

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de enero de 2020 (30.01.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/021152 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
A23D 7/00 (2006.01) A23D 9/00 (2006.01)

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2019/070530

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Fecha de presentación internacional:
26 de julio de 2019 (26.07.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201830776 27 de julio de 2018 (27.07.2018) ES

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 MADRID (ES).

(72) Inventores: **LÓPEZ RUBIO, Amparo**; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Avenida Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 PATERNA (Valencia) (ES). **MARTÍNEZ SANZ, Marta**; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Avenida Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 PATERNA (Valencia) (ES). **FONTES, Candia**; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Avenida Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 PATERNA (Valencia) (ES). **FABRA ROVIRA, María José**; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Avenida Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 PATERNA (Valencia) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta Rubén Darío, 4, 28010 MADRID (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING OLEOGELS

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE OLEOGELES

(57) Abstract: The present invention relates to a method for obtaining oleogels, characterised in that they are obtained by means of the dispersion of a cationic salt in an emulsion of sulfated polysaccharide and an oil. The invention also relates to the oleogel obtained using the method, which is useful for food as a substitute for solid fats, as well as in biomedicine and the cosmetic and pharmaceutical industry.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de oleogeles caracterizado porque se obtienen mediante la dispersión de una sal catiónica en una emulsión de un polisacárido sulfatado y un aceite. La invención también se refiere al oleogel obtenido por el procedimiento útil para alimentación como sustituto de grasas sólidas, así como en biomedicina, cosmética y farmacia.



WO 2020/021152 A1

Procedimiento de obtención de oleogeles

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de oleogeles caracterizado porque se obtienen mediante la dispersión de una sal catiónica en una emulsión de un polisacárido sulfatado y un aceite. La invención también se refiere al oleogel obtenido por el procedimiento útil para alimentación como sustituto de grasas sólidas, así como en biomedicina, cosmética y farmacia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las grasas juegan un papel muy importante en el procesado de alimentos, aportando ciertas características a los productos alimenticios que garantizan la aceptabilidad de los consumidores. Las grasas están relacionadas con atributos como textura, palatabilidad, aroma y sabor en los alimentos procesados. Debido a su gran importancia en la industria alimentaria, se han desarrollado a lo largo del tiempo procesos para transformar aceites vegetales en grasas sólidas, el método principal para la solidificación de estas es por medio de la hidrogenación, que es un proceso por el cual el hidrogeno es capaz de saturar los enlaces insaturados del aceite y así aumentar su punto de fusión, convirtiéndolos en grasas sólidas. La desventaja de este tipo de procesos es que, al llevarse a cabo la solidificación de los aceites, se producen gran cantidad de grasas trans y grasas saturadas, las cuales llevan asociadas problemas de salud como enfermedades cardiovasculares. Se ha descrito que el remplazo de al menos un 5 % de grasas saturadas con grasas poliinsaturadas minimiza el riesgo de enfermedades en un 22-37 %. Por este motivo, actualmente se busca desarrollar nuevas estrategias para obtener grasas solidas que den a los alimentos las características organolépticas necesarias, reduciendo el contenido de grasas trans y saturadas.

Una alternativa para este problema consiste en el uso de oleogeles (Pehlivanoğlu, H. et al., Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2017, 0(0), 1–12). La oleogelación es el mecanismo por el cual un aceite líquido se transforma en una estructura tipo gel. En general, los oleogeles presentan una estructura viscoelástica formada por el aceite y un agente gelificante. Existen distintos mecanismos de oleogelación, siendo la oleogelación indirecta (gelificación a partir de emulsiones), una alternativa sencilla y eficiente para compuestos que son difíciles de dispersar en aceite por su naturaleza hidrofílica (Tavernier, A. R. et al., Food Hydrocolloids 2017, 65, 107–

120). La principal aplicación de los oleogeles en la industria alimentaria es la sustitución de grasas sólidas en productos de panificación, sustitución de margarinas y como sustituto de grasa en la fabricación de chocolates o cárnicos procesados. Además, se ha descrito su uso en cosméticos y como sistemas de liberación controlada (Hughes, N. E., et al., Trends in Food Science & Technology 2009, 20(10), 470–480).

Se ha investigado el uso de diversos compuestos como agentes gelificantes, tales como proteínas, ceras vegetales, mono y diacilglicéridos, alcoholes o ésteres de ácidos grasos, fosfolípidos y fitoesteres (Siraj et al., International Journal of Food Properties 2015, 18(9), 1973–1989). La etilcelulosa es uno de los agentes gelificantes que más se ha explorado, ya que tiene una buena solubilidad en aceite (Jiang, Y. et al., Food Hydrocolloids 2018, 77, 460–464). La desventaja del uso de este polímero es que para conseguir una solubilidad completa es necesario exponer la solución a altas temperaturas ($>130^{\circ}\text{C}$), lo que favorece la oxidación de la grasa líquida y se generan productos que son dañinos para la salud. Los procedimientos utilizados para producir oleogeles con etilcelulosa son bastante complejos. Un ejemplo es el caso descrito en la patente US9655376B2, donde se describe la producción de oleogeles por medio de un proceso de extrusión. También se ha descrito el uso de proteínas como agentes gelificantes (Romoscanu, A. I. et al., Langmuir 2006, 22(18), 7812–7818; y Tavernier, A. R. et al., Food Hydrocolloids 2017, 65, 107–120). La patente EP3011836A1 describe un procedimiento en el cual se utiliza un aislado de proteína de suero y el proceso de oleogelación se lleva a cabo por intercambio de disolvente. Dicho proceso consiste en dispersar la proteína en agua y lentamente sustituir el contenido de agua por acetona, para finalmente intercambiar la acetona por aceite, lo cual supone un proceso largo y complejo (7 horas).

Por otro lado, para que los oleogeles tengan aplicación en la industria alimentaria, es necesario el uso de agentes gelificantes de grado alimenticio y que a su vez sean fáciles de utilizar, por lo que se proponen polisacáridos sulfatados como agentes gelificantes en la oleogelación. La principal fuente de estos polisacáridos son algas marinas y según el tipo de alga variará su estructura química (Wijesekara, I. et al., Carbohydrate Polymers 2011, 84(1), 14–21). Los polisacáridos sulfatados se encuentran principalmente en tres grupos de algas; rojas, pardas y verdes. Entre los principales polisacáridos sulfatados se encuentran los carragenatos, que dependiendo de su grado de sulfatación presentan diferentes características gelificantes, siendo los

más utilizados en la industria alimentaria los carragenatos tipo κ (κ -C), tipo ι (ι -C) y tipo λ (λ -C), los cuales tiene 1,2 y 3 grupos sulfatos, respectivamente (Campo, V. L. et al., Carbohydrate Polymers 2009, 77(2), 167–180). Los polisacáridos sulfatados, son ampliamente utilizados en industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. A este grupo de polisacáridos se les atribuyen efectos benéficos en la salud como actividad antioxidante, anticoagulante, y antiviral entre otros, además de ser ampliamente utilizado en la industria alimentaria por las características reológicas que aporta a diversos alimentos.

