



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0614917-0 B1



(22) Data do Depósito: 25/07/2006

(45) Data de Concessão: 20/08/2019

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM CONCENTRADO NATURAL RICO EM HIDROXITIROSOL NATURAL A PARTIR DE RESÍDUOS DE OLIVEIRA E SUBPRODUTOS

(51) Int.Cl.: A61K 36/63; A23L 33/105; A61K 8/34; A61Q 17/00; A61Q 19/00; (...).

(52) CPC: A61K 8/97; A23L 33/105; A61K 8/347; A61Q 17/005; A61Q 19/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 27/07/2005 PT 103326.

(73) Titular(es): MANUEL LUÍS DE MAGALHÃES NUNES DA PONTE; JOSÉ LUÍS CARDADOR DOS SANTOS; ANA ALEXANDRA FIGUEIREDO MATIAS; ANA VITAL MORGADO MARQUES NUNES; JOÃO PAULO SEREJO GOULÃO CRESPO; CATARINA MARIA MARTINS DUARTE.

(72) Inventor(es): ANA ALEXANDRA FIGUEIREDO MATIAS; ANA VITAL MORGADO MARQUES NUNES; JOÃO PAULO SEREJO GOULÃO CRESPO; MANUEL LUÍS DE MAGALHÃES NUNES DA PONTE; JOSÉ LUÍS CARDADOR DOS SANTOS; CATARINA MARIA MARTINS DUARTE.

(86) Pedido PCT: PCT IB2006052552 de 25/07/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/013032 de 01/02/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/01/2008

(57) Resumo: PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UM CONCENTRADO NATURAL, RICO EM HIDROXITIROSOL, A PARTIR DE RESÍDUOS DE OLIVEIRAS E DE SUBPRODUTOS, UTILIZANDO TECNOLOGIAS LIMPAS. A presente invenção refere-se a um processo para a obtenção de um concentrado natural, bioativo, rico em hidroxitirosol, a partir de resíduos de oliveiras e de subprodutos, utilizando tecnologias limpas. Estas tecnologias compreendem a extração por um fluido supercrítico, a nanofiltração e a osmose inversa, que são utilizadas individualmente ou num modo integrado. O extrato natural compreende uma concentração mínima de 15% (fração mássica) de hidroxitirosol e uma concentração máxima de 98% (fração mássica) deste composto. O concentrado rico em hidroxitirosol exibe atividades antioxidante, anti- microbiana, anti-inflamatória e anticarcinogénica, que são superiores às atividades observadas para o hidroxitirosol isolado, em concentração equivalente. O concentrado rico em hidroxitirosol pode ser preparado na forma de partículas sólidas, como uma solução aquosa, em emulsão ou como nanopartículas de base lipídica. A aplicação industrial compreende as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética.

**PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE UM CONCENTRADO NATURAL RICO EM
HIDROXITIROSOLO NATURAL A PARTIR DE RESÍDUOS DE OLIVEIRA E
SUBPRODUTOS**

Objeto e campo da invenção

5 A presente invenção refere-se a um processo para a obtenção de um concentrado natural, bioativo, a partir de resíduos de oliveiras e de subprodutos, utilizando tecnologias limpas. Estas tecnologias compreendem a extração com fluidos supercríticos, a nanofiltração e a
10 osmose inversa. Em particular, a invenção fornece um extrato de azeitona contendo hidroxitiroso, e um processo para a sua obtenção.

 O concentrado rico em hidroxitiroso tem um valor acrescentado importante como antioxidante, antimicrobiano,
15 anti-inflamatório e anticarcinogénico. A aplicação industrial compreende as indústrias alimentar, farmacêutica e de cosméticos.

Antecedentes da invenção

 Ao longo dos últimos anos, alguns estudos epidémicos
20 têm vindo a correlacionar a dieta mediterrânica com a baixa frequência de doenças cardíacas, aterosclerose e tipos definidos de cancro. Uma característica particular da dieta mediterrânica é a utilização de azeite, consumido diretamente ou usado em culinária (Visioli et al., 2002;
25 Owen et al., 2000).

 Estudos referentes a compostos bifenólicos presentes nas azeitonas e nas folhas de oliveira levaram os investigadores a reconhecer as suas propriedades biológicas, que também estavam associadas com as
30 propriedades saudáveis positivas do azeite. Por

consequente, os compostos bioativos presentes nas azeitonas e no azeite foram reconhecidos como importantes alvos para as indústrias farmacêutica e alimentar (Schieber et al., 2001). No entanto, 98% destes compostos bifenólicos perdiam-se durante a produção do azeite e permaneciam na água de vegetação e/ou nos resíduos sólidos resultantes do processamento das azeitonas (Rodis et al., 2002).

Os compostos presentes em concentrações elevadas nos resíduos sólidos são secoiridóides glicosilados, ao passo que na água de vegetação os compostos com concentrações mais elevadas são derivados de secoiridóides, maioritariamente hidroxitirosol e oleoeuropeína (Mullinacci et al., 2001).

Foram estudadas as propriedades dos resíduos sólidos obtidos durante a produção do azeite, assim como dos extratos obtidos a partir dos mesmos (Visioli et al., 1999); em particular, foi demonstrada a sua actividade antibacteriana (Ramos-Cormenzana et al., 1996), que foi associada à presença de oleoeuropeína e hidroxitirosol; este último composto foi salientado como sendo o composto com a mais elevada bioatividade (Bisignano et al., 1999).

O hidroxitirosol também foi apontado como um potente agente quimiopreventivo (Manna et al., 2000), e foi considerado como o componente presente nos resíduos do azeite com a mais alta potência anti-oxidante. As primeiras propriedades reconhecidas do hidroxitirosol foram a sua capacidade para impedir a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Visioli e Galli, 1998) e a agregação das plaquetas sanguíneas (Petroni et al., 1995). Mana et al. (2000) demonstraram que este composto é capaz de proteger

vários sistemas celulares humanos da toxicidade induzida por espécies oxigenadas reactivas. Foi também investigada a capacidade do hidroxitirosol para induzir modificações do ADN (Aruoma et al., 1999 e Deima et al., 1999).

5 Visioli et al. (2000) também demonstraram que, consoante a dosagem, este composto bifenólico é bem absorvido pelos humanos, sendo excretado na urina como glucuronatos conjugados.

