

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 935 844**

21 Número de solicitud: 202130845

51 Int. Cl.:

B01D 11/02 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A01N 65/08 (2009.01)
C05F 5/00 (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

10.09.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.03.2023

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

18.05.2023

Fecha de concesión:

11.10.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

19.10.2023

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (82.0%)
AV. María Luisa S/N, Pabellón del Perú
41013 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (18.0%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA BORREGO, Aranzazu;
ABIA GONZÁLEZ, Rocío;
OROZCO PONCELA, Alejandro;
RODRÍGUEZ JUAN, Elisa María;
CARMONA MORENO, Inmaculada y
AGUIRRE JIMÉNEZ, María Itziar**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un extracto fenólico procedente de alpeorujó**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de un extracto fenólico procedente de alpeorujó.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos procedente de alpeorujó fresco de oliva mediante un disolvente eutéctico natural (NADES) de base ácida. La invención también se refiere al uso del extracto fenólico como nutracéutico, aditivo alimentario y como fitosanitario particularmente para el tratamiento de enfermedades microbianas. Asimismo, la invención se refiere al alpeorujó extractado para compostaje y vermicompostaje, particularmente como fertilizante y/o enmienda orgánica.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 935 844 B2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de un extracto fenólico procedente de alpeorujo

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un extracto rico en compuestos fenólicos procedente de alpeorujo fresco de oliva mediante un disolvente eutéctico natural (NADES) de base ácida. La invención también se refiere al uso del extracto fenólico como nutracéutico, aditivo alimentario y como fitosanitario particularmente para el tratamiento de enfermedades microbianas. Asimismo, la invención se refiere al alpeorujo
10 extractado para compostaje y vermicompostaje, particularmente como fertilizante y enmienda orgánica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El alpeorujo es el principal subproducto que se obtiene del proceso de extracción del aceite de oliva mediante el sistema de centrifugación a dos fases, en el que las aceitunas son extraídas en la almazara mediante los procesos de molienda, batido y centrifugación para producir por una parte una fase de aceite y por otra un único subproducto denominado alpeorujo. Mediante este sistema, se produce aproximadamente un 20% de aceite y se genera
20 un 80% de subproducto.

La aceituna está constituida por agua de vegetación, aceite, piel, pulpa y hueso. Tras la extracción a 2 fases prácticamente todos los componentes de la aceituna excepto la mayor parte de su aceite, pasan al alpeorujo. Así, el alpeorujo es una sustancia heterogénea
25 constituida por la piel, la pulpa, el hueso de la oliva y parte de su aceite (con elevada humedad que oscila entre el 65% y el 75%). Es de consistencia semisólida, y de gestión costosa especialmente por su fitotoxicidad (E. Benítez, E., Sainz, H., Melgar, R., Nogales, R. 2002, Vermicomposting of a lignocellulosic waste from olive oil industry: A pilot scale study. Waste Manage Res. 134–142), de difícil degradación biológica (Venieri, D., Rouvalis, A., Iliopoulou-Georgudaki, J. 2010. Microbial and toxic evaluation of raw and treated olive mill wastewaters. J Chem Tech & Biotech, Vol. 85, 1380-1388) y su elevada producción (mayor de 2,4 millones de toneladas mundiales sólo en la campaña olivarera 2020/2021 (IOC. Internationaloliveoil.org) que se concentra en los 4-5 meses de campaña, hace que el alpeorujo produzca un fuerte impacto ambiental, convirtiendo a este subproducto en una carga
30 económica para la industria oleícola.
35

Sin embargo, el alpeorujo es rico en compuestos bioactivos, en particular compuestos fenólicos que son muy abundantes en la aceituna y tras la extracción del aceite de oliva permanecen retenidos hasta el 98% en el alpeorujo (S. Demerche, M. Nadour, C. Larrocheb, F. Moulti-Matia, P. Michaudb. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization Strategies. Process Biochem vol 48. 1532–1552. Además, el alpeorujo contiene otras sustancias saludables y nutricionalmente valiosas como lípidos, carbohidratos y proteínas.

Los compuestos fenólicos pueden tener efectos neuroprotectores en varias patologías del sistema nervioso a través del control del estrés oxidativo, inflamación, apoptosis y disfunción mitocondrial. Según la literatura científica más reciente, la ingesta dietética de compuestos fenólicos atenúa el estrés oxidativo y reduce el riesgo de enfermedades neurodegenerativas relacionadas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, derrames cerebrales, esclerosis múltiple y la enfermedad de Huntington. También a nivel periférico, actúan como antioxidantes, defendiendo los tejidos contra el daño oxidativo y eliminando los radicales libres. [Polyphenols from Food and Natural Products: Neuroprotection and Safety. Silva RFM, Pogačnik L. Antioxidants (Basel). 2020 Jan 10;9(1)].

Muchos antioxidantes sintéticos se han utilizado para retrasar el proceso de oxidación, particularmente en los sistemas alimentarios (Shahidi, F. and Naczki, M. 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals, 576Boca Raton, FL: CRC Press.). Sin embargo, el uso de antioxidantes sintéticos está bajo una estricta regulación debido a su potencial peligro para la salud en la promoción de la carcinogénesis, así como al rechazo general de los aditivos alimentarios sintéticos por parte de los consumidores. Los tocoferoles y el ácido ascórbico o sus derivados que se utilizan como alternativas a los antioxidantes sintéticos, son antioxidantes mucho menos efectivos. (Emerging Role of Phenolic Compounds as Natural Food Additives in Fish and Fish Products. Sajid Maqsood, Soottawat Benjakul & Fereidoon Shahidi. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Volume 53, 2013 - Issue 2).

Por otra parte, existe una demanda creciente de la industria agroalimentaria de antimicrobianos de origen natural asociada a las restricciones de la normativa europea en materia de fitosanitarios y a la regulación del uso sostenible de los mismos (Directiva 2009/128/CE. Reglamento (CE) nº 1107/2009 (Directiva 2009/128/CE) asociada a los riesgos para la salud y medioambiente que conllevan (toxicidad, persistencia a largo plazo, promoción de la resistencia de patógenos). Los consumidores demandan alimentos libres de residuos

químicos de síntesis que se asocian con efectos perjudiciales para la salud (Balasubramanian, P., Karthickumar, P. 2017. Biofertilizers and biopesticides: A holistic approach for sustainable agriculture. Sustainable utilization of natural resources 256-284; Kulkarni, S. 2016. Sustainable agrochemicals for conservation of agriculture and climate change. Conservation agriculture: An approach to combat climate change in indian himalaya pp. 135-157).

Se ha descrito la actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos y entre ellos de los fenoles de la aceituna y del aceite de oliva (Brenes, M., Medina, E., García, A., Romero, C., de Castro, A. 2010. Olives and olive oil compounds active against pathogenic microorganisms, Health and disease prevention, 109, 1013-1019).

El alpeorujó es rico en estos compuestos. Una vez almacenado o transformado se producen en el mismo alteraciones químicas y biológicas (Sánchez, P., Ruiz, M.V. 2006. Production of pomace olive oil. Grasas y aceites 57, 47-55) que disminuyen o modifican su contenido fenólico pero sigue mostrando acción antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos, entre ellos las bacterias fitopatógenas (Medina, E., Romero, C., Santos, B., Castro, A., García, A., Romero, F., Romero, F., Brenes, M. 2011. Antimicrobial activity of olive solutions from stored alpeorujó against plant pathogenic microorganisms. J. Agric. Food Chem. 59, 6927–6932).

La industria agroalimentaria y la comunidad científica buscan además la obtención de compuestos bioactivos de origen natural, que éstos sean obtenidos mediante extractantes no tóxicos, biodegradables y de bajo coste como una alternativa a los disolventes orgánicos convencionales que se utilizan de forma extensa y en su mayoría no cumplen estas premisas.

Se necesitan disolventes de alta capacidad extractiva de sustancias bioactivas, que produzcan extractos de baja toxicidad que se puedan utilizar en la industria agroalimentaria y de bajo impacto ambiental.

Los Disolventes Eutécticos Profundos Naturales (NADES) están constituidos por mezclas de sustancias naturales presentes en organismos vivos y pueden ser una alternativa a los disolventes convencionales en función de su formulación. Los NADES pueden constituirse por muy diferentes combinaciones de sustancias. Típicamente se han formulado NADES para extracción de sustancias bioactivas basados en sales de amonio cuaternario como es el cloruro de colina, asociado a otros componentes como azúcares, alcoholes, o aminoácidos

entre otros (Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. 2013. Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius*. L. Anal. Chem. 85, 6272–6278). Sin embargo, estos NADES pueden presentar toxicidad frente a células y a animales, lo que limita su uso como aditivo alimentario o nutraceutico. Radošević, K., Bubalo, M. C., Srček, V. G., Grgas, D., Dragičević, T. L., Redovniković, I. R. 2015. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. Ecotoxicol Environ Saf. 112, 46–53. Además, su composición contiene cloro que los hace tóxicos a nivel ambiental.

Se han utilizado diferentes disolventes eutécticos para la extracción de fenoles de aceites de oliva y alpeorujo basados en sales de amonio y otros componentes (García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., Fernández-Bolaños, J. 2016. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). Food Chem. 197, 554–561. Garcia Borrego, A., Rodriguez-Juan, E., Fernandez-Bolaños, J. 2017. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by deep eutectic solvents (DESs), Trends in Green chem. 3:3).

El alpeorujo generado en almazara, es almacenado en balsas de evaporación durante un periodo variable de tiempo, desde meses hasta años. Durante este periodo, se producen en el mismo numerosas transformaciones químicas y biológicas que convierten a este subproducto en una sustancia diferente al alpeorujo fresco obtenido en almazara, especialmente por la degradación de su contenido fenólico, formación de sustancias derivadas de la fermentación, alteración química y pérdida de agua. Tras el almacenamiento el alpeorujo se utiliza para diferentes usos como es la obtención de su aceite residual (Sánchez, P., Ruiz, M.V. 2006. Production of pomace olive oil. Grasas y aceites 57, 47-55). Para este proceso es secado a elevada temperatura reduciendo su contenido en agua del 65-70% hasta del 8-10%, el secado es un proceso necesario para permitir la extracción del aceite residual mediante disolvente orgánico, principalmente hexano que es apolar e inmiscible en agua por lo que no es extractivo en matrices acuosas. Bajo condiciones de temperatura y vacío el aceite es extraído del alpeorujo seco. Posteriormente, el alpeorujo seco y extractado se desolvata (eliminación del disolvente, hexano, que es volátil con punto de ebullición de 69°C) quedando un residuo del alpeorujo seco y sin aceite que se denomina “torta desengrasada de extracción”. Este residuo ha sido transformado por la temperatura, el vacío, y por el disolvente orgánico, por lo que es muy diferente química y físicamente del alpeorujo fresco obtenido en la almazara.

Tanto el alpeorujo almacenado en balsas como el secado y extractado mediante disolvente orgánico para obtener su aceite, son físico-química y biológicamente distintos al alpeorujo fresco obtenido de la almazara y pueden ser reciclados mediante diferentes procedimientos biotecnológicos, entre ellos, el compostaje (Tortosa, G., Alburquerque, J.A., Ait-Baddi, G., Cegarra, J. 2012. The production of commercial organic amendments and fertilisers by composting of two-phase olive mill waste ("alpeorujo"). Journal of Cleaner Production 26, 48-55) y el vermicompostaje.

El vermicompostaje facilita la transformación de residuos orgánicos mediante procesos de bajo coste en los que intervienen microorganismos y lombrices dando lugar a un producto, el vermicompost, útil para la agricultura como fertilizante y/o enmienda de suelos (Melgar, R., Benitez, E., Nogales, R., 2009. Bioconversion of wastes from olive oil industries by vermicomposting process using the epigeic earthworm *Eisenia andrei*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 44, 488–495. Nogales, R., Romero, E., Fernandez-Gómez, M. J. 2014. Vermicompostaje: Procesos, productos y aplicaciones. Mundi-Prensa, Madrid).

Por tanto, sería deseable disponer de un procedimiento que permitiera la obtención de un extracto bioactivo y antimicrobiano del alpeorujo fresco mediante un disolvente eutéctico natural (NADES), y mediante procesos como el vermicompostaje que permitiese la gestión sostenible de la producción del aceite de oliva con residuo cero.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un extracto fenólico procedente de alpeorujo que comprende las siguientes etapas:

- i. preparación del disolvente eutéctico natural (NADES 4) seleccionado de ácido málico y sacarosa en relación 1:1 p/p, con un contenido de entre el 8% y el 35% en peso de agua; y
- ii. adición del NADES 4 de la etapa (i) al alpeorujo fresco en una relación relación alpeorujo: NADES comprendido entre 5:1 y 1:5 p/p, agitando durante un tiempo de entre 10 minutos y 6 horas, a una temperatura de entre 20 °C y 90 °C, y centrifugando entre 1000 rpm y 10.000 rpm para separar la fase de extracto fenólico con los disolventes del alpeorujo extractado (ALE) con NADES 4.

El “alpeorujo fresco” al que se refiere la invención es el alpeorujo como tal, es decir, el que se obtiene directamente de la almazara, sin tratamiento o transformación alguna.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde la etapa (ii) se repite una o más veces, preferiblemente una o dos veces, y más preferiblemente una vez.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde en la etapa (i) de preparación del disolvente eutéctico natural (NADES 4) el contenido de agua es de entre el 10% y el 30% en peso de agua, y preferiblemente 10% y el 25% en peso de agua, y más preferiblemente de 19% en peso de agua.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde en la etapa (ii) la relación al NADES de la etapa (i) y alpeorujo es de 1:1 p/p.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde la etapa (ii) se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 °C y 50 °C, y preferiblemente de 40 °C.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento tal y como se ha definido anteriormente, donde la etapa (ii) se lleva a cabo centrifugando entre 1000 rpm y 10.000 rpm.

Tras la extracción de los alpeorujos mediante NADES 4 (constituido por ácido málico/sacarosa tal y como se ha definido anteriormente), se obtiene un extracto rico en polifenoles que denominamos “extracto fenólico”, y un residuo que denominamos “alpeorujo extractado con NADES 4 (ALE)”. Atendiendo a principios de economía circular (ver figura 15), el ALE puede transformarse mediante procesos con prácticamente residuo cero.

Se podrían usar varios procesos biológicos, entre los que cabe señalar el compostaje y el vermicompostaje. En este caso se ha trabajado con vermicompostaje, incluyendo un tratamiento previo de acondicionamiento del material que podría considerarse de pre-compostaje. Se ha trabajado con lombrices de la especie *Eisenia fetida*. Se justifica este proceso de transformación biológica en la dificultad para usar el alpeorujo extractado (ALE) tal y como se obtiene. El alpeorujo extractado con NADES 4, posee características físico

químicas muy distintas al alpeorujó fresco. El alpeorujó fresco está constituido sólo por los componentes de la aceituna menos el aceite que ha sido extraído en la almazara quedándole del 3% al 10% de aceite residual (expresado como contenido en aceite sobre húmedo, CAH%), es ligeramente ácido ($\text{pH} \approx 5,5$), con una humedad del 55% al 70% por lo que es semisólido y de elevado contenido fenólico. Al extraer el alpeorujó fresco con el disolvente NADES 4 este subproducto queda transformado, NADES 4 es un disolvente eutéctico con características muy diferentes a los disolventes convencionales, es un gel ácido ($\text{pH} 1,7$) formado por ácido málico, por sacarosa y agua, es transparente, denso ($\rho \approx 1,25$) y viscoso. Posee baja volatilidad, un punto de descomposición mayor de $135\text{ }^{\circ}\text{C}$ y bajo punto de congelación. Tras extraer los compuestos fenólicos del alpeorujó fresco con NADES 4, hasta un 8% del mismo queda íntimamente unido al alpeorujó extraído y no puede separarse del mismo, formando parte de su estructura quedando el alpeorujó enriquecido en ácido málico y en sacarosa combinados en NADES 4. El alpeorujó extraído con NADES 4 es diferente al alpeorujó fresco de partida, es ácido ($\text{pH} 2,5$), contiene hasta el 2 % de aceite residual (CAH%), su humedad oscila del 20-30% al haber sido deshidratado por la extracción con NADES 4, su consistencia es viscosa debido a su contenido en NADES 4 residual y además se le ha eliminado contenido fenólico. Sus propiedades químicas, especialmente su acidez, y físicas (especialmente su elevada viscosidad y escasa aireación) hacen del alpeorujó extraído con NADES 4 un producto difícil de transformar mediante mecanismos biológicos. Los procesos de compostaje y vermicompostaje utilizados en esta invención facilitan su transformación. Se ponen en marcha procesos de economía circular que hacen de esta invención un proceso de residuo prácticamente 0 a partir del subproducto de la elaboración del aceite de oliva.

