que se puede separar de este aceite por filtración y/o centrifugación, obteniéndose un producto semisólido que, adecuadamente lavado con un disolvente apolar (preferentemente hexano) da lugar al ácido oleanólico, que puede someterse a procesos de decoloración, si se desea. Los "orujo" ya extraídos en la forma descrita anteriormente, serán de nuevo extraídos con un disolvente más polar, preferentemente acetato de etilo, inclusive con gases licuados en condiciones "supercríticas". El extracto en cuestión se reducirá de volumen por eliminación del disolvente llevándose, preferentemente, a sequedad. El extracto así obtenido será tratado con un solvente más polar que el acetato de etilo, preferentemente metanol, o bien con gases licuados en condiciones "supercríticas", obteniéndose una solución y un precipitado viscoso, que será separado de la solución mediante centrifugación y/o filtración. Este proceso puede repetirse para aumentar la cantidad de ácido maslínico que resulta de esta operación, como se indica a continuación. Este producto no solubilizado en el metanol o en los gases licuados, será a continuación lavado con un solvente apolar, preferentemente hexano, y preferentemente en caliente, quedando un sólido sin disolver que es ácido maslínico. Puede, por el contrario, hacerse un tratamiento de polaridades inversas, con lo que el producto solubilizado resulta ser fundamentalmente ácido maslínico. La solución polar de acetato de etilo, en su caso, anteriormente mencionada se concentra, preferiblemente a sequedad, y se somete a tratamientos sucesivos con agua a distintos valores de pH. Después de un tratamiento con agua básica, queda un precipitado, que se separa de las aguas de lavado y que es la sal del ácido maslínico. El posterior tratamiento de esta sal con medios ácidos, preferentemente minerales, o con cualquier tipo de tratamiento de intercambio iónico, conduce al ácido maslínico libre.

Explicación de la figura 1

Producto 1: Materia industrial que resulta de la molturación de la aceituna en cualquiera de sus procedimientos, y que contiene la piel de la misma y materiales que le acompañan.

Operación (A): En su caso, eliminación de agua que contiene el producto 1 hasta un contenido en agua inferior al 15% (Producto 2). Se pueden emplear, entre otros, hornos rotatorios o secados en contracorriente. Por ejemplo, partimos de 350 kg de este producto 2.

Operación (B): Extracción con hexano del Producto 2. Puede ser en forma continua o discontinua. Esta operación aprovecha unos 21 kg de los 350 kg originales (alrededor del 6%).

Operación (C): Extracción con acetato de etilo del sólido insoluble en hexano (producto 5), procedente de la operación anteriormente descrita (B). Puede ser en forma continua o discontinua. Esta operación aprovecha, aproximadamente, otros 24 kg del producto original (alrededor del 6.5% con respecto al producto 2).

Operación (D): Concentración parcial del producto 3 y separación del precipitado por filtración y/o centrifugación, o bien concentración completa del producto 3 y posterior dilución con hexano, filtrando y/o centrifugando el sólido precipitado, que se lavará repetidamente con disolventes (p.e. hexano). Así se obtendrá una disolución que, tras la eliminación del solvente dará lugar a aceite (19.5 kg) (producto 4), y a ácido oleanólico (0.07% del producto 2), que podrá someterse a procesos de decoloración.

pitado, que se lavará repetidamente con disolventes (p.e. hexano). Así se obtendrá una disolución que, tras la eliminación del solvente dará lugar a aceite (19.5 kg) (producto 4), y a ácido oleanólico (0.07% del producto 2), que podrá someterse a procesos de decoloración.

Operación (E): Concentración del extracto del acetato de etilo, procedente de la operación (C), y lavado del sólido (24 kg) resultante con metanol (75 kg), separando la disolución resultante (producto 7) del sólido insoluble (producto 8), por filtración y/o centrifugación.

(F): Lavado con hexano en caliente del sólido (8), procedente de la operación descrita en (E), separando el sólido residual (ácido maslínico 0.04 a 0.2% respecto del producto 2) de las disoluciones resultantes (10), por filtración y/o centrifugación.

(G): Concentración de la disolución metanólica procedente de la operación (E) y lavado del sólido resultante con agua (75 kg), preferentemente en caliente, separando la parte insoluble (producto 11) de la disolución (12) por filtración y/o centrifugación.

(H): Tratamiento con agua basificada (75 kg), p.e. con hidróxido sódico al 5%, obteniéndose una disolución (14) y un conjunto de sales poco solubles de ácido maslínico, que se separan de la referida disolución por filtración y/o centrifugación. Posteriormente se libera el ácido maslínico por tratamiento de las sales en medios ácidos (0.15 a 0.35% respecto del sólido 2).