10 Atualmente, o azeite é produzido exclusivamente utilizando-se processos mecânicos e físicos, que consistem na prensagem do fruto (polpa e caroços) até à obtenção de uma pasta homogênea, que é depois processada por separação de fases.

15 O passo de separação de fases tradicional utiliza prensas hidráulicas, que têm sido substituídas por centrifugação contínua. O processo contínuo é também denominado processo em três fases, no qual são obtidos como produtos finais azeite, água de vegetação e bagaço da azeitona, ou como processo em duas fases, no qual as
20 correntes de produtos finais são azeite e bagaço de azeitona.

 No sistema em três fases é adicionada água à pasta de azeitona e esta mistura é depois tratada numa centrífuga horizontal, na qual a fase sólida é separada do mosto
25 oleoso. Este mosto é depois processado por uma centrífuga vertical, na qual o azeite é separado da água de vegetação.

 O processo mais comum atualmente é o processo em duas fases, visto envolver um menor consumo de água. Por consequência, produz uma menor quantidade de água residual.
30 Este processo utiliza centrífugas de duas fases, que

separam o azeite e o bagaço de azeitona. O bagaço de azeitona é um resíduo semi-sólido, com a aparência de uma lama.

Têm sido publicadas diversas patentes, que apresentam
5 métodos para a recuperação dos compostos fenólicos a partir dos resíduos da oliveira. A Patente dos E.U.A. n.º 6 361 803 descreve um processo para a recuperação de compostos antioxidantes a partir de resíduos de azeitona. Este processo consiste numa extração preliminar com um
10 solvente aquoso, sendo o extrato produzido usado para alimentar uma coluna de adsorção, a fim de reter os compostos com interesse. Estes compostos são recuperados subsequentemente eluindo-se um solvente orgânico através da coluna de adsorção. A patente dos E.U.A. n.º 6 849 770
15 descreve um processo para a recuperação de hidroxitirosol através de um processo cromatográfico que utiliza metanol ou misturas de água/etanol como solventes de eluição.

A Patente WO 0218310 descreve um processo de obtenção de uma composição rica em hidroxitirosol a partir da água
20 de vegetação, utilizando-se um método patenteado anteriormente (Patente dos E.U.A. n.º 5 490 884), conhecido por Porocrit. A extração dos compostos pretendidos a partir da água de vegetação é conseguida utilizando-se fluidos supercríticos, tais como dióxido de carbono, e membranas
25 porosas em vez de colunas de contacto. Em vez de dispersar as fases, o líquido é alimentado continuamente através de membranas porosas de polipropileno, configuradas na forma de feixes de fibras ocas ou de folhas enroladas em espiral. O líquido passa através das membranas porosas dentro de um
30 módulo pressurizado, enquanto o dióxido de carbono

supercrítico flui em contra-corrente do outro lado da membrana. É importante notar, de acordo com os autores desta patente, que a pressão no módulo é essencialmente a mesma, de forma que a extração é provocada pelo gradiente
5 de concentração entre o líquido e o dióxido de carbono supercrítico, e não por um gradiente de pressão entre os dois lados da membrana. O extrato pode ser recuperado vaporizando-se o dióxido de carbono para reciclagem. Adicionalmente, a Patente dos E.U.A. n.º 5 714 150 descreve
10 um processo para a extração de oleuropeína das folhas da oliveira, utilizando-se misturas de água/etanol.

A utilização de processos de filtração através de membranas e a sua integração com outras técnicas, tais como centrifugação, tem sido relatada por grupos de
15 investigação, tendo em vista desenvolver processos para o tratamento de águas residuais de moinhos de azeitonas.

O processo apresentado no Documento WO 0218310 difere do processo da presente invenção principalmente porque não inclui uma operação de osmose inversa, estando esta
20 operação compreendida no segundo passo da presente invenção. Outro aspecto que distingue este processo é o fato de a pressão, nos dois lados opostos da membrana, ser essencialmente a mesma, de forma que a extração é provocada pelo gradiente de concentração entre o líquido e o dióxido
25 de carbono supercrítico e não por um gradiente de pressão entre os dois lados da membrana. Consequentemente, o produto obtido pelo processo descrito no Documento WO 0218310 é substancialmente diferente do extrato obtido de acordo com o processo da presente invenção, o qual, muito
30 preferivelmente, exclui compostos com um peso molecular

acima de 300 Da.

Drouiche et al. (2004) descrevem a utilização de ultrafiltração para remover as partículas e os compostos orgânicos da água de vegetação. O trabalho publicado por
5 Turano et al. (2002) descreve um processo que integra a centrifugação e a ultrafiltração para o tratamento da água de vegetação. Neste processo integrado, a centrifugação permite remover a fração de sólidos em suspensão, protegendo a membrana de ultrafiltração de problemas graves
10 de obstrução causados por estas partículas.

DellaGreca et al. (2001 e 2004) relatam um método analítico desenvolvido para a caracterização da água de vegetação. Este método envolve o fracionamento da água de vegetação, a fim de se obterem componentes individuais
15 isolados presentes na água. É utilizada para este fim uma série de técnicas com membranas.

O Documento US 2003/0108651 refere-se a um processo diferente do processo descrito na presente invenção, nomeadamente porque não inclui uma operação de osmose
20 inversa, que está incluída no segundo passo da presente invenção. Como consequência da utilização de processos diferentes, o extrato complexo obtido de acordo com o processo da presente invenção é diferente do produto obtido pelo processo descrito no Documento US 2003/0108651, que
25 descreve que o método compreende o fracionamento da água de vegetação incubada, para separar o hidroxitirosol de outros componentes. Adicionalmente, este processo utiliza, para o fracionamento e a separação do hidroxitirosol, a incubação da água de vegetação com um solvente orgânico, nomeadamente
30 o acetato de etilo, e compreende ainda a purificação do

hidroxitirosol por cromatografia. Pelo contrário, a presente invenção não compreende a separação do hidroxitirosol nem a sua purificação por cromatografia ou por qualquer outro meio, uma vez que a sua finalidade é
5 obter um extrato biológico, que compreende o hidroxitirosol e outros compostos bioativos.

