

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/175771 A1

(43) Fecha de publicación internacional
27 de diciembre de 2012 (27.12.2012) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 36/63 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 8/92 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)

Sevilla (ES). **SENENT RUBIO, Fátima** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2012/070441

(74) **Mandatario: UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:

14 de junio de 2012 (14.06.2012)

(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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201131041 21 de junio de 2011 (21.06.2011) ES

(71) **Solicitante** (*para todos los Estados designados salvo US*): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Avenida María Luisa, s/n, Palacio-Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (ES).

(72) **Inventores; e**

(75) **Inventores/Solicitantes** (*para US solamente*): **FERNÁNDEZ-BOLAÑO GUZMÁN, Juan** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, Guillermo** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre Tejero, 4, E-41012 Sevilla (ES). **LAMA MUÑOZ, Antonio** [ES/ES]; Instituto de la Grasa, Avenida Padre Tejero, 4, E-41012

(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, 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,

[Continúa en la página siguiente]

(54) **Title:** PHENOL EXTRACT FROM HEAT-TREATED OLIVE SUBPRODUCTS

(54) **Título :** EXTRACTO FENÓLICO DE LOS SUBPRODUCTOS DE LA ACEITUNA TRATADOS TÉRMICAMENTE

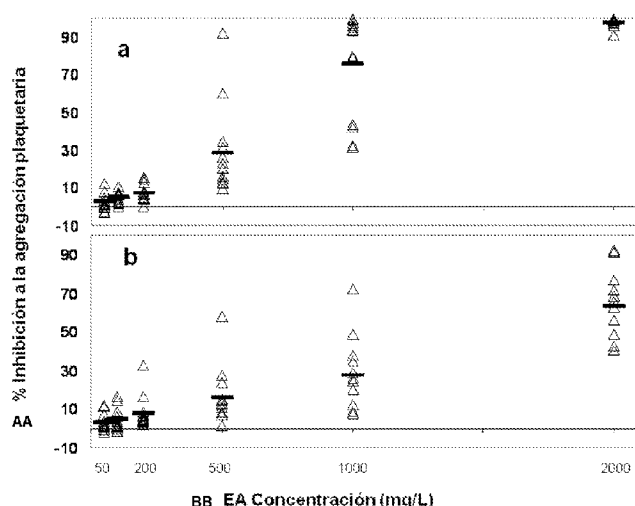


FIG. 1

AA Inhibition of platelet aggregation
BB Concentration

(57) **Abstract:** The invention relates to a phenol extract obtained from subproducts derived from the extraction of olive oil and/or from the olive preparation industry, which is characterized in that it includes an average composition of total phenol alcohols over 5% in dry weight and an average composition in total phenol acids over 0.3% by dry weight. Likewise, the invention relates to the method for obtaining said extract and to the use thereof as an antioxidant in the preparation of food, cosmetic and/or pharmaceutical preparations, as an agent inhibiting the action of the enzyme L-tyrosinase, or as an agent inhibiting platelet aggregation in the prevention of coronary diseases. Finally, the invention relates to the partially or totally isolated fraction or fractions that can be obtained from said phenol extract.

(57) **Resumen:** Es objeto de esta invención un extracto fenólico obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que comprende una composición media en alcoholes fenólicos totales por encima del 5% en peso seco y una composición media en ácidos fenólicos

[Continúa en la página siguiente]

WO 2012/175771 A1



RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

Publicada:

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

totales por encima del 0.3% en peso seco. Asimismo, es objeto de la invención el proceso de obtención de dicho extracto y su uso como antioxidante para la preparación de preparados con uso alimentario, cosmético y/o farmacéutico, como agente inhibitorio de la acción de la enzima L-tirosinasa, o como agente inhibitorio de la agregación plaquetaria en la prevención de enfermedades coronarias. Finalmente, es objeto de la invención una fracción o fracciones parcial o totalmente aisladas obtenibles a partir de dicho extracto fenólico.

**Extracto fenólico de los subproductos de la aceituna tratados
térmicamente**

Sector de la técnica

5 La presente solicitud está dirigida al sector de la alimentación, farmacéutico, de la cosmética y de la agricultura.

Estado de la técnica

10 Recientes estudios demuestran que los fenoles son poderosos antioxidantes y poseen otras actividades biológicas que podrían explicar en parte los efectos saludables observados en la dieta Mediterránea. Estos compuestos también juegan un importante papel en la estabilidad, inhibiendo la
15 peroxidación lipídica, y en las propiedades químicas y organolépticas de los productos de las aceitunas (aceite de oliva y aceituna de mesa), y tienen significativos efectos nutricionales, fisiológicos y farmacéuticos sobre la salud humana. Estudios epidemiológicos han asociado la baja
20 incidencia de enfermedades coronarias, aterosclerosis, y algunos tipos de cáncer (pecho y colon) con el consumo de aceite de oliva en la dieta Mediterránea (López-Miranda, J. et al., (2010), *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 20, 284-294). La ingesta habitual de aceite de
25 oliva proporciona un continuo aporte de antioxidantes, que pueden reducir el estrés oxidativo en el cuerpo humano. Numerosos estudios relacionan los efectos beneficiosos del aceite de oliva, con una gran variedad de antioxidantes fenólicos (fenoles simples, secoroideos, flavonoides,
30 lignanos), y su contenido fenólico. Todas estas sustancias son potentes inhibidores del ataque de especies de oxígeno reactivas y en la actualidad hay evidencias que ponen de manifiesto que las especies oxidantes (oxígeno activo, radicales libres, etc.) están implicadas en la etiología de
35 enfermedades tales como el cáncer (Menéndez, J.A. et al.,

(2007), *BMC Cancer*, 7, 80). Además, incrementan los niveles de disponibilidad de óxido nítrico, suprimen la agregación plaquetaria, disminuyen la presencia de moléculas de adhesión y promueven el contenido fenólico total de las LDL retrasando así su oxidación y, por tanto, la formación y el crecimiento de la placa de ateroma.

Las aceitunas poseen una composición fenólica característica. La existencia y cantidad de fenoles específicos en la aceituna dependen de la variedad y estado de madurez, condiciones climáticas, estacionales y geográficas. Sólo una pequeña cantidad (1-2%) entran a formar parte de la fase oleosa durante la extracción del aceite de oliva mientras que el resto permanece en el residuo o alperujo (Rodis, P.S., Karathanos, V.T. y Mantzavinou, A. (2002), *J. Agric. Food Chem.*, 50, 596-601). Hasta el momento el alperujo no ha sido adecuadamente explotado debido en cierta manera a la dificultad que entraña su manipulación. Por lo tanto, la extracción de estos fenoles como productos de alto valor añadido podría ser considerada como una interesante alternativa para hacer provechosos los residuos de almazaras. Se han desarrollado y patentado diversos métodos y sistemas encaminados a la obtención de extractos que contienen compuestos fenólicos desde la aceituna y sus subproductos, así como la purificación de algunos de ellos (hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína fundamentalmente).