En el estado de la técnica se han descrito procedimientos de obtención de oleogeles en los que el gel se produce a partir de la fase acuosa que contiene el polisacárido y el catión, previamente a añadir el aceite. Así, por ejemplo, en el documento “Exploitation of κ -carrageenan aerogels as template for edible oleogel preparation” (Manzzocco, et al., Food Hydrocolloids 2017, 71, 68-75) se describen oleogeles que se preparan usando como molde aerogeles de κ -carragenato en presencia de iones monovalentes. Los hidrogeles que contienen una concentración creciente (0,4, 1,0 y 2,0% p / p) de κ -carragenato se convierten primero en geles de alcohol y posteriormente se secan usando CO_2 supercrítico para obtener aerogeles. Estos últimos son materiales porosos y estructuralmente estables con alta resistencia mecánica. El contenido de polisacárido afecta a la estructura del aerogel, de tal modo que aumentando la concentración inicial de κ -carragenato se obtiene una estructura más gruesa con agregados de polímero más grandes. Sin embargo, el aerogel obtenido con una concentración de carragenato intermedia resulta más firme. Los aerogeles muestran una buena capacidad de absorción de aceite. La máxima capacidad de carga de aceite (aproximadamente 80%) se obtiene para el aerogel con el contenido más alto de κ -carragenato. Estos aerogeles basados en la estructuración de polisacáridos solubles en agua son útiles como material para la absorción y el suministro de aceite.

El documento EP0271132A hace referencia a una dispersión alimentaria que comprende una fase acuosa que forma un gel y que se compone de carragenato, un catión (calcio, sodio o potasio) y una fase lipídica a base de aceites o grasas. Las propiedades dependen de la cantidad y tipo de carragenato y cationes utilizados. En dicho documento se describen emulsiones de aceite en agua en las que se produce la inversión de la fase antes de que se forme el gel. En este documento se especifica que dichas dispersiones comestibles tienen una temperatura de transición por debajo de los 50°C y preferiblemente entre 15 y 35°C, lo que limita su uso para determinadas

aplicaciones que requieren temperaturas más altas, dado que por encima de dicha temperatura no se mantendría su estructura tipo gel.

5 El documento US5082684A divulga una emulsión en dos fases que comprende una fase acuosa formadora de gel a base de carragenato, pectina, agar o gelatina, una sal de calcio o de potasio y un emulsificante. La fase lipídica puede contener grasas, aceites animales o vegetales y preferiblemente utilizan grasas o aceites parcialmente hidrogenados. El desarrollo de estos materiales descritos también requiere de un ajuste de pH, mediante el uso de ácidos.

10

Por tanto, sería deseable disponer de un procedimiento en el que se generen oleogeles con temperaturas de transición superiores, que puedan ser manipulados y mantengan la estabilidad por encima de los 50°C y que no requieran del uso de emulsificantes o pasos adicionales para ajustar el pH. Sería deseable, por tanto, 15 obtener oleogeles con potencial en la industria alimentaria, biomédica, cosmética y farmacéutica obtenidos mediante emulsificación de polisacáridos en el que el proceso de gelificación sea más rápida, sencilla (disminuyendo el número de pasos requeridos) y que no requiera llevarlo a cabo a altas temperaturas para evitar que se oxide el aceite y genere subproductos nocivos para la salud.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un oleogel que comprende las siguientes etapas:

25

- a. dispersar un polisacárido sulfatado en agua; y
- b. dispersar un aceite en la dispersión obtenida en la etapa (a) hasta conseguir una emulsión y posteriormente dispersar una sal catiónica en dicha emulsión,

30

caracterizado por que durante las etapas (a) y (b) el sistema se mantiene a una temperatura entre 40°C y 150°C, y preferiblemente a una temperatura entre 90°C y 100°C.

35

El procedimiento de la invención requiere la adición de una sal catiónica al final de la última etapa del procedimiento, la etapa (b), es decir, una vez obtenida una dispersión a partir de un polisacárido sulfatado y un aceite, que es una grasa líquida a temperatura ambiente. El hecho de añadir la sal catiónica después de obtener la

emulsión del polisacárido sulfatado y el aceite favorece la formación de una red capaz de atrapar el aceite, lo cual tiene la ventaja de que se consiga una gelificación más rápida y eficaz.

- 5 Además, en el procedimiento de la invención se utilizan polisacáridos sulfatados como agentes gelificantes. Estos polisacáridos se extraen principalmente a partir de algas marinas y presentan la ventaja de ser aptos para su uso en alimentación. Además, se les atribuyen efectos beneficiosos para la salud (por ejemplo, actividad antioxidante, anticoagulante, y antiviral).

10

El proceso descrito permite obtener oleogeles con distintas características reológicas mediante la modificación de parámetros como el grado de sulfatación del polisacárido, la concentración de polisacárido y sal catiónica y el ratio aceite:agua. Por tanto, se trata de un procedimiento sencillo, que utiliza compuestos de origen natural y que
15 permite obtener oleogeles con un amplio rango de características que se pueden adaptar a la aplicación final.

20

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde el polisacárido sulfatado comprende entre un 0,1% y un 20% de grupos sulfato.

25

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde el polisacárido sulfatado es de origen marino, y preferiblemente donde el polisacárido sulfatado se extrae de las algas.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde el polisacárido sulfatado se selecciona entre carragenato, alginato, agar, fucoidano, ulvano y mezclas de los mismos.

30 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde el polisacárido sulfatado es carragenato, preferiblemente donde el carragenato se selecciona entre un carragenato tipo κ (κ -C), tipo ι (ι -C) y tipo λ (λ -C), y más preferiblemente donde el carragenato es carragenato de tipo κ (κ -C).

35 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde el aceite es un aceite comestible, y preferiblemente donde el

aceite comestible se selecciona de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja y aceite de canola.

5 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde la sal catiónica se selecciona entre una sal con cationes monovalentes o una sal con cationes divalentes.

10 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde la sal catiónica se selecciona entre sales con cationes monovalentes de Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ o entre sales con cationes divalentes de Ca^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} . Ejemplos de sales catiónicas incluyen entre otras cloruro potásico (KCl), cloruro sódico (NaCl), cloruro cálcico (CaCl_2), o sorbato potásico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$), y preferiblemente cloruro potásico (KCl).

15 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde la sal catiónica se selecciona de cloruro potásico (KCl), cloruro sódico (NaCl), cloruro cálcico (CaCl_2), o sorbato potásico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$), y preferiblemente donde la sal catiónica es cloruro potásico (KCl).

20 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde el ratio aceite/agua está entre el 0,001 y el 5, y preferiblemente donde el ratio aceite/agua está entre el 0,01 y el 1,25.

25 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde el polisacárido sulfatado se utiliza en una proporción entre el 0,01% y el 5% en peso en relación al volumen total, y preferiblemente en una proporción entre el 0,5% y el 2% en peso en relación al volumen total.

30 En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde la sal catiónica se utiliza en una proporción entre el 0,001% y el 5% en peso en relación al volumen total, y preferiblemente en una proporción entre el 0,01% y el 1,25 % en peso en relación al volumen total.

35 En otra realización la invención se refiere al procedimiento de obtención de un oleogel que comprende en las siguientes etapas:

- a. dispersar carragenato, preferiblemente carragenato tipo κ ($\kappa\text{-C}$), tipo ι ($\iota\text{-C}$) y tipo λ ($\lambda\text{-C}$), y más preferiblemente carragenato de tipo κ ($\kappa\text{-C}$), en agua; y

- b. dispersar un aceite comestible, y preferiblemente donde el aceite comestible se selecciona de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja y aceite de canola, en la dispersión obtenida en la etapa (a) hasta conseguir una emulsión, y posteriormente dispersar una sal con cationes monovalentes o una sal con cationes divalentes, preferiblemente donde la sal catiónica se selecciona entre sales con cationes monovalentes de Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ o entre sales con cationes divalentes de Ca^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} , y más preferiblemente donde la sal catiónica es KCl, en dicha emulsión, caracterizado por que durante las etapas (a) y (b) el sistema se mantiene a una temperatura entre 40°C y 150°C, y preferiblemente a una temperatura entre 90°C y 100°C.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento de obtención de un oleogel que comprende las siguientes etapas:

- a. dispersar carragenato, preferiblemente carragenato tipo κ (κ -C), tipo ι (ι -C) y tipo λ (λ -C), y más preferiblemente carragenato de tipo κ (κ -C), en agua; y
- b. dispersar un aceite comestible, y preferiblemente donde el aceite comestible se selecciona de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja y aceite de canola, en la dispersión obtenida en la etapa (a) hasta conseguir una emulsión, y posteriormente dispersar una sal con cationes monovalentes o una sal con cationes divalentes, preferiblemente donde la sal catiónica se selecciona entre sales con cationes monovalentes de Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ o entre sales con cationes divalentes de Ca^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} , y más preferiblemente donde la sal catiónica es KCl, en dicha emulsión, caracterizado por que durante las etapas (a) y (b) el sistema se mantiene a una temperatura entre 40°C y 150°C, y preferiblemente a una temperatura entre 90°C y 100°C, donde el ratio aceite/agua está entre el 0,001 y el 5, y preferiblemente donde el ratio aceite/agua está entre el 0,01 y el 1,25; el polisacárido sulfatado se utiliza en una proporción entre el 0,01% y el 5% en peso en relación al volumen total, y preferiblemente en una proporción entre el 0,5% y el 2% en peso en relación al volumen total; y la sal catiónica se utiliza en una proporción entre el 0,001% y el 5% en peso en relación al volumen total, y preferiblemente en una proporción entre el 0,01% y el 1,25 % en peso en relación al volumen total.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento de obtención de un oleogel que consiste en las siguientes etapas:

- 5 a. dispersar un polisacárido sulfatado, preferiblemente carragenato, más preferiblemente carragenato tipo κ (κ -C), tipo ι (ι -C) y tipo λ (λ -C), y aún más preferiblemente carragenato de tipo κ (κ -C), en agua; y
- 10 b. dispersar un aceite, preferiblemente aceite comestible, y más preferiblemente donde el aceite comestible se selecciona de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja y aceite de canola, en la dispersión obtenida en la etapa (a) hasta conseguir una emulsión, y posteriormente dispersar una sal catiónica, preferiblemente una sal con cationes monovalentes o una sal con cationes divalentes, más preferiblemente donde la sal catiónica se selecciona entre sales con cationes monovalentes de Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ o entre sales con cationes divalentes de Ca^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} , y aún más preferiblemente donde la sal catiónica es KCl, en
- 15 dicha emulsión,
- caracterizado por que durante las etapas (a) y (b) el sistema se mantiene a una temperatura entre 40°C y 150°C , y preferiblemente a una temperatura entre 90°C y 100°C .

20 En otra realización la invención se refiere al procedimiento de obtención de un oleogel que consiste en las siguientes etapas:

- a. dispersar un polisacárido sulfatado, preferiblemente carragenato, más preferiblemente carragenato tipo κ (κ -C), tipo ι (ι -C) y tipo λ (λ -C), y aún más preferiblemente carragenato de tipo κ (κ -C), en agua; y
- 25 b. dispersar un aceite, preferiblemente aceite comestible, y más preferiblemente donde el aceite comestible se selecciona de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja y aceite de canola, en la dispersión obtenida en la etapa (a) hasta conseguir una emulsión, y posteriormente dispersar una sal catiónica, preferiblemente una sal con cationes monovalentes o una sal con cationes divalentes, más preferiblemente donde la sal catiónica se selecciona entre sales con cationes monovalentes de Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ o entre sales con cationes divalentes de Ca^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} , y aún más preferiblemente donde la sal catiónica es KCl, en
- 30 dicha emulsión,

caracterizado por que durante las etapas (a) y (b) el sistema se mantiene a una temperatura entre 40°C y 150°C, y preferiblemente a una temperatura entre 90°C y 100°C,

5 donde el ratio aceite/agua está entre el 0,001 y el 5, y preferiblemente donde el ratio aceite/agua está entre el 0,01 y el 1,25;

el polisacárido sulfatado se utiliza en una proporción entre el 0,01% y el 5% en peso en relación al volumen total, y preferiblemente en una proporción entre el 0,5% y el 2% en peso en relación al volumen total; y

10 la sal catiónica se utiliza en una proporción entre el 0,001% y el 5% en peso en relación al volumen total, y preferiblemente en una proporción entre el 0,01% y el 1,25 % en peso en relación al volumen total.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un oleogel obtenido por el procedimiento definido anteriormente.

15

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del oleogel definido anteriormente como aditivo en alimentación, biomedicina, cosmética o farmacia

20 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del oleogel definido anteriormente como sustituto de grasas sólidas en alimentación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el oleogel definido anteriormente.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición definida anteriormente en alimentación, biomedicina, cosmética o farmacia, y preferiblemente como sustituta de grasas sólidas en alimentación.

30 A lo largo de la invención el "polisacárido sulfatado" al que se refiere la invención se refiere a un polisacárido que comprende entre un 0,1% y un 20% de grupos sulfato. Preferiblemente el polisacárido sulfatado de la invención es de origen marino, más preferiblemente se extrae de las algas, principalmente de las algas rojas, pardas y verdes. Preferiblemente el polisacárido sulfatado se selecciona entre carragenato, alginato, agar, fucoidano, ulvano y mezclas de los mismos, más preferiblemente el
35 polisacárido sulfatado es carragenato, aún más preferiblemente carragenato tipo κ (κ -C), tipo ι (ι -C) y tipo λ (λ -C) (los cuales tiene 1,2 y 3 grupos sulfatos respectivamente),

y todavía más preferiblemente carragenato tipo κ (κ -C).

El "aceite" al que se refiere la invención es una grasa caracterizada por que es líquida a temperatura ambiente, es decir, a una temperatura de entre 18°C y 26°C.

5 Preferiblemente el aceite es un aceite comestible. Ejemplos incluyen entre otros el aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de soja, o aceite de canola.

La "sal catiónica" a la que se refiere la invención es una sal con cationes monovalentes o divalentes. Ejemplos de cationes monovalentes incluyen entre otros Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ ; y cationes divalentes incluyen entre otros Ca^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} . Ejemplos de sales catiónicas incluyen entre otras cloruro potásico (KCl), cloruro sódico (NaCl), cloruro cálcico (CaCl_2) y sorbato potásico ($\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$).

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

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Graficas de superficie de respuesta para la fuerza de los oleogeles de carragenato kappa. A) efecto de % κ -C y ratio aceite:agua con %KCl como punto central, B) % κ -C y %KCl con ratio aceite:agua como punto central C) % KCl y ratio
25 aceite:agua con % κ -C como punto central;

FIG. 2 Graficas de superficie de respuesta para la fuerza de los oleogeles de carragenato lambda. A) efecto de % λ -C y ratio aceite:agua con %KCl como punto central, B) % λ -C y %KCl con ratio aceite:agua como punto central C) % KCl y ratio
30 aceite:agua con % λ -C como punto central;

FIG. 3 Graficas de superficie de respuesta para la fuerza de los oleogeles de carragenato iota. A) efecto de % ι -C y ratio aceite:agua con %KCl como punto central, B) % ι -C y %KCl con ratio aceite:agua como punto central C) % KCl y ratio aceite:agua con % ι -C como punto central.

35 **FIG. 4** Rampas de temperatura para un ciclo de enfriamiento ($\bullet\blacktriangle$) y calentamiento ($\Delta\circ$) para los oleogeles de carragenato A) κ -C, B) λ -C y C) ι -C.