A Patente EP 1 623 960 A1 descreve um processo para o tratamento das águas residuais de moinhos de azeite, permitindo a recuperação de tirosol e hidroxitirosol
10 altamente puros. A fim de se obter o referido produto, este processo utiliza técnicas de membranas. Adicionalmente, o composto tirosol recuperado das águas residuais de moinhos de azeite é convertido cataliticamente no hidroxitirosol. Por conseguinte, este processo visa a obtenção de compostos
15 altamente puros, em vez de extratos naturais complexos de subprodutos do azeite.

Skaltsounis, L. et al. (PROJECTO MINOS "Desenvolvimento de um processo para uma gestão integrada de resíduos de moinhos de azeitonas, recuperando antioxidantes naturais
20 e produzindo fertilizante orgânico) descreve um processo de adsorção, uma vez que utiliza uma resina para capturar polifenóis das águas residuais de moinhos de azeite. Os polifenóis capturados no meio de resina são, por conseguinte, recuperados por utilização de um solvente
25 orgânico. Além disso, estes polifenóis são recuperados termicamente do solvente orgânico utilizado e separados por cromatografia. As nanofiltração/osmose inversa são referidas neste projeto como uma forma de para tratar o efluente de descarga de resina e salmoura, que é rico em
30 sais minerais (contra-íões do material da resina), mas não

contém polifenóis. Assim, o processo mencionado acima é completamente diferente do processo descrito na presente invenção, devido à utilização daquela resina para isolar os polifenóis das águas residuais de moinhos de azeite, em vez
5 da utilização de um processos em dois passos, que consiste na extração dos compostos biológicos por meio de uma coluna de extração por fluido supercrítico ou de uma unidade de nanofiltração, e utilizar em seguida uma unidade de osmose inversa para se obter um extrato biológico contendo
10 hidroxitirosol.

Não existe qualquer processo, recorrendo a tecnologias limpas, capaz de remover, dos resíduos da azeitona, um extrato natural complexo rico em hidroxitirosol e contendo outros compostos bioativos com propriedades desejáveis,
15 assegurando simultaneamente a rejeição de compostos com peso molecular mais elevado e com propriedades biológicas prejudiciais.

Existem comercialmente, como suplementos dietéticos, concentrados ricos em hidroxitirosol. Um destes produtos é
20 produzido de acordo com o processo patenteado WO 0218310, anteriormente referido. É ali dito que este concentrado pode ser utilizado na agricultura como um agente natural antibacteriano, antiviral e antifúngico, bem como como um agente terapêutico ou aditivo alimentar.

25 De fato, foram realizados estudos a fim de se comparar o resultado do processo apresentado no Documento WO 0218310, um produto comercial designado por Hydrox®, Creagi, e o extrato obtido pelo processo da presente invenção. Ambos os produtos foram ensaiados, quanto à
30 citotoxicidade, sobre a linha de células CACO-2 (cólon

humano), e quanto à atividade anti-proliferativa sobre a linha de células de cancro do cólon humano HT-29. Os resultados mostram que ambos os extratos são não citotóxicos para a linha de células CACO-2 (cólon humano).

5 No entanto, o efeito inibidor de proliferação do extrato natural produzido pela presente invenção sobre a linha de células de cancro humano ensaiada, é superior (110% mais elevado para concentrações de polifenóis acima de 200 mg/L) à atividade biológica exibida pelo produto obtido de acordo
10 com o processo descrito no Documento WO 0218310.

Além disso, a presente invenção utiliza como matéria-prima qualquer tipo de resíduo de oliveira, incluindo resíduos sólidos, e não visa o isolamento do hidroxitirosol em si mesmo, mas antes a obtenção de um extrato complexo
15 rico neste composto, compreendendo também outros compostos bioativos.

Breve descrição da invenção

A presente invenção refere-se a um processo para a obtenção de um concentrado natural, bioativo, rico em
20 hidroxitirosol, obtido a partir de resíduos de oliveiras e de subprodutos, utilizando tecnologias limpas, compreendendo um dos seguintes passos: (a) o fornecimento de uma corrente líquida contendo hidroxitirosol e outros compostos bioativos da oliveira a uma coluna de extração
25 por um fluido supercrítico, na qual os referidos hidroxitirosol e compostos bioativos são recuperados para uma corrente de extrato, ou (b) o fornecimento de uma corrente fluida contendo hidroxitirosol e outros compostos bioativos da oliveira a uma unidade de nanofiltração, na
30 qual os referidos hidroxitirosol e outros compostos

bioativos são recuperados na corrente de permeado da referida nanofiltração, que são seguidos pelo passo (c), que consiste em fornecer a corrente de extrato da referida coluna de extração com fluido supercrítico ou a corrente de permeado da referida operação de nanofiltração ao compartimento de alimentação de uma unidade de osmose inversa, na qual os referidos hidroxitirosol e compostos bioativos são retidos e concentrados e concentrados na corrente de fração retida.

O extrato natural compreende uma concentração mínima de 15% (fração mássica) de hidroxitirosol e uma concentração máxima de 98% (fração mássica) deste composto. O concentrado rico em hidroxitirosol exhibe actividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticarcinogénica, que são superiores às actividades observadas para o hidroxitirosol isolado, em concentração equivalente. O concentrado rico em hidroxitirosol pode ser preparado na forma de partículas sólidas, como solução aquosa, em emulsão ou como nanopartículas de base lipídica. A aplicação industrial compreende as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética.

Breve descrição dos desenhos

Para complementar a presente descrição, e com a finalidade de auxiliar um melhor entendimento das características da invenção, será feita uma descrição pormenorizada de uma forma de realização preferida, baseada num conjunto de desenhos que são anexados à presente especificação e nos quais a descrição que se segue está representada com um carácter ilustrativo e não limitativo:

a figura 1 mostra a estrutura química de alguns dos compostos fenólicos presentes nos resíduos em duas fases;

a figura 2 mostra um diagrama esquemático do processo integrado, que foi utilizado na variante de realização do processo que é objeto da presente invenção;

a figura 3 mostra os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de: (a) um concentrado rico obtido por extração supercrítica; (b) a correspondente solução de alimentação. Além do hidroxitirosol, é notória a presença no extrato, entre outros, de luteolina e de ácidos hidroxicinâmicos, tais como o ácido cafeico e o ácido p-cumárico;

a figura 4 mostra uma comparação entre os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de: (a) um extrato aquoso, obtido por lixiviação de um bagaço de azeitona com água à temperatura ambiente, que alimenta o processo de nanofiltração, (b) a corrente de concentrado obtida por nanofiltração/osmose inversa. É notório o aumento da concentração de hidroxitirosol e de tirosol na corrente produzida por nanofiltração/osmose inversa;

a figura 5 mostra o efeito antibacteriano do extrato rico em hidroxitirosol obtido por nanofiltração integrada/osmose inversa. A cultura bacteriana era de *Ehrlichia ruminantum*;

a figura 6 mostra o efeito do extrato rico em hidroxitirosol obtido por nanofiltração integrada/osmose inversa como um agente capaz de reduzir a proliferação de células cancerígenas. As células usadas neste exemplo são da linha de células HT 29 (células do adenocarcinoma cólico humano).

