



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 362 576**

51) Int. Cl.:

A23D 7/05 (2006.01)

A23D 9/007 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96) Número de solicitud europea: **08788910 .1**

96) Fecha de presentación : **23.07.2008**

97) Número de publicación de la solicitud: **2170090**

97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54) Título: **Aceites enriquecidos con hidroxitirosol y sus usos.**

30) Prioridad: **23.07.2007 EP 07014390**

45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.07.2011

45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.07.2011

73) Titular/es: **PROBELTE PHARMA, S.A.**
Ctra. Madrid, Km. 389
Polígono Industrial el Tiro
30100 Espinardo, ES

72) Inventor/es: **López Más, José, A.;**
Streitenberger, Sergio, A.;
Peñalver Mellado, Marcos y
Martínez Ortiz, Pedro

74) Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 362 576 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aceites enriquecidos con hidroxitirosol y sus usos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al enriquecimiento de productos nutricionales con extractos de oliva que contienen hidroxitirosol; la invención se refiere también a los productos nutricionales enriquecidos con hidroxitirosol y el uso de los extractos de oliva y los productos nutricionales enriquecidos con extractos de oliva para su uso en medicina, en particular para prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (ECV), formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico.

Según la invención, el extracto de oliva derivado de olivas o de residuos de extracción de aceite de oliva (orujo, alpeorujo y orujillo) se añade a un aceite comestible y por medio de este aceite, a productos nutricionales, lo que resulta en un incremento en el nivel de hidroxitirosol. Más específicamente, la invención se refiere al enriquecimiento de productos que contienen aceite comestible para su uso como una fuente de hidroxitirosol para prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico, debido al aporte nutricional de una composición purificada rica en hidroxitirosol.

20 Estado de la técnica

Según el suplemento publicado por la British Heart Foundation: European cardiovascular disease statistics, edición 2005, las ECV son la principal causa de mortalidad en Europa: representa más de 4,35 millones de muertes cada año. La enfermedad coronaria (EC) es la causa más común de muerte en Europa: representa 1,95 millones de muertes en Europa cada año.

Este suplemento incluía una nueva sección sobre la estimación del coste económico de las ECV. El coste total de las ECV es de 169 billones de euros, de los cuales 105 billones de euros son para tratar las ECV en la Unión Europea y 64 billones se deben a la pérdida de productividad y al coste del cuidado familiar.

La acumulación de plaquetas en las arterias, también llamada aterosclerosis, es la principal causa de ECV y la causa más frecuente de EC. La acumulación de plaquetas ateroscleróticas es un trastorno común en las arterias. Esto ocurre cuando grasas, colesterol, y otras sustancias se acumulan en las paredes de las arterias y forman lo que se conoce como placa de ateroma.

Finalmente, los depósitos de placa pueden hacer que la arteria se estreche y sea menos flexible. Esto dificulta que la sangre fluya. Si las arterias coronarias se estrechan, el flujo sanguíneo al corazón puede disminuir o detenerse, causando dolor torácico (angina de pecho estable), dificultad respiratoria, ataque cardíaco y otros síntomas.

Los fragmentos de placa se pueden romper y viajar a través del torrente sanguíneo. Esta es una causa común de ataque cardíaco y accidente cerebrovascular. Los coágulos de sangre también se pueden formar alrededor de los depósitos de placa y pueden bloquear el flujo sanguíneo. Si el coágulo se desplaza hacia el corazón, los pulmones o el cerebro, puede causar un ataque cardíaco, embolia pulmonar o accidente cerebrovascular.

Se ha demostrado que la hipertensión arterial, los altos niveles de triglicéridos y colesterol total en la sangre, así como el tabaco, son factores que contribuyen al desarrollo de esta afección. En los últimos años, los investigadores han descubierto que algunos de estos factores de riesgo se agrupan en determinadas personas. Esta agrupación de factores de riesgo se conoce como síndrome metabólico.

