

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 341 526**

21 Número de solicitud: 200803630

51 Int. Cl.:

**A61K 8/34** (2006.01)

**A61K 8/97** (2006.01)

**C07C 37/82** (2006.01)

**A61K 36/63** (2006.01)

**A61K 36/28** (2006.01)

**A61K 36/185** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **19.12.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.06.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**21.06.2010**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Fernández-Bolaños Guzmán, Juan;**  
**Guillén Bejarano, Rafael;**  
**Jiménez Araujo, Ana;**  
**Rodríguez Arcos, Rocío;**  
**Rodríguez Gutiérrez, Guillermo y**  
**Lama Muñoz, Antonio**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales.**

57 Resumen:

Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales.

Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de cualquier parte de la planta, productos o subproductos derivados del olivo o cualquier otro producto vegetal de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae* y/o *Scrophulariaceae*, y que comprende 1 o más etapas en las que se introduce el producto inicial en al menos una columna de resina iónica, en posibles posteriores etapas se introduce el producto eluido en la columna anterior en una columna de resina iónica y/o de resina de adsorción no iónica. Además, se refiere al extracto de DHFG obtenible mediante el procedimiento descrito y a sus aplicaciones.

ES 2 341 526 A1

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales.

5 La presente invención se refiere a procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de cualquier parte de la planta, productos ó subproductos derivados del olivo o cualquier otro producto vegetal de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae*, y/o *Scrophulariaceae*. Dada las diferentes aplicaciones del DHFG, la presente invención se engloba al sector de la alimentación, farmacéutico o de la cosmética.

10

**Estado de la técnica anterior**

15 Estudios epidemiológicos indican que la dieta Mediterránea está asociada a una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis y ciertos tipos de cánceres (piel, pecho, próstata, tracto digestivo). Se trata de una dieta rica en frutas y vegetales frescos, con una relativa baja proporción de grasa animal y teniendo al aceite de oliva como principal fuente de grasa. Estos efectos beneficiosos se los han atribuido no solo a una baja proporción ácidos grasos saturados/monoinsaturados del aceite de oliva, sino también a otras moléculas adicionales presentes en menor concentración, en particular a los compuestos fenólicos antioxidantes.

20

El interés en los antioxidantes naturales se está incrementando hoy en día porque crecen las evidencias que indican que son capaces de contrarrestar los efectos geno y citotóxicos de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que se producen en casos de estrés oxidativo y, que están implicadas en varios procesos patológicos, tales como enfermedades renales y hepáticas y en procesos inflamatorios. Es por eso que a partir de la aceituna se aislan varios de ellos destacando entre todos el hidroxitirosol (HT).

25

Según la “European Olive Oil Medical Information Library”, el HT es un compuesto fenólico de una reconocida especial eficacia antioxidante. Sus propiedades antioxidantes se atribuyen especialmente a la presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto, es decir un grupo ortodifenol, característico de los biofenoles.

30

Además de su capacidad de donar electrones y de neutralizar radicales libres, su elevada eficacia antioxidante radica en su capacidad de secuestro o quelación de iones metálicos como Fe o Cu, responsables de la formación de radicales libres durante el proceso de la oxidación. En los últimos años, se ha comprobado que este antioxidante natural posee además importantes propiedades biológicas. Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado su capacidad para actuar como antiagregante plaquetario y como inhibidor de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en colesterol, lo que ayudarían a reducir la aterosclerosis. El HT es también capaz de modular la ciclooxigenasa, lipoxigenasa y óxido nítrico o NO-sintetasa, contribuyendo, por tanto, a paliar los procesos trombogénicos e inflamatorios. Además, es capaz de reducir la producción de radicales libres como el anión superóxido, y por tanto, presenta efecto inhibidor sobre la iniciación de procesos mutagénicos y carcinogénicos, e induce la apoptosis en células HL-60. Se ha demostrado también su capacidad para actuar sobre bacterias Gram-negativa y Gram-positiva y sobre el virus VIH. En estudios *in vivo* de biodisponibilidad en humanos, se han detectado en el plasma conjugados de dicho compuesto y su metabolito, el 3-O-metil-hidroxitirosol, siendo la cantidad absorbida dependiente de la dosis ingerida.

35

40

Actualmente, son, por tanto, numerosas las investigaciones que intentan demostrar la actuación de este compuesto en la prevención y tratamiento de gran número de enfermedades. Protege contra enfermedades neurodegenerativas, previene contra el ictus cerebral isquémico e incluye el tratamiento de la piel. Todos estos antecedentes sugieren además el uso del HT como componente funcional en alimentos, así como su empleo para la prevención del deterioro de los mismos debido a su demostrada capacidad para inhibir la oxidación de los lípidos.

45

50

Por otro lado, el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) es un compuesto muy similar al HT pero con un grupo hidroxilo adicional. Esta sustancia ha sido descrita en la aceituna, alpechín y aceite de oliva.

55

60

65

El DHPG presenta además una elevada actividad antioxidante superior incluso al HT, siendo su eficacia antioxidante en agua 2-3 veces más alta que el ácido ascórbico o el HT mientras que en medio lipídico es el doble que el HT y similar a la vitamina E (Rodríguez, G., Rodríguez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillen, R., & Jiménez, A. (2007), *European Food Research and Technology*. 224, 733-741.) También es importante destacar que tanto el HT como el DHFG forman parte de la misma familia, los glucósidos fenilpropanoides, también llamados acteosídeos o hidroxiacteosídeos, dependiendo si es el HT o el DHFG los que forman parte de la molécula. La molécula está además formada por el ácido caféico y un di- o trisacárido, y están ampliamente distribuidas como metabolitos secundarios en muchas especies de plantas, muy utilizadas en la medicina tradicional oriental (china, japonesa y coreana) (Nishibe, S. (2002). *Yakuqaku Zasshi*. 122, 363-379), por su amplia variedad de actividades biológicas (antiproliferativas, antiinflamatorias, neurodegenerativas, etc), todas ellas explicables por su elevado poder antioxidante.

