

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 996 007**

21 Número de solicitud: 202300064

51 Int. Cl.:

C09K 23/00 (2012.01)
B01J 47/014 (2007.01)
A23L 29/10 (2006.01)
A61K 8/9794 (2007.01)
A61K 36/899 (2006.01)
A01N 25/30 (2006.01)
C11D 1/00 (2006.01)
C02F 1/26 (2013.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

04.08.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.02.2025

Fecha de concesión:

04.06.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.06.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE VIGO (100.00%)
 Campus Universitario de Vigo s/n
 36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**VECINO BELLO, Xanel;
 CRUZ FREIRE, José Manuel;
 MOLDES MENDUIÑA, Ana Belén y
 MARTÍNEZ ARCOS, Andrea**

54 Título: **Protocolo para la obtención de un extracto biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz, mediante extracción líquido-sólido, utilizando matrices sólidas poliméricas**

57 Resumen:

En esta invención se describe el protocolo a seguir para la obtención de un extracto biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz mediante su separación con diferentes matrices sólidas poliméricas (extracción líquido-sólido) y posterior desorción del extracto biosurfactante contenido en la matriz polimérica mediante extracción sólido-líquido. El disolvente utilizado en la regeneración del polímero y elución del extracto biosurfactante es separado mediante destilación o evaporación dando lugar a un extracto biosurfactante libre de disolvente que es capaz de reducir la tensión superficial del agua en más de 15 unidades y con una concentración micelar crítica (CMC), en las condiciones más favorables, inferior a 200 mg/L.

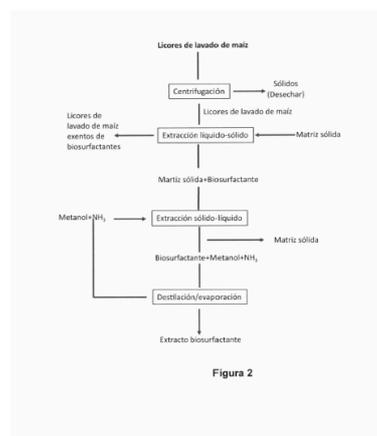


Figura 2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 996 007 B2

DESCRIPCIÓN

5 Protocolo para la obtención de un extracto biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz, mediante extracción líquido-sólido, utilizando matrices sólidas poliméricas

Sector de la técnica

10 La presente invención se incluye en el ámbito de la obtención de surfactantes de origen natural a partir de corrientes líquidas fermentadas. El objetivo principal de esta invención es la obtención de un extracto biosurfactante a partir de los licores de lavado de maíz mediante extracción líquido-sólido utilizando distintas matrices poliméricas y posterior desorción del extracto biosurfactante utilizando distintos eluyentes.

15 Antecedentes de la invención

20 Los licores de lavado de maíz, producidos como sub-producto o materia prima secundaria durante el procesado de maíz por vía húmeda, constituyen una fuente interesante de compuestos bioactivos entre los que se incluyen compuestos con capacidad surfactante los cuales al ser producidos a partir de una corriente natural fermentada espontáneamente tienen la connotación de biosurfactantes. Los compuestos biosurfactantes, a diferencia de los surfactantes químicos, están constituidos por compuestos naturales producidos por microorganismos o extraídos de células vegetales. En los últimos años se han recogido varios métodos para la extracción de estos biosurfactantes obteniéndose diferentes extractos en función del proceso de separación propuesto. Los procesos de extracción están recogidos en varias patentes (ES-2424399_B2, ES-2435324_B2, EP 28262624_B1-WO2014044876_A1, ES- 2527366_B1, ES-2739050_B2, ES-2795574_A1).