Otro aspecto de la invención se refiere al extracto fenólico procedente de alpeorujó obtenido por el procedimiento descrito anteriormente.

El extracto fenólico de la presente invención es un conjunto de compuestos bioactivos que pueden tener capacidad antiinflamatoria y antioxidante.

Así, otro aspecto de la invención se refiere al uso del extracto fenólico definido anteriormente como nutracéutico o aditivo alimentario.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del extracto fenólico definido anteriormente como fitosanitario.

En otra realización la invención se refiere al uso del extracto fenólico definido anteriormente como fitosanitario en el tratamiento de enfermedades microbianas de plantas, preferiblemente para el tratamiento de enfermedades microbianas de plantas causadas por las bacterias de los géneros, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Rhizobium*.

5

Otro aspecto de la invención se refiere al alpeorujó extractado con NADES 4 (ALE) obtenido por el procedimiento descrito anteriormente.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del alpeorujó extractado con NADES 4 (ALE) definido anteriormente, como suplemento orgánico para compostaje y vermicompostaje.

En otra realización la invención se refiere al uso del alpeorujó extractado con NADES 4 (ALE) definido anteriormente, como suplemento orgánico para vermicompostaje caracterizado por que se lleva a cabo un tratamiento del ALE con lombrices de la especie *Eisenia fetida*.

15

El vermicompostaje así obtenido, da lugar a un producto útil como fertilizante o enmienda orgánica.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al disolvente eutéctico natural (NADES 4) seleccionado de ácido málico y sacarosa en relación 1:1 p/p.

25 En otra realización la invención se refiere al disolvente eutéctico natural (NADES 4) definido anteriormente donde el contenido de agua es de entre el 8% y el 35% en peso de agua, preferiblemente 10 % y el 25% en peso de agua, y más preferiblemente de 19% en peso de agua.

30 A lo largo de la descripción, el término “fertilizante” se refiere a un producto utilizado en agricultura o jardinería que, por su contenido en nutrientes, facilita el crecimiento de las plantas (Real Decreto 506/2013)

35 El término “enmienda orgánica” se refiere a un producto procedente de materiales carbonados de origen vegetal o animal, utilizado fundamentalmente para mantener o aumentar el contenido en materia orgánica del suelo, mejorar sus propiedades físicas y mejorar también sus propiedades o actividad química o biológica (Real Decreto 506/2013). La presente invención se refiere al alpeorujó extractado con NADES (ALE) como material carbonado de

origen vegetal.

El término “alpeorujos extractados con NADES 4” se refiere a el residuo de alpeorujos fresco tras la extracción mediante el disolvente eutéctico natural (NADES) de compuestos bioactivos, principalmente compuestos fenólicos, por tanto, contiene poca cantidad de los mismos.

El término “nutracéutico” (agente bioactivo) se refiere a productos de origen natural que se encuentran en el extracto del alpeorujos obtenido con NADES 4, que se pueden administrar como tal en forma concentrada o ser adicionado a un alimento natural y que son beneficiosos para la salud y con capacidad preventiva y/o terapéutica ejemplos incluyen entre otros fitoesteroles, compuestos fenólicos, etc.

El término “aditivo alimentario” se refiere a productos de origen natural que se encuentran en el extracto del alpeorujos que, aunque no se consumen como alimentos por sí mismos, añadidos a estos durante su fabricación cumplen una importante función tecnológica colaborando en la crucial tarea de obtener alimentos seguros y de calidad.

El término “enfermedad microbiana” se refiere a la respuesta de las células y tejidos de las plantas a microorganismos patógenos que provocan daño en la fisiología o integridad de la planta y pueden ocasionar deterioro de la misma e incluso su muerte. Ejemplos de enfermedades bacterianas de plantas incluyen, entre otras, el “fuego bacteriano” causado por *Erwinia amylovora* sobre el frutal de pepita o de hueso en rosáceas como el manzano, níspero, membrillero, entre otros y que provoca la muerte de la planta; “tuberculosis” en oleáceas, entre ellas el olivo produciendo tumores, agallas o verrugas con pérdida de vigor y productividad del cultivo, la infección afecta a las propiedades organolépticas y estabilidad del aceite causada por *Pseudomonas savastanoi*; necrosis, agallas, chancros, destruye el tejido infectado mermando a la planta frutal como peral, mango, cítricos, otras hortícolas y ornamentales causado por *Pseudomonas syringae*; tumores en el cuello de la planta disminuyendo la productividad y calidad de cultivos como la viña, frutal de pepita y de nuez causados por *Rhizobium radiobacter*; o marchitez de cultivos hortícolas y frutícolas causados por *Xanthomonas campestris*.

Así pues, en la presente invención se utilizan por primera vez un NADES de base ácida de baja toxicidad para la obtención de sustancias bioactivas, especialmente compuestos fenólicos, de los alpeorujos frescos de oliva y se genera un nuevo subproducto alpeorujos

extractado con NADES 4.

Tras la extracción del alpeorujó con NADES 4 se genera un nuevo subproducto diferente al alpeorujó fresco obtenido en la almazara, al alpeorujó almacenado en balsas de evaporación o al alpeorujó extractado para obtener su aceite residual por procedimientos físicos (centrifugación) y/o químicos con disolventes orgánicos convencionales (principalmente hexano), este alpeorujó extraído con hexano ha sido previamente almacenado, secado y sometido a vacío y temperatura). El alpeorujó extractado con NADES 4", es una sustancia nueva, difícilmente manejable por sus características físicoquímicas, su elevada viscosidad, bajo pH y escasa aireación. Se ha desarrollado una metodología para el vermicompostaje de este nuevo subproducto. De este modo se recicla el alpeorujó extractado (ALE) y se facilita el diseño de procesos de residuo cero en los que los materiales y nutrientes que contiene el producto vuelven a las parcelas agrícolas en el formato de fertilizantes y/o enmiendas.

Por tanto, la presente invención supone un punto de inflexión en el aprovechamiento integral del subproducto de la elaboración del aceite de oliva, el alpeorujó, que posibilita el aprovechamiento integral del mismo, para obtener por un lado sus compuestos bioactivos utilizando mezclas eutécticas acídicas extractivas constituidas por sustancias de grado alimentario y de baja toxicidad que generan extractos bioactivos, y por otra parte el subproducto de esta extracción, alpeorujó extractado, es transformado para ser reincorporado al suelo. Con esta invención, se contribuye al aprovechamiento integral del alpeorujó y a la gestión sostenible de la producción del aceite de oliva con residuo cero.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus 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.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Esquema resumen del procedimiento de extracción fenólica.

Fig. 2. Concentración en compuestos fenólicos individuales (mg/kg) extraídos de alpeorujó

fresco de la variedad Picual mediante diferentes disolventes eutécticos naturales, mezclas acuosas de metanol y agua. Los disolventes se corresponden con los que figuran en la tabla 1. Los análisis se realizaron mediante HPLC-UV con confirmación de estructuras mediante HPLC-MS. (n=2).

Fig. 3. Concentración suma de los compuestos fenólicos extraídos (mg/kg) de alpeorajo fresco de la variedad Picual mediante diferentes disolventes eutécticos, mezclas acuosas de metanol y agua. Los disolventes se corresponden con los que figuran en la tabla 1. Los análisis se realizaron mediante HPLC-UV con confirmación de estructuras mediante HPLC-MS (n=2).

Fig. 4. Concentración en compuestos fenólicos individuales (mg/kg) extraídos de alpeorajo fresco de la variedad Manzanilla mediante NADES 4. Los análisis se realizaron mediante HPLC-UV con confirmación de estructuras mediante HPLC-MS (n=2).

Fig. 5. Concentración en compuestos fenólicos individuales (mg/kg) extraídos de alpeorajo fresco de la variedad Branquita mediante NADES 4. Los análisis se realizaron mediante HPLC-UV con confirmación de estructuras mediante HPLC-MS (n=2).

Fig. 6. Efecto bactericida de NADES 4 sobre microorganismos fitopatógenos expresados como concentración mínima inhibitoria (MIC) en porcentaje, (**6a**) NADES 4 a pH ácido original y a pH ajustado 5, 5-6, (**6b**), NADES 4 a pH ajustado, glicerol, DMSO y etanol, sobre *Erwinia amylovora* CECT 222, *Erwinia toletana* CECT 5263, *Xanthomonas campestris* CECT 97, *Pseudomonas syringae* CECT 4429, *Pseudomonas savastanoi* CECT 5019 y, *Rhizobium radiobacter* CECT 4119. (n=3). La línea de puntos indica el valor por encima del cual no se considera toxicidad.

Fig. 7. Viabilidad de células microglía BV2 tratadas con distintas concentraciones de NADES 4 con o sin extracto en las Variedades Manzanilla y Branquita a pH 0 y 3, (**7a**) Manzanilla pH 0, (**7b**) Branquita pH 0, (**7c**) Manzanilla pH 3, (**7d**) Branquita pH 3. En el eje de las X se muestran la concentración de compuestos fenólicos en los extractos (µg/mL) y en el eje Y derecho se muestran los mg de NADES 4 para cada una de las muestras. Los resultados se expresan como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación: % = D.O de las células tratadas x 100/D.O de las células controles. P<0,5 . * Significativamente diferente para NADES 4 versus NADES 4 con su extracto. La línea de puntos indica el valor por debajo del cual se produce toxicidad celular.

Fig. 8. Viabilidad de células microglía BV2 tratadas con distintas concentraciones de compuestos fenólicos aislados de los extractos con NADES 4 mediante columna C18 en variedades Manzanilla y Branquita a pH 0 y 3, **(8a)** Manzanilla pH 0, **(8b)** Branquita pH 0, **(8c)** Manzanilla pH 3, **(8d)** Branquita pH 3. Los resultados se expresarán como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación: $\% = \text{D.O de las células tratadas} \times 100 / \text{D.O de las células controles}$. $P < 0.5$. Letra distinta para cada columna denota significativamente diferente para las distintas concentraciones de compuestos fenólicos (g, h, i, j, k) La línea de puntos indica el valor por debajo del cual se produce toxicidad celular.

Fig. 9. Viabilidad de células de microglía BV2 tratadas con compuestos fenólicos extraídos mediante columnas C-18 procedentes de extractos con NADES 4 después de su digestión con enzimas gastrointestinales (digestatos). Células de microglía BV2 fueron incubadas en medio de cultivo en ausencia (C-) y presencia de suero (C+) y tratadas con distintas concentraciones de digestatos en concentraciones de 400, 200, 100 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo en las variedades Manzanilla **(9a)** y Branquita **(9b)** . El efecto citotóxico se muestra por debajo del porcentaje de viabilidad del 80% (línea discontinua horizontal), $^*(p < 0,01)$, cada una de las muestras versus C-. $n=6$.

Fig. 10. Expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en células de microglía murinas estimuladas con digestatos procedentes de extractos con NADES 4 de las variedades Manzanilla **(10a)** y Branquita **(10b)**. Células de microglía murinas fueron incubadas en medio de cultivo en ausencia (C-) y presencia de LPS (lipopolisacárido inductor) (C+LPS), y estimuladas con blancos (B) y con compuestos fenólicos de los digestatos (F), en ambos casos, en ausencia y presencia de LPS. En el eje de las x, se muestra la expresión relativa de TNF- α . $^*(p < 0,01)$, C- versus C+LPS; B versus B+LPS, F versus F+LPS; $\emptyset$ ($p < 0,01$), B+LPS versus F+LPS, $n=6$.

Fig 11. Expresión del factor de interleucina 1-beta (IL-1 β) en celulas de microglía murinas estimuladas con digestatos procedentes de extractos con NADES 4 de las variedades Manzanilla **(11a)** y Branquita **(11b)**. Células de microglía murinas fueron incubadas en medio de cultivo en ausencia (C-) y presencia de LPS (C+LPS), y estimuladas con blancos (B) y con compuestos fenólicos de los digestatos (F), en ambos casos, en ausencia y presencia de LPS. En el eje de las x, se muestra la expresión relativa de IL-1 β . $^*(p < 0,01)$, C- versus C+LPS; B versus B+LPS, F versus F+LPS; $\emptyset$ ($p < 0,01$), B+LPS versus F+LPS, $n=6$.

Fig 12. Expresión de inflamasona NLRP3 en células de microglía murinas estimuladas con digestatos procedentes de extractos con NADES 4 de las variedades Manzanilla (**12a**) y Branquita (**12b**). Células de microglía murinas fueron incubadas en medio de cultivo en ausencia (C-) y presencia de LPS (C+LPS), y estimuladas con blancos (B) y con compuestos fenólicos de los digestatos (F), en ambos casos, en ausencia y presencia de LPS. En el eje de las x, se muestra la expresión relativa de IL-1 β . *(p < 0,01), C- versus C+LPS; B versus B+LPS; $\emptyset$ (p < 0,01), B+LPS versus F+LPS, n=6.

Fig. 13. Vermicompostaje de alpeorujos extractados con NADES 4. (**13a**) Evolución de la biomasa total (g) de lombrices adultas en los diferentes tratamientos. ALE = alpeorujo extractado con NADES 4, ALP = alpeorujo fresco; EST = estiércol de caballo; ALE_EST= mezcla alpeorujo y estiércol. (**13b**) número total de cocones y de lombrices juveniles producidas en cada tratamiento durante todo el ensayo (n=8 semanas). ALE = alpeorujo extractado con NADES 4, ALP = alpeorujo fresco; EST = estiércol de caballo; ALE_EST= mezcla alpeorujo y estiércol. (P<0,05).

Figura 14. Concentración en compuestos fenólicos individuales expresados en porcentaje extraídos de alpeorujo fresco mediante NADES 4 a escala de laboratorio mediante la relación alpeorujo:disolvente (1:1) y a escala industrial mediante las relaciones alpeorujo:disolvente (1:1) y (2:1). Los análisis se realizaron en UHPLC-UV-MS. (n=2).

Figura 15 Esquema resumen de los procesos de valorización del alpeorujo fresco atendiendo a principios de economía circular, desde la producción de aceite de oliva virgen (AOV) a la producción de fertilizante o enmienda orgánica. Proceso 0, extracción de AOV con obtención del producto 0 que es el AOV y su subproducto 0, el alpeorujo fresco. Proceso 1, extracción de compuestos fenólicos del alpeorujo fresco mediante NADES 4, obtención del producto 1 que es el extracto fenólico con usos nutraceuticos o antimicrobianos y del subproducto 1, el alpeorujo extractado con NADES 4 (ALE). Proceso 2, vermicompostaje del ALE, obtención solamente de producto, la enmienda orgánica o fertilizante que retorna al ciclo de producción del AOV cerrándose el ciclo con residuo prácticamente cero.