65

Debido a su similitud con el HT y al formar parte de los glucósidos de fenilpropanoides, es deseable desarrollar un método que produzca esta sustancia, DHFG, ya sea pura o en extracto acuoso, con alto porcentaje de pureza.

**Descripción de la invención**

La presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de un concentrado natural, bioactivo, a partir de productos y/o subproductos derivados del olivo y o cualquier otro producto vegetal de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae*, y/o *Scrophulariaceae*, que contienen DHFG, así como la obtención del DHFG de alta pureza.

El compuesto que se obtiene mediante el procedimiento de la presente invención es un extracto fenólico muy rico en DHFG.

El DHFG está presente, sobre todo, en la aceituna y el aceite de oliva virgen. También se encuentra en el organismo humano al ser un metabolito de la hormona simpática mimética noradrenalina. Posee mayor capacidad antioxidante que su acompañante en la aceituna como es el HT.

Mediante el procedimiento de la invención se obtiene el DHFG con una elevada pureza mediante técnicas cromatográficas sencillas en donde la ausencia de disolventes orgánicos simplifica y reduce sustancialmente los costos, llegándose a un sistema sencillo y muy económico, y haciéndolo totalmente compatible con los productos alimenticios.

El procedimiento de obtención de DHFG purificado de la presente invención es a partir de productos y subproductos derivados del olivo y o cualquier otro producto vegetal de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae*, y/o *Scrophulariaceae*. El sistema de purificación se basa en el uso y combinación de diversos sistemas cromatográficos. Se emplean resinas de adsorción y de resinas iónicas, preferentemente resinas iónicas fuertes o débiles. Combinando columnas en serie de estas resinas se llega a obtener una disolución rica en DHFG.

La fuente de DHFG se introduce en dichas columnas obteniéndose, en función a la combinación usada, una disolución tras su elución con agua que contiene un DHFG con una pureza en peso de entre el 10-100%, acompañado de otros compuestos como el tirosol o el HT entre otros.

El procedimiento de la invención utiliza un sistema cromatográfico en una, dos, tres o más fases para la obtención de un producto natural no aislado hasta ahora. El número de fases que se van a utilizar en este procedimiento de la invención dependerá de la pureza con la que se desee obtener el producto final, DHFG.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de DHFG purificado (a partir de productos y subproductos derivados del olivo y o cualquier otro producto vegetal de la familia) a partir de un producto inicial procedente de especies vegetales seleccionadas de la familia de las *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae*, *Scrophulariaceae*, o cualquiera de sus combinaciones, caracterizado porque comprende (a partir de ahora procedimiento de la invención):

- a. introducir el producto inicial en una columna de resina iónica;
- b. eluir el compuesto retenido en la columna del paso (a).

En una realización preferida, la elución del paso (b) se hace pasar por una segunda columna que contiene una resina que se selecciona de entre una resina iónica o de una resina de adsorción no iónica y posteriormente se eluye el compuesto retenido.

En una realización más preferida del procedimiento de la invención, la disolución eluida de la segunda columna se hace pasar por una tercera columna que contiene una resina que se selecciona de entre una resina iónica o de una resina de adsorción no iónica y posteriormente se eluye el compuesto retenido.

En una realización aún más preferida del procedimiento de la invención, la disolución eluida de la tercera columna se hace pasar por una cuarta columna que contiene una resina que se selecciona de entre una resina iónica o de una resina de adsorción no iónica y posteriormente se eluye el compuesto retenido.

Preferiblemente cualquiera de las eluciones del producto retenido en cualquiera de las columnas se lleva a cabo con agua.

Preferentemente se utiliza en la primera columna una resina iónica, que a su vez puede ser una resina iónica fuerte o una resina iónica débil, que permite obtener una disolución rica en DHFG tras su elución con agua. Este tipo de resina es preferiblemente de base de poliestireno, fácilmente regenerable, de gran durabilidad mecánica y funcional, bajo costo de inversión, regeneración y de operación.

En la segunda y tercera fase se pueden emplear o bien una resina iónica y una resina adsorbente no iónica o bien una resina adsorbente no iónica y una resina iónica, respectivamente.

Las resinas adsorbentes preferiblemente son polimérica XAD, esta es una resina macroreticular, no iónica, en base poliestireno, que adsorbe y libera las sustancias a través de interacciones hidrofóbicas y polares.

## ES 2 341 526 A1

En una realización preferida, el producto inicial, para obtener DHFG, procedente de especies vegetales de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae*, y/o *Scrophulariaceae* es de la planta entera, la parte aérea, las hojas, las flores, las semillas o los frutos.

5 Las especies vegetales procedentes de las familias de *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae* y/o *Scrophulariaceae*, se utilizan, en el procedimiento de la invención, al llevar incluido hidroxiacteosidos.

10 En una realización preferida, los productos iniciales que se utilizan en el procedimiento de la invención son los de especies vegetales de la familia de *Oleaceae*. Ejemplos de géneros de esta familia son entre otros *Abeliophyllum*, *Chionanthus* L., *Comoranthus*, *Fontanesia* Labill., *Forestiera* Poir., *Forsythia* Vahl, *Menodora* Bonpl., *Myxopyrum*, *Nestegis* Raf., *Noronhia*, *Notelaea*, *Nyctanthes* o *Olea*. En una realización más preferida las especies vegetales son del género *Olea*, y más preferiblemente es el olivo, sus frutos, el aceite que se extrae de ellos y los productos o subproductos derivados de sus industrias, aceite de oliva o aceitunas de mesa.