30 Las primeras publicaciones relacionadas con la actividad surfactante de los licores de lavado de maíz fueron recogidas en una patente (ES-2424399_B2) presentada en el año 2012 y publicadas con posterioridad en el año 2014 en el Journal Agricultural and Food Chemistry (Vecino y col. 2014). En estas publicaciones no se hace referencia ni se propone métodos de extracción de los extractos biosurfactantes contenidos en los licores de lavado de maíz. Simplemente se aportan datos que demuestran la capacidad tensoactiva de los licores de lavado de maíz reivindicando, en la patente ES- 2424399_B2, su uso directo como agente tensoactivo, detergente o surfactante.

40 Posteriormente en la patente nacional EP-28262624_B1 y patente europea WO2014044876_A1 se propone la obtención de extractos biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz, utilizando distintos agentes extractantes entre los que se incluyen los siguientes disolventes: alcohol isoamílico, cloroformo, 1,2-dicloroetano, acetato de etilo, tetrahidrofurano, fosfato de tributilo, metil butil éter, éter dietílico, tricloroetano, hexano, heptano, xileno, diclorometano. El proceso comprende la obtención de extractos biosurfactantes mediante extracción líquido-líquido y posterior separación del extracto biosurfactante y recuperación del disolvente mediante destilación. Los usos de estos extractos biosurfactantes están recogido en varias publicaciones con potencial aplicación en la industria cosmética, la industria farmacéutica y la industria relacionada con la limpieza de suelos. Los extractos biosurfactantes obtenidos mediante este procedimiento están constituidos por lipopéptidos, fosfolípidos, así como por otros biocompuestos entre los que se incluyen antioxidantes. La caracterización de estos extractos fue publicada en el año 2020 en la revista Separation and Purification Technology (Rodríguez-López y col. 2020); además información relacionada con la composición de estos extractos está recogida en la patente ES-2527366_B1. El extracto obtenido según se recoge en la bibliografía

tiene un aspecto oleoso de color marrón-naranja (Knoth y col. 2019, International Journal of Pharmaceutics).

5 Por otra parte, en la patente ES-2795574_A1 se recoge la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz empleando diferentes disoluciones acuosas tamponadas, evitando el uso de disolventes orgánicos. En esta patente la extracción del extracto biosurfactante se lleva a cabo a partir de la fracción sólida contenida en los licores de lavado de maíz la cual incluye biomasa microbiana, que contiene compuestos bioactivos adheridos a su membrana plasmática que son extraídos con las disoluciones tamponadas aplicadas. Tras la
10 extracción de los compuestos biosurfactantes, el extracto separado de la biomasa, es sometido a un proceso de diálisis para la eliminación de sales y otros compuestos de bajo peso molecular. Tras la diálisis el extracto acuoso que contiene los compuestos biosurfactantes puede ser liofilizado para una mejor conservación y manejo. El extracto obtenido, una vez liofilizado, es un polvo blanco- amarillo con una composición diferente, según se recoge en dicha patente, al
15 obtenido siguiendo la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos.

Además, en los licores de lavado de maíz se ha detectado la presencia de fosfolípidos y lecitina, los cuales son compuestos naturales con capacidad surfactante, cuyo proceso de extracción se recoge en la patente ES-2739050_B2. En dicha patente se reivindica el uso de los licores de
20 lavado de maíz, como fuente de lecitina y fosfolípidos para su aplicación en el campo cosmético y alimentario. El proceso aplicado en esta invención para la obtención de un extracto biosurfactante a base de lecitina y fosfolípidos consiste en una extracción con disolventes orgánicos (cloroformo, acetato de etilo, etc.), seguido de una destilación o evaporación del disolvente y posterior precipitación del extracto biosurfactante con acetona. Además, y con
25 posterioridad a la fecha de solicitud de dicha patente, se ha publicado un trabajo en la revista Separation and Purification Technology (Rodríguez-López y col. 2020) sobre la extracción y caracterización de este extracto biosurfactante a base de fosfolípidos y lecitina extraído de los licores de lavado de maíz.