Descrição pormenorizada da invenção

A presente invenção refere-se a um processo para a obtenção de um concentrado natural bioativo, rico em hidroxitirosol, a partir de resíduos de oliveiras e de subprodutos, utilizando tecnologias limpas. Estas tecnologias compreendem a extração com fluidos supercríticos, a nanofiltração e a osmose inversa, que são empregues individualmente ou num modo integrado. Utilizando-se este processo, um ou mais solutos bioativos, presentes nos resíduos da oliveira e nos subprodutos, são recuperados no extrato. As estruturas químicas de alguns destes compostos estão representadas na figura 1.

Os resíduos da oliveira e os subprodutos incluem: i) águas de vegetação e resíduos sólidos de moinhos de azeitonas que trabalham de acordo com o processo em três fases; ii) resíduos semi-sólidos dos moinhos de azeitonas, que trabalham de acordo com o processo em duas fases; iii) caroços de azeitonas e folhas de oliveira.

A figura 2 mostra um diagrama esquemático do processo integrado, que foi utilizado na forma de realização do processo que constitui o objeto da presente invenção. Esta figura compreende as seguintes operações: extração com solventes biocompatíveis, recuperação seletiva do soluto ou solutos bioativos utilizando-se a extração com fluido supercrítico, ou a nanofiltração, e a osmose inversa. O primeiro passo consiste no tratamento dos resíduos sólido e semi-sólido da oliveira (A) por extração com água ou com outros solventes biocompatíveis (B), tais como misturas hidroalcoólicas. O extrato resultante pode ser enviado diretamente para a unidade de extração com fluido

supercrítico (I) ou para a unidade de nanofiltração (E), ou, em alternativa, pode ser misturado com as águas de vegetação dos moinhos de azeitonas (C) e centrifugado (D), a fim de se removerem as partículas e outros sólidos em suspensão. Neste último caso, o sobrenadante da centrífuga é enviado para a unidade de extração com fluido supercrítico (I) ou para a unidade de nanofiltração (E). A operação de nanofiltração separa o hidroxitirosol e outros compostos bioativos com os compostos de baixo peso molecular, que são recuperados na corrente de permeado produzida, dos compostos com peso molecular superior, que são retidos na corrente da fração retida. A fim de aumentar a concentração do hidroxitirosol e dos outros compostos bioativos presentes no permeado, esta corrente pode ser enviada a uma unidade de osmose inversa (F). Esta operação produz uma corrente de fração retida, rica em hidroxitirosol e nos outros compostos bioativos com interesse (G), e uma corrente aquosa (H), que pode ser reutilizada no passo de extração (B) ou descartada no meio ambiente. O processo de extração supercrítica compreende uma coluna de extração supercrítica (I), onde são recuperados o hidroxitirosol e os outros compostos bioativos, e são separados dos outros componentes da corrente de alimentação. A corrente rica em hidroxitirosol e nos outros compostos bioativos pode ser então encaminhada para uma unidade de osmose inversa (J), a fim de aumentar a sua concentração. Esta operação produz uma corrente de fracção retida rica em hidroxitirosol e nos outros compostos bioativos de interesse (L), e uma corrente aquosa (M), que pode ser reutilizada no passo de extração (B) ou descartada no

ambiente.

A fim de se projetar um processo que permita uma recuperação efetiva dos compostos bioativos com interesse, com altos rendimentos e elevada seletividade, é necessário
5 definir as condições ótimas para a integração dos diferentes passos envolvidos. Esta integração envolve a seleção de um solvente adequado e biocompatível para a extração, e a seleção das condições de operação da unidade de extração com fluido supercrítico e dos passos de
10 nanofiltração e osmose inversa.

Os fluidos supercríticos são gases à temperatura ambiente e à pressão atmosférica, ou líquidos muito voláteis, que se tornam muito densos acima das suas pressão e temperatura críticas. As suas propriedades situam-se
15 entre as de um gás e de um líquido, resultando numa maior capacidade para dissolver compostos. A sua massa específica relativamente elevada, próxima da massa específica dos líquidos e, simultaneamente, a alta difusibilidade e baixa viscosidade, semelhantes às dos gases, permitem-lhes
20 extrair compostos mais rapidamente do que os solventes líquidos convencionais. Adicionalmente, o seu poder de solvatação pode ser facilmente ajustado por variação da temperatura e da pressão, o que os torna particularmente apropriados para o fracionamento seletivo de extratos.

25 A extração dos solutos visados a partir das matérias-primas líquidas, utilizando a extração com fluidos supercríticos é realizada numa coluna que promove o contacto entre os líquidos supercríticos e a matriz líquida. A mistura líquida é enviada continuamente ao topo da coluna
30 por meio de uma bomba e a alimentação com o líquido

supercrítico é realizada na base da coluna, por meio de um compressor. O líquido supercrítico e os solutos extraídos, recuperados do líquido da alimentação, abandonam a coluna por uma saída no topo. Os solutos são recuperados num
5 ciclone por expansão do fluido supercrítico até 6 MPa; o fluido supercrítico é novamente comprimido e reutilizado de novo na coluna. A pressão no interior da coluna é controlada por uma válvula pneumática localizada antes do ciclone. Esta coluna de extração supercrítica pode ser
10 alimentada diretamente com as águas de vegetação, mas também pode trabalhar com extratos previamente obtidos por extração com solventes biocompatíveis, tais como água, etanol ou misturas destes solventes.

Na presente invenção, o passo de extração supercrítica
15 é realizado num intervalo de temperaturas entre 30°C e 200°C, preferivelmente entre 30°C e 80°C, e a pressões que oscilam desde 6 MPa até 40 MPa, preferivelmente entre 8 MPa e 20 MPa.