En muchos casos se utilizan técnicas de extracción con solvente o procedimientos de separación y concentración selectiva por ultrafiltración, ósmosis inversa, evaporación, separación cromatográfica y extracción de fluidos supercríticos, a partir tanto de las aguas de vegetación separadas del alperujo, como de las aguas de procesado de la aceituna de mesa. Estas técnicas pueden ser usadas individualmente o de modo integrado. Así, después de efectuar una ultrafiltración de las aguas generadas en el procesado de la aceituna de mesa se procedía a efectuar un proceso de

adsorción en resina no iónica (tipo XAD) para obtener un extracto rico en hidroxitirosol (ES 2186467). También se han descrito técnicas de separación por membrana de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, seguido de un proceso de purificación en columna (US 2006/0070953).

Otros procedimientos emplean una extracción sólido-líquido sometiendo directamente el alperujo a una extracción con una mezcla de etanol-agua, para posteriormente la fase orgánica ser sometida a una extracción en fluido supercrítico (WO 2007/013032). Por otro lado también se obtienen extractos de hidroxitirosol a partir de las aguas de vegetación de la aceituna mediante fluidos supercríticos, tal como el dióxido de carbono (US 2002/0198415).

Uno de los procedimientos más simple, práctico y económico de los descritos es el que permite obtener un hidroxitirosol con alto grado de pureza a partir de cualquier fuente acuosa (alpechín, fase acuosa del proceso hidrotérmico del alperujo, agua de lavado de la elaboración de las aceitunas de mesa, etc.) mediante una cromatografía en dos pasos, una primera con una resina de intercambio iónico y una segunda con una resina adsorbente del tipo XAD (US 2004/0102657).

También se ha descrito la extracción del aglicón de la oleuropeína a partir del alpechín mediante una extracción con hexano:acetona (50/50, v:v) (US 2005/01037111), así como otros procedimientos que permiten obtener extractos polifenólicos mediante extracciones líquido-líquido a partir de productos derivados de la aceituna (concentrado de alpechín o fase acuosa de las aceitunas), utilizando acetato de etilo (ES 2051238) o mezcla de acetato de etilo y etanol o acetato de etilo, etanol y agua (ES 2311401) para posteriormente llevar a cabo tratamientos de la fase orgánica con una cromatografía de alta eficacia en fase reversa en el caso de la primera invención o en una resina del tipo XAD

para la segunda, que permiten obtener unos extractos con una alta concentración de hidroxitirosol.

Descripción de la invención

5 El objeto de la presente invención es un nuevo extracto procedente de los residuos o subproductos generados a partir de la extracción del aceite de oliva o de la aceituna de mesa, una vez éstos han sido sometidos a un tratamiento térmico.

10 El nuevo extracto posee un contenido fenólico distinto a los extractos que se puedan obtener a partir de los mismos subproductos sin tratar térmicamente, y se caracteriza por aumentar significativamente ciertos fenoles y además por la presencia de compuestos que se forman durante dicho
15 tratamiento y que contribuyen en gran medida a la mejora de sus propiedades (antioxidantes, anti-inflamatorias, secuestrante de radicales libres, etc.).

La aplicación de determinados procesos, como es el caso de tratamientos térmicos, ayuda a la solubilización de los
20 fenoles y con ello facilita su posterior extracción. Se han estudiado procedimientos en un alto rango de temperaturas que facilitan sustancialmente no sólo la liberación de los fenoles y otros compuestos interesantes, sino que además, favorecen la hidrólisis en fenoles más simples y la aparición
25 de otros nuevos con un alto valor añadido.

La novedad de la aplicación de tratamientos térmicos radica en la obtención de un extracto fenólico con una mayor cantidad de fenoles simples y nuevos, favorecido por el tratamiento térmico, al mismo tiempo que facilita la
30 separación de fases y con ello se simplifica la extracción. A partir del extracto fenólico se pueden llegar a obtener distintas fracciones ricas en diferentes tipos de fenoles que proporcionan una amplia variedad de propiedades, o incluso aislar determinados compuestos de alto valor añadido.

Descripción detallada de la invención

Partiendo de cualquier tipo de subproducto del aceite de oliva o de la industria de aderezo, ya sea el caso del alperujo, alpechín, orujo, mezcla de ellos, o salmueras, la aplicación de un tratamiento térmico favorece sustancialmente a la posterior extracción de compuestos fenólicos y de interés presentes en los mismos. Durante el tratamiento no sólo se facilita la extracción sino también la formación de nuevos y activos compuestos al mismo tiempo que se hidrolizan fenoles en su forma más activa. El resultado final es un extracto enriquecido en compuestos bioactivos y con una mayor actividad antioxidante que un extracto obtenido a partir de un subproducto del aceite de oliva sin tratar térmicamente.

La masa de subproducto se trata en un rango de temperatura de entre 50°C y 250°C, más preferentemente entre 70°C y 200°C, por aporte directo o indirecto de calor, ya sea a través de una entrada de vapor u otro gas inerte, o bien a través de una camisa calefactora o resistencia eléctrica que esté en contacto con el material a tratar. El tiempo de reacción puede ser muy variable dependiendo del tipo de calentamiento, la temperatura y diseño del reactor térmico, pero puede oscilar entre los dos minutos hasta tratamientos más largos de hasta 3 ó 5 horas.

Tras el tratamiento térmico puede procederse a una separación sólido-líquido con el fin de obtener el extracto de cada fase por separado, o bien se puede proceder a la obtención del extracto de ambas fases sin separarlas previamente. La separación facilita la extracción en el caso de llevarse ésta a cabo con disolventes orgánicos y es la vía para obtener el extracto concentrado de la fracción líquida como producto final rico en fenoles.

De manera preferente, la extracción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 50°C y 100°C.

Por lo tanto se puede partir de cualquier subproducto de la aceituna, sólido o líquido.

En una realización preferente de la invención, el proceso puede comprender una etapa adicional que puede consistir en la microencapsulación o nanoencapsulación del extracto fenólico; la absorción o adsorción del extracto fenólico en cualquier tipo de soporte; o la formación de una emulsión del extracto fenólico.

Adicionalmente, es objeto de la invención una formulación alimentaria, cosmética y/o farmacéutica caracterizada por que comprende un extracto fenólico según ha sido descrito.