30 Respecto a la utilización de procesos de extracción líquido-sólido para la obtención de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz se ha publicado un trabajo en el año 2021 en la revista Water (Martínez-Arcos y col. 2021) que recoge el uso de polímeros de alginato cálcico y polímeros de alginato cálcico combinado con bagazo de uva oxidado biológicamente para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz, con porcentajes
35 de extracción del 55%.

En la Figura 1 se muestra en forma de diagrama de flujo los procesos según las patentes EP-28262624_B1-WO2014044876A1, ES-2795574_A1 para la obtención de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz. En este diagrama se recogen 2 tipos de extractos
40 biosurfactantes. Un primer extracto biosurfactante producido de forma extracelular y extraído de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz mediante extracción líquido-líquido y un segundo extracto biosurfactante obtenido de la fracción sólida de los licores de lavado de maíz mediante disoluciones acuosas tamponadas.

45 **Explicación de la invención**

Se evalúan distintas matrices sólidas de la casa comercial Phenomenex, para la extracción de biosurfactantes a partir de licores de lavado de maíz seleccionándose un polímero de intercambio
50 aniónico débil que acopla un esqueleto hidrofóbico con un ligando di-amino que contiene aminas primarias y secundarias (Strata-X-AW - Phenomenex), como mejor opción ya que permite recuperar en su totalidad los biosurfactantes presentes en los licores de lavado de maíz.

Explicación detallada de la invención

5 En primer lugar, se llevó a cabo una preselección de las matrices sólidas poliméricas de la casa comercial Phenomenex (Strata-XL, Strata-XL-C, Strata-XL-CW, Strata-X-A, Strata-X-AW, Strata C18-E, Strata Phenyl, Strata NH2), cuyas características se recogen en la Tabla 1. Para ello se pusieron en contacto a temperatura ambiente, durante 5 minutos las diferentes matrices sólidas poliméricas con los licores de lavado de maíz exentos de sólidos, utilizando diferentes concentraciones de matriz sólida de entre 4 y 20 g/L.

10 Para separar la fase sólida de los licores de lavado de maíz puede utilizarse cualquier proceso de separación sólido-líquido conocido en la técnica, tal como centrifugación o filtración.

15 Tras el contacto de los licores de lavado de maíz con las diferentes matrices sólidas poliméricas se midió la tensión superficial de los licores para verificar la presencia o ausencia de biosurfactantes.

20 Aquellas matrices con capacidad de extraer los biosurfactantes de los licores de lavado de maíz indujeron un incremento de la tensión superficial de los licores de lavado de maíz tras contacto con las mismas. La tensión superficial de los licores de lavado de maíz exentos de sólidos está en torno a 50 mN/m, tras contacto con las matrices sólidas poliméricas, esta tensión superficial se incrementó hasta 70-72 mN/m.

Tabla 1. Diferentes matrices sólidas poliméricas empleadas con sus características.

Matriz sólida polimérica	Características
Strata-XL	Matriz polimérica de fase inversa funcionalizada con compuestos hidrocarbonados.
Strata-XL-C	Matriz de intercambio catiónico fuerte, que combina una columna vertebral hidrófoba con un grupo funcional de ácido sulfónico (-O ₃ S).
Strata-XL-CW	Matriz de intercambio catiónico débil, que acopla una columna vertebral hidrófoba con un grupo funcional de ácido carboxílico (-O ₂ C).
Strata-X-A	Matriz polimérica de intercambio aniónico fuerte, que acopla una espina dorsal hidrófoba con un grupo funcional de amina cuaternaria dimetilbutilada (*R ₃ N).
Strata-XL-A	Matriz de intercambio aniónico fuerte, que acopla una espina dorsal hidrófoba con un grupo funcional de amina cuaternaria de dimetilbutil (*R ₃ N).
Strata-X-AW	Matriz de intercambio aniónico débil, que acopla una columna vertebral hidrófoba con

	un ligando diamino que contiene aminas primarias y secundarias ($+H_3N$).
Strata C18-E	Matriz que ofrece una fuerte retención hidrofóbica con interacciones polares secundarias insignificantes con grupos silanol activos.
Strata Phenyl	Matriz con una cadena alquílica corta con un grupo fenilo que proporciona una moderada selectividad hidrófoba y selectividad aromática mediante interacciones π - π .
Strata NH_2	Matriz que ofrece una fuerte selectividad polar y enlace de hidrógeno de hidrógeno en condiciones de fase normal o puede utilizarse como matriz de intercambio aniónico ($+H_3N$).

