

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 26001 A1**
(51) Cl. internationale : **B01D 15/04; C07C 39/11;
B01D 15/08**
(43) Date de publication : **31.12.2003**

(21) N° Dépôt : **27278**
(22) Date de Dépôt : **13.08.2003**
(30) Données de Priorité : **15.02.2001 ES P200100346**
(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/ES02/00058 08.02.2002**
(71) Demandeur(s) : **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, SERRANO, 117, E-28006 MADRID (ES)**
(72) Inventeur(s) : **RODRIGUEZ GUTIERREZ, GUILLERMO ; RODRIGUEZ ARCOS, ROCIO ; GUILLEN BEJARANO, RAFAEL ; HEREDIA MORENO, ANTONIA ; JIMENEZ ARAUJO, ANA ; FERNANDEZ-BOLANOS GUZMAN, JUAN**
(74) Mandataire : **CABINET CHARDY**

(54) Titre : **PROCEDE D'OBTENTION D'HYDROXYTYROSOL PURIFIE A PARTIR DES PRODUITS ET SOUS-PRODUITS DERIVES DE L'OLIVIER.**

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir de produits et de sous-produits dérivés de l'olivier au moyen d'un traitement chromatographique en deux étapes. L'invention utilise un procédé de chromatographie sur résine échangeuse d'ions non activée, suivi d'un second traitement sur une résine non ionique absorbante de type XAD qui concentre et purifie complètement l'hydroxytyrosol par élution avec une dissolution de méthanol ou d'éthanol: eau à 33%). Le procédé de l'invention peut également être appliqué à des pâtes à deux phases, à des marcs triphasés et à des pierres s'ils sont soumis à un processus d'explosion à la vapeur. <IMAGE>

- Résumé** : le présent certificat se rapporte à une méthode permettant d'obtenir de l'hydroxytyrosol purifié à partir de produits et de sous-produits dérivés des oliviers grâce à un traitement chromatographique en deux étapes. Cette invention repose sur une méthode chromatographique de résine échangeuse d'ions non-actifs, suivie par un second traitement sur une résine non ionique absorbante de type XAD qui permet de concentrer et de purifier complètement l'hydroxytyrosol par le biais d'une élution au méthanol ou à l'éthanol : dissolution de l'eau (de 30 à 33 %). Cette nouvelle méthode peut également être appliquée aux grignons dans le cadre d'une extraction à deux phases ou à trois phases ou aux noyaux s'ils sont soumis à un processus d'explosion de vapeur.

P. 27 277
~~277~~

- Chêne et de la
feuille

- Origine de la
feuille

- Paris, le 13/3/2003

G

MEMOIRE DESCRIPTIF

D'UNE DEMANDE DE

BREVET D'INVENTION

(ENTREE EN PHASE NATIONALE DE DEMANDE
INTERNATIONALE AU MAROC n°PCT/ES02/00058)

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

**«PROCEDE D'OBTENTION D'HYDROXYTYROSOL PURIFIE
A PARTIR DES PRODUITS ET SOUS-PRODUITS DERIVES DE
L'OLIVIER»**

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

La sté.dite : CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS

-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-0-

26001ES
31 DEC 2003

TITRE

Procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-produits dérivés de l'olivier.

SECTEUR DE LA TECHNIQUE

5 La présente requête de certificat d'adjonction s'adresse, de même que pour le brevet principal P200002422, au secteur alimentaire, pharmaceutique, de la cosmétique et de l'agriculture.

OBJET DE L'INVENTION

10 La présente invention a pour objet un perfectionnement du procédé d'obtention de l'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-produits dérivés de l'olivier.

L'hydroxytyrosol est un anti-oxydant naturel hautement appréciable, présentant des propriétés antibactériennes et phytotoxiques qui peuvent être utilisées pour la conservation des aliments, dans l'agriculture pour la protection
15 des oliviers, et dont on peut mettre à profit l'action prophylactique lors de certaines maladies humaines induites par les radicaux. Dans ce sens, il est susceptible d'être employé dans diverses préparations topiques, antvieillissement, anti-inflammatoires, etc.