EJEMPLOS

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

Ejemplo 1: Preparación de NADES

Se mezclan los componentes del NADES, ácido málico y sacarosa en relación 1:1 p/p, con un 8-35% en peso de agua. Los componentes correspondientes se mezclan y se mantienen en
5 agitación continua a temperatura de 50-80 °C hasta la constitución del disolvente como un gel transparente y estable.

Ejemplo 2: Procedimiento de extracción fenólica:

Se pesan alpeorujos y NADES en una relación alpeorujos: NADES comprendido entre 5:1 a 1:5 p/p, agitando durante 10 min a 6 h, a una temperatura de 20-90 °C. A continuación, la mezcla se centrifuga entre 1000 rpm-10.000 rpm para separar la fase constituida por extracto fenólico más NADES 4 del alpeorujos parcialmente extractado. Se pueden realizar dos extracciones
10 tomándose la fase de extracto fenólico y se repite el proceso de extracción sobre la fase de alpeorujos parcialmente extractado. Las 2 fases de extracto resultantes de las 2 extracciones se combinan y constituyen el “extracto fenólico”. La fase de alpeorujos tras 1 extracción o tras
15 las 2 extracciones con NADES se denomina “alpeorujos extractado con NADES”.

Mediante este procedimiento, se obtienen extractos líquidos (o geles) ricos en fenoles combinados con los NADES cuya composición permite su uso como nutracéuticos o como
20 aditivos alimentarios dado que dichos extractos líquidos no son tóxicos para dicho uso, y para su uso fitosanitario como antimicrobianos, puesto que los NADES se han descrito para ese uso.

Y, también, por dicho procedimiento se obtiene alpeorujos extractado con NADES 4 (ALE), es decir, con una baja concentración de fenoles, útil para su uso en vermicompostaje al
25 combinarlo con sustratos orgánicos.

El procedimiento de la invención se resume en la figura 15.

Ejemplo 3: Eficiencia extractiva de los NADES ácidos en estudio

Mediante este ensayo se ha determinado la capacidad extractante de dos disolventes eutécticos naturales (NADES) con base ácida y se ha comparado con NADES de diferente
35 formulación y con disolventes convencionales. Para ello, se analizó el contenido fenólico

extraído por 16 disolventes diferentes sobre los compuestos fenólicos de alpeorujo fresco de la variedad Picual (**Figs. 2, 3**).

Tabla 1: Composición y pH de los diferentes disolventes utilizados.

Disolvente	Componentes			Relación Molar	% Agua	pH
	1	2	3			
1	ácido láctico	betaína	-	2:1	-	0,28
2	ácido láctico	D-(-)-fructosa	-	5:1	-	0,37
3	ácido glicólico	D-(-)-fructosa	-	1:1	13	0,33
4	ácido málico	sacarosa	-	1:1	19	0,71
5	ácido cítrico	xilitol	-	1:1	17	0,3
6	ácido cítrico	sorbitol	-	1:1	19	0,34
7	cloruro de colina	xilitol	-	2:1	11	3,33
8	cloruro de colina	glicerol	-	1:2	-	6,47
9	mezcla metanol : agua (80%)					
10	mezcla metanol : agua (50%)					
11	betaína	sacarosa	-	2:1	13	6,48
12	cloruro de colina	ácido glicólico	ácido oxálico	1:1,7:0,3	-	0,15
13	D-(+)-glucosa	glicerol	-	1:1	21	1,6
14	Agua destilada					
15	D-(-)-fructosa	D-(+)-glucosa	sacarosa	1:1:1	22	6,05
16	D-(-)-fructosa	sacarosa	-	1:1	18	6,2

5 La tabla 1 muestra los diferentes componentes de los disolventes utilizados para la extracción de polifenoles de alpeorujo. El disolvente NADES 4 es la formulación acídica objeto de este estudio. Los disolventes 9 y 10 se corresponden con mezclas acuosas del disolvente metanol y el disolvente 14 con agua, estos disolventes se utilizaron como controles de extracción ya que son las mezclas convencionales habituales para la extracción de polifenoles.

15 En la figura 2 se muestran la concentración en fenoles de forma individualizada obtenida por cada disolvente por orden decreciente. Los disolventes 1, 2 y 4 mostraron similar patrón de extracción de compuestos fenólicos y las mayores eficacias extractivas (ver figuras 2 y 3). El NADES 4 superó 3900 mg/kg en peso húmedo de polifenoles extraídos en la variedad Picual,

cantidades estadísticamente similares a las del resto de disolventes de base ácida utilizados más extractivos.

El disolvente NADES 4 fue significativamente más extractivo que las mezclas convencionales acuosas de metanol (9, 10) y que el agua (14).

Obtención de extractos fenólicos mediante NADES 4 de alpeorujos frescos de las variedades Manzanilla y Branquita para determinación de su efecto bioactivo. Las figuras 4 y 5 muestran la concentración en 14 compuestos fenólicos y oleosídicos característicos de la aceituna y sus derivados frescos como el alpeorujo, cuantificados de forma individualizada.

Ejemplo 4: Determinación de la toxicidad de los NADES ácidos en estudio sobre bacterias fitopatógenas y la actividad antimicrobiana de extractos fenólicos obtenidos mediante NADES 4 a partir de alpeorujos frescos.

Se analizó la toxicidad *in vitro* de NADES 4 de base ácida (ácido málico/sacarosa) sobre bacterias fitopatógenas de interés agronómico. Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos fenólicos obtenidos con NADES 4 de alpeorujos frescos de las variedades Picual, Manzanilla y Branquita.

Los análisis de toxicidad y actividad antimicrobiana se realizaron con cepas obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). *Erwinia amylovora* CECT 222, *Erwinia toletana* CECT 5263, *Xanthomonas campestris* CECT 97, *Pseudomonas syringae* CECT 4429, *Pseudomonas savastanoi* CECT 5019 y, *Rhizobium radiobacter* CECT 4119.

Para cada experimento se incubó la cepa en condiciones de aerobiosis en agitación a 29 °C durante 24 h con lo que se obtuvieron caldos con valores aproximados de 10⁹ UFC/mL. La determinación de la capacidad antimicrobiana de los extractos se realizó calculando la mínima capacidad inhibitoria (MIC) mediante dilución seriada de los extractos en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se realizaron las diluciones correspondientes para obtener 10⁶ UFC/mL por pocillo.

Para el análisis de toxicidad de NADES 4, se compararon los efectos de NADES 4 a pH ácido inicial, que es el pH original del NADES (pH 0,71), y ajustado a pH 5,5 – 6 con NaHCO₃. El ajuste de pH se llevó a cabo para evitar un medio excesivamente ácido incompatible para el

desarrollo óptimo bacteriano. Se incluyeron además como control otros disolventes convencionales, como glicerol de baja toxicidad y utilizado para la crioconservación de bacterias y dimetilsulfóxido (DMSO) también considerado de baja toxicidad. Considerando que un disolvente muestra baja toxicidad cuando no inhibe el crecimiento de los microorganismos a una concentración en el medio de cultivo igual o superior al 10%. Se usó también etanol que es un disolvente tóxico frente a bacterias. Estos 3 disolventes nos permiten establecer comparaciones con el NADES objeto de este estudio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

En todos los casos, se observó que NADES 4 ajustado a pH 5,5 - 6 mostró baja toxicidad frente a todas las cepas bacterianas analizadas (Fig. 6a). Al ajustar el pH del NADES, la concentración mínima inhibitoria de NADES aumentó al doble en todos los casos excepto para la cepa de *X. campestris* en la que la inhibición por NADES 4 no se vió afectada por el pH. NADES 4 es por tanto un disolvente de baja toxicidad para las bacterias en estudio incluso a pH ácido original.

A continuación, se estudió el efecto sobre el crecimiento bacteriano de NADES 4 a pH ajustado a 5,5-6 y de tres disolventes convencionales, glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO) como controles positivos por su baja toxicidad y etanol como control negativo por su potente toxicidad frente a bacterias (Figura 6b).

NADES 4 a pH ajustado presentó menor o igual porcentaje de inhibición que todos los disolventes analizados. Así, fue menos inhibitorio incluso que los controles positivos para las cepas género *Pseudomonas*, para *X. campestris* y *R. radiobacter* e idéntico porcentaje de inhibición que glicerol para las cepas del género *Erwinia*. NADES 4 fue entre 4 y 125 veces menos tóxico que el control negativo, etanol, y 4 veces menos tóxico que DMSO.

Estos resultados indican su posible uso como crioprotector o vehiculizante de sustancias de interés para el trabajo con bacterias sin que inhiba el crecimiento de las mismas.

Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos mediante NADES 4 de los alpeorujos procedentes de tres variedades de aceitunas, Manzanilla, Picual y Branquita frente a las 6 cepas fitopatógenas. El pH de los extractos fue ajustado hasta valores óptimos para el crecimiento bacteriano a pH 5,5 – 6 con NaHCO_3

Tabla. 2. Efecto bactericida (MIC) mg/L de los extractos fenólicos obtenidos con NADES 4 procedentes de las variedades de aceituna Manzanilla, Picual y Branquita sobre las cepas, *Erwinia amylovora* CECT 222, *Erwinia toletana* CECT 5263, *Xanthomonas campestris* CECT 97, *Pseudomonas syringae* CECT 4429, *Pseudomonas savastanoi* CECT 5019 y, *Rhizobium radiobacter* CECT 4119.

Extracto con NADES 4	MIC (mg/L)		
	Manzanilla	Picual	Branquita
<i>Erwinia amylovora</i>	503	740	1190
<i>Erwinia toletana</i>	1007	740	1190
<i>Xanthomonas campestris</i>	252	185	149
<i>Pseudomonas syringae</i>	252	370	595
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	252	370	297
<i>Rhizobium radiobacter</i>	503	370	1190

$N_0 = 10^6$ UFC/ml, n=3.

En la **Tabla 2** se muestra como el extracto obtenido con NADES 4 a partir de alpeorujos frescos de tres variedades diferentes exhibe actividad antimicrobiana frente a las 6 cepas bacterianas en estudio.

Todos los extractos fenólicos obtenidos con NADES 4 mostraron efecto antimicrobiano. Los extractos de las variedades Manzanilla y Picual fueron más inhibidores del crecimiento bacteriano que los de Branquita para todas las cepas excepto para *X. campestris* con el valor MIC (149 mg/mL) más bajo. Sin embargo, estos extractos contienen menor concentración fenólica total que los de la variedad Branquita, pero son más ricos en derivados secoiridoides y fenoles simples de conocido efecto antimicrobiano (Brenes, M., García, A., de los Santos, B., Medina, E., Romero, C. & de Castro, A., Romero, F. (2010). Olive glutaraldehyde-like compounds against plant pathogenic bacteria and fungi. Food Chemistry, Vol. 125, 1262-1266.).

Las bacterias del género *Erwinia* fueron las más resistentes a los extractos fenólicos de las 3 variedades, ejerciendo los extractos de Picual sobre *E. toletana* el mayor efecto antimicrobiano y el género *Pseudomonas* fue el más sensible a los extractos de las 3 variedades.

Estos resultados se relacionan con la capacidad inhibidora del crecimiento bacteriano de los diferentes fenoles que componen el extracto. Es bien conocido el efecto antimicrobiano de los compuestos fenólicos, especialmente de derivados de oleuropeína como 3,4-DHPEA-EDA (oleaceína), otros secoiridoides, oleósidos, alcoholes como hidroxitirosol, sus glucósidos y en menor medida fenilpropanoides como verbascósido.

Estos resultados indican que los extractos fenólicos obtenidos con NADES 4 de las variedades Manzanilla, Picual y Branquita muestran efecto antimicrobiano sobre todas las cepas estudiadas, que es comparable al que exhiben otros extractos fenólicos de origen natural. El efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos con NADES 4 se relacionaría con los compuestos fenólicos que ha extractado el NADES 4 del alpeorujo fresco y no con el propio NADES 4, ya que éste mostró baja toxicidad sobre los microorganismos analizados (**fig. 6**).

Ejemplo 5: Citotoxicidad de extractos fenólicos obtenidos con NADES 4 en células microglía BV2 murinas.

Se analizó la citotoxicidad *in vitro* de NADES 4 de base ácida (ácido málico/sacarosa) de alpeorujos frescos de las variedades Manzanilla y Branquita en células microglia BV2 murinas con el fin de determinar su potencial como nutracéutico frente a enfermedades neuronales tales como el Alzheimer debido a sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

La figura 7 muestra el porcentaje de células vivas tras la incubación con NADES 4 (0 compuestos fenólicos) y los extractos de alpeorujo fresco de la variedades Manzanilla y Branquita con NADES 4 con distintas concentraciones de compuestos fenólicos (250, 200, 150, 100, 50 y 25 µg/mL de medio celular) a pH 0 y 3. Los resultados mostraron que los NADES 4 son citotóxicos para células microglía a partir de una concentración mayor a 50-75 mg de NADES por mililitro de medio, tanto a pH0 como a pH3. Sorprendentemente, el efecto citotóxico de los NADES se vio contrarrestado con los extractos de alpeorujo en ambas variedades y ambos pH. La viabilidad celular fue mayor para la variedad Manzanilla que para Branquita.

Se aislaron los compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos con NADES 4 de las variedades de Manzanilla y Branquita mediante columna de fase sólida con relleno C18 y se determinó su efecto citotóxico en células de microglía murinas.

La figura 8 muestra el efecto citotóxico *in vitro* en células de microglía múrinas de los compuestos fenólicos aislados de los extractos obtenidos con NADES 4 de las variedades de Manzanilla y Branquita. Los compuestos fenólicos fueron lavados mediante columna de fase sólida con relleno C18 previa incubación celular. Los compuestos fenólicos de la variedad Manzanilla mostraron un efecto citotóxico a altas concentraciones (250-150 µg/mL) en células microglía tanto a pH0 como a pH3. La variedad Branquita mostró citotoxicidad para concentraciones de compuestos fenólicos de 250-100 µg/mL a ambos pH.

Atendiendo a estos datos *in vitro*, los extractos aislados con NADES 4 podrían ser utilizados a pH inicial, con ello se evitaría producir modificaciones de los compuestos fenólicos debidos a cambios de pH. Ambos extractos parecen contener unos compuestos distintos de los fenoles que están favoreciendo la viabilidad celular, contrarrestando el efecto citotóxico que los fenoles tienen de manera aislada a concentraciones altas en estas células. Este dato sugiere que los extractos de los NADES estudiados podrían permitir el uso de altas concentraciones de compuestos fenólicos evitando su factor citotóxico en células de microglía pudiendo ejercer funciones antiinflamatorias y antioxidantes típicas de estos compuestos.

Ejemplo 6: Efecto antiinflamatorio de los extractos fenólicos obtenidos con NADES 4 en células microglía BV2 múrinas.

Las células gliales reactivas liberan una serie de factores implicados en la respuesta inflamatoria, siendo los más importantes un grupo de citoquinas con marcado carácter pro-inflamatorio, como son el factor de necrosis tumor alfa (TNF- α) y la interleucina 1-beta (IL-1 β). Las citocinas de la familia IL-1 β requieren además un proceso de activación controlada por varios complejos denominados inflamomas, entre ellos el inflamoma NLRP3 es un complejo importante en la activación de células BV2.