Finalmente, es objeto de la invención el uso del extracto fenólico como antioxidante para la preparación de preparados tanto lipófilos como hidrófilos, los cuales pueden presentar uso alimentario, cosmético y/o farmacéutico.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra la inhibición de la agregación plaquetaria de un extracto de alperujo (EA) usando colágeno (a) y TRAP (b) como agentes agonistas o estimulantes de la agregación. La inhibición plaquetaria está expresada en % de disminución de las áreas bajo la curva control de agregación plaquetaria. El número de muestras n=12-13 incubaciones por test. Todos los valores muestran una alta inhibición estadísticamente significativa frente al control ($p < 0.05$). (-) Valor promedio.

Ejemplos de la invención

A continuación se muestran a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo tratamientos térmicos aplicados a una muestra de alperujo como subproducto del aceite de oliva y la obtención a partir de los mismos del extracto fenólico.

Ejemplo

Una muestra de 20 kg de alperujo fresco fue sometida a varios procesos de tratamientos térmicos. Las condiciones

fueron en este caso de 160°C durante 30, 60 y 90 minutos mediante un calentamiento directo con vapor de agua.

Tras dicho proceso se obtiene una fracción sólida y otra líquida que son separadas mediante centrifugación, obteniéndose 51 litros de fracción líquida. Se toma una alícuota de 10 litros de la fracción líquida y se concentra a 1 litro. Se extraen los compuestos apolares (grasa) con hexano (2x100 ml por cada 200 ml de fracción soluble).

A continuación se procede a la extracción de los compuestos fenólicos, para ello se realiza una extracción en caliente y a contracorriente con acetato de etilo durante 8 horas, empleándose 500 ml de acetato de etilo por cada 200 ml de muestra. De la fase orgánica se obtienen las cantidades señaladas en la **tabla 1** de extracto fenólico seco (EF).

La misma extracción se realiza directamente sobre la muestra original de alperujo sin tratar térmicamente (EFNT) para que sirva como control y poder establecer los efectos del tratamiento térmico:

Para ello se somete el alperujo sin tratar a una extracción con etanol (EtOH) al 80% (v/v) en agua. Se parte de 2.690 kg del alperujo fresco no tratado térmicamente, que ha sido previamente desgrasado con hexano. El alperujo desgrasado se pone en contacto bajo agitación suave con EtOH 80% a temperatura ambiente durante 30 minutos, empleando 15 ml de EtOH 80% por cada 10 g de alperujo, la extracción es repetida dos veces más, utilizando 10 ml de EtOH 80% por cada 10 g de alperujo. Las fracciones son filtradas a través de un filtro de papel en Buchner, reunidas y el EtOH es evaporado hasta obtener un extracto acuoso. Al concentrado obtenido se le extraen los compuestos fenólicos con acetato de etilo, para ello se realiza una extracción en caliente y a contracorriente con acetato de etilo durante 8 horas, se emplean 500 ml de acetato de etilo por cada 200 mL de muestra. De la fase orgánica se obtienen 15.56 g de extracto fenólico seco no tratado (EFNT).

La cantidad de extracto fenólico obtenido a partir del alperujo tratado y no tratado térmicamente se muestra en la **tabla 1**, en donde se aprecia un significativo aumento con el tratamiento. Tres de los extractos tratados más el control sin tratar han sido caracterizados en cuanto a su composición total en la **tabla 2**.

Tabla 1. Gramos de extracto obtenido por kilogramo de alperujo fresco tratado o no térmicamente (AFNT).

Sin tratar	Tratamiento térmico a 160°C					
	15 (min)	30 (min)	45 (min)	60 (min)	75 (min)	90 (min)
AFNT	5,784	4,089	7,037	8,345	7,102	11,195
						9,051

10

Tabla 2. Composición de los extractos fenólicos obtenidos a partir de un alperujo sin tratar (EFNT) y tratado a 160°C para tres tiempos (n.d., no detectado). Fracción fenólica polimérica (FFP).

Componentes (%)	Sin tratar	Tratamiento térmico a 160°C			
	AFNT	30 (min)	60 (min)	90 (min)	
Humedad	8,62	12,36	15,60	13,02	
Fenoles	25,70	48,40	19,93	22,68	
FFP	n.d.	7,32	1,09	14,21	
Proteínas	1,41	1,81	3,09	3,90	
Cenizas	0,01	0,02	0,04	0,03	
Azúcares	7,30	5,75	5,54	3,52	
Lípidos	52,64	20,25	42,64	35,08	
Ácidos urónicos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Total	95,68	95,91	87,93	92,44	

15

El porcentaje en humedad es mayor en el caso de los extractos tratados térmicamente, mientras que el contenido en fenoles totales y lípidos no parece variar significativamente. Gracias al tratamiento térmico y posterior extracción aparece un nuevo componente que consiste en una mezcla de polímeros fenólicos (FFP), entre otros, que puede presentar importantes propiedades bioactivas. La cantidad de proteínas aumenta con los tratamientos mientras que la de azúcares disminuye.

20

Para estos mismos extractos se llevó a cabo una caracterización más detallada sobre el contenido de compuestos fenólicos como se detalla en la **tabla 3a** y en la **tabla 3b**. Las notables diferencias de composición así como la aparición de nuevos compuestos fenólicos y otros de degradación de azúcares marcan una importante diferencia con los extractos fenólicos que se pueden llegar a obtener a partir de los subproductos sin tratar. Estas diferencias se traducen en una mayor actividad por una mayor presencia de fenoles más activos y otros nuevos con importantes propiedades para la salud, entre otras. A continuación se detallan más a fondo las nuevas características de los extractos tratados térmicamente.

Tabla 3a. Componentes fenólicos y de degradación de azúcares presente en los diferentes extractos EF a distintas temperaturas y para el EFNT expresados en mg de compuesto por kilogramo de alperujo fresco.