15 Preferiblemente la materia prima es procedente del olivo. Los productos o subproductos derivados del olivo, de la producción de aceite o de aceitunas se pueden seleccionar de entre, pero sin limitarse a los orujos de dos fases (alperujo), orujos de tres fases, alpechín, lejías, aguas de lavado del aderezo de aceitunas, la hoja de olivo procedentes del procesado de aceitunas, los huesos de aceituna o cualquiera de sus combinaciones.

20 Previamente a su utilización en el procedimiento de la invención estos materiales se pueden someter a un pretratamiento, que puede consistir en un tratamiento térmico o a una extracción con disolventes orgánicos.

25 Cuando el pretratamiento del producto inicial se lleva a cabo mediante un proceso térmico, calentamiento por contacto directo o indirecto usando vapor de agua, gases u otros líquidos calefactantes o a través de resistencia eléctrica, a una temperatura de entre 40°C y 200°C, a baja o alta presión, con o sin proceso de explosión al vapor.

Otra realización preferida del procedimiento de la invención, además comprende la regeneración de las columnas de resinas iónicas o adsorbentes, para su reutilización en el mismo procedimiento.

30 La regeneración de las columnas iónicas consiste en un lavado con disolución ácida fuerte o débil y orgánica e inorgánica como por ejemplo, pero sin limitarse a ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico ó ácido nítrico, y cada muchos ciclos de carga y descarga en uno previo con disolución alcalina.

35 Preferiblemente, la regeneración de la resina iónica se lleva a cabo mediante las siguientes etapas:

i. lavado con disolución básica, fuertes o débiles, orgánicas o inorgánicas como por ejemplo, pero sin limitarse a NaOH, KOH, NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, piridina, carbonatos de sodio, magnesio o aluminio; y

40 ii. lavado con disolución ácida, fuerte o débil, y orgánica o inorgánica como por ejemplo, pero sin limitarse a ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico ó ácido nítrico.

45 En el caso de la regeneración de columnas de resina adsorbente no iónica, se realiza mediante un lavado con una disolución de alcohol orgánico, como por ejemplo etanol ó metanol, u otros disolventes como el acetonitrilo, butanol, propanol, hexano, diclorometano, trifluorometano o cloroformo. Si fuera necesario, además puede comprender su lavado con disoluciones fuertemente básicas como por ejemplo, pero sin limitarse a NaOH, KOH, NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, piridina, carbonatos de sodio, magnesio o aluminio.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere al extracto que contiene DHFG obtenible mediante el procedimiento de la invención, con una pureza de entre el 10% y el 100% en peso seco. Preferiblemente con una pureza de entre el 50% y el 100% en peso seco.

55 El DHFG es un antioxidante natural que puede ser utilizado en la conservación de alimentos y en la prevención de ciertas enfermedades humanas, inducidas por radicales libres durante el estrés oxidativo. En este sentido se puede emplear en el desarrollo de alimentos funcionales y en la preparación de diversos preparados tópicos, antienvjecimiento y antiinflamatorios. Dada su similitud con el HT, con un grupo hidroxilo más, y que este compuesto presenta una mayor capacidad antioxidante que el propio HT, al que se le atribuyen interesantes efectos farmacológicos, el DHFG puede tener un papel favorable en la prevención de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y tumorales.

60 El DHFG resulta, por lo tanto, un compuesto interesante susceptible de ser incluido dentro de una dieta saludable con el fin de proteger contra la oxidación lipídica, inducida por el estrés oxidativo, que provoca diversas patologías de alto impacto actual en la población. Además, puede contribuir al emergente y prometedor papel de los antioxidantes en general como herramienta terapéutica contra enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer y el Parkinson. La utilización de un DHFG purificado y barato podría ayudar, al mismo tiempo, a desarrollar nuevas rutas para la preparación de productos biológicamente activos, ayudando a producir nuevas drogas más baratas.

65 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del extracto de DHFG de la invención, para el enriquecimiento nutricional de alimentos, preferiblemente esos alimentos son leche o sus derivados, zumos o grasas.

## ES 2 341 526 A1

Debido a sus propiedades antioxidantes, el extracto de la invención puede utilizarse para el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo. Estas enfermedades son conocidas por cualquier experto en la materia y se pueden seleccionar de la lista que comprende aterosclerosis, procesos trombogénicos e inflamatorios, procesos mutagénicos o carcinogénicos, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo Alzheimer), ictus cerebral isquémico, entre otras.

De esta forma, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del extracto de la invención, para la elaboración de una composición farmacéutica, y preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el extracto de la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente efectivo.

Por “vehículo farmacéuticamente efectivo” se refiere a los adyuvantes y/o vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un alimento funcional que comprende el extracto de la invención, para la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

Por “alimento funcional” se entiende, en la presente invención, a aquellos *alimentos* que son elaborados no sólo por sus *características nutricionales* sino también para cumplir una función específica como puede ser el mejorar la *salud* y reducir el riesgo de contraer *enfermedades*. Para ello se les agregan componentes biológicamente activos, en este caso se le añade DHFG que es un *antioxidante*.

Otros usos del extracto de la invención vendrán dados por sus propiedades antioxidantes.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Esquema de cuatro posibles combinaciones del procedimiento de purificación de DHFG a nivel de laboratorio.

Fig. 2. Esquema y balance del sistema llevado a cabo a nivel semiindustrial o de planta piloto.

### Ejemplos

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

El procedimiento de obtención de DHFG purificado se ha desarrollado a partir de una muestra de alperujo sometida a un tratamiento térmico. Se han desarrollado dos tipos de experiencias, una a nivel de laboratorio en la que se han seleccionado cuatro de las mejores combinaciones de los tres tipos de resina, y la otra a nivel de planta piloto o semiindustrial. Ésta última se ha llevado a cabo seleccionando una de las mejores opciones en función a su simplicidad, reproducibilidad y reducción de costos.