Se estudió el efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos con NADES 4 en células de microglía múrinas.

Previamente a la incubación con las células de microglía, los extractos fueron sometidos a una digestión enzimática *in vitro*, (Jaramillo, S., Muriana F.J.G. Muriana, Guillen, R., Jimenez-Araujo, A., Rodriguez-Arcos, R., Lopez, S. (2016). Saponins from edible spears of wild asparagus inhibit AKT, p70S6K, and ERK signalling, and induce apoptosis through G0/G1 cell cycle arrest in human colon cancer HCT-116 cells. Journal of Functional Foods 26, 1-10),

con el fin de simular los cambios producidos por las muestras durante el proceso biológico de la digestión, finalmente se extrajeron los compuestos fenólicos mediante columna C18 de los extractos digeridos antes de su incubación con las células de microglía.

- 5 Posteriormente, se determinó la concentración máxima a la cual dichos compuestos no son citotóxicos para las células, estableciéndose este valor en 100 µg/mL (**fig. 9**).

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo en presencia y ausencia de LPS (100 ng/ml). En experimentos paralelos las células se incubaron con los digestatos purificados a una
10 concentración no citotóxica de 100 µg/mL, en presencia y ausencia de LPS. La expresión de TNF-α (**fig. 10**), IL-1β (**fig. 11**) y NRLP3 (**fig. 12**), fueron medidos mediante PCR cuantitativa.

Los resultados mostraron que la expresión de TNF-α, IL-1β y NRLP3 inducida por la LPS aumentó significativamente en relación a los controles y a los blancos ($p < 0,01$), pero el
15 aumento fue significativamente menor cuando las células fueron estimuladas con los compuestos fenólicos purificados en ambas variedades. El efecto fue mayor en los extractos obtenidos en la variedad manzanilla excepto en NRLP3 que fueron iguales.

El estudio de expresión de TNF-α, IL-1β y NRLP3 refleja un marcado carácter antiinflamatorio
20 de los compuestos fenólicos purificados obtenidos de los extractos con NADES 4 en la variedad Manzanilla y en menor expresión en los extractos obtenidos con la variedad Branquita.

Ejemplo 7: Vermicompostaje de alpeorujos extractados con NADES 4

25 El alpeorujo extractado con NADES 4 (ALE) presenta una baja palatabilidad para las lombrices de la especie *Eisenia fetida* usada en este estudio, ya que su escasa porosidad y su bajo pH (2,5) limitan que este producto pueda vermicompostarse. Para obtener buenos resultados con el vermicompostaje del alpeorujo extractado con NADES 4 es necesario realizar tres
30 procesos. El primero de ellos consiste en el pre-compostaje de al menos 8 semanas del alpeorujo extractado con NADES 4 para facilitar la degradación de la materia orgánica y la mineralización de compuestos nitrogenados. Además, durante este proceso se produce la subida de pH de ALE hasta valores óptimos para la vida de las lombrices. Como segundo proceso, es necesario mezclar ALE con materiales que permitan mejorar su estructura física-
35 química y la palatabilidad del mismo para las lombrices. El proceso final consiste en utilizar

en cada mezcla de ensayo a vermicompostar un porcentaje de estiércol que es un sustrato muy palatable para las lombrices, en proporción del 20 al 50% (p/p) de material a compostar, con el objetivo de facilitar la aceptación de la dieta por las lombrices. Cada uno de estos ensayos se realizó en recipientes que denominamos macetas.

5 Una vez verificados estos tres procesos, se establecieron 4 tratamientos: alpeorujo extractado (ALE) y dos mezclas de ALE con estiércol de caballo (EST) en las proporciones que se indican a continuación en (p/p), ALE-EST (1:1) y ALE-EST (3:1). Además, se añadió un tratamiento sólo con alpeorujo fresco sin extractar (ALP). Las características físico-químicas de los
10 tratamientos al inicio del vermicompostaje se presentan en la **tabla 3**.

Tabla 3: Propiedades físico-químicas de los tratamientos al inicio del ensayo antes de iniciar el proceso de vermicompostaje de cada sustrato y relación (p/p) de cada componente en las mezclas. Alpeorujo extractado (ALE), alpeorujo fresco (ALP), estiércol de caballo (EST). La
15 concentración de cada elemento se expresa en porcentaje y mg/kg de muestra. CE, conductividad eléctrica, MOT materia orgánica total. (n= 4).

Determinación	Tratamiento				
	ALE	ALE_EST (1:1)	ALE_EST (3:1)	ALP	EST
Humedad (%)	45,09±1,29	66,05 ± 0,35	61,94±0,01	51,90±0,18	54,67±0,02
pH	2,45±0,01	8,50±0,29	4,29±0,03	6,35±0,02	8,17±0,07
CE (mS/cm2)	1,92±0,04	1,33±0,11	3,94±0,35	2,58±0,44	3,28±0,18
MOT (%)	97,50±0,23	54,11±2,34	71,43±2,12	92,24±0,23	30,20±0,85
C (%)	51,65±1,52	31,17±2,42	37,87±0,52	51,31±0,08	18,89±0,62
N (%)	0,33±0,06	2,02±0,27	1,41±0,06	0,83±0,02	1,55±0,07
C/N	161±27,19	16±3,33	27±1,60	62±1,78	12±0,13
P (%)	0,01±0,0	0,01±0,0	0,13±0,01	0,07±0,0	0,04±0,0
K (%)	0,26±0,04	0,96±0,04	0,72±0,03	1,5±0,10	1,66±0,23
Ca (%)	0,03±0,0	4,59±0,22	3,21±0,13	0,13±0,07	4,78±0,63
Mg (%)	0,02±0,0	0,23±0,0	0,17±0,0	0,09±0,0	0,27±0,03
Na (%)	nd	0,12±0,0	0,08±0,0	0,01±0,0	0,25±0,0
Fe (mg/kg)	56,10±5,38	67,70±4,43	382,84±30,44	36,68±0,35	65,81±3,94
Mn (mg/kg)	2,14±0,02	2,39±0,19	3,70±0,44	7,78±0,67	2,40±0,04
Cu (mg/kg)	0,65±0,06	4,69±0,44	3,35±0,29	5,37±0,37	12,49±1,22
Zn (mg/kg)	1,76±0,12	38,89±3,12	39,27±4,81	8,19±0,56	33,77±1,74

Tras el pre-compostaje y elaboración de las mezclas de materiales base descritas, se inició el proceso de vermicompostaje con 30 lombrices de la especie *Eisenia fetida* por maceta. En total, se establecieron 4 macetas por cada tratamiento, que permanecieron durante 8 semanas en condiciones óptimas de humedad y temperatura. Los principales resultados del proceso de vermicompostaje del alpeorajo extractado con NADES 4 se resumen a continuación:

El tratamiento de ALE se puede vermicompostar, pero al igual que el ALP presenta una baja palatabilidad para las lombrices. Su transformación se demora entre 3-5 semanas respecto a los tratamientos con estiércol, más apetecibles para las lombrices (**Fig. 13a**). Consecuentemente, el número total de cocones y de juveniles en los tratamientos de ALE y

de ALP fue significativamente menor que en los tratamientos con estiércol ALE_EST (1:1) y ALE_EST (3:1) (**Fig. 13b**).

La adición de estiércol al ALE, no solo mejoró el pH inicial del ALE, sino que permitió que las lombrices transformaran el ALE en apenas 4-5 semanas. Ambos tratamientos con estiércol alcanzaron una biomasa total de lombrices adultas parecida (**Fig. 13a**).

El número total de cocones también fue similar (**Fig. 13b**). No obstante, el número de juveniles fue inferior en el tratamiento ALE_EST (1:1) posiblemente debido a la falta de alimento para las lombrices jóvenes (**Fig. 13b**). El tratamiento ALE_EST (1:1) fue el que presentó mayor palatabilidad para las lombrices. Las 30 lombrices adultas se comieron en apenas 4 semanas todo el sustrato del tratamiento ALE_EST (1:1), no dejando apenas alimento para las lombrices juveniles. Para evitar este problema y aunque el proceso de vermicompostaje se alargue un poco más en el tiempo, se recomienda reducir el número de lombrices (máximo 15-20 lombrices) para el mismo volumen de sustrato o añadir más sustrato del tratamiento ALE_EST (1:1) para que las juveniles puedan desarrollarse adecuadamente. En comparación con el tratamiento ALE_EST (1:1), el tratamiento ALE_EST (3:1) se ha comportado de forma muy similar y además permite transformar 3 veces más del ALE en vermicompost, sin presentar problemas para el crecimiento y reproducción de las lombrices.

Los resultados obtenidos indican que el ALE es un subproducto que puede ser transformado en vermicompost realizando previamente un precompostaje que facilite la subida del pH hasta valores compatibles con la vida de las lombrices ($\text{pH} \geq 5$). El tratamiento de ALE_EST (3:1) parece ser la opción más viable y económica de transformar el ALE en vermicompost.

Ejemplo 8: Ensayo de estabilidad de los extractos fenólicos de NADES 4.

Se determinó la estabilidad de los extractos fenólicos obtenidos con NADES 4 de las 3 variedades de alpeorujo fresco tras un periodo de 12 meses de almacenamiento en oscuridad a temperatura ambiente. El ensayo se realizó conservando 5 ml de cada extracto en viales cerrados. Tras el almacenamiento se determinó la presencia o ausencia de precipitación. Como resultado no se detectó precipitación en ninguno de los extractos y se concluyó en que eran estables a las condiciones de ensayo.

Ejemplo 9: Escalado industrial.

Se obtuvo el extracto fenólico y el alpeorujo extractado (ALE) a partir de alpeorujo fresco extraído con NADES 4 a escala industrial. Se realizó el proceso en las instalaciones del Instituto del Grasa de Sevilla (Almazara experimental), se utilizó alpeorujo fresco conservado en congelación a -20 °C desde su obtención hasta su uso.

Se prepararon 75 kilogramos de NADES 4 mezclando los componentes en un agitador industrial a 60 °C hasta la formación del disolvente (30-40 minutos).

Se realizaron los extractos con dos relaciones de alpeorujo y disolventes diferentes:

- relación (1:1), 25 kilogramos de alpeorujo fresco más 25 kilogramos de NADES 4, y
- relación (2:1), 100 kilogramos de alpeorujo fresco más 50 kilogramos de NADES 4.

Las extracciones se realizaron en equipos industriales de la citada Almazara experimental, los equipos utilizados son habitualmente usados para la extracción industrial de aceite de oliva virgen.

Se adicionó NADES 4 al alpeorujo fresco en relación (1:1) o (2:1) se agitó la mezcla durante 1 hora en batidora industrial a 40 °C, se añadió talco como coadyuvante tecnológico durante el mezclado para mejorar la separación de fases sólida y de extracto. A continuación, se separó la fase de extracto fenólico con el disolvente NADES 4 del alpeorujo extractado (ALE) mediante centrifugación en separador centrífugo horizontal o decánter (centrífuga para la obtención de aceite de oliva en almazara), el extracto fenólico fue tamizado y se volvió a centrifugar para su clarificación.

Se obtuvieron extractos fenólicos procedentes de alpeorujo fresco con NADES 4 usando las relaciones alpeorujo:disolvente (1:1) y (2:1). Con el objeto de conocer la eficacia extractiva de fenoles del procedimiento a escala industrial, se analizaron los compuestos fenólicos de los extractos así obtenidos y se compararon sus concentraciones fenólicas con la de extractos obtenidos en laboratorio del mismo alpeorujo (utilizando un sistema de extracción marca ABENCOR) con la relación alpeorujo disolvente (1:1) y con similares condiciones de tiempo temperatura y velocidad de centrifugación.

La concentración fenólica expresada en porcentaje de los extractos industriales obtenidos con NADES 4 en las relaciones (1:1) y (2:1) y a escala de laboratorio en relación (1:1) se muestra en la **figura 14**.

Al comparar los extractos industriales en relación (1:1) con los obtenidos en laboratorio en la misma relación, las concentraciones en compuestos fenólicos no mostraron diferencias significativas excepto para los compuestos 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 1-acetoxipinoresinol en los que el procedimiento industrial fue más extractivo. Cuando se compararon los dos procedimientos industriales en relaciones (1:1) y (2:1), la relación (2:1) fue significativamente más extractiva para los compuestos hidroxitirosol glucósido, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 1-acetoxipinoresinol. Estos resultados sugieren que la relación alpeorujo: disolvente (2:1) sería más efectiva para la extracción industrial de los compuestos fenólicos de los alpeorujos con NADES 4.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de un extracto fenólico procedente de alpeorujos que comprende las siguientes etapas:
 - i. preparación del disolvente eutéctico natural (NADES 4) seleccionado de ácido málico y sacarosa en relación 1:1 p/p, con un contenido de entre el 8% y el 35% en peso de agua; y
 - ii. adición del NADES 4 de la etapa (i) al alpeorujos fresco en una relación alpeorujos: NADES comprendido entre 5:1 y 1:5 p/p, agitando durante un tiempo de entre 10 minutos y 6 horas, a una temperatura de entre 20 °C y 90 °C, y centrifugando entre 1000 rpm y 10.000 rpm para separar la fase de extracto fenólico con los disolventes del alpeorujos extractado (ALE) con NADES 4.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde la etapa (ii) se repite una o más veces.
3. Extracto fenólico procedente de alpeorujos obtenido por el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
4. Uso del extracto fenólico según la reivindicación 3, como nutracéutico, aditivo alimentario o fitosanitario.
5. El uso según la reivindicación 4, como fitosanitario en el tratamiento de enfermedades microbianas de plantas, preferiblemente para el tratamiento de enfermedades microbianas de plantas causadas por las bacterias de los géneros, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Rhizobium*
6. Alpeorujos extractado (ALE) obtenido por el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
7. Uso del alpeorujos extractado (ALE) según la reivindicación 6, como suplemento orgánico para compostaje y vermicompostaje.
8. El uso del alpeorujos extractado (ALE) según la reivindicación 7, como suplemento orgánico para vermicompostaje caracterizado por que se lleva a cabo un tratamiento del ALE con

lombrices de la especie *Eisenia fetida*.

