

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901844991A1

Publication Date

20111203

Applicant

LABIOCHEM S.A.S. DI MAZZOTTA A. & C.

Title

PREPARAZIONE DI UN ESTRATTO RICCO DI POLIFENOLI E DI UNA
FRAZIONE SOLIDA DA ACQUE DI VEGETAZIONE DELLE OLIVE E SUO USO
FARMACEUTICO, COSMETICO E ALIMENTARE.

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

Preparazione di un estratto ricco di polifenoli e di una frazione solida da acque di vegetazione delle olive e suo uso farmaceutico, cosmetico e alimentare

a nome di Mazzotta Alessandro, residente in Sciacca (AG), Piazza Carmine 3, di nazionalità italiana.

L'olio extra-vergine di oliva, utilizzato nella cucina mediterranea, è stato raccomandato nella dieta in quanto si tratta di un grasso che porta ad una bassa incidenza nell'insorgenza di malattie cardiovascolari. Negli ultimi anni, sono stati fatti numerosi studi sulla composizione chimico-fisica di tale alimento e soprattutto nella correlazione tra la presenza di determinate molecole e le proprietà antinfiammatorie e/o ad azione chemo-protettiva dell'alimento stesso. La classe dei polifenoli dell'olivo presenti nell'olio e nelle acque di vegetazione ottenute come prodotto secondario, ha mostrato avere elevate proprietà antiossidanti, rendendo tali molecole utili nella prevenzione e cura di patologie cardiovascolari. I fenoli derivanti dall'idrolisi dell'oleuropeina, come l'idrossitirosolo risultano prevenire l'ossidazione delle lipoproteine LDL ed inibire le lipossigenasi. Tuttavia, durante il processo di estrazione dell'olio dai frutti, la maggior parte della componente polifenolica finisce nelle acque di vegetazione. Tali acque di vegetazione, allo stato attuale, rappresentano un problema enorme per i frantoi, i quali le utilizzano spargendole in terreni appositamente autorizzati. L'invenzione riguarda principalmente la purificazione e preparazione di un estratto acquoso ricco in polifenoli a partire dalle acque di vegetazione dei frantoi oleari e di una corrispondente frazione solida. L'oggetto della presente invenzione si può realizzare attraverso la seguente metodologia che si può riassumere nei seguenti passaggi:

1. Produzione delle acque di vegetazione dalle olive sia intere che denocciolate;
2. Trattamento delle acque di vegetazione con calce o idrossido di calcio, o idrossido di magnesio, o un idrossido di metallo alcalino o alcalino terroso, o un idrossido di un metallo bivalente o trivalente, o una miscela di questi ultimi, preferibilmente con calce purissima, costituita principalmente da idrossido di calcio, in quantità comprese tra lo 0,5% e il 20%, preferibilmente in quantità pari all'1,5%;
3. La temperatura e il tempo della reazione del punto 2 devono essere controllate. In particolare la temperatura della reazione del punto 2 deve essere compresa tra la temperatura ambiente e 100 °C, preferibilmente mantenuta costante a 50 °C. Il tempo di reazione è compreso tra 30 secondi e 96 ore, preferibilmente 30 minuti e comunque in funzione del quantitativo di acqua di vegetazione da trattare;
4. Decantazione e separazione della frazione solida dall'estratto acquoso surnatante, o centrifugazione per favorire tale separazione;
5. Acidificazione con acido inorganico minerale e/o organico fino a quando l'estratto acquoso presenta un pH compreso tra 3,0 e 6,0, preferibilmente 5,5;
6. Ulteriore filtrazione per eliminare eventuali residui solidi.