#### A) Experiencia a nivel de laboratorio

Unos 7 Kg de alperujo se sometieron a un tratamiento térmico a 70°C durante dos horas. Una vez finalizado se centrifugó obteniendo una disolución de 4,75 L con una concentración de DHFG de 0,2 g/L y un sólido residual con un 50% de humedad, lo cual implica que había 950 mg de dicho compuesto en lo que constituye la muestra denominada A1. Se repitió la experiencia cuatro veces para llevar a cabo los cuatro esquemas de la Figura 1:

A1: muestra inicial, fuente de DHFG (fracción acuosa).

C1: columna de resina iónica fuerte en donde el compuesto se eluye preferentemente con agua.

C2: columna de adsorción tipo XAD, en donde o bien únicamente retiene otros compuestos eluyéndose el DHFG con el propio licor de carga o bien, parte o todo es necesario eluirlo de la columna preferentemente con agua.

## ES 2 341 526 A1

C3: columna de resina iónica débil en donde el compuesto se eluye preferentemente con agua, y es donde se produce el mayor salto de pureza del compuesto.

DHFG I-IV: fracciones del compuesto purificado con un rango de pureza de 10-100%.

5

### *Descripción de cada esquema*

#### Esquema I

10 1<sup>er</sup> Paso: La muestra A1 se introdujo en la primera columna (C1) con 1 L de resina iónica fuerte. El DHFG quedó completamente retenido en la columna. Se realizaron lavados con agua. Se unieron las fracciones centrales más puras desechando unos 360 mg más impurificados más unos 136 mg que no se llegaron a eluir de la columna. La fracción resultante (B1) fue de 7,85 L con unos 454 mg de DHFG con una pureza de entre un 5 y un 20% en peso seco.

15 2<sup>o</sup> Paso: La fracción B1 se hizo pasar a través de una columna (C2) con 3 L de resina tipo XAD en donde el DHFG quedó totalmente retenido. Tras eluir con agua se obtuvo una fracción (B2) de 8,5 L que contienen 257 mg del compuesto con una pureza de 20-30% en peso seco.

20 3<sup>er</sup> Paso: B2 se concentró antes de ser pasada a través de la columna (C3) de 0,5 L de resina iónica débil, en donde se obtuvo una fracción de 150 mg de DHFG-I con una pureza de un 60-80%.

#### Esquema II

25 1<sup>er</sup> Paso: Se partió de la misma muestra A1 y se hizo pasar por la misma columna (C1) que en el caso anterior, obteniendo la misma fracción B1.

30 2<sup>o</sup> Paso: En este caso la fracción B1 se concentró antes de su pase por una columna (C3) con 0,9 L de resina iónica débil. La fracción concentrada presentó 412 mg de DHFG en 1,45 L. El DHFG quedó totalmente retenido en la columna. Tras eluir con agua se obtuvo una fracción (D1) de 5 L que contienen 300 mg del compuesto con una pureza de 15-30% en peso seco.

3<sup>er</sup> Paso: D1 se pasó a través de la columna (C2) de 1,9 L de resina adsorbente tipo XAD. Tras la elución con agua se obtuvo una fracción de 180 mg de DHFG-II con una pureza de un 70-90%.

#### Esquema III

40 1<sup>er</sup> Paso: La muestra A1 se introdujo en la primera columna (C3) con 2,6 L de resina iónica débil, en donde el DHFG quedó completamente retenido. Se realizaron lavados con agua. Se unieron las fracciones centrales más puras desechando unos 243 mg más impurificados más unos 147 mg que no se llegaron a eluir de la columna. La fracción resultante (E1) fue de 6,25 L con unos 560 mg de DHFG con una pureza de entre un 5 y un 20% en peso seco.

45 2<sup>o</sup> Paso: La fracción E1 se hizo pasar a través de la columna C1 con 1,9 L de resina iónica fuerte en donde el DHFG quedó totalmente retenido. Tras eluir con agua se obtuvo una fracción (E2) de 11,36 L que contienen 345 mg del compuesto con una pureza de 20-40% en peso seco.

3<sup>er</sup> Paso: E2 se pasó a través de la columna (C2) de 2,3 L de resina adsorbente tipo XAD. Tras la elución con agua se obtuvo una fracción de 273 mg de DHFG-III con una pureza de un 70-90%.

#### Esquema IV

50 1<sup>er</sup> Paso: Se repitió la misma experiencia en el primer paso del esquema III obteniendo una fracción resultante (E1) de 6,25 L con 560 mg de DHFG con una pureza de entre un 5 y un 20% en peso seco.

55 2<sup>o</sup> Paso: La fracción E1 se hizo pasar a través de una columna (C2) con 3 L de resina tipo XAD en donde el DHFG queda totalmente retenido. Tras eluir con agua se obtuvo una fracción (F1) de 16 L que contienen 537 mg del compuesto con una pureza de 50-70% en peso seco.

60 Antes de cada columna la disolución que contiene al DHFG puede concentrarse disminuyendo la cantidad de resina a utilizar. Las disoluciones finales obtenidas pueden también concentrarse para aumentar su concentración en dicho compuesto. Siempre que se realice una operación de concentración ha de mantenerse un valor de pH de entre 6 y 6,5 para evitar degradaciones. Por el mismo motivo el producto ha de conservarse a un pH siempre inferior a 6,5, y si es posible en frío o congelado.

#### B) *Experiencia a nivel semiindustrial*

65 La experiencia se llevó a cabo partiendo de una fracción líquida obtenida de la misma forma que en las experiencias anteriores con un alperujo diferente. En base a los resultados obtenidos en laboratorio se estableció como una combinación óptima de las resinas la que aparece en la Figura 2. Esta combinación reduce las etapas de concentración,

## ES 2 341 526 A1

evita que la resina de tipo iónica débil esté en contacto con grandes cantidades de otros compuestos fenólicos que dificultan su regeneración, y simplifica el tamaño y uso de la resina del tipo XAD. Con este esquema se reduce los costos de operación resultando un sistema sencillo y económico en el que el agua es el único eluyente.