A continuación se indicará un ejemplo de la realización práctica del procedimiento objeto de la presente Patente.

Ejemplo.- Se parte de 1000 kg de alpeorajo procedente de la molturación de la aceituna por el procedimiento denominado de "dos fases". Se procede a secar este alpeorajo, en un horno rotatorio adaptado al efecto, eliminando la mayor parte del agua que contiene hasta alcanzar una humedad del alrededor del 8%, obteniéndose de esta forma unos 350 kg de una materia susceptible de aprovechamiento, que se extrae a continuación con hexano en unas instalaciones típicas de la industria orujera. El extracto hexánico contiene alrededor del 6% en peso de materia no volátil, y está constituido en su mayoría por el denominado aceite de orujo (entre el 5 y el 6%), en una proporción muy variable dependiendo de la calidad, naturaleza e "historia" del orujo procesado. En aceite así obtenido (unos 21 kg) se diluye con 50 litros de hexano y se deja reposar a temperatura ambiente hasta que aparezca un precipitado blanquecino, que se separa de la disolución por centrifugación. El sólido así obtenido se somete a lavados sucesivos con hexano, procediendo a separar en cada paso el sólido de la solución resultante mediante centrifugación. La soluciones resultantes se llevan a sequedad y el residuo se somete a nuevos lavados con hexano. El sólido resultante se añade al primer sólido obtenido, resultando en su conjunto un rendimiento próximo al 0.1% de ácido oleanólico con una riqueza mínima del 85%, siendo ácido maslínico la principal materia que le acompaña (alrededor del 10%) así como restos de materias grasas. Tras disolver el ácido oleanólico en una mezcla de cloroformo/metanol,

se agrega carbón activo, se hierve unos minutos, se filtra o centrifuga y se lleva a sequedad resultando unos 350 g (entre el 0.07 y el 0.1 % respecto al alpeorujo seco) de ácido oleanólico blanco, con una riqueza superior al 85 %, contrastada por resonancia magnética nuclear y por cromatografía. El alpeorujo sólido ya extraído con hexano, del que quedan alrededor de 325 kg, se somete a extracción con acetato de etilo, en las mismas instalaciones que las descritas para la extracción con hexano. Se obtiene así una disolución de acetato de etilo que se concentra a vacío hasta un contenido de materia sólida de alrededor de un 50 % y se termina de llevar a sequedad mediante atomización, resultando unos 24 kg de materia sólida que se tratan con 150 litros de metanol a ebullición, dejando enfriar reposando, centrifugando a continuación. El sólido obtenido se lava con hexano en caliente, obteniéndose unos 150 gramos de sólido lavado, que se separa por centrifugación de las soluciones hexánicas. Este sólido se disuelve en una mezcla de cloroformo/metanol y se decolora con carbón activo, obteniéndose así unos 130 gr (0.04 % con respecto al alpeorujo seco procesado) de un sólido blanco que es ácido maslínico, con una riqueza mayor del 85 %, al que acompaña alrededor de un 10 % de ácido oleanólico. Los materiales solubilizados en metanol se llevan a sequedad mediante los procedimientos descritos para el extracto de acetato de etilo, repitiéndose el tratamiento con metanol, resultando nuevos lotes de ácido maslínico hasta alcanzar, aproximadamente, un 0.2 % de rendimiento en esta fase del proceso. El conjunto

de las materias solubilizadas en metanol (unos 23 kg) se llevan a sequedad mediante la combinación de procedimientos descritos para el extracto de acetato de etilo, tratándose a continuación con 75 litros de agua a ebullición, separando los materiales no disueltos de la solución acuosa por centrifugación. Posteriormente se hace otro tratamiento en caliente con el mismo volumen de agua que contiene un 5 % de bicarbonato sódico, separando igualmente la disolución acuosa bicarbonatada del sólido residual. La parte no soluble se trata a continuación con el mismo volumen de agua que contiene un 5 % de hidróxido sódico. Se separa la fase acuosa de un material sólido de color marrón constituido fundamentalmente por sales sódicas de ácido maslínico, que constituyen entre el 0.2 y el 0.5 % en peso con respecto al alpeorujo seco original, dependiendo además del rendimiento de maslínico que se haya conseguido en la fase anterior. El tratamiento posterior de este sólido, previamente molido, en caliente con agua acidificada con ácido clorhídrico conduce al ácido libre, que se separa por centrifugación y se somete a decoloración con carbón activo como se ha descrito anteriormente. Se obtiene así, entre las dos fases de obtención del ácido maslínico, alrededor de un 0.5 % del mismo con una riqueza superior al 85 %, si bien los rendimientos, como sucede también con el ácido oleanólico dependen en cierta medida de la variedad de aceituna, del grado de madurez, de la "historia" del alpeorujo, y muy especialmente de la relación en peso entre las materias (pulpa y hueso) que, en su conjunto, formen el alpeorujo original.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de los ácidos 3-betahidrox -28-carboxioleanano (oleanólico), 2-alfa,3-betahidroxi-28 -carboxioleanano (maslínico) y productos derivados a partir de los residuos de molturación de la aceituna completa o sus partes, de las tortas de orujo producidas en las almazaras de prensas, de los orujos procedentes de las almazaras de tres fases y de los alpeorujos procedente de la extracción de aceite de la aceituna en la modalidad conocida como sistema de "dos fases", **caracterizado** por el aislamiento de ambos ácidos por separado con riquezas superiores al 80 % mediante extracciones selectivas de los indicados ácidos y/o eliminación de los productos acompañantes de los mismos mediante disolvente, incluyendo las extracciones con gases licuados.