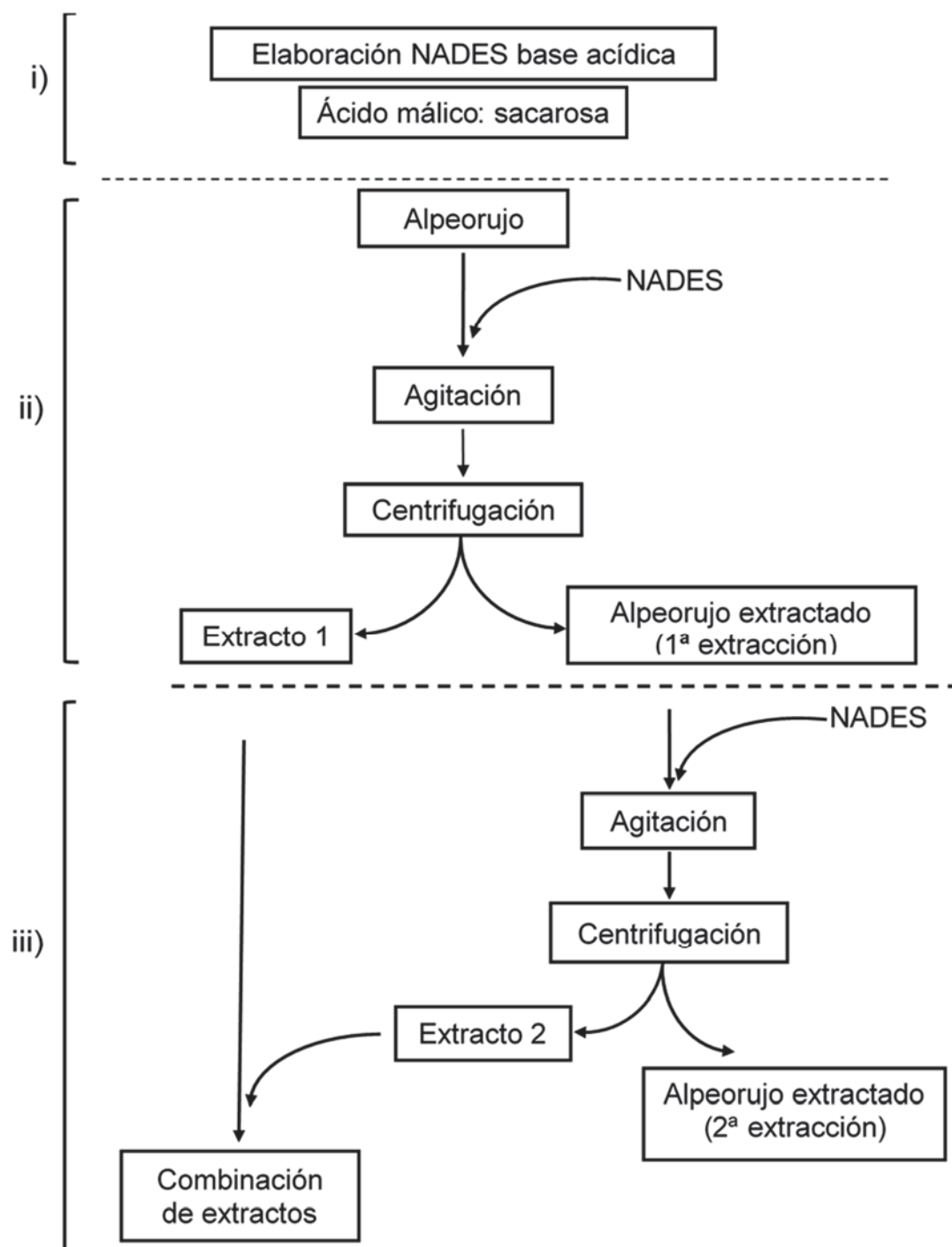


Fig. 1

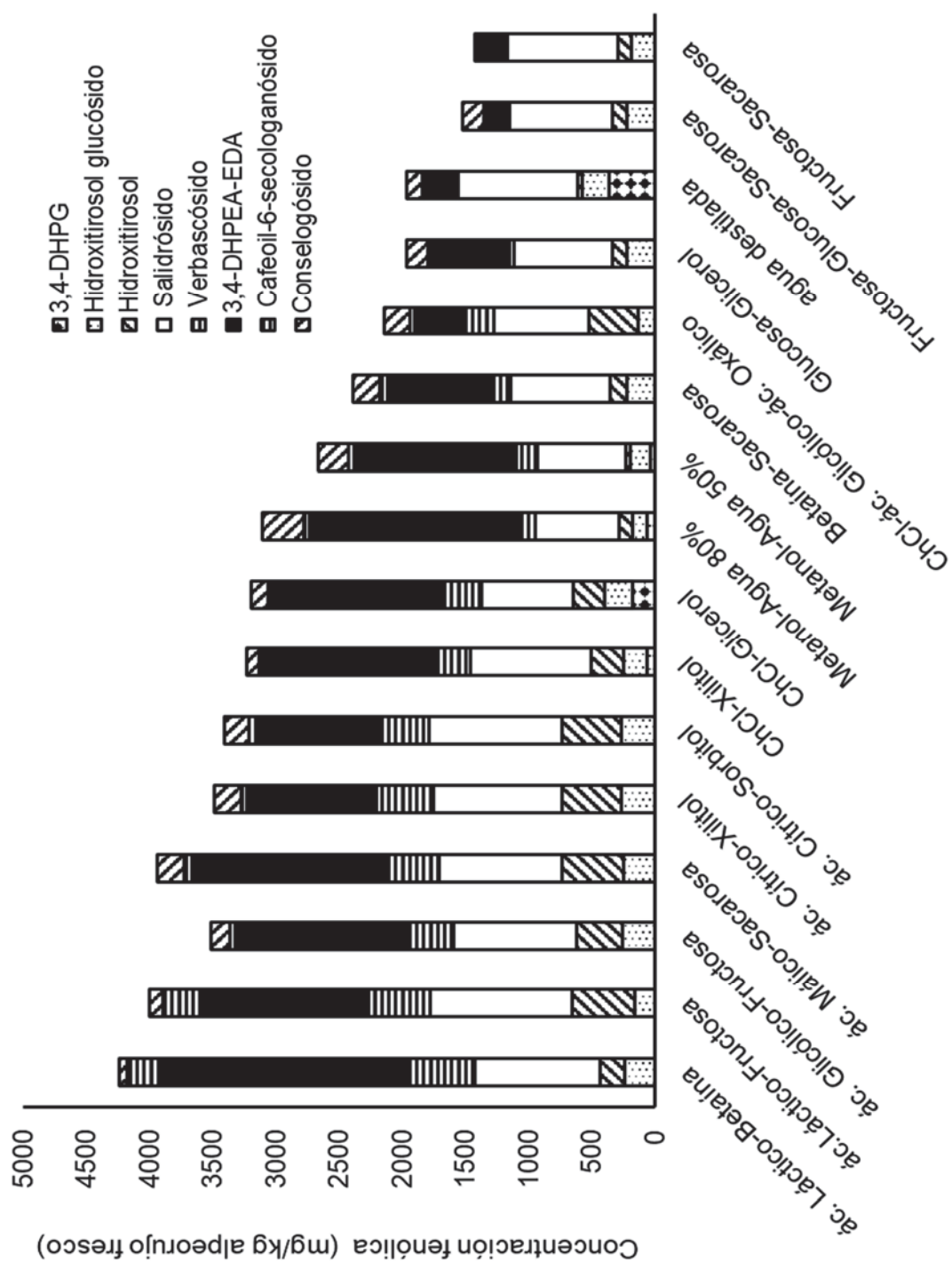


Fig. 2

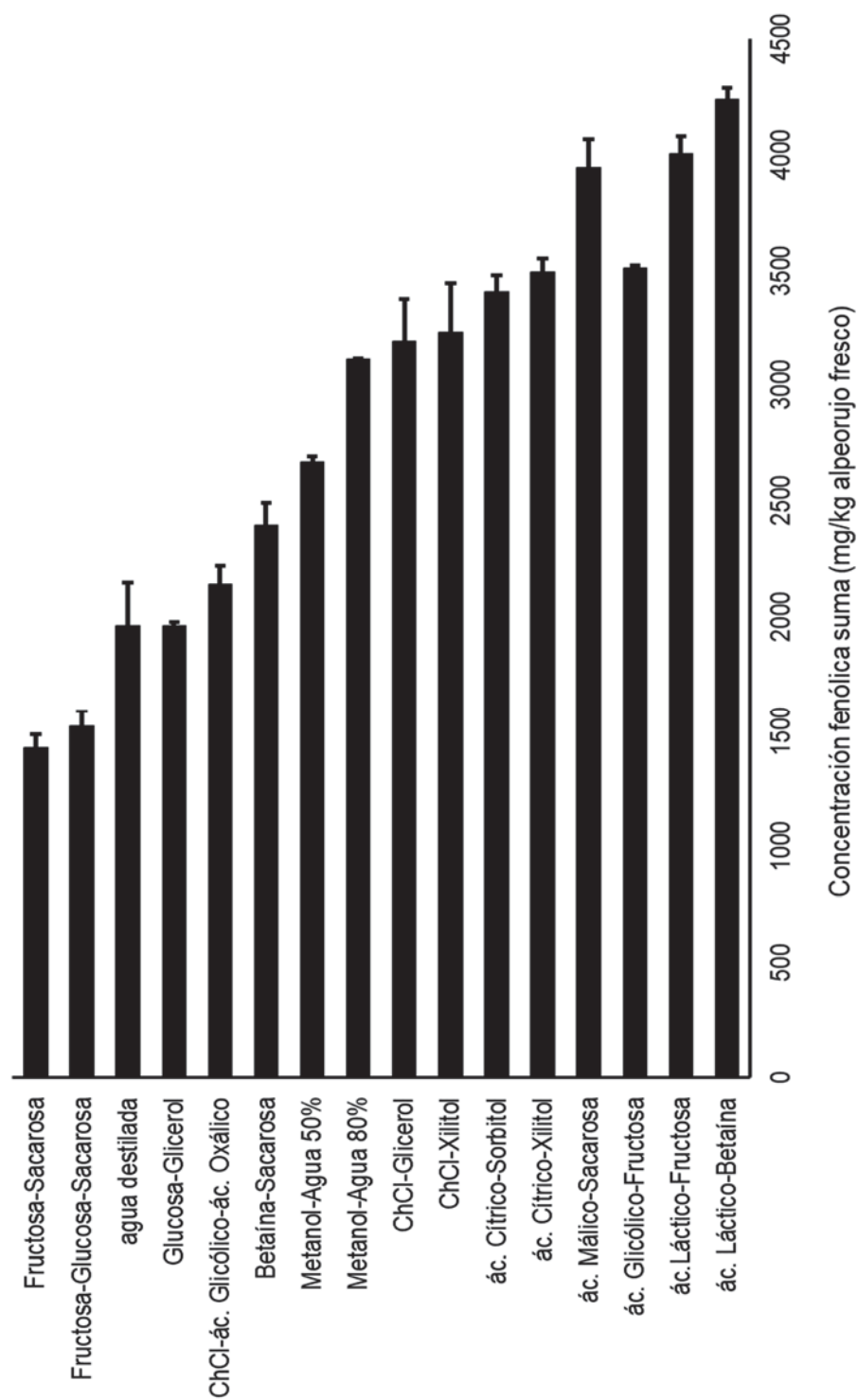


Fig. 3

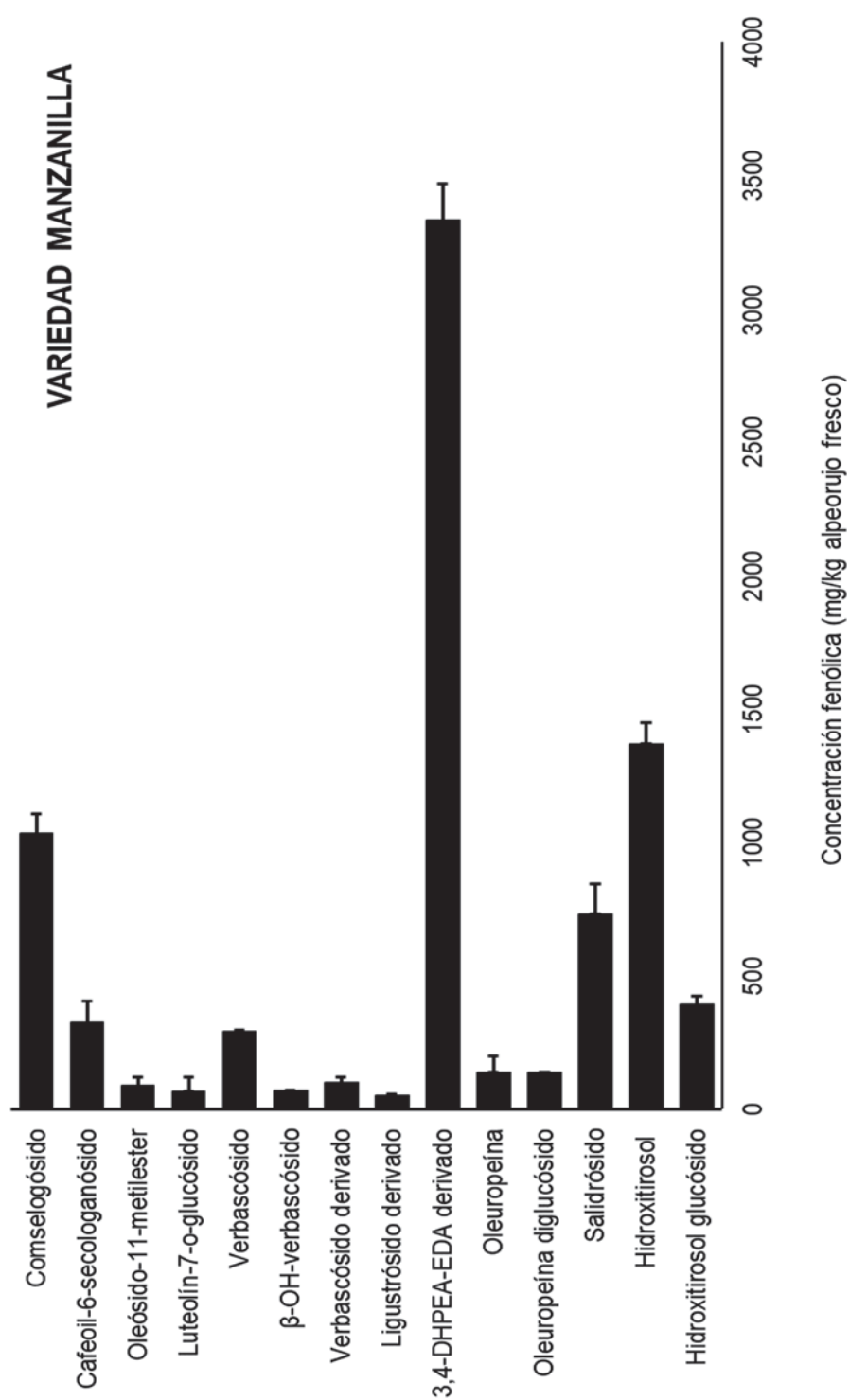


Fig. 4

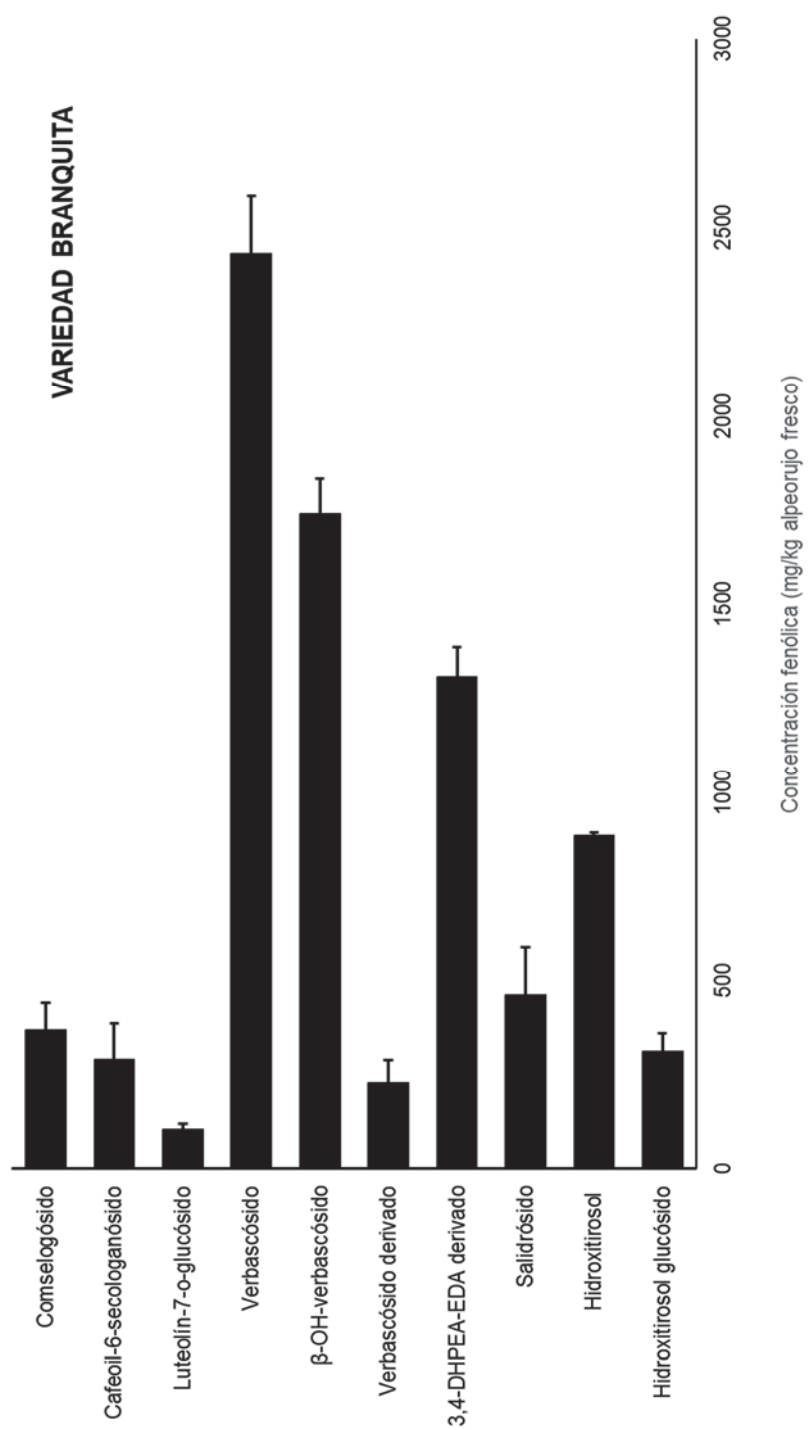


Fig. 5

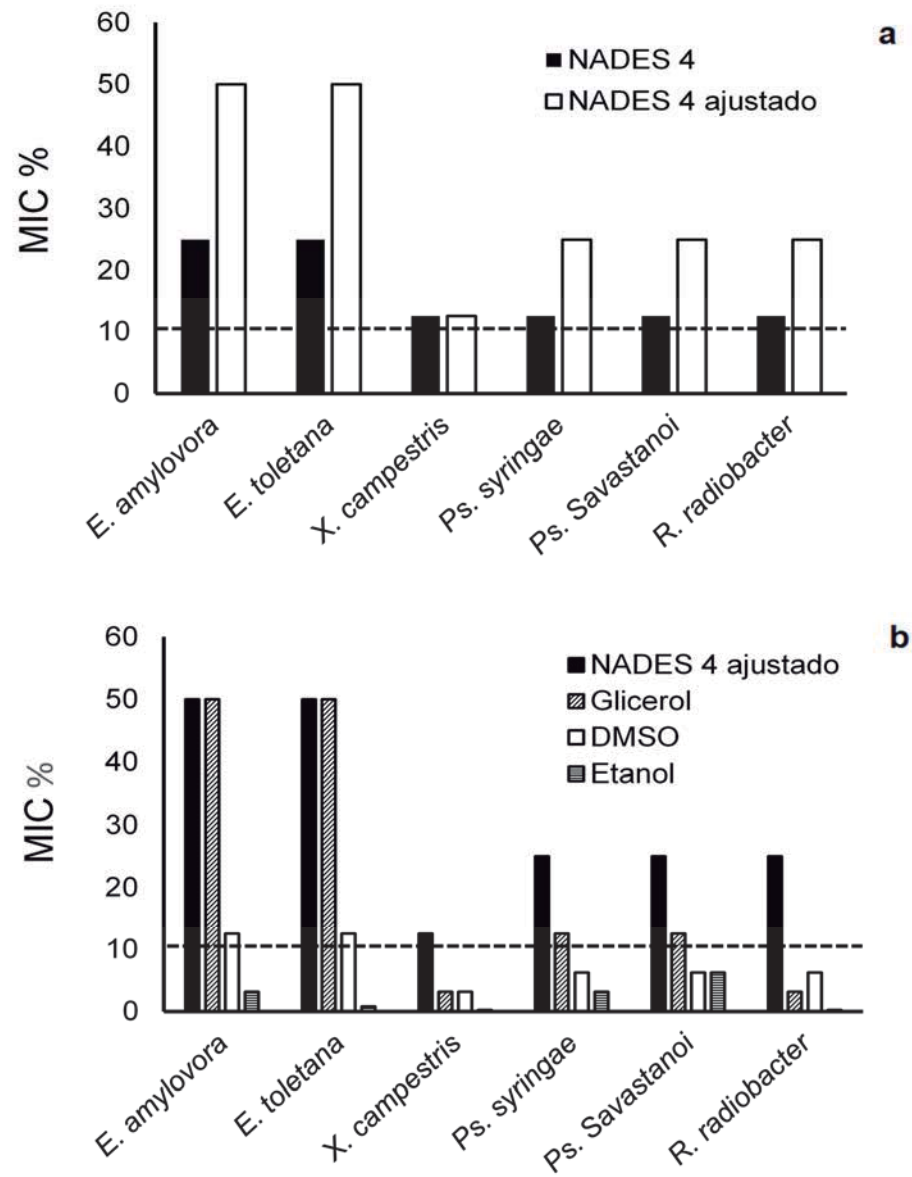


Fig. 6

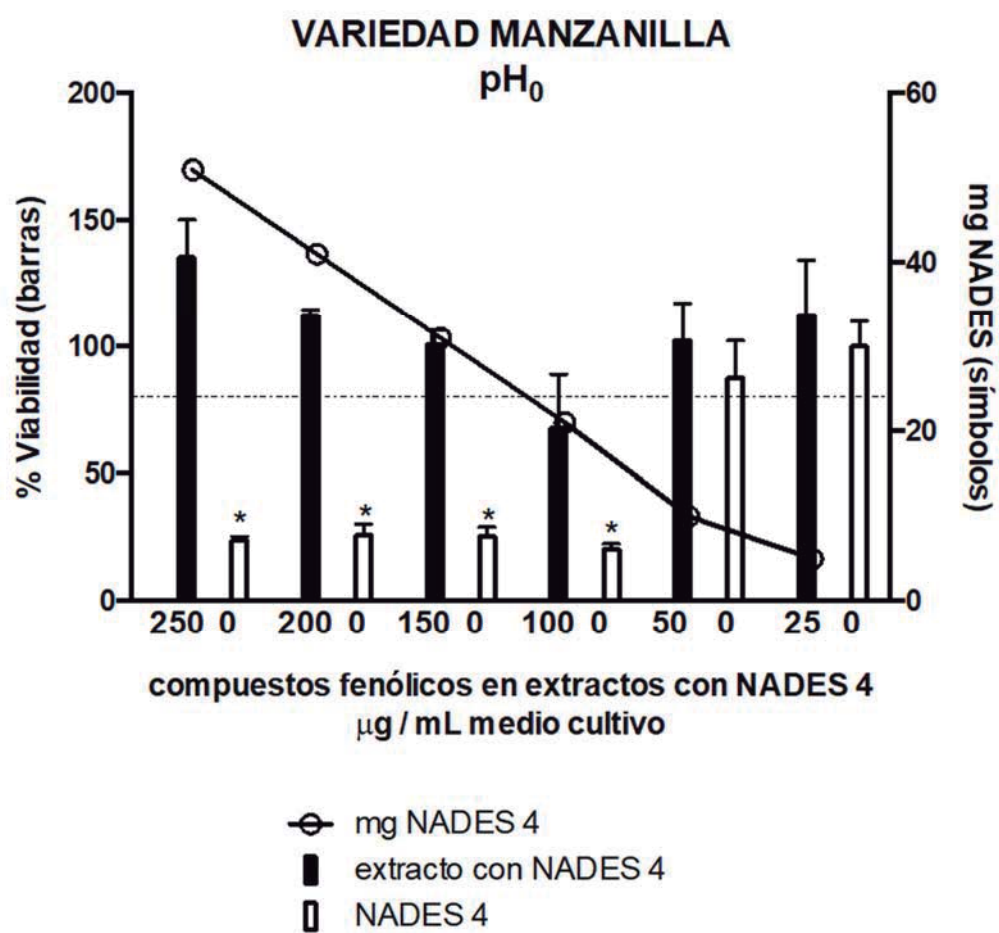