20 Les perfectionnements introduits consistent à substituer à la colonne de la première phase du procédé une autre plus économique offrant des possibilités de remploi, et à éliminer la troisième phase de la purification.

ETAT DE LA TECHNIQUE

La pulpe des olives contient de nombreux composés phénoliques, presque tous sous forme de glucosides ou leurs esters, dont le pourcentage
25 peut atteindre jusqu'à 5% de leur poids sec. Parmi toutes les substances phénoliques, on remarque en particulier l'oleuropéine, le glucoside le plus abondant, constitué par l'ester hétéroside de l'acide allénolique et l'hydroxytyrosol, responsable de son goût amer. Sont également présents la glucose-acide allénolique-tyrosol, le verbacoside (acide caféique-glucose-
30 (ramnose)-hydroxytyrosol, des flavonoïdes comme la rutine et dans les fruits mûrs, des colorants anthocyaniques, des dérivés de la cyanidine.

Toutes ces substances ont une grande importance dans les processus technologiques auxquels ces fruits sont soumis, que ce soit pour l'élaboration des olives de table (par ex. pour en éliminer le goût amer, pour en développer
35 la couleur noire, etc.) (Brenes, M., Rejano, L., García, P., Sánchez, A.H. et

- Garrido, A. 1995. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 2702-2795) ou pour l'obtention de l'huile d'olive, car suivant leur coefficient de répartition, certains phénols passent dans l'huile et sont responsables de la stabilité vis-à-vis de l'oxydation (Baldioli, M., Servili, M., Perreti, G. et Montedoro, G.F. 1996. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 : 1589-1593), des caractéristiques sensorielles Aparicio, R., Roda, L. Albi, M.A. et Gutiérrez, F. 1999. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 3531-3534) et des effets bienfaisants pour la santé humaine (Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Molledo, O., Leone, A. et Zappia, V. 1997. *J. Nutr.* 127 : 286-292) et une autre partie passe à la phase aqueuse.
- 10 L'hydroxytyrosol, le phénol le plus actif parmi ceux qui se trouvent à l'état naturel dans l'huile d'olive vierge et notamment dans la ressence (sous-produit aqueux), est obtenu spontanément par l'hydrolyse chimique et/ou enzymatique de l'oleuropéine pendant le broyage et le battage des pâtes. On le trouve aussi dans des proportions très importantes dans les lessives et les eaux de lavage, étant donné l'hydrolyse chimique qui se produit dans ce cas, pendant l'élaboration des olives de table. C'est un composé très intéressant par ses propriétés anti-oxydantes qui doit essentiellement son activité au groupe fonctionnel o-diphénol, caractéristique des biphénols, et qui présente certains aspects très importants pour la santé humaine et la conservation des aliments, jouant en outre un rôle important dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes et les insectes des olives (Bianco, A.D., Muzzalupo, I., Piperno, A., Romeo, G. et Ucella, N. 1999. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 3531-3534).
- 25 Cependant, l'hydroxytyrosol est un produit qui n'est pas disponible dans le commerce, malgré les divers procédés qui ont été développés pour sa purification à partir de l'huile d'olive, des ressences et des feuilles d'olivier, et cela en dépit des différents procédés de synthèse mis en œuvre pour sa production.
- 30 Plusieurs auteurs italiens et japonais ont décrit la récupération des composés actifs, masse de phénols à partir des ressences, feuilles d'olivier et fruits, au moyen de différents procédés d'extraction liquide-liquide et liquide-solide (Visioli, F., Vinceri, F.F. et Galli, C. 1995.- *Experientia* 51 : 32-34) (brevet japonais JP-09078061). Pourtant, le pouvoir anti-oxydant des extraits dépend de leur degré de purification, les plus actifs étant les extraits qui contiennent des phénols à poids moléculaire bas (Violi, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini,
- 35

S., Conte, D., Vinceri, FF. et Galli, C. 1999. J. Agric. Food Chem. 47 : 3397-3401).