Qualquer fluido ou mistura de fluidos no estado
20 supercrítico ou no estado líquido sub-crítico pode ser utilizado para realizar o processo descrito na presente patente. O fluido comprimido ou a mistura de fluidos têm, preferivelmente, que ser muito voláteis ou estar no estado gasoso em condições atmosféricas, a fim de tornar fácil a
25 sua recuperação por expansão e/ou evaporação depois de se completar o passo de extração. Por razões de segurança, o fluido comprimido, ou a mistura destes fluidos, deverá ser não tóxica e não inflamável e tem que ser reciclável para utilização posterior.

30 A nanofiltração e a osmose inversa são técnicas de

separação através de membranas para o processamento de correntes líquidas, em que a força responsável pelo transporte é a diferença de pressão efetiva entre os compartimentos de alimentação (portanto, da fração retida) e do permeado. Uma correta seleção das membranas de nanofiltração e de osmose inversa, e das condições de operação do equipamento relacionado, permitem obter um transporte seletivo do soluto ou solutos visados e da corrente ou correntes de permeação relevantes.

As unidades de nanofiltração e de osmose inversa incluem um recipiente de alimentação, que contém a solução com os solutos a ser recuperados. O conteúdo do recipiente de alimentação é enviado, por meio de uma bomba centrífuga ou de uma bomba de deslocação positiva, para o módulo ou módulos de nanofiltração ou de osmose inversa, que compreendem um compartimento de alimentação/fração retida, a membrana escolhida através da qual o soluto ou solutos alvo são permeados, e um compartimento de permeado. O permeado pode ser removido continuamente ou intermitentemente. Depois do contacto com a membrana, a corrente de fração retida pode ser reciclada para o recipiente de alimentação.

A corrente de matéria-prima consiste numa solução aquosa ou hidroalcoólica. Esta solução pode ser água de vegetação ou um extrato obtido durante o processamento dos resíduos de azeitona. Os solutos alvo a serem recuperados compreendem todos os tipos de solutos bioativos.

A corrente de matéria-prima tem, preferivelmente, que estar a uma temperatura inferior a 150°C, se forem empregues membranas poliméricas, mas pode ser tratada a

temperaturas mais elevadas se forem utilizadas membranas estáveis à temperatura, tais como membranas cerâmicas ou metálicas.

As membranas para a nanofiltração e a osmose inversa
5 têm que atuar como uma barreira seletiva, a fim de se evitar a permeação de componentes indesejáveis da matéria-prima, permitindo a permeação do soluto ou solutos com uma bioatividade desejável. As membranas têm que ter características que conduzam a um débito elevado do soluto
10 ou solutos visados e a um débito baixo ou nulo dos componentes indesejáveis da matéria-prima.

A membrana pode ser polimérica ou inorgânica. Também podem compreender materiais tanto poliméricos como inorgânicos. No que se refere à sua estrutura, também podem
15 ser homogêneas ou compósitas; neste último caso podem incluir diversas camadas, constituídas por materiais diferentes e/ou com características morfológicas diferentes. Cada uma destas camadas pode ter uma espessura diferente.

20 No que se refere à sua natureza química, as membranas podem apresentar um caráter hidrofóbico, significando que são mais permeáveis às espécies químicas hidrofóbicas, isto é, a espécies químicas que apresentem um coeficiente de atividade infinita maior que a unidade em solução aquosa.
25 As membranas também podem apresentar um caráter hidrofílico, o que significa que são mais permeáveis à água do que a compostos orgânicos.

As membranas podem ter uma geometria plana ou tubular e podem estar dispostas num módulo de placa e armação, num
30 módulo enrolado em espiral, num módulo de fibras ocas, num

módulo capilar ou num módulo tubular.

A corrente de matéria-prima pode ser fornecida de forma contínua, semi-contínua ou por cargas. O módulo ou módulos de membranas podem estar submersos num ou em vários
5 recipientes de matéria-prima, ou colocados exteriormente em relação ao recipiente de matéria-prima. No caso de ser utilizado mais do que um módulo de membrana, aqueles podem estar dispostos em série ou em paralelo.

Para estabelecer a força atuante necessária para
10 promover o transporte do soluto ou solutos através da membrana, é estabelecida uma diferença de pressão entre os dois compartimentos (de alimentação/fração retida e de permeado) do módulo ou módulos de membrana. O valor da diferença de pressão absoluta deverá estar situado num
15 intervalo de 0,5 MPa a 3,0 MPa, preferivelmente no intervalo de 1,0 MPa a 1,5 MPa para a operação de nanofiltração; na operação de osmose inversa o intervalo da diferença de pressão absoluta situa-se entre 3 MPa e 8 MPa, preferivelmente no intervalo de 4 MPa a 6 MPa.

20 O concentrado natural rico em hidroxitirosol (correntes G e L na figura 2), obtido pelo processo da presente invenção, contém uma fração mássica mínima de 15% de hidroxitirosol e uma fração mássica máxima de 98% deste composto. A seleção das condições de operação e das
25 características da membrana de nanofiltração, tais como, o seu nível de corte de peso molecular, permite permear seletivamente os compostos bioativos com as propriedades desejadas, assegurando simultaneamente a retenção de compostos com um peso molecular superior, que podem exibir
30 uma atividade biológica prejudicial. Tendo em vista o

fracionamento seletivo dos compostos bioativos presentes na corrente de alimentação, o nível de corte de peso molecular da membrana de nanofiltração deverá ser inferior a 1000 Da, preferivelmente inferior a 400 Da, e muito preferivelmente inferior a 300 Da. O valor do nível de corte de peso molecular das membranas de nanofiltração é calculado por determinação da rejeição de solutos de referência, tais como, galactose ou sacarose, de soluções aquosas.

Os extratos concentrados contêm outros compostos bioativos além do hidroxitirosol, originalmente presente nas azeitonas ou nas folhes de oliveira, de acordo com o material de partida utilizado. A presença concomitante de hidroxitirosol e de outros compostos bioativos desejados, que resulta do processo da presente invenção, origina uma sinergia entre eles que se reflete sobre a atividade biológica global dos extratos concentrados. Como consequência, estes concentrados ricos em hidroxitirosol exibem atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticarcinogénica que são superiores às atividades observadas para o hidroxitirosol isolado em concentração equivalente.