Las personas con síndrome metabólico tienen una agrupación de los siguientes factores de riesgo:

- Obesidad central, que se caracteriza por un exceso de peso en la zona abdominal.
- Dificultad en la digestión de la glucosa (intolerancia a la glucosa). Las personas con síndrome metabólico generalmente tienen hiperinsulinemia o diabetes tipo 2.
- Altos niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos en el torrente sanguíneo.
- Bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el torrente sanguíneo.
- Alta presión sanguínea (hipertensión).

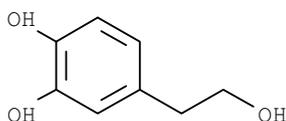
Aún hay mucho que aprender sobre el síndrome metabólico, pero los médicos saben que las personas con síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de padecer ECV.

Numerosos estudios han demostrado que la oxidación de LDL *in vivo* juega un papel central en el desarrollo de aterosclerosis (Knight, 1995; Witzum, 1994).

5 El aceite de oliva, principal componente graso de la dieta mediterránea, ha sido asociado con una menor incidencia de EC (De Lorgeril y otros, 1999; Hertog y otros, 1993; Mattson y Grundy, 1985) y ciertos cánceres (d'Amicis y Farchi, 1999; Braga y otros, 1998; Trichopoulou y otros, 1995; Martin-Moreno y otros, 1994).

10 Los beneficios para la salud del consumo de aceite de oliva en la prevención de la oxidación del LDL podrían estar vinculados tanto a sus propiedades antioxidantes como a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (Nicolaiw y otros, 1998). Los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen tienen potentes propiedades antioxidantes que protegen al aceite de la oxidación (Visioli y otros, 1998; Papadopoulos y Boskou, 1991), y además han demostrado beneficios para la salud (Owen y otros, 2000; Manna y otros, 1999). Algunos de los compuestos fenólicos más representativos en el aceite de oliva virgen son el hidroxitirosol, el tirosol y algunos de sus derivados, que se extraen del

15 El hidroxitirosol está presente en el aceite de oliva y tiene la siguiente fórmula:



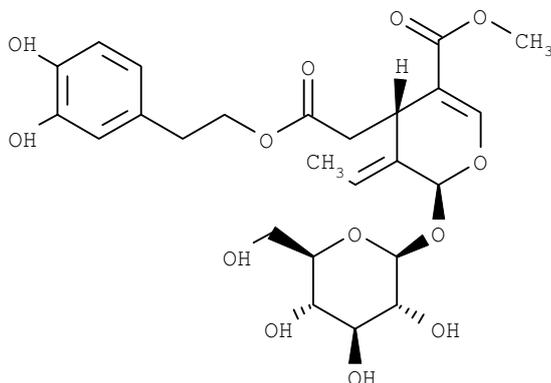
20 En las solicitudes de patente co-pendientes EP07001791 y PCT/IB2008/000173, se describen un proceso y aparato para la producción de hidroxitirosol a partir de oliva y/o residuos del aceite de oliva, que tienen como objetivo la producción de productos o extractos que contengan hidroxitirosol para ser utilizados como una fuente de hidroxitirosol en alimentación, medicina y cosmética.

25 El contenido de las solicitudes antes mencionadas es incorporado aquí como referencia.

30 Está demostrado que varias propiedades sensoriales en los aceites de oliva virgen extra y virgen son provocadas por los polifenoles de la oliva. Los aspectos sensoriales de los aceites de oliva tienen gran repercusión sobre su aceptabilidad por los consumidores. Algunos fenoles son responsables de la percepción del amargor; en cambio otros compuestos fenólicos pueden estimular las terminaciones libres del nervio trigémino localizadas en el paladar y también en las papilas gustativas, dando lugar a la percepción de atributos como la pungencia, la astringencia y el sabor metálico.

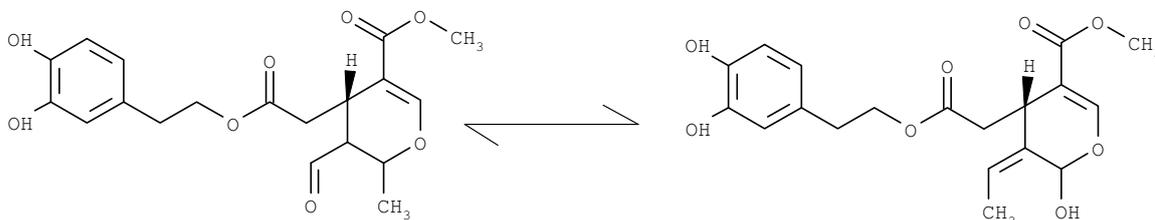
35 La oleuropeína, el compuesto fenólico que proporciona el amargor en la oliva, es más hidrosoluble que liposoluble, por lo que apenas se transfiere al aceite al prensar la oliva, así que el contenido medio de oleuropeína en aceites de oliva virgen y virgen extra es de 1 a 11 ppm.