Tabla 2. Porcentaje de biosurfactante atrapado por las matrices sólidas poliméricas a partir de los licores de lavado de maíz.

5

Matriz sólida polimérica	Porcentaje de biosurfactante extraído (%)
Strata-XL	< 25
Strata-XL-C	> 90
Strata-XL-CW	< 50
Strata-X-A	> 90
Strata-X-AW	> 95
Strata C18-E	< 50
Strata Phenyl	< 50
Strata NH_2	> 85

De entre las matrices sólidas poliméricas evaluadas las que proporcionaron mejores resultados fueron las matrices sólidas tipo Strata-X-AW, seguida de la Strata-X-A y la Strata XL-C. En la Tabla 2 se recogen los porcentajes de extracción de biosurfactante detectados en los licores de lavado de maíz tras contacto con las diferentes matrices sólidas poliméricas evaluadas. Como se puede observar el extracto biosurfactante puede ser atrapado por matrices tanto de intercambio aniónico como catiónico lo cual está en consonancia con su carácter anfotérico

10

demostrado en un trabajo previo (Rodríguez-López y col. 2016) publicado en el Journal of Surfactants and Detergents.

5 En este trabajo se extrajeron los extractos biosurfactantes de los licores de lavado de maíz con cloroformo, y tras destilación de la fase orgánica, el extracto biosurfactante se diluyó en agua y se puso en contacto con las resinas Amberlita IRA 400 y Amberlita IR 120, de naturaleza aniónica y catiónica, respectivamente. Tras el proceso de extracción líquido-sólido se comprobó que
10 ambas resinas eran capaces de extraer los compuestos biosurfactantes presentes en la disolución acuosa alcanzándose valores de tensión superficial de 72 mN/m. Resaltar que en este trabajo las resinas no se han aplicado sobre los licores de lavado de maíz sino sobre el extracto biosurfactante sometido a un proceso de extracción con cloroformo con el fin de estudiar su carácter iónico.

15 Con las matrices sólidas que dieron mejores resultados se llevaron a cabo estudios más amplios para optimizar las condiciones de operación, ensayándose diferentes temperaturas entre las que se incluye temperatura ambiente en el rango 18-27 °C, así como 40 °C. También se llevaron a cabo ensayos con diferentes relaciones sólido- líquido hasta conseguir reducir la relación sólido-líquido a 0.01 g/mL (1:100 g/mL) y aplicando diferentes tiempos de extracción (5 min, 30 min, 1 h, 4 h, 24 h).

20 Una vez atrapados los biosurfactantes en la matriz sólida, se probaron distintos eluyentes con el fin de recuperar el extracto biosurfactante.

25 Los agentes eluyentes ensayados fueron agua Milli-Q, acetato de etilo, cloroformo, etanol, acetona, metanol, metanol + 5% ácido fórmico, metanol + 5% amoniaco, los cuales se mantuvieron en contacto con la matriz sólida cargada de biosurfactantes al menos durante 5 minutos a temperaturas de entre 18 y 40 °C, observándose que una relación eluyente: matriz sólida de 100:1 (mL/g) es suficiente para extraer alrededor del 100% del extracto biosurfactante cuando el eluyente es metanol en combinación con amoniaco o con ácido fórmico. Además, se
30 llevaron a cabo ensayos de reutilización de la matriz sólida tras 10 ciclos de extracción y regeneración siendo las pérdidas de eficacia de dicha matriz sólida respecto a la extracción líquido-sólido de biosurfactantes inferiores al 25%.