Concernant la purification de l'hydroxytyrosol à partir des extraits de ressource obtenus avec l'acétate d'éthyle, Capasso et al. 1999 (Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S. et Solla, F. 1999. J. Agric. Food Chem. 47 : 1745-1748) présentent une nouvelle méthode chromatographique en utilisant des colonnes de silicagel à moyenne pression (20 bar), à la différence d'autres méthodes antérieures d'extraction et chromatographie à pression normale et basse (Capasso, R., Evidente, A. et Visca, C. 1994. Agrochimica 38 : 164-171) et qui se complètent avec une chromatographie préparatoire en couche mince.

D'autres auteurs espagnols (brevet espagnol ES-2051238) obtiennent différents types de phénols, parmi lesquels l'hydroxytyrosol, en mettant en œuvre une extraction à rebours à partir de la solution aqueuse de la ressource. Une fois extraite la ressource, telle quelle ou concentrée au moyen d'un solvant ou mélange de solvants peu miscibles avec l'eau, la phase organique est soumise à une extraction liquide-liquide à contre-courant.

L'hydroxytyrosol qui a été aussi purifié en partant de l'huile d'olive a été breveté pour son usage dans les préparations topiques et pour les bains, compte tenu qu'il inhibe la formation de mélanine et des peroxydes lipidiques (brevet japonais JP-08119825).

Parmi les méthodes de synthèse existantes, celle décrite par Capasso et al. (Capasso, R., Evidente, A., Avolio, S. et Solla, F. 1999. J. Agric. Food Chem. 47 : 1745-1748) est, d'après l'auteur lui-même, la plus avantageuse en regard des autres décrites dans la littérature (Baraldi, P.G., Simoni, D., Manfredini, S. et Menziani, E. 1983. Liebigs Ann. Chem. 684-689), et il ajoute que cette méthode est encore plus avantageuse que la récupération chromatographique que réalisent les mêmes auteurs à partir des ressources, étant donné les bas rendements de ces dernières et du fait qu'elles sont beaucoup plus chères que celles de synthèse. L'hydroxytyrosol est synthétisé dans ce travail à partir de l'acide 3,4 dihydroxy-phényl acétique par réduction avec LiAlH_4 en tétrahydrofurane, sous reflux, pendant 2 heures.

Bai et al. 1998 (Bai, C., Yan, X., Takenaka, M., Sekiya, K. et Nagata, T. 1998, J. Agric. Food Chem. 46 : 3998-4001), l'ont également synthétisé à taux de rendement élevé, à l'échelle de grammes et à un haut degré de pureté. La synthèse est réalisée à partir du même acide, 3,4 dihydroxy-phényl acétique,

mais en utilisant un système de méthylation rapide avec trimethylsilyldiazométhane et réduction postérieure des produits de réaction par NaBH_4 .

5 Cependant, l'acide pur (pureté analytique) utilisé comme matière première dans les méthodes de synthèse est un produit chimique dont le prix actuel est d'environ 4.000 pts/gramme, ce qui représente un coût excessivement élevé pour être produit au niveau industriel.

10 Deux dépôts de brevet antérieurs (ES-9800413 et ES-9800668) montrent un procédé pour l'obtention de mannitol à partir de la pulpe en extrait (ES-9800413) provenant du prélèvement de l'huile d'olive par le système à trois phases soumis à un processus d'explosion à la vapeur, et également un procédé pour l'obtention de l'hydroxytyrosol à partir des noyaux d'olives (ES-9800668) qui ont été soumis à un procédé d'autohydrolyse rapide.