La oleuropeína está presente en el aceite de oliva y tiene la siguiente fórmula:



40 Sin embargo, una serie de compuestos relacionados con la oleuropeína son más solubles en el aceite que la propia oleuropeína, por lo que están en mayor contenido en el aceite, en forma de isómero (o isómeros) de la oleuropeína aglicona (ej: forma aldehídica oleuropeína aglicona, AOA), y de la forma dialdehídica del ácido elenólico unida con el hidroxitirosol o el tirosol, llamadas 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA, respectivamente, que son los polifenoles de la oliva responsables principalmente del sabor amargo, según Gutiérrez-Rosales y colaboradores, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 6021-6025.

La oleuropeína aglicona (ej: forma aldehídica de la oleuropeína aglicona) está presente en el aceite de oliva y tiene la siguiente fórmula:



FORMA ALDEHÍDICA DE LA OLEUROPEÍNA AGLICONA

5 Frank y colaboradores en *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 231-238 describen un procedimiento llamado “análisis del sabor por dilución” para definir el límite sensorial de amargor para los derivados de oleuropeína. El amargor se evaluó mediante la preparación de diluciones seriadas de las muestras en agua para después probar las diluciones en orden creciente de concentración, hasta la dilución en la que la muestra se puede diferenciar del agua según la conocida “prueba triangular” de evaluación sensorial. Se ha demostrado que, al menos para estos compuestos, no existe una
10 correlación directa del amargor con la absorbancia a 225 (el valor K225): Mateo y otros, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2004, 81, 71-75, comprobaron la correlación entre la forma aldehídica de la oleuropeína aglicona (obtenida por hidrólisis de oleuropeína con β -glucosidasa de almendras de Sigma) y el amargor.

Andrewes y otros, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1415-1420, comprobaron la relación entre los polifenoles y la pungencia del aceite de oliva; el derivado *p*-HPEA-EDA fue el principal responsable de la sensación de picante en muchos aceites de oliva.

En 2005, Beauchamp y colaboradores, *Nature* 2005, 437, 45-46, midieron la intensidad de la pungencia de *p*-HPEA-EDA aislado de diferentes aceites de oliva virgen y virgen extra, confirmando que esta molécula es el principal agente responsable de la irritación de la garganta provocado por aceite de oliva virgen y virgen extra.

En resumen, cualquier proceso para aumentar la capacidad antioxidante utilizando técnicas basadas en el enriquecimiento del aceite de oliva con polifenoles de la oliva no debería alterar las características organolépticas de los aceites, ni incrementar la cantidad de polifenoles de oliva responsables del sabor amargo; en caso contrario, el enriquecimiento causaría la alteración de las propiedades organolépticas del aceite, causando un sabor desagradable debido al excesivo sabor amargo, pungencia y/o astringencia, lo que provocaría el rechazo de muchos consumidores.

Se han descrito alimentos a los que se les ha añadido polifenoles o hidroxitirosol.

30 La US-B1-6942890 describe un método para enriquecer alimentos añadiendo a éstos materias sólidas procedentes de la oliva, lo que provoca un incremento en el nivel de antioxidantes, en particular de polifenoles de la oliva. Este proceso requiere la incubación durante un cierto tiempo del alimento que se va a enriquecer, ej. un aceite vegetal, con materia sólida derivada de olivas que no han sido sometidas a un tratamiento de desamargado, y después separando el sólido del aceite por filtración. El principal problema relacionado con este proceso está asociado con la alteración de las propiedades organolépticas del aceite vegetal, causando una desagradable sensación cuando hay un excesivo amargor y/o astringencia debidos al incremento de polifenoles en el aceite. Según los inventores, esta alteración se podría evitar cuando el producto final obtenido es producido añadiendo como mucho un 2,5 % de materia sólida de oliva, lo que provoca un incremento de polifenoles de oliva en el aceite de oliva virgen extra de 145 a 530 ppm como máximo.