35 Por otra parte, se ensayaron distintos tiempos de contacto entre el eluyente y la matriz sólida polimérica cargada de biosurfactantes entre 5 y 60 min, observándose que 5 min es tiempo suficiente para extraer la mayoría de los biosurfactantes atrapados por la matriz sólida polimérica.

40 El extracto biosurfactante obtenido presenta unos biomarcadores con pesos moleculares más elevados que los biomarcadores encontrados en el extracto biosurfactante protegidos bajo las patentes ES-2435324_B2, E P-28262624B1- WO2014044876A1, ES-2527366_B1, ES-2739050_B2, ES-2795574_A1, dando lugar a un extracto más selectivo en cuanto a componentes.

45 Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción realizada y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

50 **Figura 1.** Esquema de los procesos de separación de biosurfactantes aplicados a los licores de lavado de maíz que comprenden un proceso de extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos o un proceso de extracción sólido-líquido con soluciones acuosas tamponadas,

aplicado en este último caso a la fracción sólida de los licores de lavado de maíz. Tras el proceso de extracción líquido-líquido se incluye en este esquema un proceso de destilación necesario para recuperar el disolvente y obtener el extracto biosurfactante. En relación con el proceso de extracción sólido-líquido aplicado a la fracción sólida de los licores de lavado de maíz se incluye un proceso de diálisis que pretende la eliminación de sales presentes en el agente extractante y un proceso de liofilización para obtener el extracto biosurfactante en forma de polvo.

Figura 2. Esquema del proceso novedoso de extracción propuesto para la separación de biosurfactantes a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz empleando la matriz sólida tipo Strata-AW, compuesta por un polímero hidrofóbico unido a un ligando di-amino, que se ha tomado como ejemplo. En este esquema se parte de los licores de lavado de maíz que, tras centrifugación o filtración, se someten a un proceso de extracción líquido-sólido con distintas matrices poliméricas que retiene las sustancias biosurfactantes contenidas en los licores de lavado de maíz. Posteriormente las matrices poliméricas cargadas con las sustancias surfactantes son sometidas a un proceso de extracción sólido-líquido utilizando una disolución disolvente por ejemplo a base de metanol y NH₃. Tras la recuperación de las sustancias biosurfactantes el disolvente es sometido a un proceso de destilación o evaporación con el fin de recuperar el disolvente, y separarlo del extracto biosurfactante objeto de la invención.

Realización preferente de la invención

Ejemplo 1. Obtención del extracto de biosurfactante

Se realizaron extracciones líquido-sólido a los licores de lavado de maíz suministrados por FeedStimulants (Zoetermeer, Países Bajos), procedentes del proceso de fraccionamiento del maíz por vía húmeda. Se tomaron los licores de lavado de maíz y se sometieron a un proceso de centrifugación o filtración, con el fin de obtener una fracción líquida exenta de sólidos, la cual se puso en contacto con diferentes matrices sólidas poliméricas entre las que se incluye el polímero aniónico débil Strata-X-AW de Phenomenex, por un tiempo de al menos 5 minutos a temperatura ambiente.