Cantidades totales	mg/Kg alperujo fresco			
	EFNT	160°C/30	160°C/60	160°C/90
3,4-Dihidroxi-fenilglicol	24,907	123,433	70,18	71,64
Hidroxitirosol	15,733	1624,825	776,548	1127,53
Tirosol	14,970	108,072	80,648	168,038
Vainillina	n.d.	0,095	n.d	11,122
4-metilcatecol	n.d.	1,921	n.d	n.d
Alcoholes fenólicos totales	55,610	1858,347	927,376	1378,329
Hidroximetil-furfural	n.d.	1,325	4,68	21,29
Ácido 3,4 Dihidroxi-fenilacetico	n.d.	15,563	n.d	19,59
Ácido protocateico	9,174	24,464	18,462	2,74
Ácido cafeico	n.d.	7,115	2,658	0,957
Ácido p-Ohbenzoico	0,4	1,657	1,432	1,067
Derivados del ácido protocateico	n.d.	5,137	n.d	n.d
4-metilcatecol	n.d.	1,921	n.d	n.d
Ácido p-cumárico	2,929	n.d	1,496	n.d
Der ac p-cumárico	n.d.	n.d	0,049	n.d
Ácido clorogénico	n.d.	n.d	n.d	19,572
Ácido siríngico	n.d.	n.d	n.d	1,786
Ácido vainíllico	3,362	n.d	5,013	2,089

Ácidos fenólicos totales	15,865	55,857	29,11	47,802
Hemiacetal de la aglicona de la oleuropeina	n.d	n.d	0,019	n.d
Derivados de la oleuropeina 4C	n.d	8,382	1,39	n.d
Oleuropeina	2,743	0,922	0,461	n.d
Desmetiloleuropeina	n.d	n.d	n.d	14,535
Secologanosido	n.d	7,355	n.d	n.d
Oleuropeina aglicón derivado	n.d	n.d	0,196	n.d
10-Hidroxi-metiloleuropeina	n.d	4,277	n.d	n.d
Derivados de la oleuropeina, totales	2,743	20,937	0,676	14,535
Derivado del ácido elenoico A	1339,749	664,381	191,299	527,404
Derivado del ácido elenoico C	n.d	294,459	123,562	n.d
Derivado del ácido elenoico B	n.d	26,48	0,577	9,39
Derivados del ácido elenoico totales	1339,749	985,32	315,438	536,794
Ligstrosido	n.d	n.d	0,042	n.d
Desmetilligstrosido	n.d	18,716	2,207	111,395
Derivados del ligstrosido, totales	n.d	18,716	2,25	111,395
Luteolin-7-O-Rutinosido	n.d	1,34	0,072	0,125
Apigenin-7-O-Rutinosido	n.d	n.d	0,179	n.d
Luteolin-7-O-Glucosido	3,697	n.d	0,58	n.d
Cianidina-3-Oruriosido	n.d	0,055	n.d	n.d
Cfeoil-6'-O-Secologanosido	n.d	8,752	n.d	0,809
Flavonoides totales	3,697	10,147	0,831	0,934
1-Acetoxipinoresinol	n.d	154,671	59,831	174,922
Pinoresinol	n.d	25,021	5,939	n.d
Lignanos totales	n.d	179,692	65,77	174,922
1-Fenil-6,7-dihidroisocromona	n.d	5,097	36,926	21,056
Verbascósido	n.d	2,025	8,432	n.d
6'-O-[(2E)-2,6-Dimetil-8-hidroxi-2octonoiloxi]	n.d	2,141	n.d	n.d

secologanosido				
Comsegolosido	184,427	58,93	22,684	5,121
Nuzherina	n.d	2,432	n.d	n.d
Ácido 3-				
Hidroximetil-2,3-				
dihidroxi-5-				
(metoxycarbonil)-2-	n.d	207,18	n.d	n.d
metil-2H-piran-4-				
acetico metil éster				
Varios, totales	184,427	277,805	68,042	26,177
FFP	n.d	515,823	77,658	1286,409

Tabla 4b. Componentes fenólicos y de degradación de azúcares presente en los diferentes extractos EF a distintas temperaturas y para el EFNT expresados porcentaje (gramos de componente por 100g de extracto fenólico).

5

Cantidades totales	% en el extracto			
	EFNT	160°C/30	160°C/60	160°C/90
3,4-Dihidroxi-fenilglicol	0,431	1,754	0,988	0,792
Hidroxitirosol	0,272	23,088	10,935	9,58
Tirosol	0,259	1,536	1,136	1,857
Vainillina	n.d.	0,001	n.d	0,123
4-metilcatecol	n.d.	0,027	n.d	n.d
Alcoholes fenólicos totales	0,961	26,406	13,058	12,351
Hidroximetil-furfural	n.d.	0,019	0,066	0,235
Ácido 3,4 Dihidroxi-fenilacetico				
Ácido protocateico	n.d	0,221	n.d	0,217
Ácido cafeico	0,159	0,073	0,26	0,03
Ácido p-Ohbenzoico	n.d	0,101	0,037	0,011
Derivados del ácido protocateico	0,007	0,024	0,02	0,012
4-metilcatecol	n.d	0,348	n.d	n.d
Ácido p-cumárico	n.d	n.d	n.d	n.d
Der ac p-cumárico	0,051	n.d	0,021	n.d
Ácido clorogénico	n.d	n.d	0,001	n.d
Ácido siríngico	n.d	n.d	n.d	0,216
Ácido vainíllico	n.d	n.d	n.d	0,023
Ácidos fenólicos totales	0,058	n.d	0,071	0,02
Hemiacetal de la aglicona de la oleuropeina	0,274	0,766	0,41	0,528
Derivados de la oleuropeina 4C	n.d	n.d	n.d	n.d

Oleuropeina	n.d	0,119	0,02	n.d
Desmetiloleuropeina	0,047	0,013	0,006	n.d
Secologanosido	n.d	n.d	n.d	0,161
Oleuropeina aglicón derivado	n.d	0,105	n.d	n.d
10-Hidroxi-metiloleuropeina	n.d	n.d	0,003	n.d
Derivados de la oleuropeina, totales	n.d	0,061	n.d	n.d
Derivado del ácido elenoico A	0,047	0,297	0,029	0,161
Derivado del ácido elenoico C	23,161	9,441	2,694	5,829
Derivado del ácido elenoico B	n.d	4,184	1,74	n.d
Derivados del ácido elenoico totales	n.d	0,376	0,008	0,104
Ligstrosido	23,161	14,001	4,442	5,933
Desmetilligstrosido	n.d	n.d	0,001	n.d
Derivados del ligstrosido, totales	n.d	0,266	0,031	1,231
Luteolin-7-O-Rutinosido	n.d	0,266	0,032	1,231
Apigenin-7-O-Rutinosido	n.d	0,019	0,001	0,001
Luteolin-7-O-Glucosido	n.d	n.d	0,003	n.d
Cianidina-3-Oruriosido	0,064	n.d	0,008	n.d
Cfeoil-6'-O-Secologanosido	n.d	0,001	n.d	n.d
Flavonoides totales	n.d	0,124	n.d	0,009
1-Acetoxipinoresinol	0,064	0,144	0,012	0,01
Pinoresinol	n.d	2,198	0,842	1,933
Lignanos totales	n.d	0,356	0,084	n.d
1-Fenil-6,7-dihidroisocromona	n.d	2,553	0,926	1,933
Verbascósido	n.d	0,072	0,52	0,233
6'-O-[(2E)-2,6-Dimetil-8-hidroxi-2octonoiloxi]secologanosido	n.d	0,029	0,119	n.d
Comsegolosido	n.d	0,03	n.d	n.d
Nuzherina	1,198	0,837	0,319	0,057
Ácido 3-Hidroximetil-2,3-dihidroxi-5-(metoxycarbonil)-2-	n.d	0,035	n.d	n.d

metil-2H-piran-4-acetico metil éster				
Varios, totales	n.d	2,944	n.d	n.d
FFP	1,198	3,947	0,958	0,2892342