O concentrado rico em hidroxitirosol pode ser preparado na forma de um líquido, de um sólido ou de uma emulsão. A forma líquida refere-se a uma solução aquosa, que pode ser evaporada, liofilizada ou atomizada, a fim de produzir partículas sólidas. Adicionalmente, podem ser preparadas diferentes formulações específicas, utilizando-se excipientes biocompatíveis e matrizes lipídicas, a fim de proteger a bioatividade dos compostos recuperados.

Em alternativa, o concentrado rico em hidroxitirosol

pode ser preparado na forma de uma emulsão, a fim de tornar mais fácil a sua incorporação em diferentes produtos. Estas emulsões podem ser preparadas mediante a utilização de ésteres de poliglicerol de ácidos gordos, ésteres de glicerol de ácidos gordos, lecitina, ou combinações destes emulsionantes. Estas formulações deverão ter uma fração em volume entre 5% e 60% de hidroxitirosol, preferivelmente entre 30% e 55%. Pode ser adicionado ácido cítrico a estas emulsões, a fim de as estabilizar.

As aplicações dos concentrados ricos em hidroxitirosol nas suas diversas formas de fornecimento incluem as indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética.

Exemplos

Tendo em vista ilustrar a presente invenção, são dados quatro exemplos da utilização da presente invenção. Estes exemplos não são restritivos.

Exemplo 1:

Produção de um concentrado rico em compostos polifenólicos, contendo hidroxitirosol, através de um processo integrado compreendendo a extração com solventes biocompatíveis e o subsequente fracionamento por extração com fluido supercrítico

300 g de um resíduo semi-sólido, de um processo de produção de azeite em duas fases, foram extraídos com 900 mL de uma solução hidroalcoólica com uma relação volumétrica de 90:10 (etanol:água). O extrato recuperado foi centrifugado e o sobrenadante foi usado para alimentar uma coluna de extração com fluido supercrítico, com um enchimento estruturado fornecido por Sulzer; a coluna tinha 4 m de altura, com um diâmetro interno de 4 cm. O líquido

de alimentação foi extraído em contra-corrente com dióxido de carbono supercrítico. Foram recuperados da coluna 500 ml de extrato. Este extrato foi analisado por cromatografia líquida e o cromatograma correspondente é apresentado na figura 3. Esta figura mostra os cromatogramas obtidos para: (a) um concentrado rico, obtido por extração supercrítica; (b) a correspondente solução de alimentação. Pode ser observado da figura 3 (a) que o pico correspondente ao hidroxitirosol e aos seus derivados representa 35% da área de todos os picos. Além do hidroxitirosol, é notória a presença no extrato, entre outros, de luteolina e de ácidos hidroxicinâmicos com alta atividade biológica, tais como o ácido cafeico e o ácido p-cumárico.

Exemplo 2:

Produção de um concentrado rico em compostos polifenólicos, contendo hidroxitirosol, utilizando um processo integrado de nanofiltração/osmose inversa

250 mL de um extrato aquoso, obtido por lixiviação de um bagaço de azeitona com água à temperatura ambiente, foram usados para alimentar uma unidade de nanofiltração, onde foram processados a uma diferença de pressão absoluta de 1 MPa. Foram obtidos 240 mL de permeado, com um rendimento de recuperação de hidroxitirosol de 70%. O permeado obtido foi tratado posteriormente por osmose inversa operada a 2,5 MPa. A fração retida resultante foi caracterizada por cromatografia líquida. A figura 4 mostra os cromatogramas obtidos para (a) o extrato aquoso que alimenta o processo de nanofiltração, e (b) a fração retida concentrada obtida depois do processo de nanofiltração/osmose inversa descrito. É notório o aumento

da concentração de hidroxitirosol e de tirosol na corrente produzida por nanofiltração/osmose inversa. A membrana de nanofiltração era uma Desal DK, da General Electric, com um nível de corte de peso molecular de 250 Da. A membrana de osmose inversa era uma Filmtec SW 30 da Dow.

Exemplo 3:

Caracterização da atividade antimicrobiana de um extrato concentrado rico em hidroxitirosol, produzido por nanofiltração/osmose inversa

10 A atividade antimicrobiana de um extrato concentrado rico em hidroxitirosol, obtido por nanofiltração/osmose inversa, foi avaliada por adição de diferentes concentrações deste extrato a culturas de células animais infectadas com a bactéria *Ehrlichia ruminantum*. A figura 5
15 mostra que a percentagem de células bacterianas mortas se eleva até 80% depois da exposição ao extrato.

Exemplo 4:

Caracterização da atividade anticancerígena de um extrato concentrado rico em hidroxitirosol, obtido por
20 nanofiltração/osmose inversa

A atividade anticancerígena de um extrato concentrado rico em hidroxitirosol, obtido por nanofiltração/osmose inversa integradas, foi avaliada por adição de diferentes concentrações deste extrato a culturas de células do
25 adenocarcinoma cólico humano (linha de células HT 29). A figura 6 mostra que a percentagem de células de cancro viáveis diminui para menos de 20% depois da exposição ao extrato.

Referências

30 Patentes

US 6 361 803... Cuomo et al.
 US 6 849 770... Fernandez-Bolanos et al.
 US 5 714 150... Nashman
 WO 0218310... Crea
 5 EP 1 623 960 A1... Villanova et al.

Outras referências

Allouche et al., "Toward a High Yield Recovery of Antioxidants and Purified Hydroxytyrosol from Olive Mill Wastewaters", J. Agric. Food Chem. 52(2) (2004) 267-273

10 Ryan et al., "Recovery of phenolic compounds from Olea europaea", Anal. Chim. Acta 445 (2001) 67-77

DellaGreca et al., "Low-molecular-weight components of olive oil mill wastewaters", Phytochem. Anal. 15 (2004) 184-188

15 DellaGreca et al., "Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill waste waters", Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67 (2001) 352-359

Drouiche et al., "A compact process for the treatment of olive mill wastewater by combining UF and UV/H2O2 techniques", Desalination 169 (2004) 81-88

Fernandez-Bolanos et al., "Production in Large Quantities of Highly Purified Hydroxytyrosol from Liquid-Solid Waste of Two-Phase Olive Oil Processing or Alperujo", J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6804-6811