La Figura 2 recoge, a modo de ejemplo, el esquema del nuevo proceso propuesto para la obtención de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz, mediante extracción con la matriz sólida polimérica tipo Strata-AW. En este esquema se incluye la etapa de elución del extracto biosurfactante con una disolución de metanol y NH₃, así como la recuperación del disolvente mediante evaporación o destilación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz caracterizado porque comprende las etapas de separación de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación con matrices sólidas poliméricas formadas por una cadena principal hidrofóbica y un ligando di-amino que contiene aminas primarias y secundarias.
- 10 2. Procedimiento para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz caracterizado porque comprender las etapas de separación de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación con matrices sólidas formadas por matrices de intercambio catiónico fuerte, que combina una columna vertebral hidrófoba con un grupo funcional de ácido sulfónico.
- 15 3. Procedimiento para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz caracterizado porque comprende las etapas de separación de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz mediante procesos de separación con matrices sólidas poliméricas formada por una matriz polimérica de intercambio aniónico fuerte, que acopla una espina dorsal hidrófoba con un grupo funcional de amina cuaternaria dimetilbutilada.
- 20 4. Procedimiento para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3 que comprende adicionalmente la elución de los biosurfactantes utilizando los siguientes disolventes: acetato de etilo, cloroformo, etanol, acetona, metanol, ácido fórmico, amoniac, en combinación o separados.
- 25 4. Procedimiento para la extracción de biosurfactantes a partir de los licores de lavado de maíz de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3 que comprende adicionalmente la elución de los biosurfactantes utilizando los siguientes disolventes: acetato de etilo, cloroformo, etanol, acetona, metanol, ácido fórmico, amoniac, en combinación o separados.
- 30 6. Uso o aplicación de los biosurfactantes obtenidos a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz, tras someter a los mismos a los procesos de separación, según la reivindicación 5 como agente surfactante y/o emulsionante en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, agroquímica o medioambiental.
- 35 7. Uso o aplicación de los biosurfactantes obtenidos a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz, tras someter a los mismos a los procesos de separación, según la reivindicación 5 como agente surfactante y/o emulsionante en la limpieza de superficies.
- 40 8. Uso o aplicación de los biosurfactantes obtenidos a partir de la fracción líquida de los licores de lavado de maíz, tras someter a los mismos a los procesos de separación, según la reivindicación 5 para mejorar la permeabilidad de aquellas fórmulas, que contengan principios activos, a través de las membranas celulares, destinadas a usos cosméticas, farmacéuticos y agroquímicos.