FIG. 5 Imagen de microscopía confocal de un oleogel de agar

FIG. 6 Rampa de enfriamiento para el oleogel de agar, donde se muestran la evolución de G' y G''

5 EJEMPLOS

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

10 Ejemplo 1. Preparación de oleogeles de carragenatos

La oleogelación se lleva a cabo realizando una emulsión de aceite en agua, la cual es estabilizada utilizando un polisacárido sulfatado como agente gelificante. En primer lugar, se realiza la dispersión del polisacárido en agua, para lo cual es necesario que el agua se encuentre a una temperatura de entre 90-100 °C. Posteriormente, y
15 manteniendo la temperatura de la disolución, se adiciona el aceite y se dispersa hasta conseguir la emulsión. Este paso puede realizarse con cualquier equipo de homogeneización. A continuación, se adiciona una sal catiónica, la cual favorecerá la formación de una red capaz de atrapar el aceite y ayudará a una gelificación más rápida. Las concentraciones de polisacárido y sal, así como el ratio aceite:agua se
20 establecen según el diseño de experimentos, teniendo un límite máximo y mínimo para cada variable.

Análisis de experimentos

Se realizó un diseño central compuesto para observar el efecto de las variables en la
25 fuerza de gel, los datos se analizaron por medio de un análisis de varianza (analysis of variance, ANOVA) y se realizó una optimización del proceso usando un análisis de superficie de respuesta (ver tabla 1).

Tabla 1. Niveles máximos y mínimos de los factores experimentales.

Tipo de carragenato	% Carragenato (peso/volumen)		% Sal (peso/volumen)		Ratio aceite:agua	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
κ -C	0,5	2	0,25	1,25	0	1,25
λ -C	0,5	2	0,15	1,25	0	0,8
ι -C	1	2	0,3	0,5	0	0,8

Análisis de textura

La fuerza de los oleogeles fue obtenida mediante un ensayo de penetración en un texturómetro "Texture Analyzer TA Plus". Los oleogeles se prepararon en envases
5 cilíndricos con 30 mm de diámetro y 40 mm de altura. El ensayo consistió en un ciclo de penetración de una sonda cilíndrica de 11 mm de diámetro. En cada ciclo la muestra fue penetrada a una velocidad de 1 mm/s, una velocidad de pre-ensayo de 5 mm/s y una velocidad de post ensayo de 10 mm/s. La fuerza de activación fue de 5 g y la distancia de penetración fue de 5 mm.

Resultados

A continuación, se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para oleogeles basados en carragenatos con KCl como sal catiónica.

Optimización de la fuerza de los oleogeles

Se realizó la optimización de la fuerza de los oleogeles obtenidos a partir de los tres tipos de carragenatos (κ -C, λ -C y ι -C) y, como se puede observar en la figura 1, 2 y 3 respectivamente, la fuerza de gel es mayor para el carragenato tipo κ -C en comparación con los carragenatos tipo λ -C y ι -C, los cuales no presentan gran
20 diferencia entre ellos, ya que ambos generan geles débiles. Esto es debido a que el carragenato tipo κ tiene menos grupos sulfato, lo que hace que se obtengan oleogeles más fuertes.

En la figura 1, se puede observar que los tres factores experimentales considerados
25 tienen un efecto significativo en la variable respuesta (es decir, la fuerza de gel) de los oleogeles de κ -C. En general se puede ver que siempre un aumento en el contenido de aceite generará un oleogel más débil. Por el contrario, un aumento en el contenido de sal y de κ -carragenato dará lugar a oleogeles más fuertes.

30 Para los oleogeles obtenidos a partir de λ -C (Figura 2) se observa que es necesario utilizar una concentración alta de carragenato para obtener geles más fuertes. En cuanto al contenido de aceite y la concentración de KCl, se observa que los valores intermedios favorecen una mejor estructura, lo que genera oleogeles más fuertes.

35 En el caso de los oleogeles de ι -C, el factor que más efecto tenía sobre la fuerza de los oleogeles desarrollados era la concentración de carragenato, mientras que las

interacciones de concentración de carragenato con el ratio aceite:agua o la concentración de KCl no mostraron gran efecto en la fuerza del oleogel. En cuanto a la interacción del contenido de sal y ratio aceite:agua, se puede observar que es necesario aumentar el contenido de aceite para obtener un gel más fuerte.

5

Una vez obtenidos los resultados del diseño central compuesto, se realizó la optimización de los oleogeles de los tres diferentes carragenatos, generando las condiciones óptimas para obtener la fuerza de gel máxima para cada tipo de carragenato (ver tabla 2). Cabe destacar que dependiendo del tipo de carragenato

seleccionado, será posible obtener oleogeles más fuertes con textura firme o, por el contrario, oleogeles más débiles con textura tipo pasta o untable.

10

Tabla 2. Condiciones óptimas para la obtención de oleogeles con fuerza de gel máxima a partir de diferentes carragenatos.

Factores	κ -C	λ -C	I-C
% Carragenato	1,33	1,37	2
% KCl	0,51	0,41	0,5
Ratio aceite:agua	0,51	0,58	0,51
Fuerza (g)	859,5	29,4	31,12

15

Análisis de propiedades reológicas

Con el fin de estudiar el comportamiento reológico de los oleogeles producidos a partir de las condiciones óptimas antes mencionadas (ver tabla 2) y determinar el efecto de los diferentes carragenatos en el punto de fusión y gelificación en los oleogeles, se llevaron a cabo rampas de temperatura de calentamiento y enfriamiento y se registraron los valores del módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G'').

20

La figura 4 muestra los resultados obtenidos. Como se observa, a la temperatura inicial de 95°C las mezclas de los tres tipos de carragenatos presentan un comportamiento típico de fluidos ($G' < G''$). Conforme estas mezclas se someten a una rampa de enfriamiento, se producen cambios estructurales que dan lugar a la gelificación. En el caso de κ -C se puede observar que la temperatura de gelificación ($G' = G''$) es de alrededor de 61°C, siendo el oleogel que presenta una temperatura de gelificación mas alta. Le sigue el λ -C, con una temperatura de gelificación de 53°C y finalmente, el I-C con una temperatura de gelificación de 50°C. Por otro lado, cuando los oleogeles se calientan, se produce un proceso de fusión. En este caso se observa

25

30

el mismo comportamiento que para la gelificación, presentando temperaturas de fusión más altas el κ -C, seguido del λ -C y, por último, el i-C (con temperaturas de fusión de 76 °C, 72 °C y 54 °C, respectivamente).

- 5 Se puede observar, además, que para el carragenato tipo κ , el valor de G' a 20°C es más alto que para los oleogeles obtenidos a partir de λ -C y i-C, lo que se relaciona con una fuerza de gel mayor. Estos resultados coinciden con los valores de fuerza obtenidos en el análisis de textura.
- 10 Estos resultados demuestran que es posible adaptar las propiedades de los oleogeles obtenidos en función de su aplicación final y las características requeridas (ya sea la fuerza de gel, el contenido de aceite, etc.). Las tres variables consideradas en este estudio han demostrado presentar un efecto significativo en la fuerza de gel.

15 **Ejemplo 2. Preparación de oleogeles de agar**

En primer lugar, como en el caso de los carragenatos, se realiza la dispersión del polisacárido en agua, para lo cual es necesario que el agua se encuentre a una temperatura de entre 90-100 °C. Posteriormente, y manteniendo la temperatura de la disolución, se adiciona el aceite y se dispersa hasta conseguir la emulsión. Este paso

20 puede realizarse con cualquier equipo de homogeneización. En el caso del agar, no se requiere sal catiónica para formar la red que atraparé el aceite. Se probó también con adición de sal catiónica, pero los oleogeles formados no presentaron diferencias significativas en cuanto a propiedades. En el caso del agar, se observó que podía adicionarse mayor cantidad de aceite a los oleogeles (ratio aceite:agua de 1) y las

25 concentraciones de agar a utilizar podían variarse entre 0,5 y 1,7% agar.

El análisis de textura se llevó a cabo tal y como se describe en el ejemplo 1 para los carragenatos.

- 30 En la Figura 5 se muestra una imagen de microscopía confocal de un oleogel de agar, donde pueden observarse las gotas de aceite (de color rojo) distribuidas en la matriz de agar (color verde).