Proprietà antiossidanti dell'estratto acquoso

Introduzione

L'estratto acquoso è stato analizzato per valutare le sue proprietà antiossidanti ed in particolare è stata fatta una analisi del contenuto totale dei polifenoli, attraverso il metodo di Folin-Ciocalteu,

e dell'attività antiossidante con il metodo del DPPH (2,2 difenil-1-picrilidrazile radicale). I polifenoli totali sono stati espressi come mg equivalenti di acido gallico per litro di soluzione. L'analisi dell'attività antiossidante con il metodo del DPPH, si basa sulla misura dell'assorbanza a 515 nm nel tempo di una soluzione di concentrazione nota di DPPH a cui è stata aggiunta una quantità nota dell'estratto del quale si vuole misurare la attività antiossidante. Il decadimento del valore dell'assorbanza a 515 nm rappresenta la reazione di trasferimento del protone dalla molecola fenolica al DPPH e formazione della corrispondente idrazina, la quale non assorbe alla lunghezza d'onda in esame. Le curve cinetiche sono state registrate in un tempo di 30 minuti, registrando il valore dell'assorbanza a 515 nm ogni minuto fino a 15 minuti e successivamente ogni cinque minuti fino a 30 minuti. Attraverso l'analisi delle curve cinetiche è possibile ricavare la stechiometria della reazione ed avere dati sulla velocità della reazione. La curve cinetiche della reazione DPPH/estratto acquoso è stata confrontata con una curva cinetica, ottenuta in modo analogo, della reazione DPPH/acido gallico.

Contenuto polifenoli totale (parte sperimentale)

Il contenuto dei polifenoli totale è stato determinato con il metodo di Folin-Ciocalteu. In particolare è stata costruita una curva di taratura utilizzando soluzioni etanoliche di acido gallico delle seguenti concentrazioni: 574 μM , 287 μM , 143,5 μM , 57,4 μM . Il metodo si basa nell'aggiunta a 2,5 mL della soluzione di acido gallico, di 0,5 mL di Na_2CO_3 (conc. 5,4 g/30 mL) e 0,1 mL del reagente di Folin diluito 1:10. Dopo incubazione di una ora, si registra l'assorbanza a 760 nm e si costruisce la curva di taratura (figura 1). In base a tale curva di taratura è stata effettuata una analisi dell'estratto acquoso ottenuto con la metodologia descritta, diluito 1:50 e si è registrato un valore dei polifenoli totali pari a 1568 mg/L di acido gallico equivalente.

Misura dell'attività antiossidante con il metodo del DPPH (parte sperimentale)

Per la misura dell'attività antiossidante dell'estratto acquoso oggetto della presente invenzione industriale, è stato utilizzato il metodo del DPPH. In particolare è stata dapprima costruita una curva di taratura del DPPH per potere ricavare il valore del coefficiente di estinzione molare a 515 nm. Sono state utilizzate le soluzioni etanoliche del DPPH delle seguenti concentrazioni, partendo da una soluzione madre di concentrazione 882 μM : 176 μM , 88 μM , 59 μM , 44 μM , 35 μM , 29 μM . Misurando il valore dell'assorbanza a 515 nm, è stata costruita la curva di taratura (figura 2) dalla quale è stato possibile estrapolare il valore del coefficiente di estinzione molare a 515 nm. Tale valore è pari a $8350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Per la misura dell'attività antiossidante sono state effettuate delle misure a 515 nm della soluzione di DPPH alla quale è stata aggiunta una quantità nota dell'estratto acquoso ed è stata fatta una comparazione con le misure effettuate, in modo analogo, sulla soluzione di DPPH alla quale però è stata aggiunta una quantità nota di acido gallico. A 0,5 mL della soluzione di DPPH 882 μM sono stati aggiunti 0,5 mL dell'estratto acquoso, ottenuto con la metodologia sopra descritta, diluito 1:50 ($\text{pH} = 5,35$) e 2 mL di etanolo. La misura dell'assorbanza a 515 nm è stata seguita nel tempo per 30 minuti, registrando il valore di tale assorbanza ogni minuto fino a 15 minuti e successivamente ogni cinque minuti fino a 30 minuti. Per quanto riguarda la prova con l'acido gallico, sono stati aggiunti a 0,5 mL di DPPH 882 μM , 0,5 mL di acido gallico di concentrazione pari a 287 μM e 2 mL di etanolo. Le curve della cinetica DPPH/estratto acquoso (figura 3) e DPPH/acido gallico (figura 4) mostrano l'attività antiossidante sia dell'estratto acquoso che dell'acido gallico.