5 En la Figura 2, C1, C2 y C3 son el mismo tipo de columnas que en la Figura 1.

Se trataron unos 250 Kg de alperujo en varias tandas. Tras la centrifugación se obtuvo una fracción (G0) de 150 L con una concentración de 0,45 g/L de DHFG que constituye la fuente de partida de esta experiencia (Figura 2):

10 1<sup>er</sup> Paso: La muestra G0 se introdujo en la primera columna (C1) con 90 L de resina iónica fuerte. El DHFG quedó completamente retenido en la columna. Se realizaron lavados con agua. Se unieron las fracciones centrales más puras resultando una fracción G1 de 325 L con unos 32 g de DHFG con una pureza de entre un 5 y un 20% en peso seco.

15 2<sup>o</sup> Paso: La fracción G1 se hizo pasar a través de una columna (C2) con 20 L de resina tipo XAD en donde la mayor parte de DHFG no se retiene. Se recoge la misma fracción de partida más 30 L de lavado con agua, obteniendo una fracción G2 de 355 L con 25 g del compuesto con una pureza de entre 20-40% en peso seco.

20 3<sup>er</sup> Paso: G2 hizo pasar a través de la columna (C3) de 30 L de resina iónica débil, en donde se retiene todo el compuesto y recoge tras eluir con agua una fracción DHFG-P de 235 L con 15 g de DHFG con una pureza de un 80-95%.

25 4<sup>o</sup> Paso: Para aumentar la pureza de esta última fracción se concentró DHFG-P hasta 10 L con 13 g del compuesto. El concentrado se pasó a través de una columna (C3) con 2 L de resina aniónica débil. El compuesto se retuvo por completo y tras su elución con agua se obtuvo finalmente una fracción de 10 g de DHFG puro con una pureza comprendida entre 95-100% en peso seco.

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 341 526 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de DHFG purificado a partir de un producto inicial procedente de especies vegetales seleccionada de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae*, *Scrophulariaceae* o sus combinaciones, **caracterizado** porque comprende:
- a. introducir el producto inicial en una columna de resina iónica;
  - b. eluir el compuesto retenido en la columna del paso (a).
- 10 2. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 1, donde la disolución eluida del paso (b) se hace pasar por una segunda columna que contiene una resina que se selecciona de entre una resina iónica o de una resina de adsorción no iónica y posteriormente se eluye el compuesto retenido.
- 15 3. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 2, donde la disolución eluida de la segunda columna se hace pasar por una tercera columna que contiene una resina que se selecciona de entre una resina iónica o de una resina de adsorción no iónica y posteriormente se eluye el compuesto retenido.
- 20 4. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 3, donde la disolución eluida de la tercera columna se hace pasar por una cuarta columna que contiene una resina que se selecciona de entre una resina iónica o de una resina de adsorción no iónica y posteriormente se eluye el compuesto retenido.
- 25 5. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la elución del producto retenido en la columna se lleva a cabo con agua.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la resina iónica es una resina iónica fuerte o una resina iónica débil.
- 30 7. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la resina de adsorción no iónica es de tipo XAD.
- 35 8. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el producto inicial procedente de especies vegetales de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae* o *Scrophulariaceae* es de la planta entera, la parte aérea, las hojas, las flores, las semillas o los frutos.
9. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el producto inicial procede del olivo o de los productos y/o subproductos obtenidos de la producción de aceite de oliva.
- 40 10. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 9, donde el producto inicial es orujo de dos fases (alperujo).
11. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 9, donde el producto inicial es orujo de tres fases, sus alpechines o combinación de ambos.
- 45 12. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 9, donde el producto inicial son huesos de aceitunas.
13. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 9, donde el producto inicial son hojas, ramones, madera de olivo o cualquiera de sus combinaciones.
- 50 14. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 9, donde el producto inicial son las soluciones del proceso de elaboración de aceituna para alimentación.
- 55 15. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el producto inicial se somete a pretratamiento antes de introducirlo en la primera columna.
16. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 15, donde el pretratamiento es un proceso térmico o una extracción acuosa u orgánica.
- 60 17. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 16, donde el proceso térmico es un proceso de calentamiento por contacto directo o indirecto usando vapor de agua, gases u otros líquidos calefactantes o a través de resistencia eléctrica, a una temperatura de entre 40°C y 200°C.
- 65 18. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que además comprende la regeneración de las columnas de resinas, de intercambio iónico o adsorbente, para su reutilización en el mismo procedimiento.

## ES 2 341 526 A1

19. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 18, donde la regeneración de la resina iónica se lleva a cabo mediante lavado con disolución ácida.

5 20. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 19, donde la disolución ácida es de ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido cítrico o ácido nítrico.

21. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde previamente al lavado en una disolución ácida se realiza un lavado con disolución básica.

10 22. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 18, donde la regeneración de la resina adsorbente se lleva a cabo mediante su lavado con disoluciones acuosas que contienen disolventes orgánicos.

15 23. Procedimiento de obtención de DHFG según la reivindicación 22, donde los disolventes orgánicos se seleccionan de la lista que comprende etanol, metanol, acetonitrilo, butanol, propanol, hexano, diclorometano, trifluorometano o cloroformo.

24. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, donde la regeneración de la resina adsorbente además comprende su lavado con disolución básica.

20 25. Procedimiento de obtención de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 24, donde la disolución básica es de NaOH, KOH, NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, piridina o carbonatos de sodio, magnesio o aluminio.

25 26. Extracto de DHFG obtenible mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, con una pureza de entre el 10% y el 100% de riqueza en peso seco total.

27. Extracto según la reivindicación 26, donde DHFG está en un pureza de entre el 50% y el 90% de riqueza en peso seco total.