25 Fernandez-Bolanos et al., "Total Recovery of the Waste of Two-Phase Olive Oil Processing: Isolation of Added-Value Compounds", J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 5849-5855

Lesage-Meessen et al., "Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems", Food Chemistry 75 (2001) 501-507

Marrugat et al., "Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. A randomized trial", Eur. J Nutr. 43 (2004) 140-147

5 Manna et al., "Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells", FEBS Lett. 470 (2000) 341-344

Mullinacci et al., "Polyphenolic content in olive oil wastewaters and related olive samples", J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 3509-3514

10 Obied et al., "Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste", J. Agric. Food Chem. (Review) 53 (2005) 823-837

15 Quiles et al., "Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells", British Journal of Nutrition 88 (2002) 225-234

Bouazid et al., "Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product", Process Biochemistry 40 (2005) 1855-1862

20 Owen et al., "Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants", Lancet Oncol. 1 (2000) 107-112

Rodis et al., "Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases", J. Agric, Food Chem. 50 (2002) 596-601

25 Schieber et al., "By-products of plant food processing as a source of functional compounds recent developments", Trends in Food Science & Technology 12 (2001) 401-413

Tuck et al., "Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects", Journal of Nutritional Biochemistry 13 (2002) 636-644

30

Turano et al., "An integrated ccentrifugation-ultra-filtration system in the treatment of olive mill wastewaters", J. Membr. Sci. 209 (2002) 519-531

5 Visioli et al., "Antioxidant and other biological activities of olive mill wastewaters", J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 3397-3401

Visioli et al., "Olive oil phenolics are dose dependently absorbed in humans", FEBS Letters 468 (2000) 159-160

10 Visioli et al., "Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil", Medicinal Research Reviews 22 (2002) 65-75

Visioli et al., "Biological activities and metabolical fate of olive oil phenols", Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104
15 (2002) 677-684

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para obtenção de um concentrado natural rico em hidroxitirosol natural a partir de resíduos de oliveira e subprodutos, **caracterizado** pelo fato de que
5 consiste nas seguintes etapas:

(a) processar resíduos sólidos e semi-sólidos de oliveira por extração com água ou misturas hidroalcoólicas, ou

(b) alimentar o extrato que contem hidroxitirosol e outros compostos bioativos da oliveira diretamente para
10 uma unidade de nano filtração com um corte de peso molecular inferior a 300 Da ou misturar o extrato obtido na etapa (a) águas de vegetação dos moinhos de azeitonas e centrifugar a fim de remover partículas e outros sólidos em
15 suspensão e alimentando o sobrenadante obtido da centrífuga para a referida unidade de nano filtração, em que o referido hidroxitirosol e outros compostos bioativos de baixo peso molecular são recuperados em uma corrente de permeado da referida unidade de nano filtração, e

20 (c) alimentar a corrente de permeado da referida unidade de nano filtração para o compartimento de alimentação de uma unidade de osmose reversa em que o referido hidroxitirosol e outros compostos bioativos são retidos e concentrados em uma corrente de fração retida.

25 2. Processo de acordo com a reivindicado 1, **caracterizado** pelo fato de que a unidade de nano filtração é operada a uma diferença de pressão absoluta entre o compartimento de alimentação de fração retida e o compartimento de permeado no intervalo de 0,5 MPa a 3,0
30 MPa, e em que a unidade de osmose inversa é operada a uma

diferença de pressão absoluta no intervalo de 3 MPa a 8 MPa.

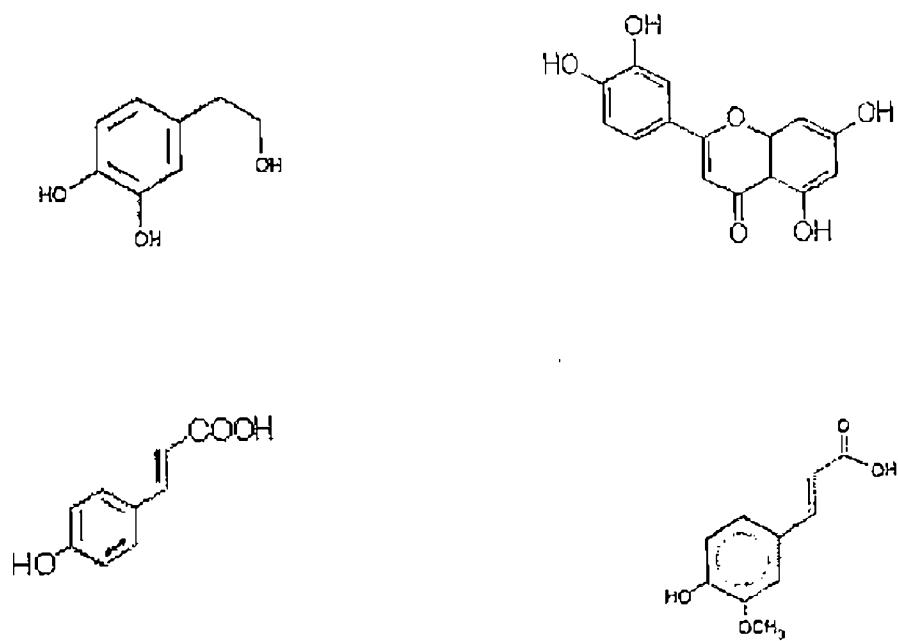
3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que a nano filtração e as
5 membranas de osmose reversa são homogêneas ou compósitas, em que as membranas são poliméricas ou inorgânicas ou ambos compreendem materiais poliméricos e inorgânicos.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a nano
10 filtração e as membranas de osmose reversa têm uma geometria plana ou uma geometria tubular, estando dispostas em um módulo de placa e armação, em um módulo de espiral, em um módulo de fibras ocas, em um módulo capilar ou em um módulo tubular.