Proprietà antiossidanti della frazione solida

La frazione solida, ottenuta durante il processo di purificazione e preparazione di un estratto acquoso ricco in polifenoli a partire dalle acque di vegetazione dei frantoi oleari, è stata seccata in stufa a 105 °C e successivamente ridotta in polvere finissima attraverso l'uso di un mortaio di agata. Industrialmente si può procedere utilizzando le numerose tecniche note di essiccazione e riduzione del solido in polvere. La frazione solida è stata caratterizzata chimicamente attraverso misure di pH di un liquido, ottenuto mescolando acqua con il solido in esame in rapporto 10:1 e lasciando in agitazione per 1 ora. Dopo filtrazione, sul liquido surnatante è stato misurato il pH, registrando un valore pari a 9,30. Inoltre, il solido è stato trattato con 20 mL di acido cloridrico 0,12 M e sul liquido è stato misurato il pH, registrando un valore pari a 7,35. Il liquido con pH pari a 9,30 è stato acidificato con acido cloridrico 0,12 M fino a pH pari a 5,15 e diluito 1:50 ed è stato effettuato il test del DPPH per la misura dell'attività antiossidante con la stessa metodologia sopra descritta ed usata per la misura dell'attività antiossidante dell'estratto acquoso. Nella figura 5 viene mostrata la curva cinetica DPPH/estratto da frazione solida (Figura 5). La frazione solida presenta una bassa attività antiossidante, infatti, la maggior parte della frazione solida è costituita da acido elenoico, derivante dall'idrolisi dell'oleuropeina. L'attività antiossidante è dovuta prevalentemente alla presenza di acido caffeico che come risulta dall'analisi HPLC è presente in quantità basse.

Analisi HPLC dell'estratto acquoso e della frazione solida

L'estratto acquoso diluito 1:50 con pH pari a 5,35 e l'estratto da frazione solida, diluito 1:50 con pH pari a 5,15, sono stati analizzati tramite HPLC per potere valutare la composizione percentuale dei polifenoli e la tipologia di questi ultimi. Il metodo HPLC è isocratico e utilizza una miscela acqua/acetonitrile 60/40 come fase eluente. Il flusso è pari a 0,5 mL/min. La colonna utilizzata è una Zorbax SB C18 delle dimensioni di 150 mm per 4,6 mm. Il detector è costituito da un sistema accoppiato UV-Vis/ELSD. Il sistema di rilevazione è sia quello UV, con lunghezza d'onda fissata a 254 nm, che quello ELSD. I risultati delle analisi sono illustrati nelle seguenti figure (figure 6 e 7). Il componente principale dell'estratto acquoso risulta essere l'idrossitirosolo, mentre quello dell'estratto da frazione solida, l'acido elenoico. I picchi di queste sostanze sono stati evidenziati attraverso l'uso di standard di idrossitirosolo e di acido elenoico rispettivamente.

Applicazioni cosmetiche e farmaceutiche

L'oggetto della presente invenzione riveste notevole importanza, in quanto le applicazioni industriali sono numerose. Qui di seguito riportiamo alcune applicazioni cosmetiche e farmaceutiche.

Burro corpo all'olio extra-vergine e ai polifenoli di oliva

La ricetta è la seguente:

Fase A

50 g di Olio extra-vergine di oliva;

6 g di sucrose polybehenate.

Sciogliere i 6 g di sucrose polybehenate in 50 g di olio extra-vergine di oliva alla temperatura di 70 °C.

Fase B

100 mL acqua;

25 mL di estratto acquoso con pH = 5,35;

2,0 g di Xanthan gum.