Principales ventajas del nuevo extracto

De la caracterización se pueden destacar los siguientes puntos o ventajas del tratamiento térmico que diferencian al nuevo extracto obtenido:

- La cantidad de extracto obtenido aumenta con el tratamiento térmico y en el caso del presente ejemplo aumenta con el tiempo de tratamiento;
- En el EF obtenido tras el tratamiento térmico se produce un incremento de la concentración de los alcoholes fenólicos. El **3,4-dihidroxifenilglicol** aumenta su concentración de 3 a 5 veces en el extracto. En el caso del **hidroxitirosol** la concentración aumenta hasta 100 veces con respecto a la concentración inicial. La concentración de **tirosol** se incrementa hasta más de 10 veces con respecto al EFNT. Por lo tanto, se observa que el extracto fenólico obtenido tras el tratamiento térmico se encuentra altamente enriquecido en estos antioxidantes naturales;
- De forma global se experimenta un incremento de las concentraciones de los fenoles ácidos presentes en EF con respecto al EFNT, aumentando su porcentaje hasta 3.5 veces en el extracto. Hay que destacar que tras el tratamiento térmico se observa la presencia de **ácido cafeíco**, el cual antes del tratamiento no había sido detectado. Aunque se encuentra presente en otras muestras su concentración aumenta notablemente tras el tratamiento térmico. Esta molécula se encuentra formando parte de estructuras más complejas como el comsegolosido, el cual puede sufrir una ruptura en el reactor liberando la especie. El **ácido protocateico** experimenta un aumento de la concentración y porcentaje de más del doble en el extracto;

• En el EF también destaca la nueva presencia de compuestos como el **pinoresinol** y **1-acetoxipinoresinol** (hasta un 0.36 y 2.2% respectivamente) que no han sido identificados en el EFNT. En el alperujo el pinoresinol y 1-acetoxipinoresinol solo han sido descritos por primera vez en un artículo reciente (Suárez, M. et al., (2009), *J Agric Food Chem.*, 57, 1463-72.), aunque las concentraciones a las que se encuentran son mucho menores que las presentes en el extracto fenólico aquí tratado. Es importante señalar que prácticamente ningún autor identifica a estas especies en el alperujo, probablemente debido a las bajas concentraciones en las que se encuentran;

• Se observa la presencia de nuevos compuestos en el EF obtenido tras el tratamiento térmico que no se observan en EFNT, tales como el **hidroximetilfurfural** y el **1-fenil-6,7-dihidroisocromona**, que alcanzan porcentajes de hasta un 0.24 y 0.52% en el EF respectivamente. El hidroximetilfurfural no ha sido descrito como componente del alperujo. Su presencia se debe a la degradación de hexosas que tienen lugar en el reactor como consecuencia del calentamiento;

• El 1-Fenil-6,7-dihidroisocromona pertenece a la familia de los hidroxisocromanos, los cuales forman parte de los componentes de naturaleza fenólica procedente del aceite de oliva (Bianco, A., et al., (2001), *Food Chem.* 77, pp. 405-411). Sin embargo no han sido descritos con anterioridad en el alperujo;

• Compuestos como el comsegolosido, verbascósido, los derivados de la Oleuropeína y del Ligstrosido sufren un descenso en su concentración. Este hecho se justifica debido a que el tratamiento térmico provoca la ruptura de estas moléculas complejas, provocando la liberación de otras de menor tamaño tales como el **hidroxitirosol** o el **tirosol**, que forman parte de su estructura, aumentando la concentración de éstas como ya se ha visto con anterioridad;

• El tratamiento térmico seguido por una extracción fenólica favorece la aparición de una nueva **fracción fenólica polimérica (FFP)**, hasta un 14% en el extracto y con interesantes propiedades para la salud.

5 El incremento tan importante que ocurre para los compuestos fenólicos con tan importantes propiedades bioactivas así como la aparición de nuevos componentes hacen que el nuevo extracto presente nuevas y mejores propiedades beneficiosas para la salud. Éstas quedan claramente
10 reflejadas en los ensayos de actividad que a continuación se muestran.

Ensayos de Actividad

Actividad de los nuevos extractos fenólicos tratados térmicamente (EF) y de sus fracciones.

15 El EF es rico en una gran variedad de compuestos que pueden presentar distintas actividades, contribuyendo todas ellas en suma a la actividad final del extracto. El fraccionamiento de dicho extracto puede resultar beneficioso para potenciar ciertas actividades concretas de los
20 componentes fraccionados. Por ello, se ha realizado también un estudio sobre la actividad de las fracciones del EF tratado térmicamente. A modo de ejemplo se presentan las fracciones en las cuales se dividen el extracto 160°C/60min y se le realizan los ensayos de actividad antioxidante a cada
25 una de ellas. La composición de las distintas fracciones obtenidas se muestra a modo de ejemplo en la **tabla 4**.

Se expone en **la tabla 5** como ejemplo de la actividad in vitro de la actividad antioxidante y secuestrante de radicales libres del nuevo extracto y de sus distintas
30 fracciones los siguientes ensayos cuyos resultados obtenidos son comparados con el extracto fenólico no tratado como control (EFNT), la vitamina E (VE), el hidroxitirosol (HT) y el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), siendo éstos últimos dos de los fenoles simples más activos presentes en la aceituna.