2. Procedimiento de obtención del ácido oleanólico (principalmente) y maslínico y productos derivados, según reivindicación primera, **caracterizado** por someterse los residuos de la molturación (tal cual, diluidos con agua u otro disolvente o mezcla de ellos, filtrados y/o decantados y/o centrifugado, parcial o totalmente desecada cualquiera de las fases resultantes en su caso de las operaciones de separación sólido-líquido) a extracción, preferentemente a reflujo mediante hexano, otros solventes apolares, o mezclas de ellos, disolventes de los ácidos oleanólico y/o maslínico, con o sin extracciones previas de otros solventes.

3. Procedimiento de obtención de ácido oleanólico (principalmente) y maslínico y productos derivados, según reivindicaciones primera y segunda, **caracterizado** por separar por decantación y/o filtración y/o centrifugación en la mayor medida posible los ácidos oleanólico y maslínico, precipitados del extracto concentrado, incluso parcialmente diluido, resultante de los procesos de extracción indicados en las reivindicaciones primera y segunda, lavando estos ácidos del aceite y sustancias acompañantes mediante hexano, otros disolventes apolares, o mezclas de ellos, en frío o en caliente, decolorando en caso necesario los productos obtenidos.

4. Procedimiento de obtención de los ácidos oleanólico, maslínico (principalmente), y productos derivados, a partir de las materias indicadas en la reivindicación primera, **caracterizado** por

extraer de nuevo los residuos procedentes del proceso indicado en la reivindicación segunda preferentemente con acetato de etilo, otros disolventes de mediana polaridad o mezclas de ellos, preferentemente en caliente, incluyendo las extracciones con gases licuados en condiciones "supercríticas".

5. Procedimiento de obtención de los ácidos oleanólico, maslínico (principalmente), y productos derivados, según reivindicaciones primera a cuarta, **caracterizado** por el tratamiento del extracto obtenido en la reivindicación cuarta, preferentemente llevado a sequedad, con metanol, otros disolventes o mezclas de ellos, o gases licuados en condiciones supercríticas, capaces de disolver preferentemente los componentes de extracto que acompañan a los ácidos oleanólico y maslínico que contiene.

6. Procedimiento de obtención de ácido oleanólico, maslínico (principalmente), y productos derivados, según reivindicaciones primera a quinta, **caracterizado** por el tratamiento de la parte no disuelta, obtenida en la reivindicación quinta y compuesta esencialmente por los ácidos maslínico (principalmente) y oleanólico preferentemente con hexano, otros disolventes o mezclas de ellos capaces de disolver las materias grasas que acompañan a estos ácidos.

7. Procedimiento de obtención de los ácidos oleanólico, maslínico y productos derivados, según reivindicaciones primera a sexta, **caracterizado** por el tratamiento del concentrado de la solución obtenida según la reivindicación quinta, con agua basificada con sosa u otra base, con o sin lavados previos de agua de diferentes pH, en frío o en caliente, dando lugar a un residuo sólido de las sales de los ácidos maslínico (principalmente), y oleanólico, que pueden separarse de las soluciones por centrifugación y/o filtración, sometiéndose el producto, en caso necesario, a procesos de decoloración.

8. Procedimiento de obtención de los ácidos maslínico (principalmente), oleanólico, y productos derivados, según reivindicaciones primera a séptima, **caracterizado** por el tratamiento de las sales de los ácidos oleanólico y maslínico con medios y/o sustancias ácidas, preferentemente minerales, para la obtención de los ácidos libres, procediéndose, en caso necesario, a procesos de decoloración.