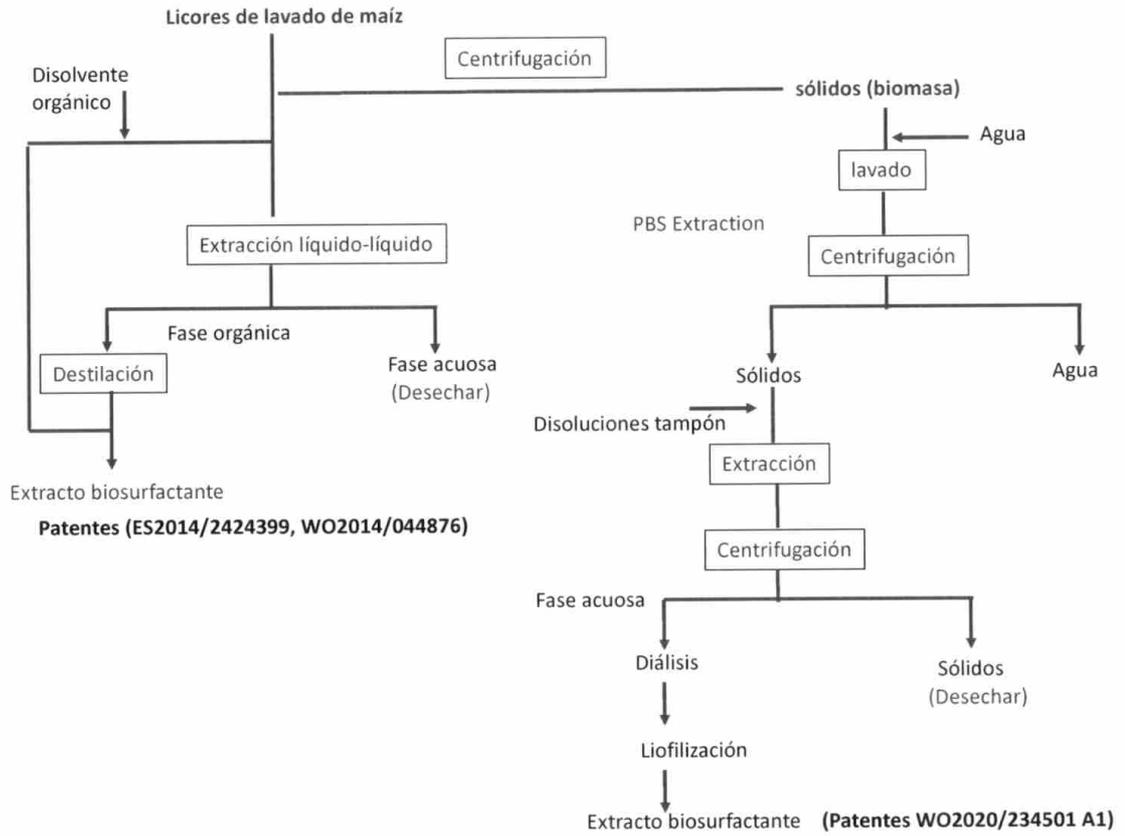


Figura 1

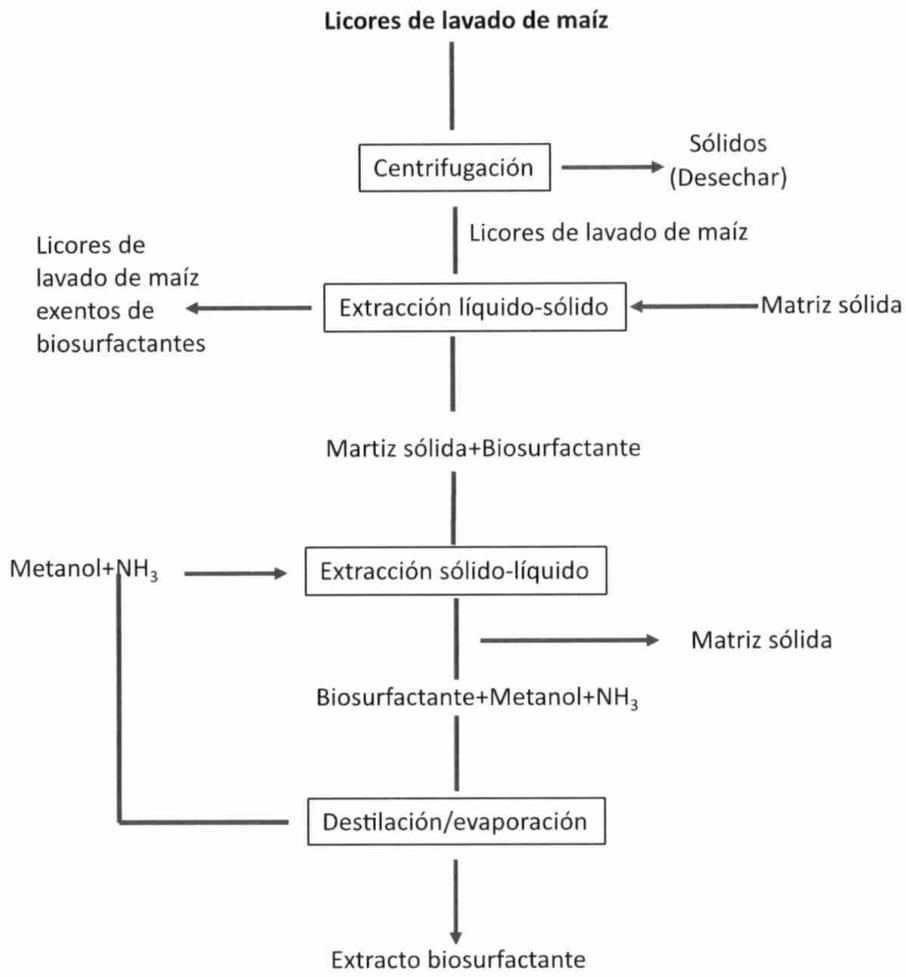


Figura 2