Resultados

35 **Fuerza de oleogeles**

Se midió la fuerza de gel en función del contenido en agar y se observó que la fuerza

de gel aumenta con el contenido en agar de los oleogeles, siendo de ~62 g para los oleogeles con un contenido de agar de 0,5%, aumentando hasta los ~614 g cuando el contenido de agar fue del 1,7%. El oleogel de agar preparado utilizando un 1.6% de polisacárido resultó en un material más homogéneo y con una fuerza de gel de ~558 g.

- 5 Mayores contenidos de agar (por encima de un 1,7%), no permitían la formación de la emulsión necesaria para el desarrollo de los oleogeles.

Propiedades reológicas

- De modo similar al ejemplo 1, se caracterizaron las propiedades reológicas de uno de los oleogeles de agar (en concreto el que tenía un contenido de 1,6% de agar por resultar el óptimo en cuanto a propiedades de homogeneidad de material y buena fuerza de gel). La figura 6 muestra una rampa de enfriamiento donde se registraron los valores del módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G''). El cambio brusco en el comportamiento reológico corresponde a la gelificación del material, que en este caso se registró a ~34°C.
- 10
- 15

- En ambos ejemplos con los carragenatos y con el agar, se demuestra que es posible generar tanto oleogeles fuertes, con propiedades reológicas, viscoelasticidad y firmeza como las otorgadas por una grasa sólida, pero sin una cantidad alta de grasas saturadas, como oleogeles más débiles con una consistencia adecuada para generar, por ejemplo, productos alimenticios de tipo untable.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un oleogel que comprende las siguientes etapas:
 - a. dispersar un polisacárido sulfatado en agua; y
 - b. dispersar un aceite, en la dispersión obtenida en la etapa (a) hasta conseguir una emulsión y posteriormente dispersar una sal catiónica en dicha emulsión,caracterizado por que durante las etapas (a) y (b) el sistema se mantiene a una temperatura entre 40°C y 150°C.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el polisacárido sulfatado comprende entre un 0,1% y un 20% de grupos sulfato.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, donde el polisacárido sulfatado es de origen marino.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde el polisacárido sulfatado se extrae de las algas.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polisacárido sulfatado se selecciona entre carragenato, alginato, agar, fucoidano, ulvano y mezclas de los mismos.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde el polisacárido sulfatado es carragenato.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde el carragenato se selecciona entre un carragenato tipo κ (κ -C), tipo ι (ι -C) y tipo λ (λ -C).
8. Procedimiento según la reivindicación 7, donde el carragenato es carragenato de tipo κ (κ -C).
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el aceite es un aceite comestible.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde el aceite comestible se selecciona de aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de soja y aceite de canola.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la sal catiónica se selecciona entre una sal con cationes monovalentes o una sal con cationes divalentes.
- 5
12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde la sal catiónica se selecciona entre sales con cationes monovalentes de Na^+ , Li^+ , K^+ , Rb^+ y Cs^+ o entre sales con cationes divalentes de Ca^{2+} , Sr^{2+} y Cu^{2+} .
- 10
13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde la sal catiónica es KCl.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el ratio aceite/agua está entre el 0,001 y el 5.
- 15
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el polisacárido sulfatado se utiliza en una proporción entre el 0,01% y el 5% en peso en relación al volumen total.
- 20
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde la sal catiónica se utiliza en una proporción entre el 0,001% y el 5% en peso en relación al volumen total.
17. Oleogel obtenido por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 25
18. Uso del oleogel según la reivindicación 17, como aditivo en alimentación, biomedicina, cosmética o farmacia.
- 30
19. Uso del oleogel según la reivindicación 17, como sustituto de grasas sólidas en alimentación.