Disperdere la xanthan gum in una miscela di 100 mL di acqua e 25 mL di estratto acquoso da acque di vegetazione alla temperatura ambiente. Riscaldare fino a 70 °C ed agitare fino a formazione di un gel stabile.

Fase C

30 mL della soluzione "Fase B";

30 mL di soluzione al 20 % in peso di oleil-sarcosinato sodico;

25 mL di acqua.

Miscelare tutti gli ingredienti della fase C a temperatura ambiente e correggere il pH fino ad un valore compreso tra 6,5 e 7,0.

Aggiungere 50 mL della soluzione "Fase C" alla fase A alla temperatura di 70 °C e agitare fino ad emulsione completa.

Shampoo per capelli grassi a base dei polifenoli dell'oliva

La ricetta è la seguente:

150 mL di acqua

25 mL di estratto acquoso con pH = 5,35;

150 mL di soluzione al 20 % in peso di lauroil-sarcosinato sodico;

4,0 g di Xanthan gum.

Disperdere la xanthan gum in una miscela di 150 mL di acqua e 25 mL di estratto acquoso da acque di vegetazione alla temperatura ambiente. Riscaldare fino a 70 °C ed agitare fino a formazione di un gel stabile. Raffreddare a temperatura ambiente e poi aggiungere i 150 mL della soluzione al 20 % in peso di lauroil-sarcosinato sodico. Agitare e correggere il pH fino ad un valore compreso tra 6,5 e 7,0.

Rivendicazioni del brevetto di invenzione industriale: Preparazione di un estratto ricco di polifenoli e di una frazione solida da acque di vegetazione delle olive e suo uso farmaceutico, cosmetico e alimentare

a nome di Mazzotta Alessandro, residente in Sciacca (AG), Piazza Carmine 3, di nazionalità italiana

- 1) Preparazione di un estratto ricco di polifenoli e di una frazione solida da acque di vegetazione delle olive attraverso trattamento dell'acqua di vegetazione con idrossido di calcio in quantità pari a 1,5 % in peso, successiva centrifugazione e separazione delle due frazioni e conseguente acidificazione dell'estratto acquoso liquido con acido inorganico e/o organico fino a pH compreso tra 3,0 e 6,0;
- 2) Preparazione di un burro corpo all'olio extra-vergine e ai polifenoli di oliva, come emulsione (oil in water), con un quantitativo di estratto acquoso (preparato secondo la rivendicazione n° 1) non inferiore al 10 % in peso;
- 3) Preparazione di uno shampoo per capelli grassi a base dei polifenoli dell'oliva con un quantitativo di estratto acquoso (preparato secondo la rivendicazione n° 1) non inferiore al 5 % in peso;

Claims

- 1) Preparation of a polyphenol-rich extract and of a solid fraction from olive vegetation water by means of treatment of this vegetation water with calcium hydroxide 1,5 % by weight, followed by centrifugation and separation of the two fractions and consequent addition of a mineral or organic acid to the aqueous extract until a value of pH between 3,0 and 6,0;
- 2) Preparation of body butter based on extra-virgin olive oil and polyphenols from olives, as an emulsion o/w, containing an amount of polyphenol-rich extract (prepared according to claim n° 1) at least of 10 % by weight;
- 3) Preparation of a shampoo based on polyphenols from olives, containing an amount of polyphenol-rich extract (prepared according to claim n° 1) at least of 5 % by weight;