Fig. 7a

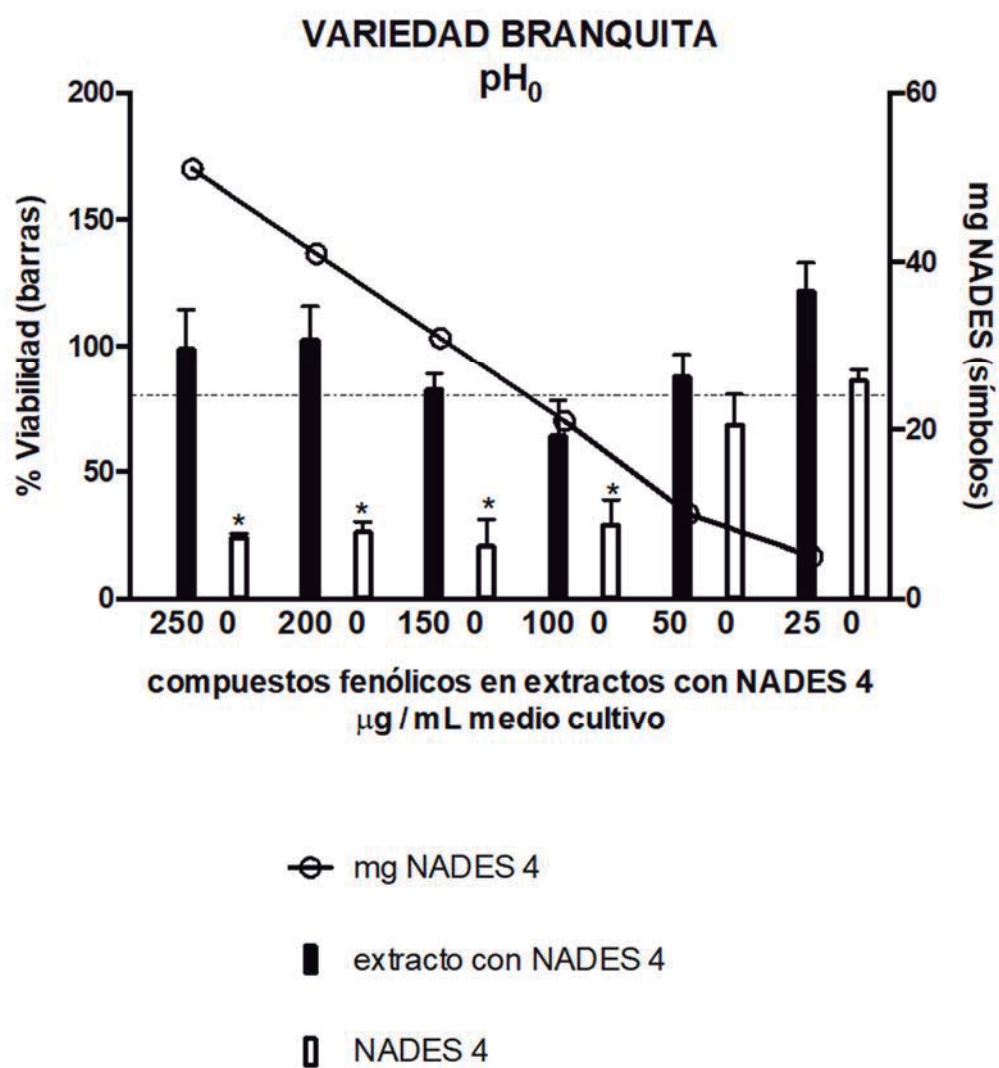


Fig. 7b

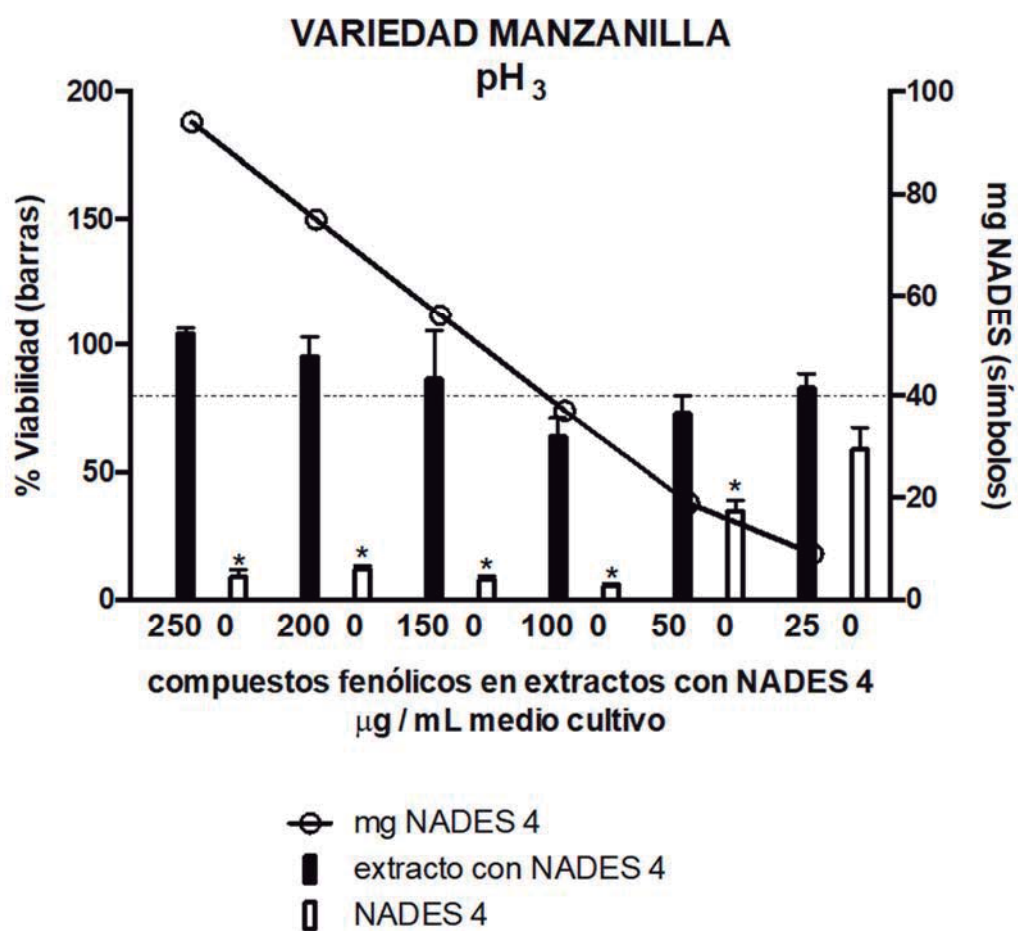


Fig. 7c

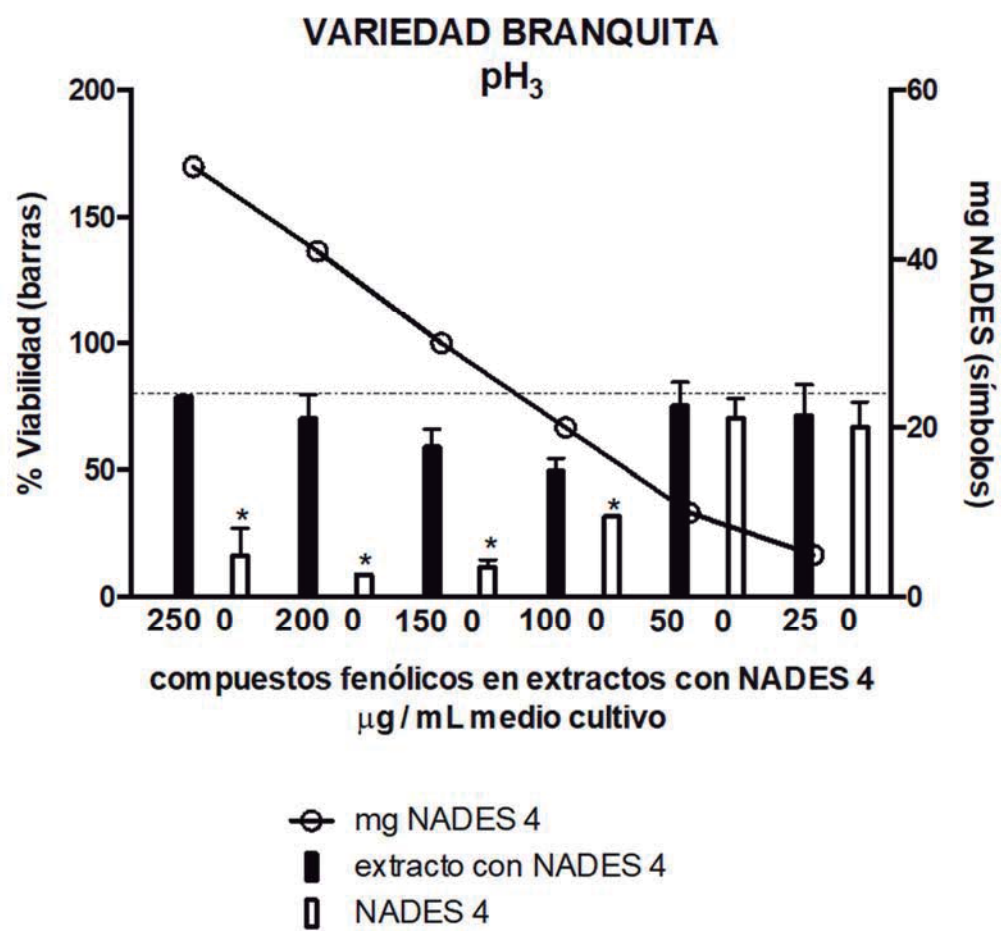


Fig. 7d

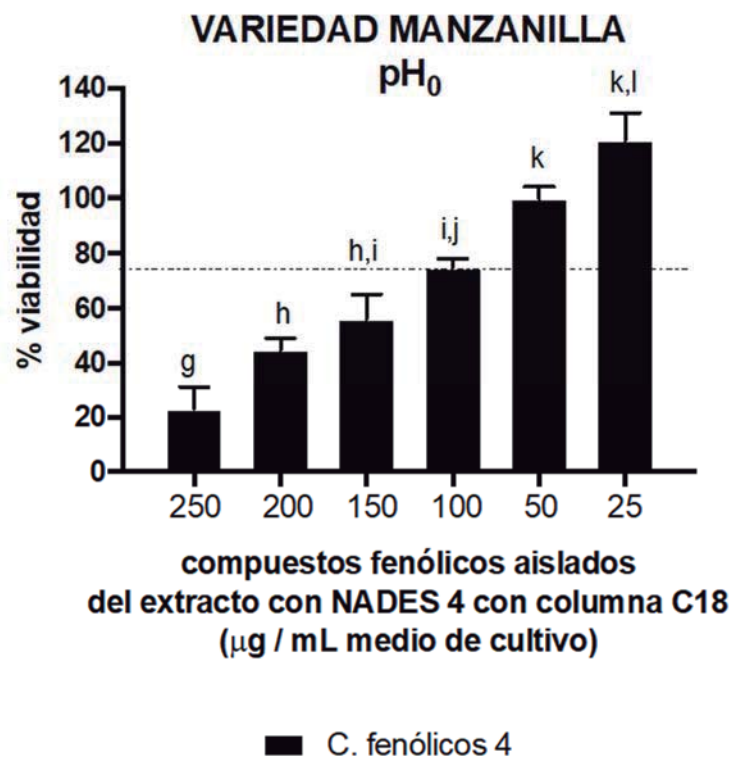


Fig. 8a

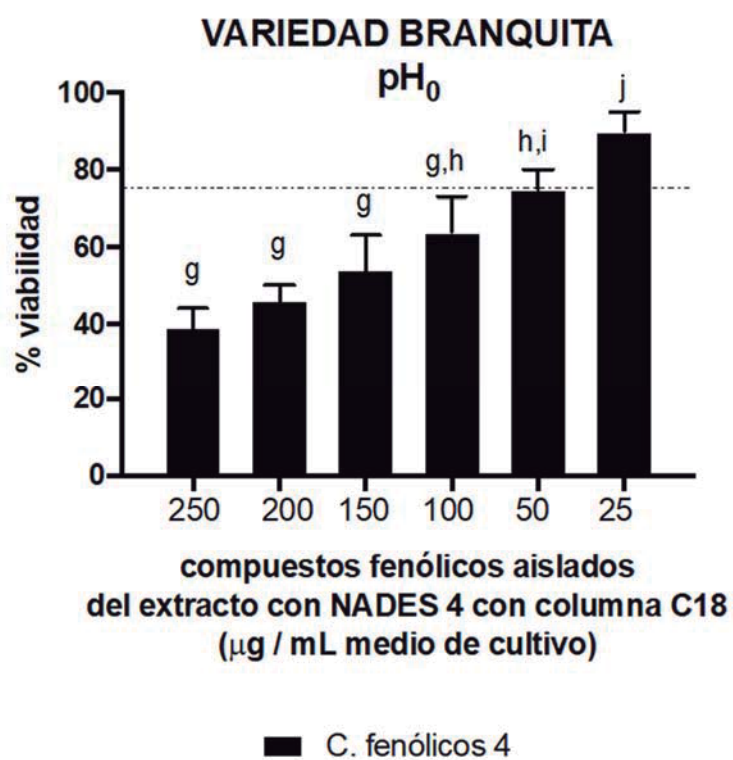


Fig. 8b

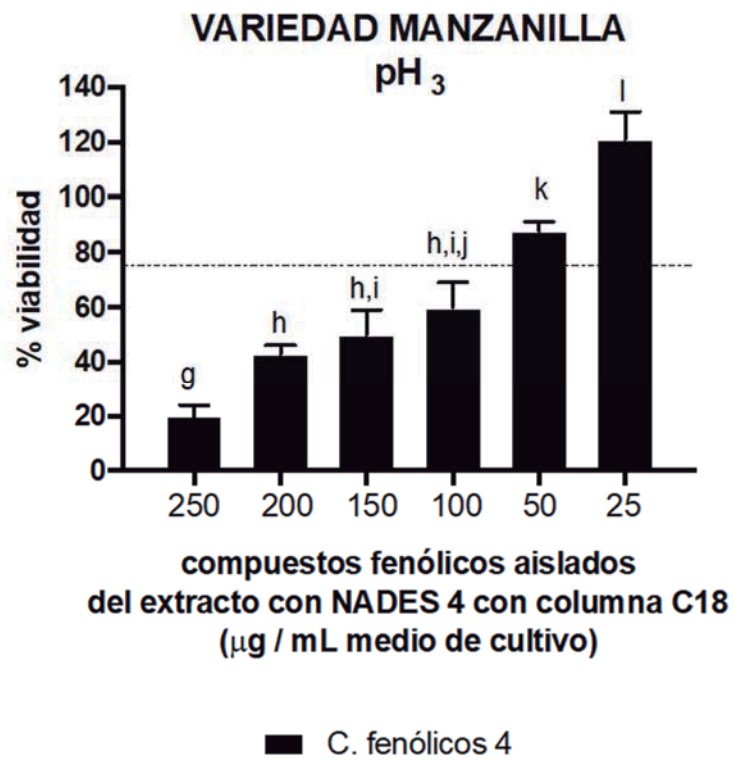


Fig. 8c