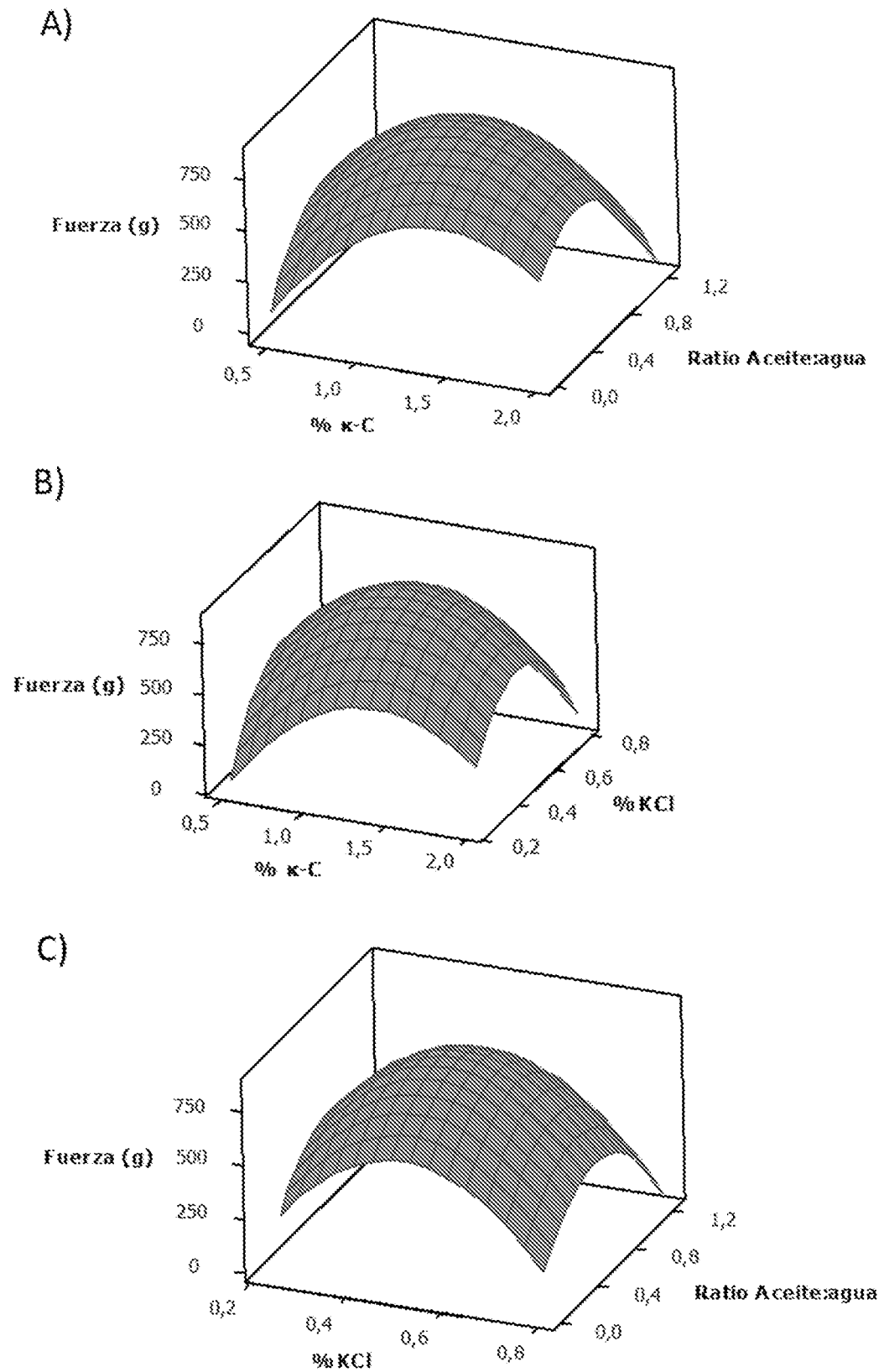


Figura 1

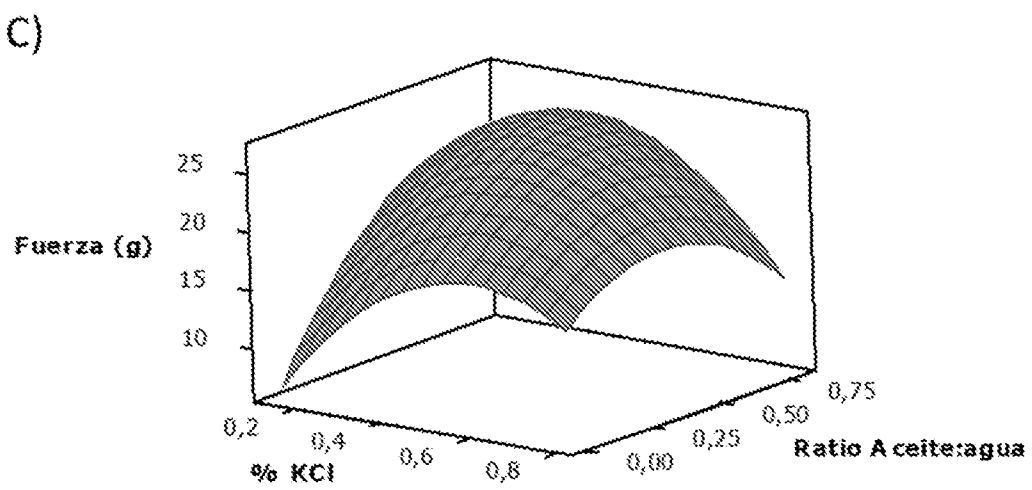
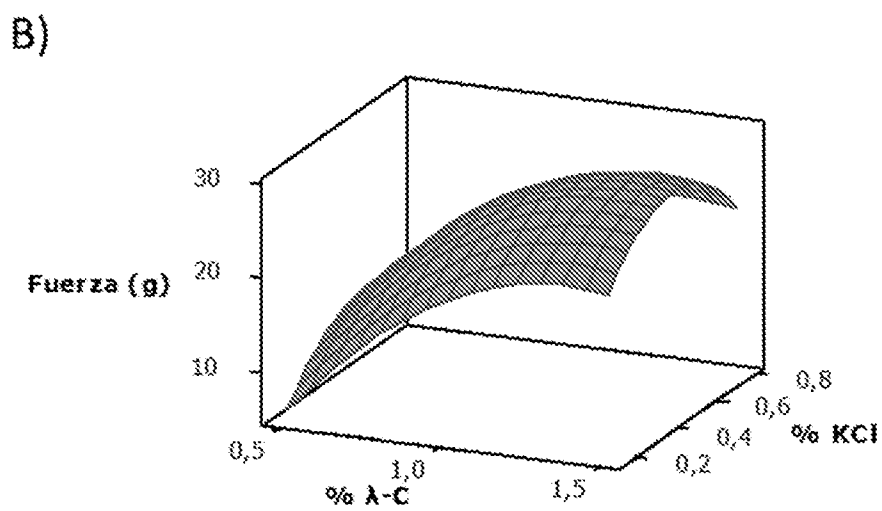
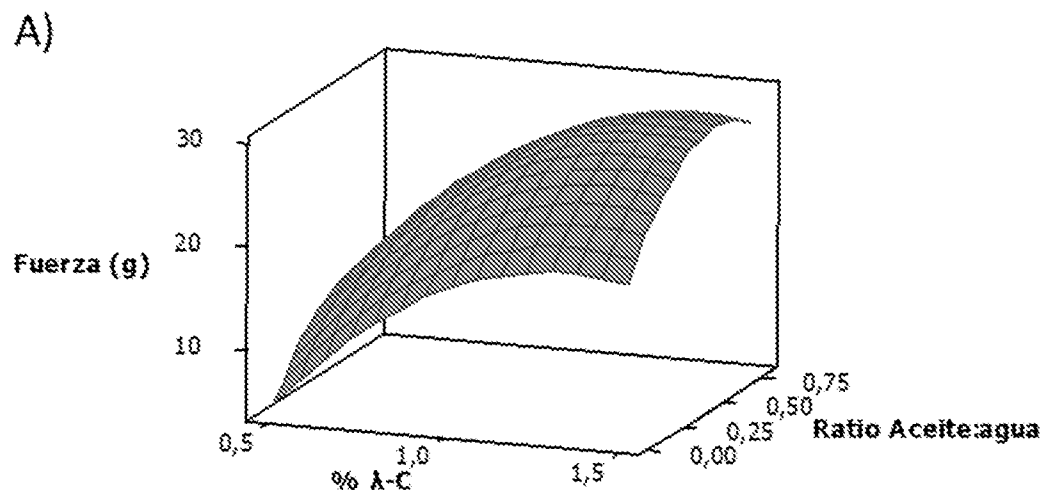
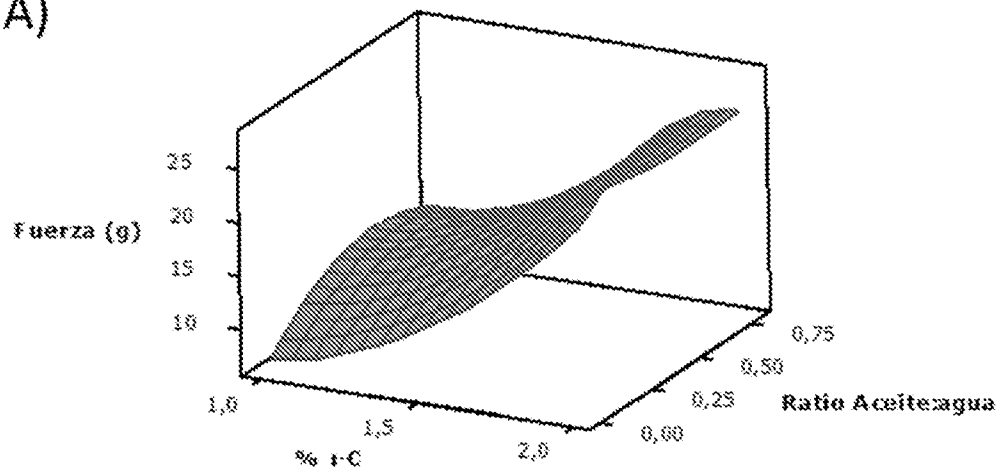
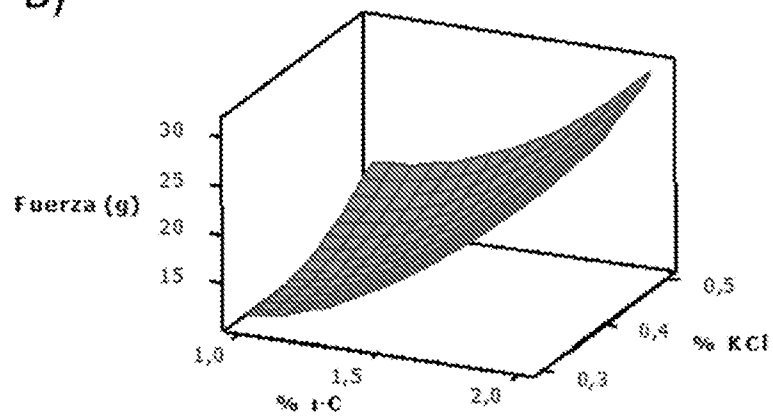


Figura 2

A)



B)



C)