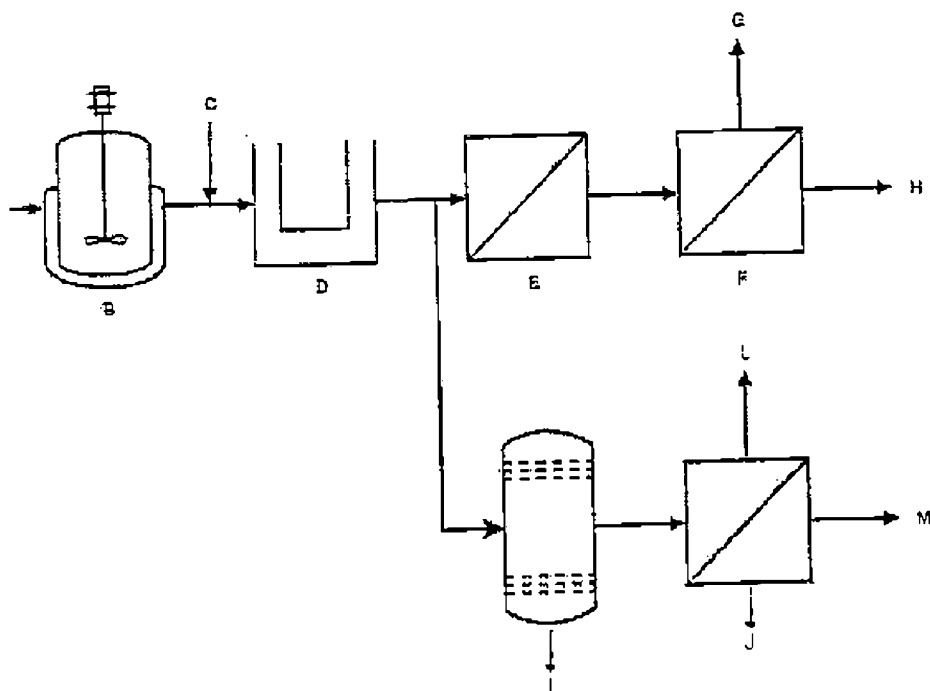
15 5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que um ou mais módulos de membrana são utilizados, dispostos em série ou em paralelo.

6. Processo de acordo com qualquer uma das
20 reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que pelo menos um módulo de membrana está submerso em um ou mais recipientes de matéria-prima, ou está colocado externamente ao recipiente de matéria-prima.

7. Processo de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a corrente de matéria-prima é alimentada à membrana de nano filtração e à unidade de osmose reversa em um modo contínuo, semi-contínuo ou por carga.



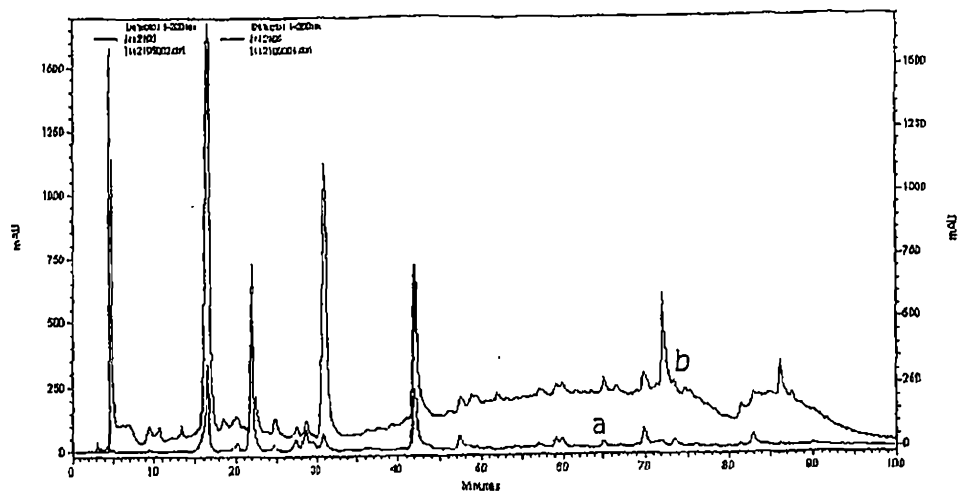
[Fig. 2]



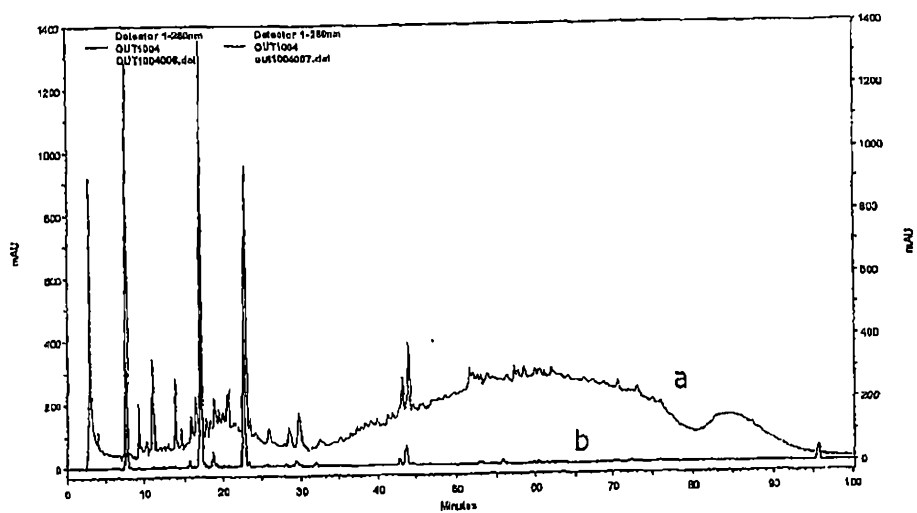
64
m

2/3

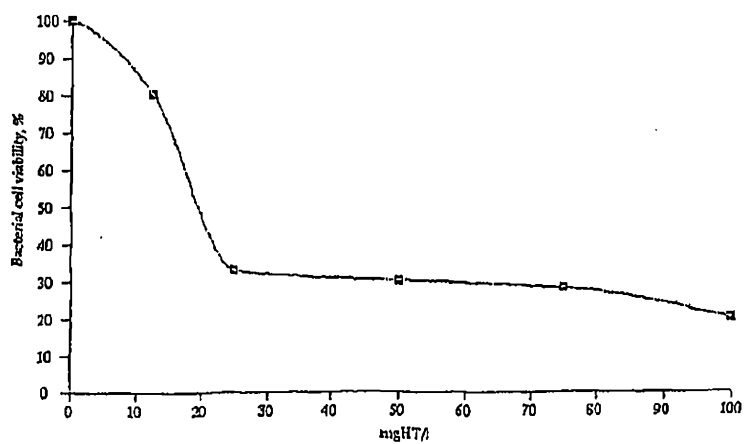
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



65 m

3/3

[Fig. 6]