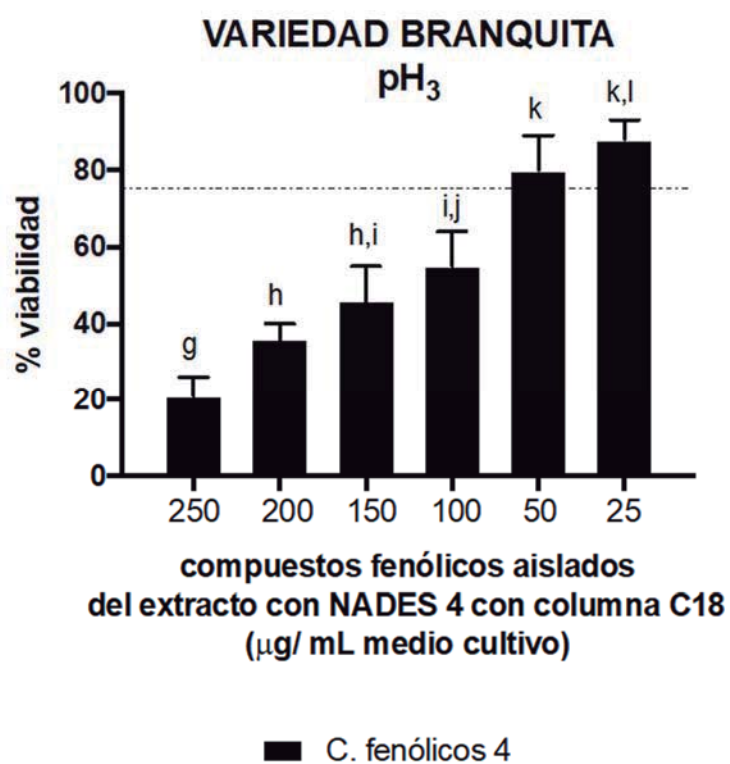


Fig. 8d

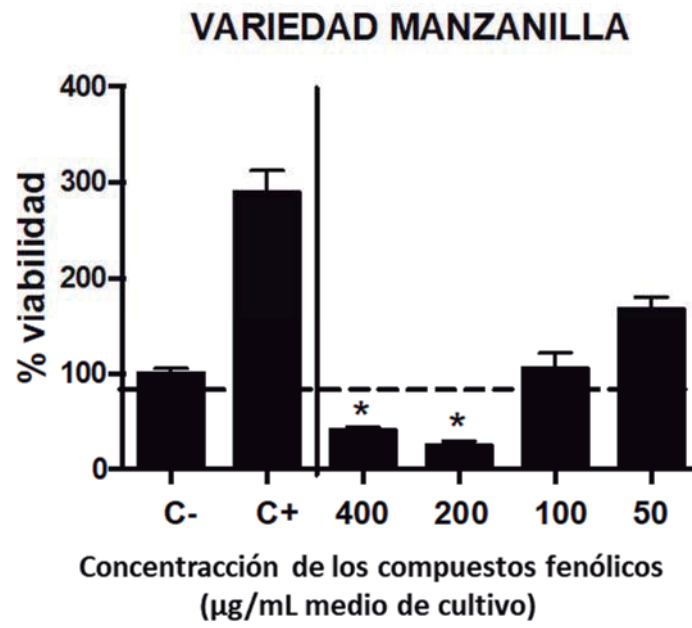


Fig. 9a

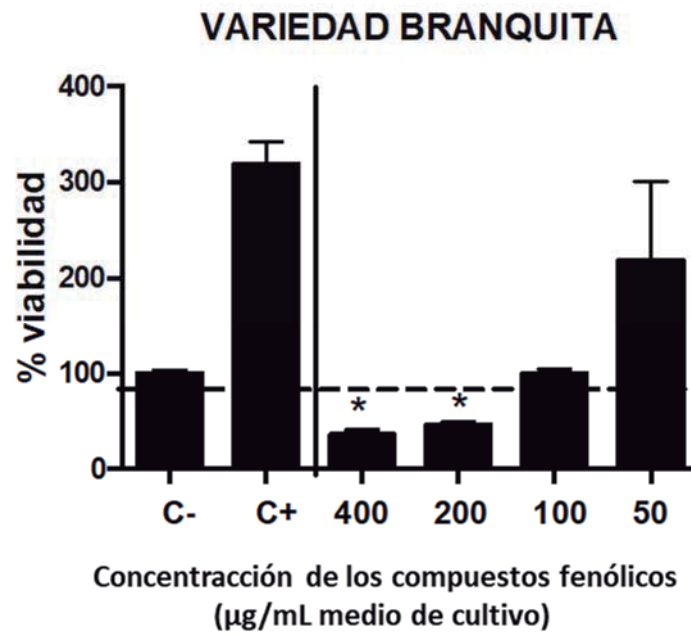


Fig. 9b

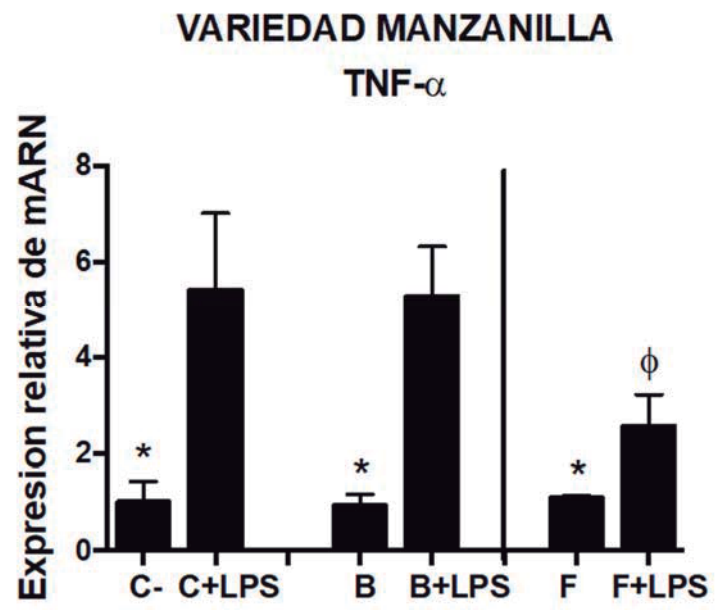


Fig. 10a

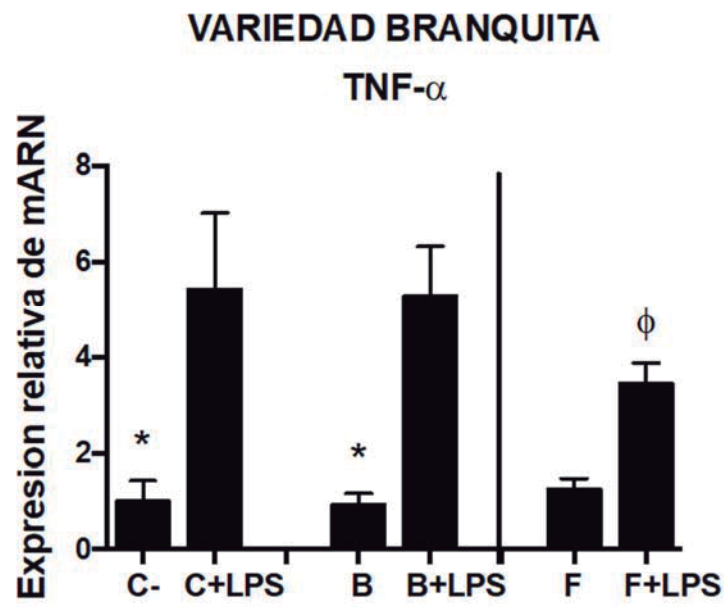


Fig. 10b

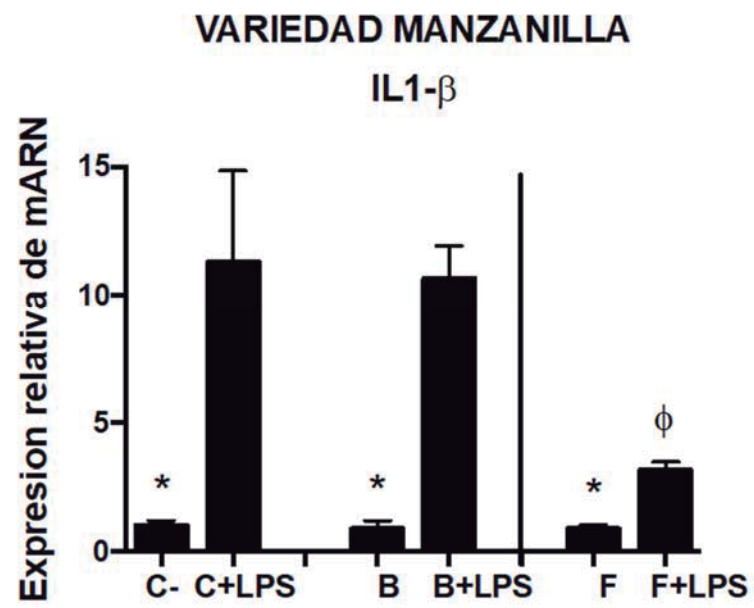


Fig. 11a

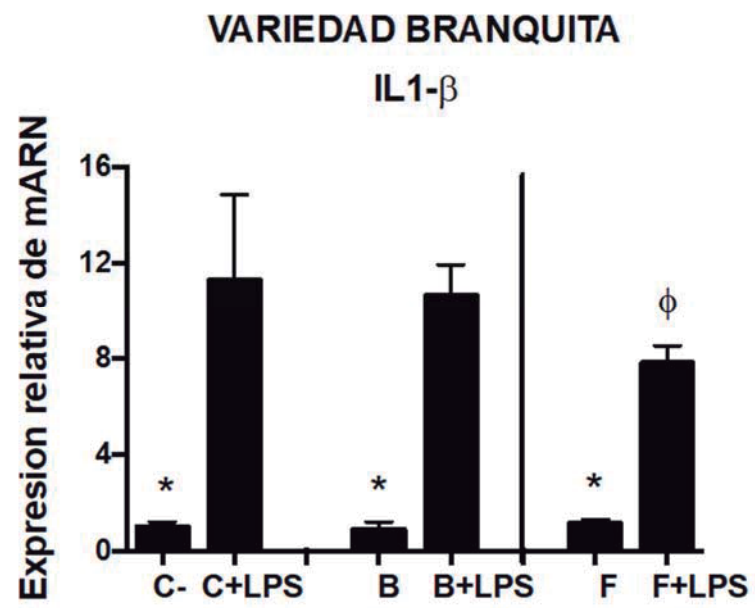