30 28. Uso del extracto según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, para el enriquecimiento nutricional de alimentos.

29. Uso según la reivindicación 28, donde los alimentos se seleccionan de entre leche o sus derivados, zumos o grasas.

35 30. Uso del extracto según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, para la elaboración de una composición farmacéutica.

40 31. Uso del extracto según la reivindicación 30, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

32. Composición farmacéutica que comprende un extracto según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, junto con un vehículo farmacéuticamente efectivo.

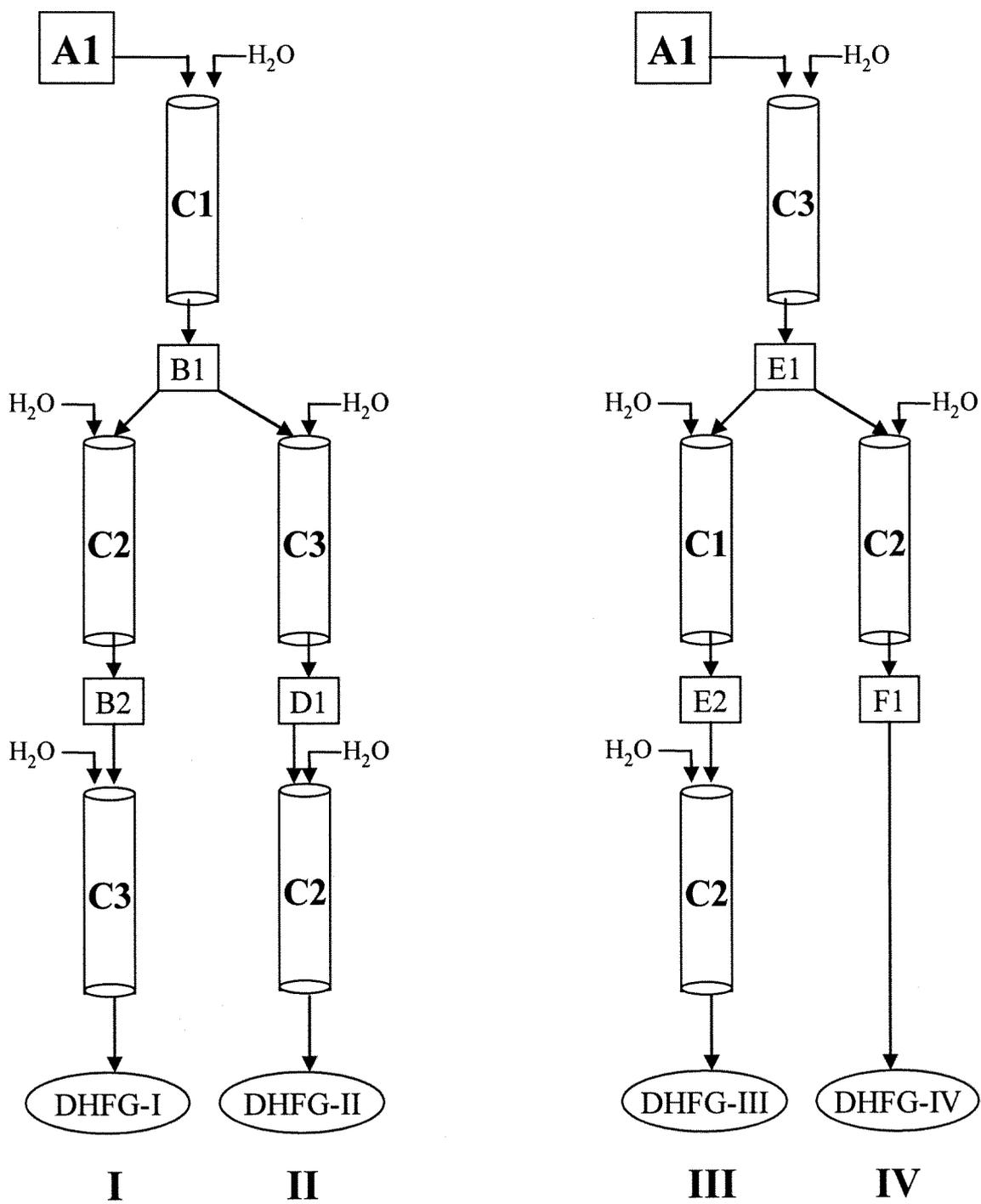
45 33. Alimento funcional que comprende un extracto según cualquiera de las reivindicaciones 26 o 27, para la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo.