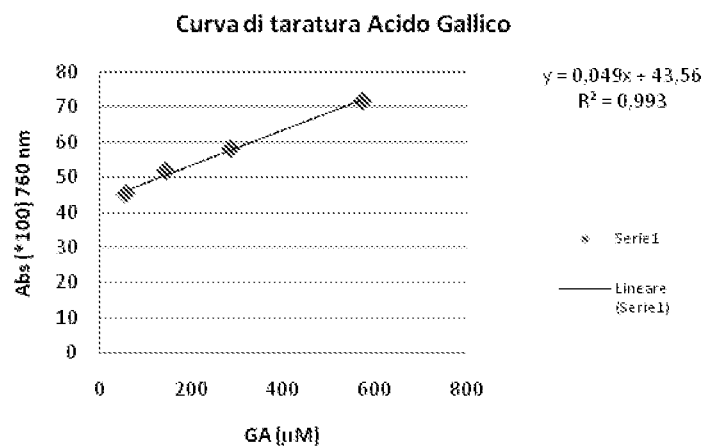


Figura 1. Curva di taratura acido gallico.

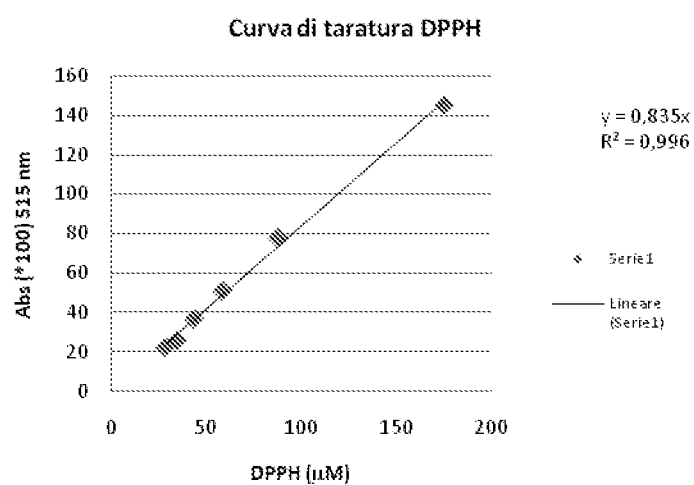


Figura 2. Curva di taratura DPPH

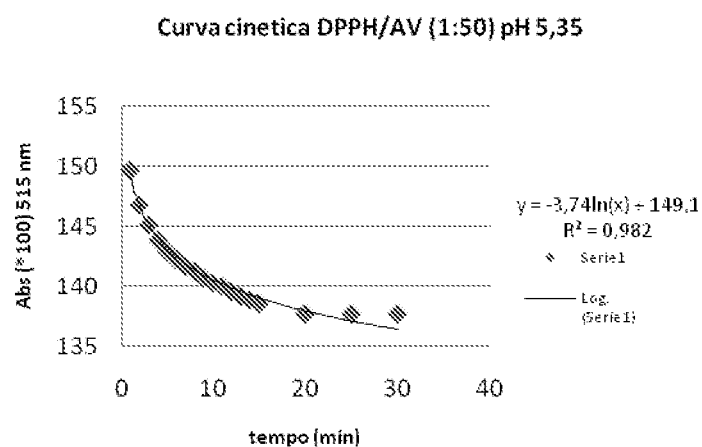


Figura 3. Curva cinetica DPPH/estratto acquoso

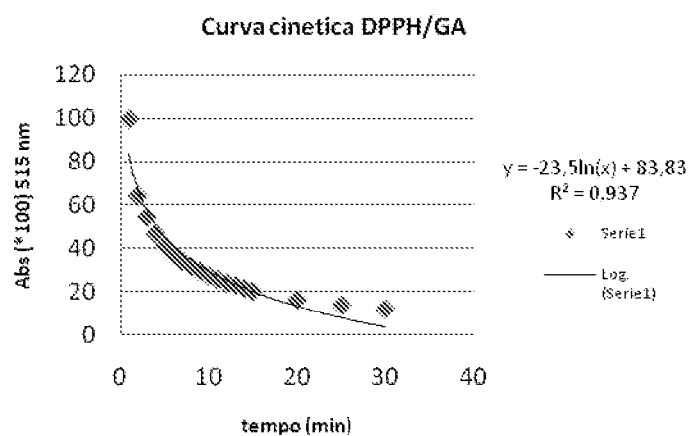


Figura 4. Curva cinetica DPPH/acido gallico