Fig. 11b

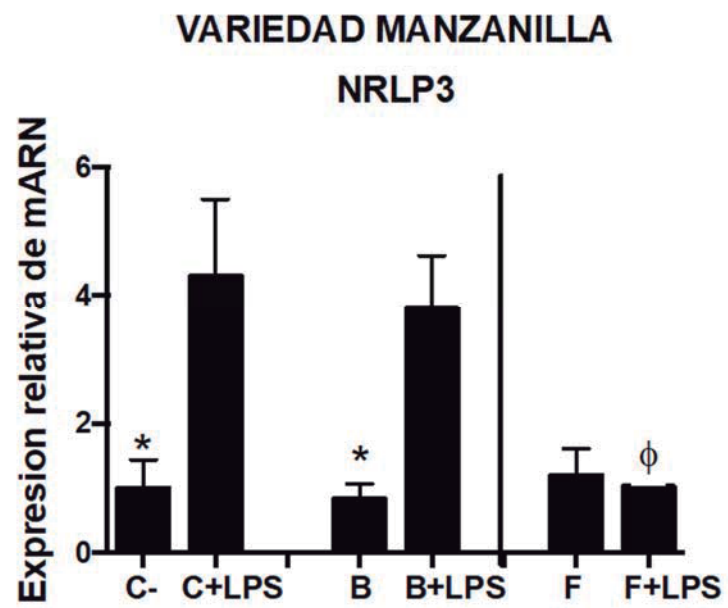


Fig. 12a

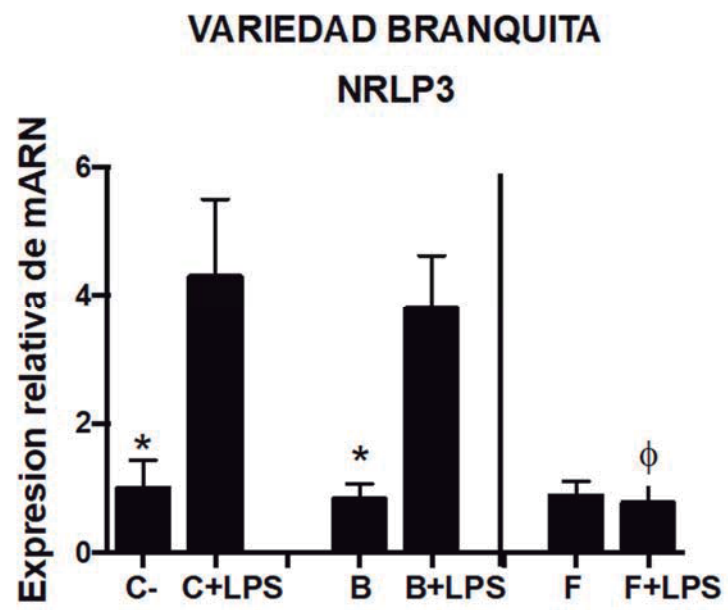


Fig. 12b

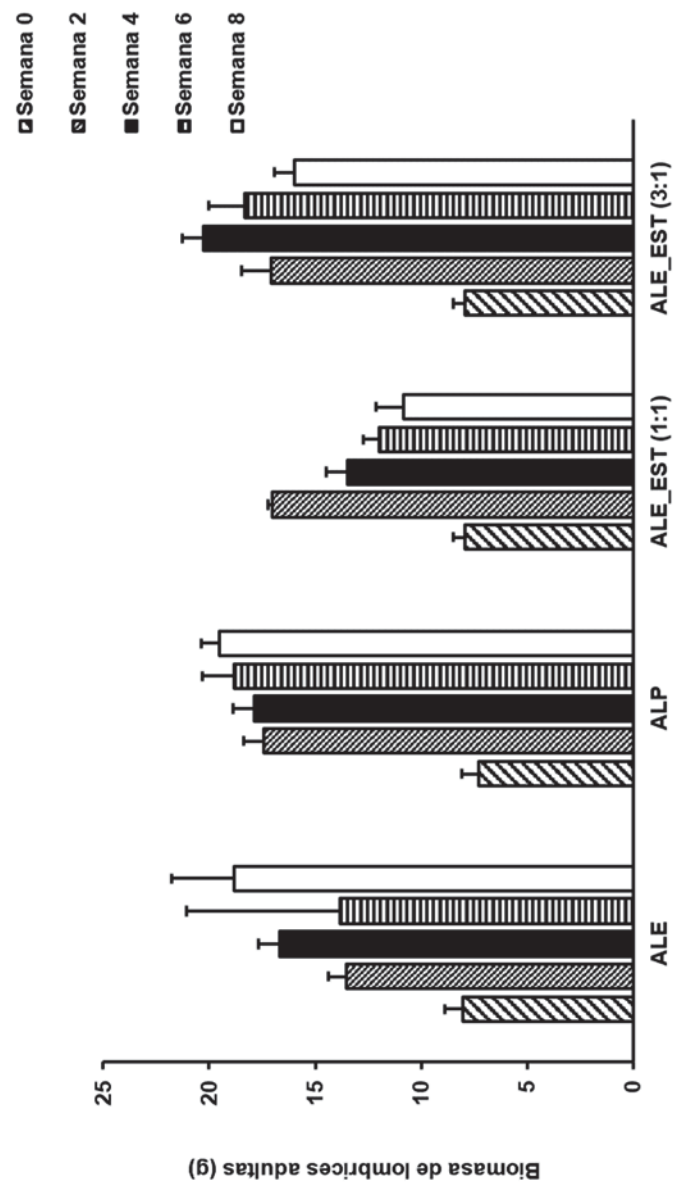


Fig. 13a

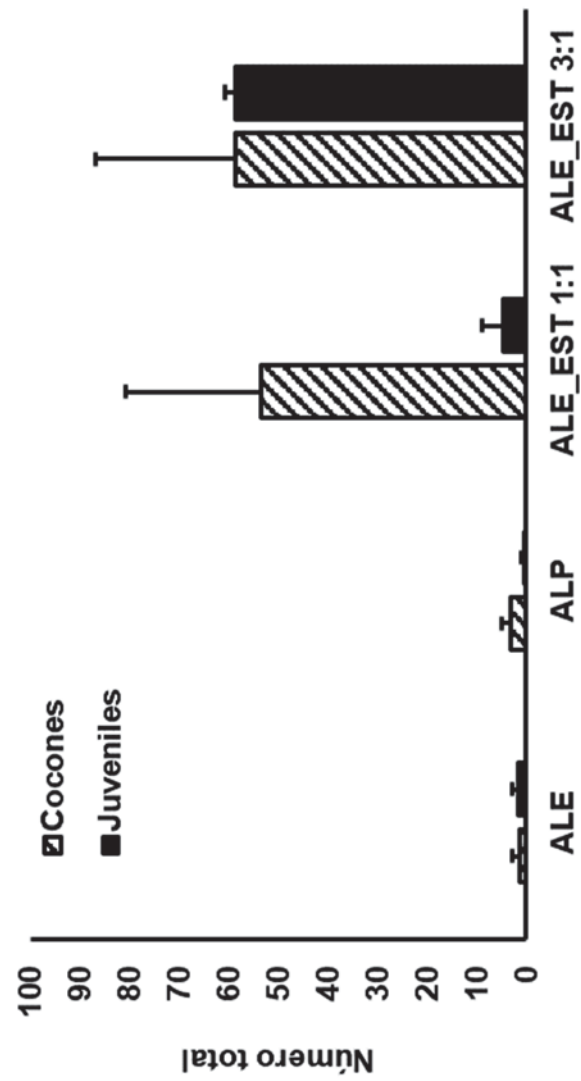


Fig. 13b

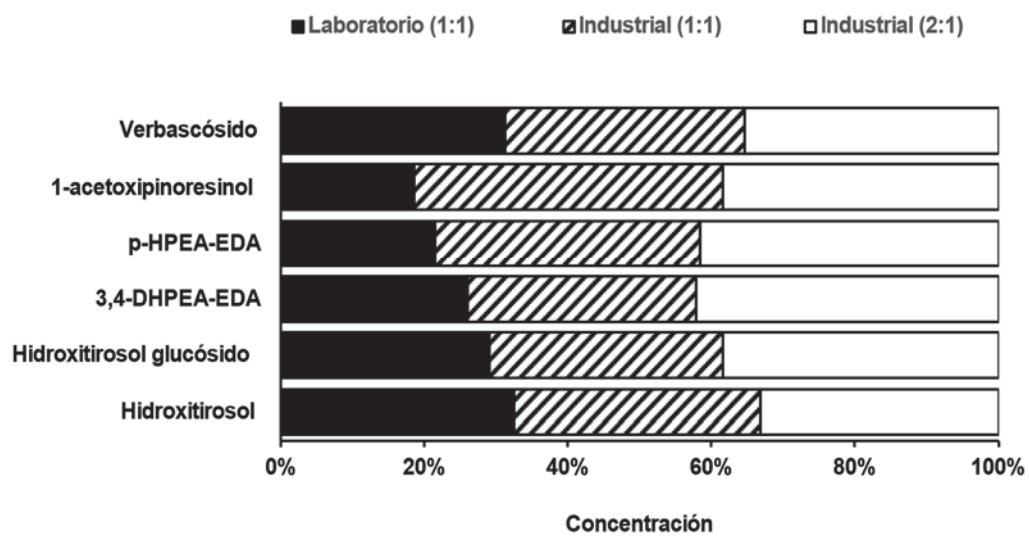


Fig. 14

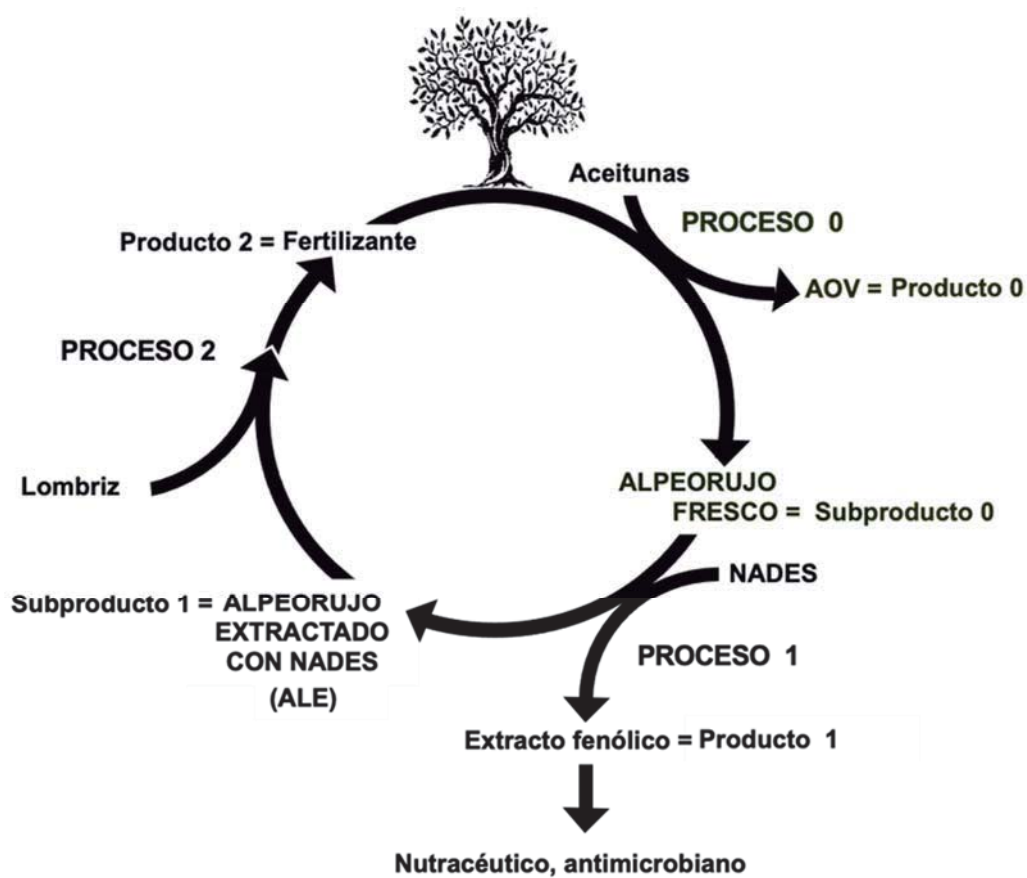


Fig. 15