Tabla 4: Composición de cada una de las fracciones en las cuales se divide el extracto fenólico obtenido tras tratar el alperujo a 160°C durante 60 minutos. Se especifica las especies de naturaleza fenólica presentes en cada fracción y la concentración de las mismas en ng/μl. (Fr.= Fracción)

Fr.	Compuestos	[ng/μl]	Fr.	Compuestos	[ng/μL]
1	DHFG	2457,377	3F	Ácido protocateico	150,142
2A	DHFG	74,445		Ácido p-hidroxibenzoico	10,663
	Hidroximetilfurfural	93,015	3G	Ácido Cafeico	106,863
	Hidroxitirosol	99,883	4A	Glicol	5,445
	Tirosol	664,213		Hidroxitirosol	12,276
2B	DHFG	284,163		Tirosol	2,775
	Hidroximetilfurfural	53,505		Derivado Ácido Elenoico A	211,814
	Hidroxitirosol	29890,674	4B	Hidroxitirosol	78,815
	Tirosol	861,222		Derivado Ácido Elenoico C	4967,175
2C	Ácido Protocateico	534,619		Derivado de Oleuropeina	56,105
3A	Hidroximetilfurfural	38,753	4C	Hidroxitirosol	78,820
3B	Hidroximetilfurfural	2,953		1-Acetoxipinoresinol	2260,066
	Hidroxitirosol	9,547		Oleuropeina	18,548
	Derivado Ácido Elenoico A	3639,062		Ligstrosido	1,705
	Hemiacetal de la aglicona de la oleuropeina	0,760		Oleuropeina aglicon derivado	7,870
3C	Hidroxitirosol	888,204	4D	Hidroxitirosol	64,102
	Derivado Ácido Elenoico A	582,152		Derivado Ácido Elenoico B	23,194
	Tirosol	1489,292		1-Acetoxipinoresinol	153,009
	Pinoresinol	238,763	4E	FFP	
3D	Hidroxitirosol	51,951	4F	Hidroxitirosol	42,644
	Derivado del Ácido p-cumárico	1,964		Ácido Vainílico	107,208

	Tirosol	224,514		Apigenin-7-O Rutinosido	7,191
	Derivado Ácido Elenoico A	2631,371		Verbascósido	293,091
	1-fenil-6,7- dihidro- isocromona	1484,426	4G	Ácido p-Cumárico	60,168
	Verbascósido	45,877		Luteolin-7-O Glucósido	23,298
3E	Ácido protocateico	53,506		Comsegolosido	911,887
	Ácido p- hidroxi- benzoico	46,905			
	Derivado ác. Elenoico A	625,750			
	Luteolin-7-O Rutinosido	2,908			
	Ác. Vainíllico	94,309			

Tabla 5. Ensayos de actividad biológica de los extractos obtenidos tras distintos tratamiento térmicos y sus fracciones comparados con el extracto sin tratamiento y compuestos como el HT, el DHFG y la vitamina E. (1= Poder Reductor; 2= Actividad antirradical DPPH; 3= Captación de radicales libres ABTS; 4= Inhibición a la Oxidación 1ª; 5= Inhibición a la Oxidación 2ª; 6= Inhibición a la actividad tirosinasa)

	1	2	3	4	5	6
	mg/ml trolox	EC50	TEAC	EC 50	EC50	Abs
EFNT	0,15	5,59	0,22	1,80	0,79	0,84
EF(160/15)	0,45	1,64	0,53	1,46	0,97	0,48
EF(160/30)	0,34	1,50	0,46	1,31	1,14	0,51
EF(160/45)	0,48	1,11	0,51	1,06	0,94	0,43
EF(160/60)	0,49	1,23	0,54	0,96	1,13	0,44
EF(160/75)	0,42	1,06	0,42	1,38	1,02	0,35
EF(160/90)	0,50	1,72	0,51	1,64	1,05	0,51
Fracción 1	0,32	1,08	0,40	1,08	0,60	-
Fracción 2A	0,17	6,03	0,20	6,03	1,06	-
Fracción 2B	1,29	0,81	1,38	0,80	0,14	-
Fracción 2C	1,79	2,79	0,70	2,79	0,08	-
Fracción 3A	0,06	1,75	0,17	1,76	1,66	-
Fracción 3B	0,09	3,22	0,17	3,22	1,88	-
Fracción 3C	0,78	0,81	0,71	0,81	0,35	-
Fracción 3D	0,97	0,94	0,28	0,94	0,29	-
Fracción 3E	0,84	0,67	0,67	0,67	0,16	-
Fracción 3F	0,96	0,60	0,29	0,59	0,35	-

Fracción 3G	0,43	7,24	0,28	7,24	0,34	-
Fracción 4A	0,03	8,58	0,06	8,57	5,65	-
Fracción 4B	0,24	3,29	0,24	3,29	0,84	-
Fracción 4C	0,83	0,32	0,69	0,32	0,10	-
Fracción 4D	0,66	1,01	0,47	1,01	0,11	-
Fracción 4E	0,54	0,57	0,45	0,57	0,24	-
Fracción 4F	0,80	0,44	1,29	0,44	0,33	-
Fracción 4G	0,52	0,86	0,95	0,86	0,41	-
HT	1,60	0,11	1,53	0,68	0,07	-
DHFG	1,96	0,17	0,99	0,83	0,03	-
Vit E	-	0,83	0,50	0,52	0,23	-

1.- Poder reductor: El poder reductor de los extractos estudiados se expresa como equivalentes en mg/ml de Trolox que se requieren para llevar a cabo una inhibición de la oxidación de igual magnitud a la que se produce con una concentración de 1 mg/ml de compuesto/extracto. Se observa (Tabla 5) que los extractos fenólicos obtenidos a partir de alperujo tratado térmicamente (EF) presentan una actividad muy superior al del obtenido a partir del alperujo no tratado térmicamente, e inferior en este caso a la actividad mostrada por el HT y el DHFG como compuestos control.

En cuanto a la actividad de las distintas fracciones se puede comprobar algunas como la 2B y 2C cuyo valor reductor se encuentra por encima del Trolox, siendo la 2B la más rica en hidroxitirosol, y la 2C está constituida exclusivamente por ácido protocateíco. La mayoría de las fracciones poseen un valor superior al del propio EF tratado térmicamente, por lo que se verifica que en casos como éste un posterior fraccionamiento ayuda a aumentar las propiedades del extracto.

2.- Captación de radicales DPPH: Los resultados se expresan como EC₅₀, de forma que se indica la concentración de los extractos/compuestos necesarias para inhibir la oxidación en un 50%. Cuanta más capacidad antirradical posea la especie a estudio menos cantidad de la misma se requiere para disminuir la oxidación en un 50%. Como puede comprobarse en la tabla 5, los extractos obtenidos tras el tratamiento

poseen mayor capacidad de captación que el extracto control sin tratar y a su vez los valores son próximos a los valores que proporciona la vitamina E.

Los resultados muestran que las fracciones 1, 2B, 3C, 3D, 3E, 3F, 4C, 4D, 4E, 4F y 4G son aquellas fracciones que presentan una mayor capacidad de captación de radicales DPPH, superando al propio EF tratado térmicamente. Estas fracciones son ricas en DHFG, hidroxitirosol, 1-fenil-6,7-dihidroisocromona, ácido vainílico, 1-acetoxipinoresinol y comsegolosido. Hay que destacar que también presenta actividad la fracción 4E que es la que está formada por FFP. Los resultados de actividad antirradical son comparables a los resultados obtenidos con la vitamina E.