40 La US-A-6162480 describe un método de enriquecimiento de aceite vegetal con antioxidantes. Olivas sin desamargadas se remojan en aceite vegetal durante 1 a 30 días, lo que resulta en un incremento del nivel de antioxidantes, en particular polifenoles de oliva. De acuerdo al ejemplo 1, añadiendo un 10 % de oliva toscana no desamargada a aceite de oliva virgen extra toscana con suave agitación durante 30 días, se produce un incremento de los polifenoles de oliva en aceite de oliva virgen extra de 420 a 591 ppm, siendo este el máximo aumento permitido según la invención. Este método básicamente es el mismo que se utiliza para conservar las olivas en aceite de oliva, aparte de la agitación.

El principal problema relacionado con los métodos descritos en la US-B1-6942890 y la US-A-6162480 es que sólo los polifenoles liposolubles son (parcialmente) extraídos de la materia sólida o de la oliva al aceite.

50 La US-B1-6746706 describe un método de enriquecimiento de composiciones de alimentos (cremas untables, vinagreta y salsa de tomate), donde éstas contienen un 20-100 % de una fase acuosa caracterizada por un contenido de tirosol e hidroxitirosol de al menos 15 ppm. Sin embargo este método es poco eficaz: ninguno de los ejemplos de la invención pone de manifiesto que las composiciones de los alimentos preparados alcancen concentraciones en la fase de agua mayores a 50 ppm para el hidroxitirosol y tirosol juntos.

55 La US-B1-6361803 describe (ejemplo 13) un método caracterizado por utilizar un extracto de oliva producido según el

ejemplo 4 para permitir una mejora de la actividad antioxidante en un aceite. Sin embargo, la capacidad antioxidante de la muestra control, 0,18 mM equivalentes de Trolox por gramo tan solo se vio incrementada en tres veces, aproximadamente, por el método de la invención, hasta 0,53 mM equivalentes de Trolox por gramo.

5 La US-B-6361803 requiere el uso de disolventes orgánicos, en concreto disolventes polares, con el fin de producir un extracto de oliva que contiene hidroxitirosol con un grado de pureza aceptable. Los disolventes acuosos polares se seleccionan entre metanol, etanol, acetonitrilo o acetona, mientras que los disolventes orgánicos polares se seleccionaron entre, por ejemplo, ésteres, amidas, dimetil sulfóxido, dioxano, DMF y sus mezclas. El uso de disolventes orgánicos, por ejemplo metanol que es un disolvente tóxico, es un inconveniente, en particular cuando el producto final
10 obtenido va a ser utilizado en el campo de la alimentación.

El principal problema relacionado con este proceso, además del derivado de la utilización de disolventes orgánicos (tóxicos en algunos casos), es que la disolución del extracto de oliva rico en hidroxitirosol descrito en el ejemplo 13 (composición antioxidante) necesita una mezcla de agua/etanol/ácido acético para disolver previamente el extracto y formar una emulsión estable en el aceite que se va a enriquecer, siendo este procedimiento inconveniente en el campo
15 alimentario.

La IT 01326553 describe un aceite de oliva enriquecido mediante la adición de extractos derivados de hojas de oliva o alpechín al aceite de oliva. Los extractos son ricos en todo tipo de polifenoles, es decir, que tienen una baja pureza de hidroxitirosol. De hecho, los extractos de hojas casi no contienen hidroxitirosol. El problema de esta invención y de las invenciones previamente descritas reside principalmente en el bajo contenido de hidroxitirosol libre con respecto a la cantidad total de polifenoles: cuanto menor es la cantidad de hidroxitirosol con respecto a otros polifenoles, mayor es el amargor del producto enriquecido con respecto a la misma cantidad de hidroxitirosol libre en el aceite.
20