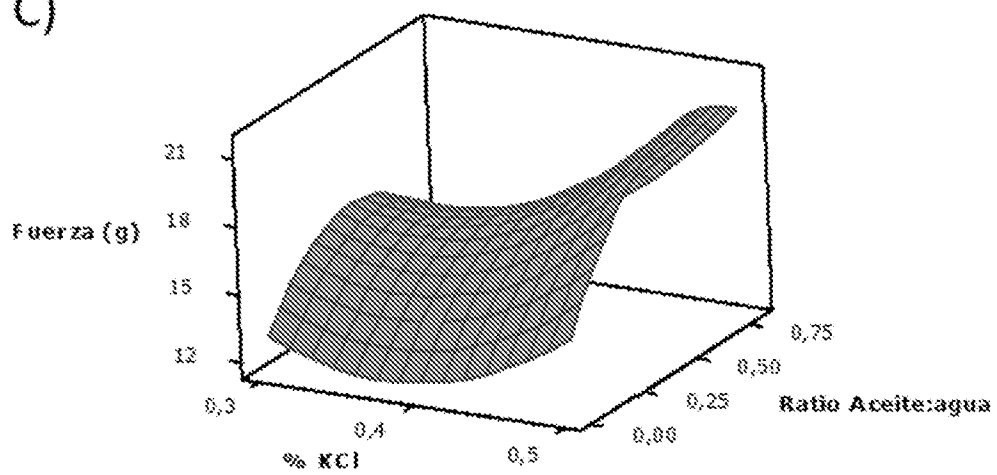


Figura 3

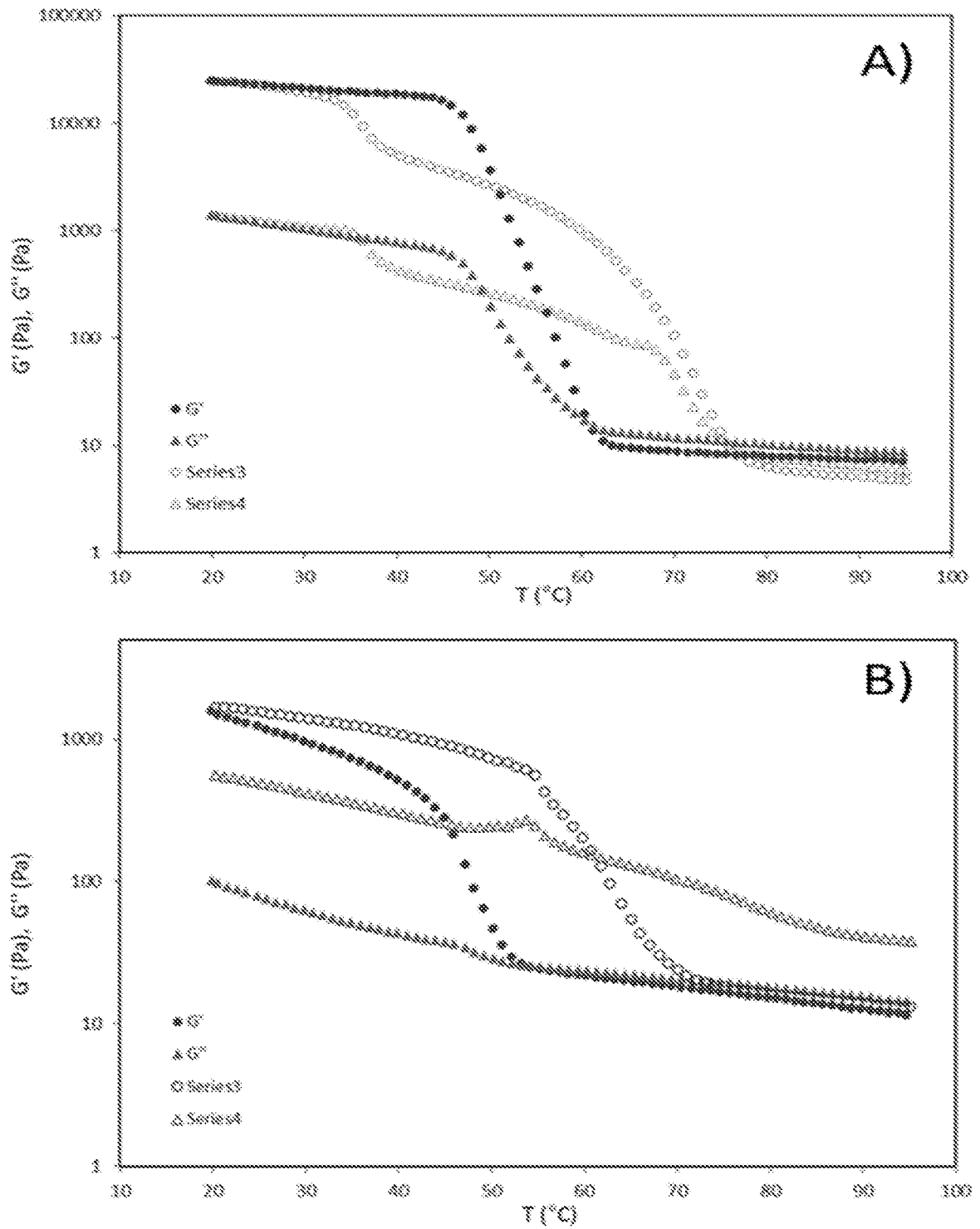


Figura 4 (cont.)