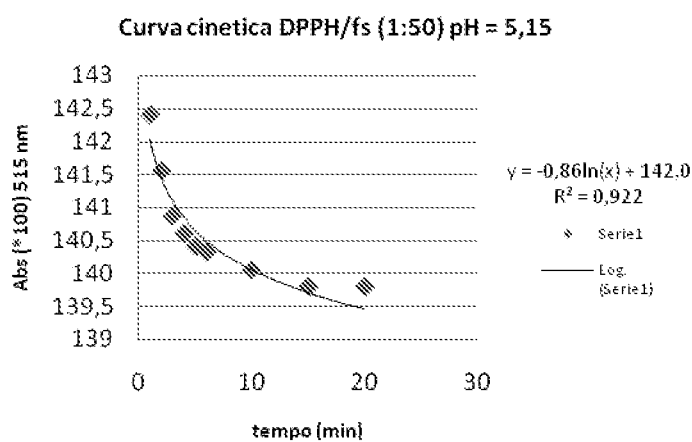


Figura 5. Curva cinetica DPPH/estratto da frazione solida diluito 1:50.

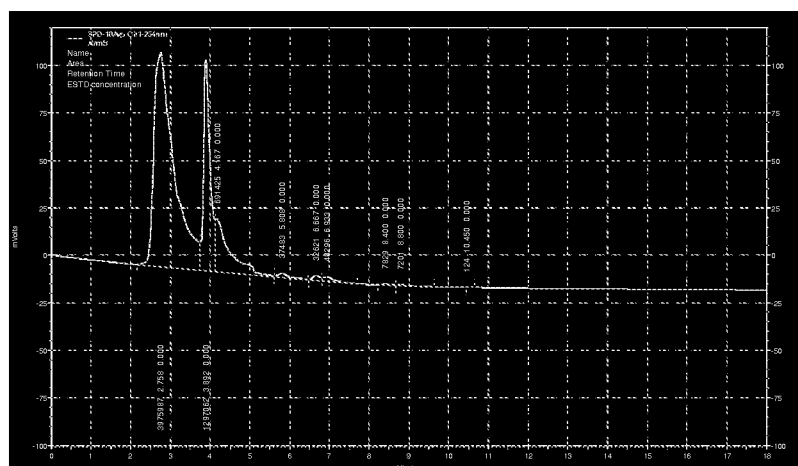


Figura 6. HPLC dell'estratto acquoso, diluito 1:50 con pH = 5,35.

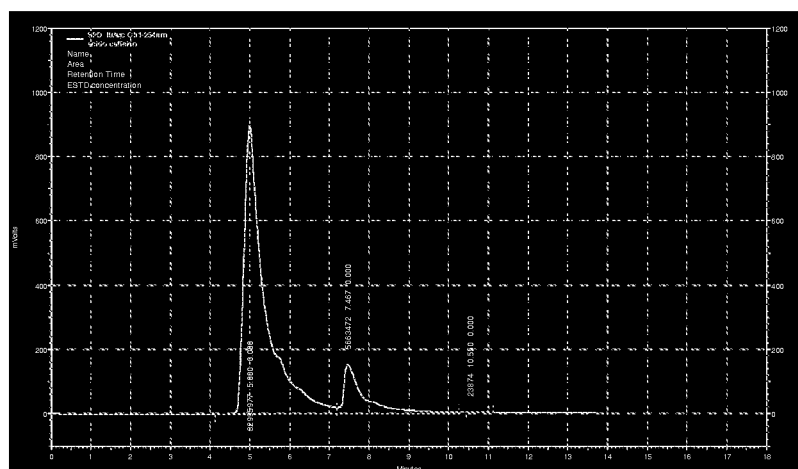


Figura 7. HPLC dell'estratto da frazione solida, diluito 1:50 con pH = 5,15.