15 Dans la requête de brevet principal (P200002422 daté le 6/12/2000) du présent certificat d'adjonction, un procédé est proposé pour la purification de l'hydroxytyrosol obtenu par les méthodes susdites ou bien à partir des noyaux d'olive de l'extraction à deux phases (pâte des grignons) également soumises au procédé d'explosion à la vapeur. Ce procédé présente plusieurs inconvénients :

- 20 - Il n'est pas capable de séparer totalement l'hydroxytyrosol de l'hydroxyméthyl-furfurol, composant de dégradation qui s'accroît en augmentant la sévérité.
- La première colonne affronte une dissolution fortement colorée et très riche en différents composés qui sont retenus, ce qui rend nécessaire
- 25 d'importantes régénérations continues dès lors que la plupart de ces autres composants restent absorbés dans la résine. Ces régénérations altèrent chimiquement et mécaniquement les résines en raccourcissant leur vie utile. Les autres colonnes ne rencontrent pas ce problème, ayant à faire face à des liqueurs décolorées.
- 30 - Les résines utilisées sont relativement chères, en particulier celle de la troisième colonne, quoique assez résistantes.

EXPLICATION DE L'INVENTION

L'objet de la présente invention est un procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-produits de l'olivier,

35 comprenant les étapes suivantes :

- a) introduction de la source d'hydroxytyrosol dans une colonne avec résine d'échange ionique non activée (de préférence une anionique forte). Après élution avec l'eau, on obtient une dissolution contenant au moins 85% de l'hydroxytyrosol contenu dans la dissolution introduite dans la colonne.
- 5 b) introduction de la dissolution contenant l'hydroxytyrosol provenant de la phase antérieure dans une deuxième colonne de résine non ionique, du type XAD, et élution moyennant un mélange méthanol ou éthanol-eau (de 30 à 33%), obtenant une dissolution qui contient au moins le 75% de l'hydroxytyrosol contenu dans la source d'hydroxytyrosol introduite dans la
- 10 première phase, avec une pureté minimale de 95%.

Les résines utilisées dans les cycles de purification de l'hydroxytyrosol peuvent être régénérées au moyen d'un traitement qui comprend les étapes suivantes :

- a) dans le cas de la résine d'échange ionique fortement anionique, elle se régénère à l'aide d'un lavage avec un acide fort, aux concentrations autour de 2N. En cas de besoin d'une régénération plus forte après de nombreux cycles de régénération, elle serait soumise à un lavage préalable au NaOH à 2% préalablement au traitement acide.
- 15
- b) pour le cas des résines non ioniques du type XAD par lavage au méthanol ou à l'éthanol pur ou, en cas de besoin d'une régénération plus forte, un lavage avec H₂O₂ à 2% avec un pH ajusté à 11,5 par addition de NaOH.
- 20

BRÈVE DESCRIPTION DE LA FIGURE

Figure 1 : Schéma des étapes du procédé de purification d'hydroxytyrosol.

25 DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION

La présente invention se réfère à une méthode chromatographique qui permet d'obtenir de l'hydroxytyrosol à un degré de pureté élevé, et qui a été développée à partir de la pâte des grignons à deux et trois phases et des noyaux provenant du traitement des olives après avoir été soumis à un procédé d'explosion à la vapeur. S'agissant d'un pré-traitement très sévère où le matériel est soumis à de très hautes températures par injection de vapeur d'eau à pression pendant un laps de temps très court, suivi d'une décompression explosive du produit, on obtient la solubilisation de l'hydroxytyrosol et de nombreux autres produits solubles dans l'eau (présents dans la ressource, solubilisation des noyaux d'olive ou résidu solide, produits de dégradation, etc.).

30

35

Le système de purification pourrait également être appliqué à de nombreuses autres sources, telles que les essences, lessives et eaux de lavage résultant de l'assaisonnement des olives, etc.