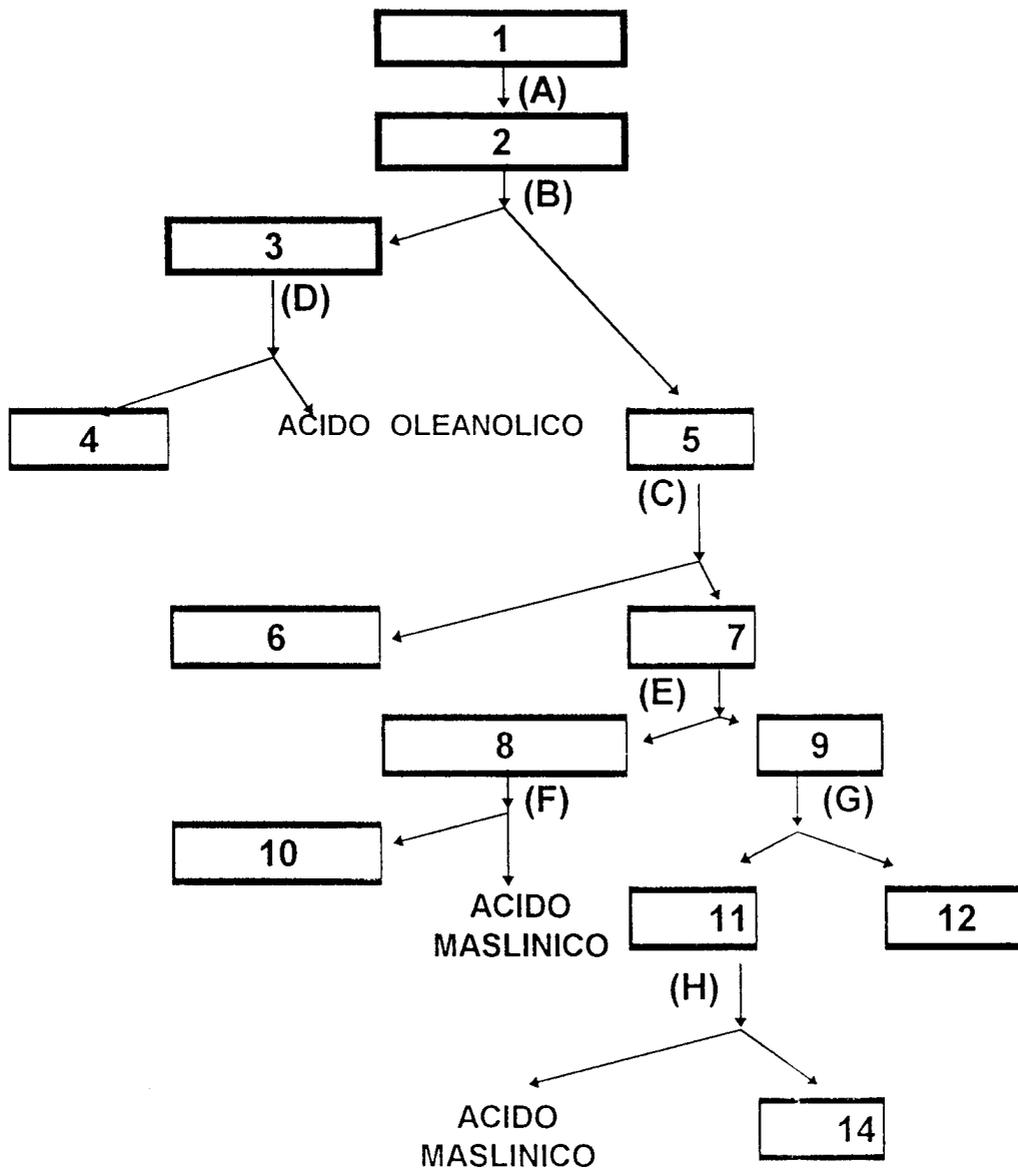


FIGURA 1



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: B01D11/00, C07C62/32, C11B13/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VAZQUEZ RONCERO, A. et al, "Triterpenic acids from the olive tree" 1969, Grasas y Aceites, vol. 20(3), pp.: 133-138 * todo el documento, en especial págs.: 134-136, "parte experimental" *	1-8
X	EP-093520-A (NORISTAN LIMITED) 09.11.83 * págs.: 11 y 12, "ejemplo 1" *	1-8
A	FREGA, N. et al., "Minor lipids of the olive drupe at different stages of ripening", 1986, Riv.Ital.Sostanze Grasse, vol. 63 (7), pp.:393-398	
A	LANZANI, A. et al., "Olive marc transformation and recovery technology of byproducts for practical applications. Note I", 1985, Riv.Ital.Sostanze Grasse, vol. 62 (11), pp.:597-604	
A	BIANCHI, G. et al., "Pentacyclic triterpene acids in olives", 1994, Phytochemistry, vol. 37, págs.: 205-207	

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 n.º:

Fecha de realización del informe

21.01.98

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1