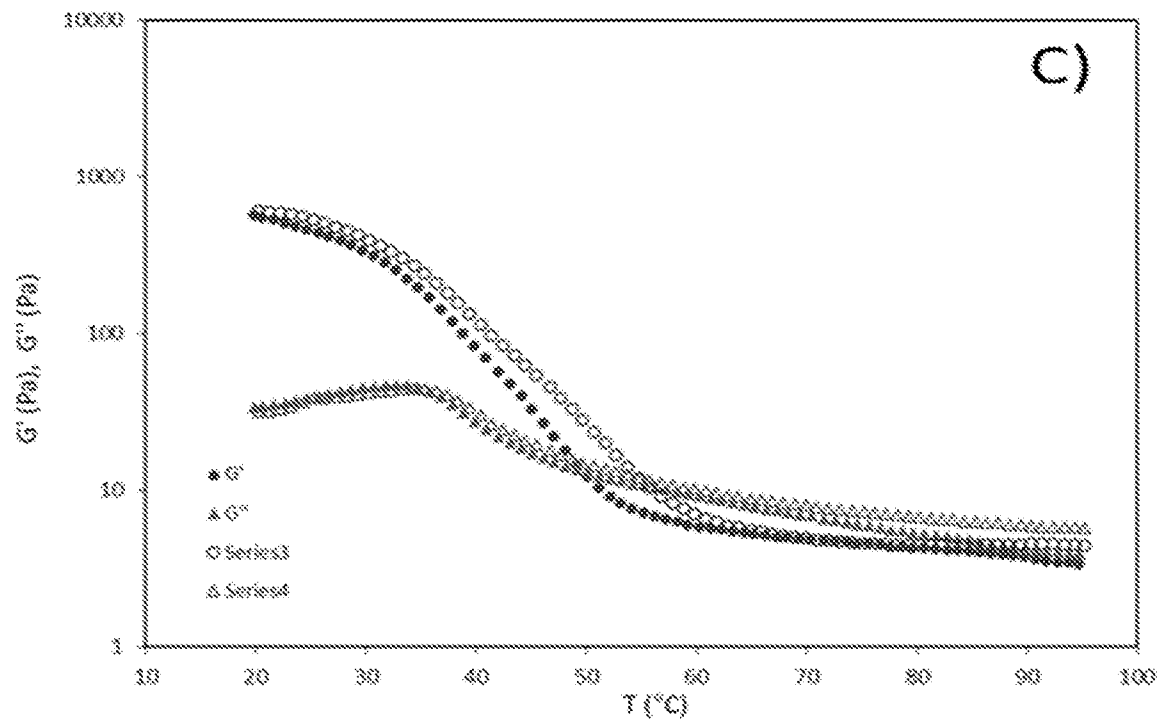


Figura 4

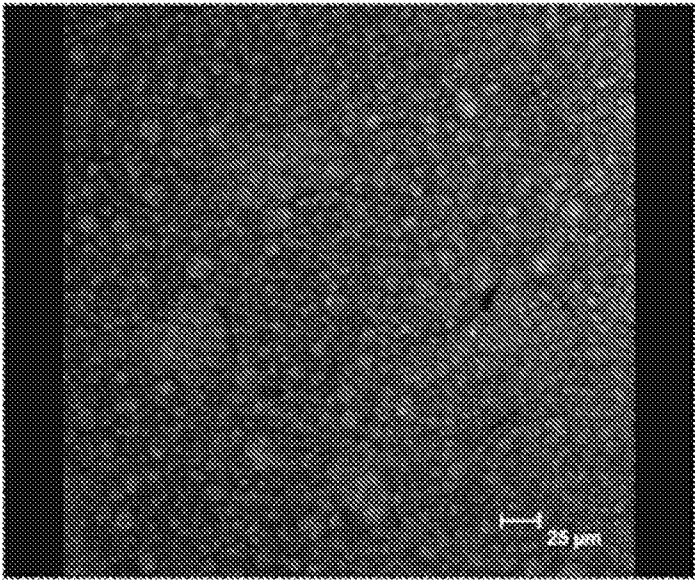


Figura 5

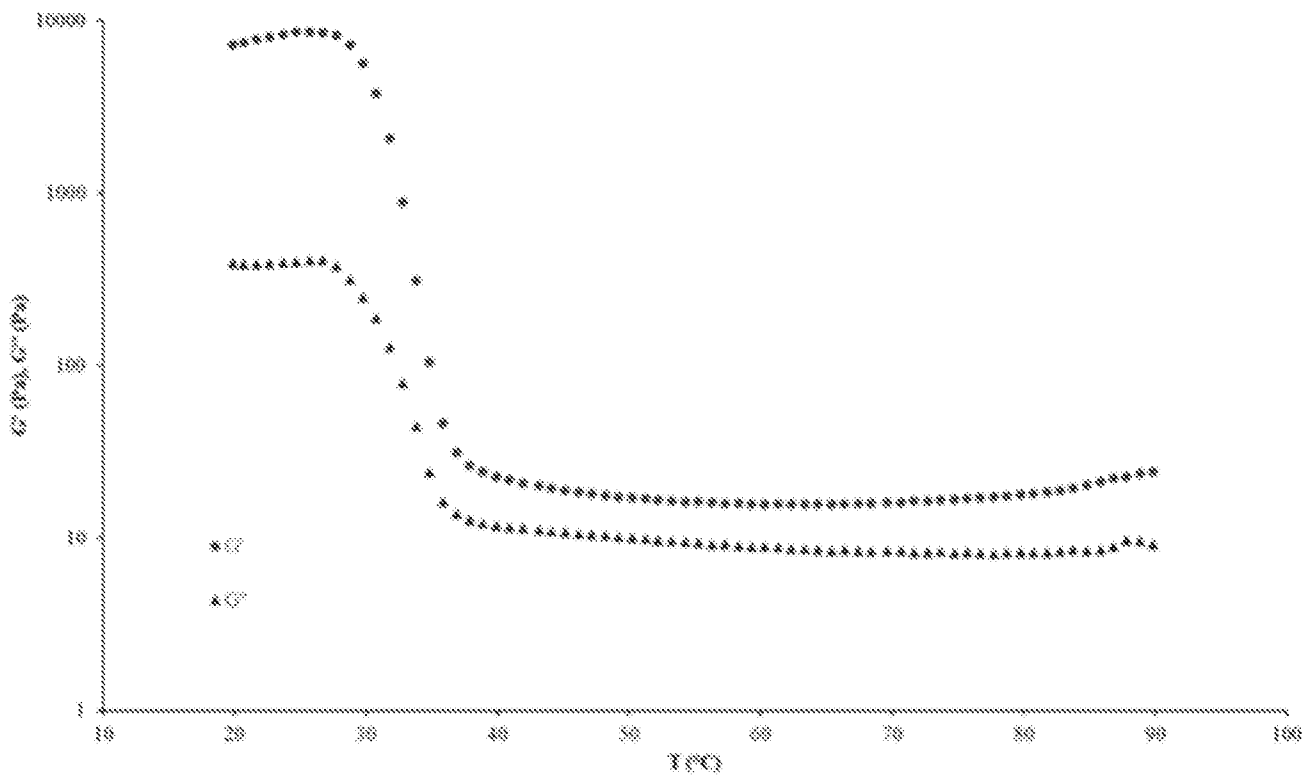


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2019/070530

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23D7/00 (2006.01)

A23D9/00 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0271132 A2 (UNILEVER NV) 15/06/1988, Page 4, lines 1-14; line 25-page 6, line 5; page 16, line 8-page 17, line 12	1-19
A	US 5082684 A (FUNG) 21/01/1992, Column 2, line 45-column 4, line 5	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23/10/2019

Date of mailing of the international search report
(25/10/2019)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. López Nieto

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498426

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2019/070530

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP0271132 A2	15.06.1988	ZA8708772 B US4943445 A JPS63291535 A CA1322692 C AU8138187 A AU606626B B2 AT71489T T	26.07.1989 24.07.1990 29.11.1988 05.10.1993 26.05.1988 14.02.1991 15.02.1992
----- US5082684 A	----- 21.01.1992	----- ZA9100805 B US5308639 A US5158798 A PT96660 A NO910421L L KR910021212 A KR930004456B B1 JPH0767577 A IL97093 A IE910368 A1 FI910534 A EP0441495 A2 EP0441495 A3 CA2035529 A1 CA2035529 C AU7023991 A AU640200B B2 AU4151993 A AU660812B B2	----- 30.09.1992 03.05.1994 27.10.1992 31.10.1991 06.08.1991 20.12.1991 27.05.1993 14.03.1995 12.04.1994 14.08.1991 06.08.1991 14.08.1991 16.09.1992 06.08.1991 31.10.1995 08.08.1991 19.08.1993 02.09.1993 06.07.1995
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070530

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A23D7/00 (2006.01)

A23D9/00 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A23D

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	EP 0271132 A2 (UNILEVER NV) 15/06/1988, Página 4, líneas 1-14; línea 25-página 6, línea 5; página 16, línea 8-página 17, línea 12	1-19
A	US 5082684 A (FUNG) 21/01/1992, Columna 2, línea 45-columna 4, línea 5	1-19

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
23/10/2019

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
25 de octubre de 2019 (25/10/2019)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. López Nieto
Nº de teléfono 91 3498426

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2019/070530

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
EP0271132 A2	15.06.1988	ZA8708772 B US4943445 A JPS63291535 A CA1322692 C AU8138187 A AU606626B B2 AT71489T T	26.07.1989 24.07.1990 29.11.1988 05.10.1993 26.05.1988 14.02.1991 15.02.1992
----- US5082684 A	----- 21.01.1992	----- ZA9100805 B US5308639 A US5158798 A PT96660 A NO910421L L KR910021212 A KR930004456B B1 JPH0767577 A IL97093 A IE910368 A1 FI910534 A EP0441495 A2 EP0441495 A3 CA2035529 A1 CA2035529 C AU7023991 A AU640200B B2 AU4151993 A AU660812B B2	----- 30.09.1992 03.05.1994 27.10.1992 31.10.1991 06.08.1991 20.12.1991 27.05.1993 14.03.1995 12.04.1994 14.08.1991 06.08.1991 14.08.1991 16.09.1992 06.08.1991 31.10.1995 08.08.1991 19.08.1993 02.09.1993 06.07.1995
-----	-----	-----	-----