3.- La captación de radicales ABTS⁺ es comparada con la capacidad del Trolox bajo las mismas condiciones. Los resultados se expresan como "Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox" (TEAC). Como se puede comprobar en la **tabla 5** la capacidad captadora de los EF tratados superan ampliamente al no tratado y presentan una actividad similar a la vitamina E. Por otro lado la actividad mostrada por los extractos tratados no solo se debe a la presencia de HT.

Los resultados muestran que las fracciones 2B, 4F y 4G poseen una capacidad de captación de radicales ABTS del mismo orden que el observado en el caso del HT y DHFG, y que junto con el 2C, 3C, 3E y 4C mejoran la actividad del extracto. La fracción 2B se caracteriza por poseer un elevado porcentaje de HT. La fracción 4F además de hidroxitirosol contiene otras especies como el ácido vainílico o el verbascósido que probablemente actúen de forma sinérgica. La fracción 4G se caracteriza por poseer un elevado porcentaje de comsegolosido. Por otro lado, las fracciones 2C, 3C, 3E, 4C, 4D y 4E poseen una capacidad de captación de radicales ABTS similar a la observada por la vitamina E, debido a la presencia de compuestos como el ácido protocateico, el ácido

vainillílico, el 1-acetoxipinoresinol, el pinoresinol, el verbascósido, el comsegolosido y la FFP.

4.- Inhibición de la oxidación primaria: Se determina la inhibición a la oxidación primaria del ácido linoleico. Los resultados se expresan como EC50. En la **Tabla 5** se muestra que los valores obtenidos para todos los EF tratados térmicamente superan al extracto no tratado y se encuentran próximos a los obtenidos con HT y DHFG. De nuevo se verifica que la actividad que presentan los extractos tratados no se puede justificar sólo por la presencia de HT.

En la fracción 4C la capacidad de inhibición de la oxidación primaria se encuentra incluso por encima de los valores obtenidos para la vitamina E. Esta fracción es rica en 1-acetoxipinoresinol. Las fracciones 1, 2B, 3C, 3D, 3E, 3F, 4D, 4E, 4F y 4G también poseen una capacidad de inhibición de la oxidación primaria por encima del extracto tratado térmicamente. En la fracción 1, 2B y 3C este efecto se puede deber a las elevadas concentraciones de HT y DHFG. En los demás casos la actividad puede deberse al igual que en los casos previos a la presencia de 1-fenil-6,7-dihidroisocromona, al ácido protocateico, ácido vainílico, 1-acetoxipinotesinol, verbascósido, comsegolosido y FFP.

5. Inhibición de la oxidación secundaria: Se basa en la medida de la cantidad de malondialdehído (MDA), un subproducto formado en sistemas de lipoperoxidación. En la **tabla 5** se muestran los resultados obtenidos de EC₅₀. Los resultados ponen de manifiesto que los valores obtenidos de los EF se encuentran por debajo de los compuestos de referencia y también del EFNT. A pesar de ello tras el fraccionamiento una gran cantidad de fracciones presentan valores de EC₅₀ muy por debajo del extracto sin tratar térmicamente, mejorando bastante las propiedades en la prevención a la oxidación en medios lipídicos.

6.- Inhibición de la actividad de la tirosinasa de hongos *in vitro*: Esta enzima cataliza las primeras dos reacciones de

la síntesis de la melanina, la hidroxilación de la L-tirosinasa para dar 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y la oxidación de la L-DOPA a dopaquinona. Esta quinona es altamente reactiva y puede polimerizar espontáneamente a melanina. Los efectos de los extractos sobre las actividades de monofenolasa, utilizando L-tirosinasa como sustrato y de difenolasa sobre L-DOPA, se siguieron mediante la inhibición de la formación de dopacromo mediante medidas espectrofotométricas. Se muestran los resultados de absorbancia mostrados a 300 segundos, como tiempo final, para concentraciones de 0.75mg/ml de los extractos en la **tabla 5**. Cuanto menor sea la absorbancia desarrollada mayor es la capacidad de inhibición. Todos los extractos tratados térmicamente se encuentran dentro del mismo rango y poseen mayor capacidad de inhibición que el extracto fenólico no tratado térmicamente.

7. Inhibición de la agregación plaquetaria: Se estudió un rango de concentraciones de entre 50-2000 mg/l del extracto EF, usando colágeno y TRAP (péptido agonista del receptor de la trombina) como agonistas o estimulantes de la agregación. Los porcentajes de inhibición observados (**Figura 1**) son bastante altos, incrementándose éstos con la concentración usada de EF, los cuales llegan hasta un 90% en el caso de usar colágeno o de un 70% para el TRAP, o de un 10% en el caso de concentraciones de EA a las que sus componentes lo están a nivel fisiológico (100-200 mg de EA/l).

El alto porcentaje de inhibición muestra al nuevo extracto fenólico como un posible agente para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Reivindicaciones

1. Extracto fenólico obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que comprende una composición media en alcoholes fenólicos totales por encima del 5% en peso seco y una composición media en ácidos fenólicos totales por encima del 0.3% en peso seco.
2. Extracto fenólico, de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que comprende al menos un compuesto fenólico seleccionado entre pinosresinol, 1-acetoxipinosresinol, hidroximetilfurfural, 1-fenil-6,7-dihidroisocromona o una fracción fenólica polimérica FFP, así como cualquiera de sus combinaciones.
3. Proceso de obtención de un extracto fenólico a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que comprende una etapa previa de tratamiento térmico entre 50°C y 250°C del subproducto de aceituna, seguido de una etapa de extracción del extracto fenólico.
4. Proceso de acuerdo a la reivindicación 3, caracterizado por que comprende una etapa adicional de separación sólido-líquido, posterior al tratamiento térmico, dando lugar a una fase sólida y a una fase líquida, seguida de una etapa de extracción por separado del extracto fenólico de la fase líquida y de la fase sólida.
5. Proceso de acuerdo a la reivindicación 3 ó 4, donde dicha extracción se lleva a cabo mediante el empleo de al menos un disolvente orgánico.
6. Proceso, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde durante la extracción se lleva a cabo la aplicación de temperatura entre 50°C y 100°C.

7. Proceso, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado por que comprende una etapa adicional de concentración total o parcial del extracto fenólico.

8. Proceso, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, caracterizado por que comprende una etapa adicional de microencapsulación o nanoencapsulación del extracto fenólico; de absorción o adsorción del extracto fenólico en cualquier tipo de soporte; o de formación de una emulsión del extracto fenólico.

9. Extracto fenólico obtenible a partir de un proceso de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.

10. Formulación alimentaria, cosmética y/o farmacéutica caracterizada por que comprende un extracto fenólico de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2 ó 9.

11. Uso de un extracto fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 9 como antioxidante para la preparación de preparados tanto lipófilos como hidrófilos, con uso alimentario, cosmético y/o farmacéutico.