Le procédé de l'invention présente comme nouveauté l'utilisation d'un système chromatographique à deux phases, utilisant dans la première une résine d'échange ionique en forme non activée qui permet la purification partielle de l'hydroxytyrosol sans que celui-ci ne subisse la moindre altération, après son élution simplement dans l'eau. Ces résines à base de polystyrène peuvent être utilisées sous forme de gel ou macroréticulaire, sont facilement régénérables et présentent une grande endurance mécanique et fonctionnelle. Leur utilisation exige de faibles investissements et les coûts de régénération et de mise en œuvre sont bas. La deuxième phase se réalise sur de la résine absorbante polymérique XAD qui permet la totale purification de l'hydroxytyrosol après élution avec un mélange méthanol ou éthanol-eau (entre 30 et 33%). Cette résine macroréticulaire, non ionique, sur base polystyrène qui absorbe et libère les substances à travers des interactions hydrophobiques et polaires présente l'avantage, par rapport à d'autres résines, de ne pas présenter des processus de retenue ni des modifications chimiques importantes de l'hydroxytyrosol pendant la phase stationnaire. Ce type de résines polymériques, aussi bien celle d'échange ionique que l'absorbante XAD, sont stables aux acides et bases fortes, à la différence des lits de silice utilisés dans d'autres procédés de purification de l'hydroxytyrosol, ce qui permet de les utiliser pendant des centaines de cycles de purification, soit avec de l'acide dans le cas de l'échange ionique, soit avec du méthanol ou H_2O_2 (pH=11,5) dans le cas de celle non ionique.

Dans le présent procédé, la régénération a consisté en un lavage des propres colonnes au HCl (2N) pour l'anionique forte, et au méthanol pour l'absorbante, à laquelle parvient une dissolution suffisamment propre des produits de souillure de l'hydroxytyrosol, ce qui rend superflues les régénérations drastiques de celui-ci.

Les étapes du procédé de purification sont celles que recueille le schéma de la figure 1 :

B1 : échantillon initial, source d'hydroxytyrosol (fraction aqueuse).

C1 : colonne de résine d'échange ionique non activée, l'hydroxytyrosol est obtenu par des lavages successifs à l'eau.

A1 : échantillon initial qui a déjà franchi la colonne C1 et lavages à l'eau sans contenu à peine d'hydroxytyrosol.

A2 : fraction non retenue dans la résine XAD, dissolution assez propre et qui pourrait être employée comme éluant dans la colonne anionique.

5 B2 : solution avec les composés, principalement hydroxytyrosol, qui sont élués de la première étape par la résine d'échange anionique avec de l'eau, et qui permet de récupérer la plupart de celui-ci, dès lors qu'il a une vitesse d'entraînement différente à travers le lit de résine que les composés restants qui l'accompagnent.

10 C2 : chromatographie sur résine absorbante XAD qui permet la concentration et purification totale de l'hydroxytyrosol au moyen de l'élution avec un mélange méthanol ou éthanol-eau (de 30 à 33%).

HT PUR : hydroxytyrosol pur.

MODE DE RÉALISATION DE L'INVENTION

15 Le procédé de purification a été développé à partir d'un échantillon de pâtes des grignons soumis à un processus d'explosion à la vapeur.

20 Environ 2 kg de pâtes des grignons (contenant quelque 8,5 gr d'hydroxytyrosol) sont soumis à un processus d'explosion à la vapeur. On injecte de la vapeur d'eau à pression dans un réacteur pendant 10 minutes à une température de 190-220° C en présence de H₂SO₄ à 2,5% p/v. En produisant la décompression explosive du matériel, il subit, mis à part une certaine réaction chimique, une destructuration importante et une partie de celui-ci est solubilisée. Après séparation des fractions soluble et insoluble, on retient la première qui contient une concentration d'hydroxytyrosol de 0,5 gr/L

25 qui est ensuite purifiée en deux étapes :

1^{ère} étape : l'échantillon (B1) est introduit dans la première colonne (C1) avec 1,25 kg de résine anionique forte non activée. Le liquide recueilli à la sortie de la colonne présente la même couleur que l'échantillon initial, ce qui fait que dans la colonne tout l'hydroxytyrosol demeure retenu avec à peine quelques éléments de plus. On procède à des lavages à l'eau jusqu'à récupérer

30 le 80% de l'hydroxytyrosol introduit, environ 7 gr, et l'on parvient ainsi à obtenir un extrait sec d'une richesse de 60% d'hydroxytyrosol.