50

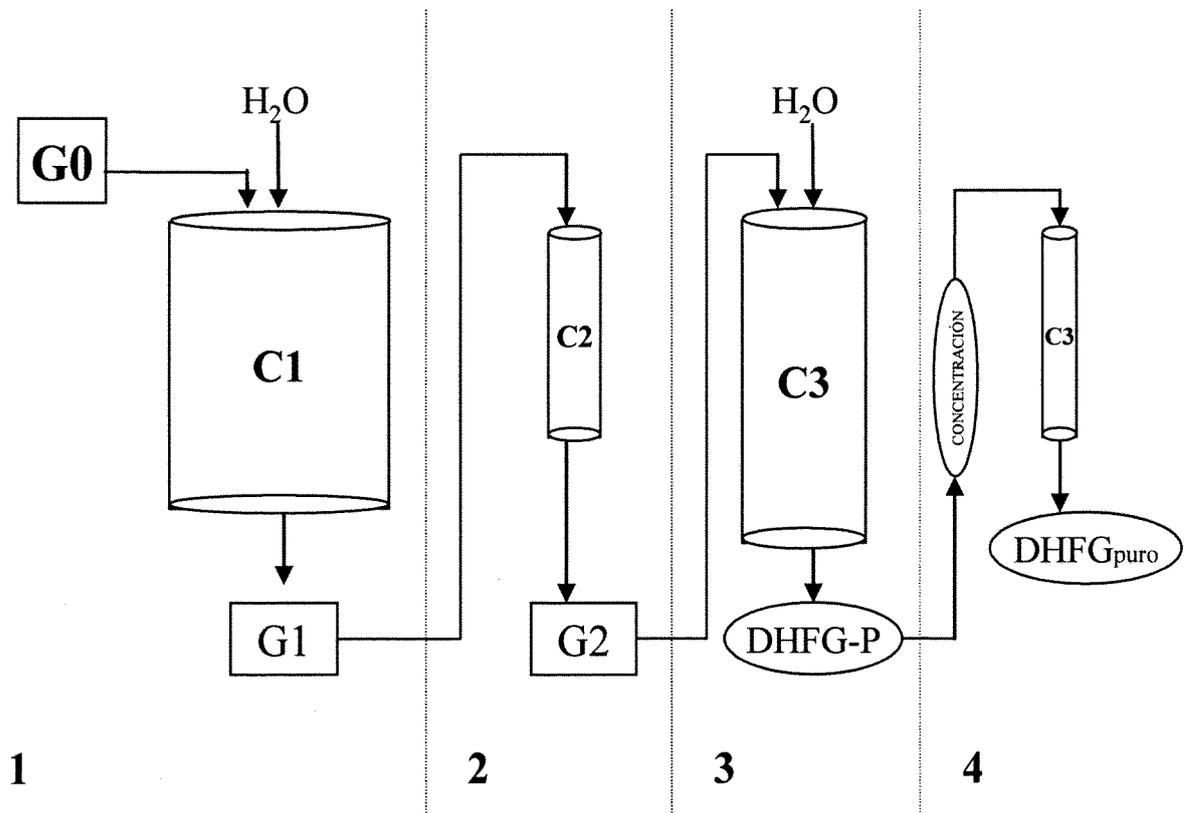
55

60

65



**FIG. 1**



**FIG. 2**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 341 526

② Nº de solicitud: 200803630

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.12.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 02/064536 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)) 22.08.2002. Página 2, línea 22 a página 9, línea 25; reivindicaciones 1,3-6,13-15, 20-22, 28,32.	1,15-17 26-33
Y		2-14,18-25
Y	WO 02/064537 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 22.08.2002. Página 1, línea 3-23; página 5, línea 14 a página 9, línea 6; reivindicaciones 1-6.	2-14,18-25
A	ES 2172429 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 16.09.2002. Todo el documento.	1-2
A	ES 2291111 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA HOSPITAL REAL) 16.02.2008. Todo el documento.	1
A	ES 2283191 A1 (ANTAS PHARMA, S.A.) 16.10.2007. Todo el documento.	1

#### 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

16.03.2010

Examinador

A. Amaro Roldán

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 8/34** (2006.01)

**A61K 8/97** (2006.01)

**C07C 37/82** (2006.01)

**A61K 36/63** (2006.01)

**A61K 36/28** (2006.01)

**A61K 36/185** (2006.01)

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

A61K, 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 NPL, BIOSIS, STN

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.03.2010

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-33	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-33	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

#### Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

#### Consideraciones:

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) purificado a partir de un extracto obtenido de un producto inicial procedente de especies vegetales seleccionadas de la familia Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Compositae, Lamiaceae, Acanthaceae, Scrophulariaceae o sus combinaciones, caracterizado porque comprende: a) introducir el producto inicial en una columna de resina iónica, y b) eluir el compuesto retenido en la columna del paso (a) (reivindicación 1).

La disolución eluida en (b) se hace pasar por una segunda columna que contiene una resina iónica (que puede ser resina iónica fuerte o resina iónica débil (reivindicación 6), o de adsorción no iónica, por ejemplo del tipo XAD (reivindicaciones 2 y 7), repitiéndose este proceso opcionalmente con otras dos columnas más (reivindicaciones 3-4), eluyendo el compuesto retenido en la columna con agua en todos los casos (reivindicación 5). El número de columnas cromatográficas que se utilizan depende de la pureza con la que se desee obtener el producto final (p.5, l.13-15).

El producto inicial de las mencionadas familias puede ser la planta entera, la parte aérea, las hojas, las flores, las semillas o los frutos (reivindicación 8). Concretamente, el producto inicial procede de los productos y/o subproductos obtenidos en la producción del aceite de oliva, tales como el orujo de dos fases, el orujo de tres fases, los huesos de aceitunas, las soluciones del proceso de elaboración de la aceituna para alimentación, las hojas del olivo, etc (reivindicaciones 8-14).

Previamente a su utilización en el procedimiento de la invención, el producto inicial se puede someter a un pretratamiento, que puede consistir en un tratamiento térmico (usando vapor de agua u otros líquidos o gases a una temperatura entre 40°C y 200°C) o una extracción con agua o disolventes orgánicos (reivindicaciones 15-17).

La regeneración y lavado de las columnas, para su reutilización en el mismo procedimiento, se puede llevar a cabo mediante un lavado con una disolución ácida, precedida o no de un lavado con una disolución básica, o mediante lavado con disoluciones acuosas que contienen disolventes orgánicos (reivindicaciones 18 a 25). Así, se obtiene el extracto de DHFG con una pureza entre 10% y 100% (reivindicaciones 26-27) que se utiliza en alimentos y en composiciones farmacéuticas para la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (reivindicaciones 28-33).