12. Uso de un extracto fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 9 como agente inhibitorio de la acción de la enzima L-tirosinasa, implicada en procesos de pardeamiento.

13. Uso de un extracto fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 9 como agente inhibitorio de la agregación plaquetaria en la prevención de enfermedades coronarias.

14. Fracción o fracciones parcial o totalmente aisladas obtenibles a partir de un extracto fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 9.

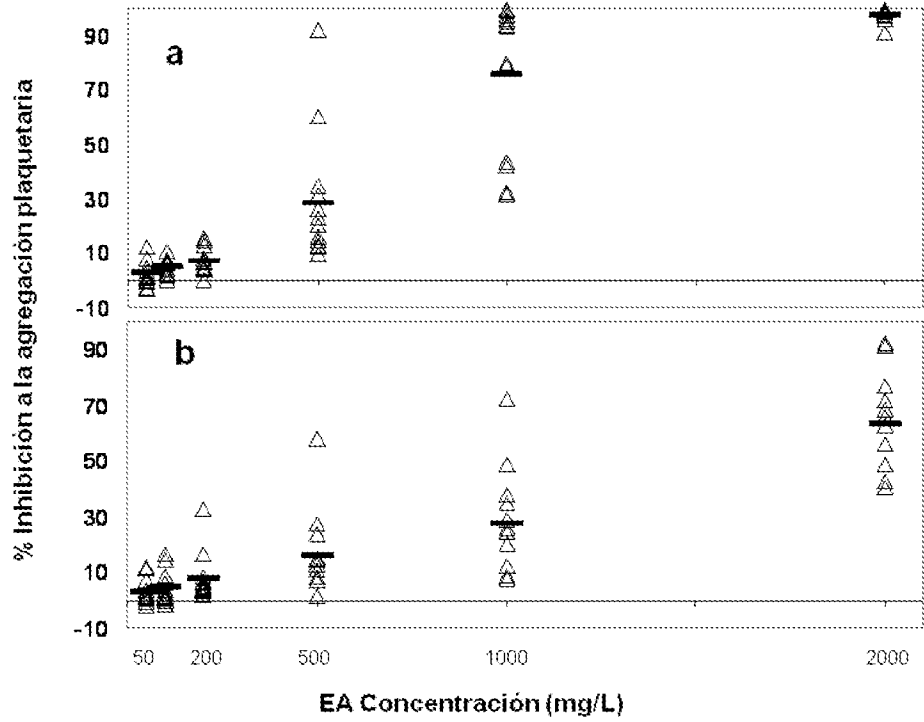


FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

A61K, A23L, A61P

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, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA CROPU, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. et al. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: isolation of added-value compounds. J. Agric. Food Chem, 2004. Vol. 52, n° 19, pages 5849-5855. DOI: 10.1021/jf030821y	1 - 5, 9 - 11, 14
A	LAMA-MUÑOZ, A. et al. New Hydrothermal treatment of alperujo enhances the content of bioactive minor components in crude pomace olive oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 25.01.2011. Vol. 59, n° 4, pages 1115-1123. Doi: 10.1021/jf103555h	1 - 6, 9, 10, 14
A	FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. et al. Potential use of olive by-products. Grasas y Aceites, 2006. Vol. 57, n° 1, pages 95-106. ISSN 0017 3495.	1, 3, 9 - 11, 13

☒ 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
5 October 2012 (05.10.2012)Date of mailing of the international search report
(15/10/2012)

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

A. Sukhwani

Telephone No. 91 3495473

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070441

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ES 2199069 A1 (CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGÉTICAS MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLÓGICAS (C.I.E.M.A.T.)) 01.02.2004, columns 3-6; claims 1, 2	1, 3, 9 - 11
A	TRIPOLI, E. et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. Nutrition Research Reviews, 2005. Vol. 18, nº 1, pages 98-112. Doi: 10.1079/NRR200495	1, 2, 11, 13, 14
A	ES 2051238 A1 (INGENIERÍA Y DESARROLLO AGRO INDUSTRIAL S. A.) 01.06.1994, columns 2, 3; claims 1, 5, 8, 11	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070441

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2199069 A	01.02.2004	WO2004009206 A AU2003208731 A US2004176647 A US7109384 B	29.01.2004 09.02.2004 09.09.2004 19.09.2006
----- ES2051238 A -----	----- 01.06.1994 -----	----- NONE -----	----- ----- -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070441

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/63 (2006.01)

A61K8/92 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61P9/10 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070441

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

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)

A61K, A23L, A61P

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, X-FULL, NPL, CAPLUS, FSTA, AGRICOLA, CABA CROPU, SCISEARCH

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. et al. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: isolation of added-value compounds. J. Agric. Food Chem, 2004. Vol. 52, n° 19, páginas 5849-5855. DOI: 10.1021/jf030821y	1 - 5, 9 - 11, 14
A	LAMA-MUÑOZ, A. et al. New Hydrothermal treatment of alperujo enhances the content of bioactive minor components in crude pomace olive oil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 25.01.2011. Vol. 59, n° 4, páginas 1115-1123. Doi: 10.1021/jf103555h	1 - 6, 9, 10, 14
A	FERNANDEZ-BOLAÑOS, J. et al. Potential use of olive by-products. Grasas y Aceites, 2006. Vol. 57, n° 1, páginas 95-106. ISSN 0017 3495.	1, 3, 9 - 11, 13

☒ 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.
5 Octubre 2012 (05.10.2012)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
15 de octubre de 2012 (15/10/2012)

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)

N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

A. Sukhwani

N° de teléfono 91 3495473

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070441

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	ES 2199069 A1 (CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGÉTICAS MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLÓGICAS (C.I.E.M.A.T.)) 01.02.2004, columnas 3-6; reivindicaciones 1, 2	1, 3, 9 - 11
A	TRIPOLI, E. et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human Health. Nutrition Research Reviews, 2005. Vol. 18, n° 1, páginas 98-112. Doi: 10.1079/NRR200495	1, 2, 11, 13, 14
A	ES 2051238 A1 (INGENIERÍA Y DESARROLLO AGRO INDUSTRIAL S. A.) 01.06.1994, columnas 2, 3: Reivindicaciones 1, 5, 8, 11	1

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070441

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2199069 A	01.02.2004	WO2004009206 A AU2003208731 A US2004176647 A US7109384 B	29.01.2004 09.02.2004 09.09.2004 19.09.2006
----- ES2051238 A -----	----- 01.06.1994 -----	----- NINGUNO -----	----- ----- -----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K36/63 (2006.01)

A61K8/92 (2006.01)

A23L1/30 (2006.01)

A61P9/10 (2006.01)