2^{ème} étape : les lavages à l'eau qui ont entraîné les 7 gr d'hydroxytyrosol (B2) sont introduits dans la colonne (C2) avec 1,5 kg de résine XAD.

35 L'hydroxytyrosol est retenu et l'on élue finalement avec un mélange à 33% de

méthanol et eau. On obtient de cette façon une dissolution d'hydroxytyrosol concentré (HT CONC) qui contient 6,5 gr d'hydroxytyrosol avec un degré de pureté de 95% au moins et une concentration de 2,2 gr/L. La purification peut être entreprise de façon plus ou moins complète suivant les buts poursuivis à l'aide de la matière que l'on cherche à obtenir par le procédé de l'invention.

5 La fraction non retenue dans la première colonne, fraction (A1), peut être utilisée pour obtenir du mannitol (31 gr) et d'autres sucres, parmi lesquels se trouve le glucose (82 gr).

REVENDEICATIONS

- 1.- Procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-produits dérivés de l'olivier, caractérisé par le fait de comporter les étapes suivantes :
- 5 - a) introduction de la source d'hydroxytyrosol dans une colonne de résine d'échange ionique en forme non activée, obtenant, après élution à l'eau, une dissolution qui contient 85% au moins de l'hydroxytyrosol présent dans la source d'hydroxytyrosol introduite dans la colonne et obtenant ainsi un hydroxytyrosol d'une richesse de 60-70%.
- 10 - b) introduction de la dissolution contenant l'hydroxytyrosol provenant de l'étape antérieure dans une deuxième colonne de résine non ionique et élution ultérieure avec mélange méthanol ou éthanol-eau (de 30 à 33%), obtenant une dissolution contenant au moins 75% de l'hydroxytyrosol présent dans la source d'hydroxytyrosol introduite lors de la première étape et d'une pureté minimale de 95%.
- 15 2.- Procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-produits dérivés de l'olivier selon la revendication 1, caractérisé par le fait que, préalablement au traitement dans les colonnes de résine, la source d'hydroxytyrosol est soumise à un processus d'explosion à la vapeur.
- 20 3.- Procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-produits dérivés de l'olivier selon les revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que la colonne de résine d'échange ionique en forme non activée est une colonne à résine d'échange anionique forte.
- 4.- Procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-
- 25 produits dérivés de l'olivier selon les revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que la colonne de résine non ionique est une colonne de résine Amberlite XAD.
- 5.- Procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-produits dérivés de l'olivier selon la revendication 3, caractérisé par le fait qu'après les cycles de purification, la résine d'échange anionique se régénère
- 30 moyennant un traitement qui comprend les étapes suivantes :
- a) lavage au NaOH à 2%
- b) lavage à l'acide fort.
- 6.- Procédé d'obtention d'hydroxytyrosol purifié à partir des produits et sous-
- 35 produits dérivés de l'olivier selon la revendication 4, caractérisé par le fait qu'après les cycles de purification la résine absorbante XAD se régénère au

moyen d'un traitement qui comprend les étapes suivantes :

- a) extraction de tous les composés qui accompagnent l'hydroxytyrosol retenu dans la résine, au moyen de méthanol ou d'éthanol dans la même colonne ou à chaud par l'emploi de soxhlet.
- 5 b) lavage avec une dissolution de H_2O_2 à 2% avec pH ajusté à 11,5 moyennant l'addition de NaOH.