**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	WO 02/064536 A1	22-08-2002
D02	WO 02/064537 A1	22-08-2002
D03	ES 2172429 A1	16-09-2002
D04	ES 2291111 A1	16-02-2008
D05	ES 2283191 A1	16-10-2007

**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**

## DOCUMENTOS CITADOS

D01 se refiere a un procedimiento de extracción, fraccionamiento y purificación de compuestos polifenólicos a partir de plantas de la familia Compositae que comprende las etapas siguientes: a) extracción de los compuestos fenólicos para obtener un extracto vegetal bruto; b) adsorción sobre una resina que adsorba los compuestos fenólicos contenidos en el extracto bruto; c) elución de los compuestos fenólicos retenidos en la resina para obtener un extracto purificado; y d) concentración y eventual secado del extracto purificado para obtener un producto rico en compuestos fenólicos, caracterizado en que la resina es una resina de estireno-divinilbenceno con características determinadas (reivindicación 1). La tasa de adsorción de los compuestos fenólicos sobre la resina es igual o superior al 80%, y la tasa de elución es igual o superior al 60% (reivindicación 2). La etapa (a) puede comprender una etapa de calentamiento del producto inicial de 25°C hasta 105°C (reivindicación 5). La etapa de extracción se puede llevar a cabo de manera continua o discontinua (reivindicación 13). Para la etapa de elución se eligen disolventes alimentarios, tales como el agua y/o el metanol o el etanol (reivindicación 14 y pág.15, lín.10-16). El extracto purificado posee un contenido de compuestos fenólicos igual o superior al 30% (reivindicación 20). El extracto purificado a partir de plantas de la familia Compositae se utilizan para la fabricación de productos cosméticos, ingredientes alimentarios o compuestos farmacéuticos (reivindicación 32 y pág.8, lín.31-33).

D02 (que es una patente de adición a D03) se refiere a un procedimiento de obtención del hidroxitirosol (HT) purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo, que consiste en las siguientes etapas: a) introducción de la fuente de hidroxitirosol en una columna de intercambio iónico en forma no activada, obteniéndose tras eluir con agua una disolución que contiene al menos 85% del hidroxitirosol presente en la fuente de HT introducida en la columna, obteniéndose un hidroxitirosol de un 60-70% de riqueza; y b) introducción de la disolución conteniendo el HT de la etapa anterior en una segunda columna de resina no iónica y posterior elución con mezcla de metanol o etanol y agua (del 30 al 33%), obteniéndose una disolución que contiene al menos el 75% del HT presente en la fuente del hidroxitirosol introducida en la primera etapa y con una pureza mínima mínima del 95%. (reivindicación 1). En dicho procedimiento, previamente al tratamiento en las columnas, la fuente de TH se puede someter a un proceso de explosión al vapor (reivindicación 2); la resina iónica no activada es una resina de intercambio aniónico fuerte y la resina no iónica es una columna de resina Amberlita XAD (reivindicaciones 2-4). Además, la resina de intercambio aniónico se regenera mediante un tratamiento en dos etapas: a) lavado con NaOH al 2%, y b) lavado con ácido fuerte (reivindicación 5).

D03 se refiere a un procedimiento de obtención de hidroxitirosol (HT) purificado a partir de productos y subproductos derivados del olivo mediante tratamiento cromatográfico en tres pasos. Se utiliza un método cromatográfico sobre resina absorbente XAD (en dos pasos), seguida de una elución con agua. Una posterior cromatografía en fase reversa (un paso) sobre resina de poliestireno y elución con un gradiente de metanol permite obtener un extracto de HT que se concentra y purifica (resumen). El procedimiento de obtención del HT a partir de productos y subproductos derivados del olivo puede caracterizarse porque se lleva a cabo con orujo de dos fases o alperujo, orujo de tres fases, o con huesos de aceituna (reivindicaciones 2-4).

D04 se refiere a un procedimiento que permite el aprovechamiento de los biofenoles tirosol e hidroxitirosol contenidos en los subproductos industriales resultantes de la molturación y procesado de la aceituna, ya sean procedentes de prensas, de tres fases o de dos fases y de sus orujos y orujillos. Dicho procedimiento consiste fundamentalmente en extracciones selectivas y fraccionamiento de las mezclas resultantes mediante disolventes.

## Hoja adicional

D05 se refiere a una biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos tales como tirosol, ácido p-hidroxibenzoico, ácido cis- o trans-caféico, HT y DHFG, entre otros. Dicha biomasa se obtiene mediante un procedimiento que comprende añadir una mezcla de vitamina E y ascorbil palmitato a la pasta de olivas trituradas previamente a su centrifugación para separar el aceite de la biomasa. Además proporciona formulaciones que comprenden dicha biomasa y su uso en aplicaciones farmacéuticas, alimentarias o cosméticas.

## NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados cita exactamente el procedimiento de obtención del 3,4-dihidroxifenilglicol tal y como se describe en la invención de la presente solicitud por lo que las reivindicaciones 1-33 se consideran nuevas según el Art.33(2) del PCT.

## ACTIVIDAD INVENTIVA

D01 describe un procedimiento de obtención y purificación de compuestos polifenólicos a partir de plantas de la familia de Compositae (ver documentos citados). Dicho procedimiento es similar al de la reivindicación 1 con la diferencia de que se refiere a compuestos polifenólicos y no al 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) en concreto como en la invención de la presente solicitud. Por lo tanto, se considera que para el experto en la materia no requiere ningún esfuerzo inventivo adaptar el procedimiento para la obtención de polifenoles en general descrito en D01 al del DHFG en particular, objeto de la presente solicitud. Por lo tanto, en vista de lo mencionado sobre D01 en el apartado de documentos citados, se considera que las reivindicaciones 1, 15-17 y 26-33 no cumplen con los requisitos del Art. 33(3) PCT respecto a la actividad inventiva.

Además, considerando que en el documento D02 (ver documentos citados), existen conocimientos expuestos para el experto en la materia antes de la fecha de presentación de la presente solicitud que son obvios combinar con D01, dado que D02 trata de la obtención de un compuesto fenólico concreto (el hidroxitirasol), como la presente solicitud, se concluye que las reivindicaciones 2-14 y 18-25 son obvias para el experto en la materia, por lo que carecen de actividad inventiva según el Art.33(3) PCT.