La EP 1582512 describe un proceso para obtener hidroxitirosol a partir de extractos de hojas de oliva. Según este documento, extractos ya preparados de hojas de oliva se someten a hidrólisis ácida a una temperatura de 70 a 100°C durante aproximadamente 4 horas. Los ejemplos comparativos muestran que a un pH de 1,5 se acelera el tiempo de reacción (ej. C1 y C2), que la purificación en absorción de resinas requiere EtOH o MeOH y que la mezcla de reacción debe ser llevada a un pH de 7,7 para recuperar hidroxitirosol.
25

La US 2002/0058078 se refiere a un proceso para la obtención de hidroxitirosol a partir de agua de vegetación que implica acidificar el agua e incubarla por al menos dos meses. Las aguas resultantes contienen alrededor de un 3,5% de oleuropeína aglicona y se fracciona con disolventes orgánicos, HPLC o se extrae con fluidos supercríticos. La WO 2007/013032 se refiere a otro proceso para recuperar hidroxitirosol a partir de agua de vegetación mediante extracción con fluidos supercríticos o nanofiltración. La extracción es no-selectiva, como se puede ver en los cromatogramas.
30

La WO 2007/1074490 describe un proceso para obtener triacetilhidroxitirosol a partir de agua de vegetación de almazara que implica la extracción del agua de vegetación con disolventes orgánicos y una reacción de acetilación de la disolución así obtenida.
35

La US 5998641 se refiere a un proceso de incremento del contenido de polifenoles en el aceite de oliva sin incremento del amargor. Para este propósito, el aceite de oliva se emulsiona con una solución acuosa que contiene polifenoles y una enzima para desamargar (ej β -glucosidasa de almendra adquirida en Sigma (ejemplo 1)). Después el agua se elimina por evaporación o ultrafiltración para evitar la pérdida de los polifenoles solubles en agua e insolubles en aceite. El problema de este método es que es muy largo (al menos 24 horas hasta 100 horas según los ejemplos) y que todos los productos de la reacción enzimática, incluyendo la oleuropeína aglicona y azúcares, permanecen en el aceite.
40

Cabe destacar que la hidrólisis de la oleuropeína por β -glucosidasa (ej. de almendra adquirida en Sigma) ha sido normalmente utilizada por varios autores para la preparación de un isómero (o isómeros) de oleuropeína aglicona que resultó ser amarga a 50 μ mol (Frank y colaboradores, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 231-238). Mateo y otros, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2004, 81, 71-75, verificaron la correlación entre la forma aldehído de la oleuropeína aglicona (obtenida por hidrólisis de oleuropeína con β -glucosidasa de almendra adquirida en Sigma) y el amargor. En otras palabras, en la US 5998641 el resultado de la hidrólisis enzimática es un conjunto de subproductos incluyendo compuestos polifenólicos que dan un sabor amargo al aceite pero no son detectados con el test K225.
45

También hay que considerar que la eliminación de agua por evaporación tiene una influencia negativa en los atributos sensoriales (características cualitativas) de los aceites de oliva vírgenes, porque la mayoría de los compuestos volátiles responsables del aroma único de este aceite se extraen junto con el agua durante el proceso de evaporación.
50

Resumiendo, las técnicas anteriormente descritas son demasiado largas, demasiado complejas o demasiado severas para el campo alimentario, o todo lo mencionado anteriormente a la vez; adicionalmente la cantidad de hidroxitirosol que puede ser incorporada en un aceite comestible sin producir demasiado amargor, pungencia, o incrementar el contenido en azúcares y subproductos sin perder compuestos aromáticos volátiles, es demasiado baja para proteger eficazmente las LDL frente a las modificaciones oxidativas en un grado significativo.
55

60

Debe ser tenido también en consideración que todas las técnicas anteriormente mencionadas permiten obtener un aceite de oliva con un incremento en el contenido total de polifenoles de oliva, pero con un bajo contenido en hidroxitirosol en relación al contenido total de polifenoles de oliva, normalmente presente en el aceite de oliva, debido al hecho de que la mayoría de los polifenoles incorporados al aceite son secoiridoides, compuestos relacionados con la oleuropeína caracterizados por una solubilidad en aceite mayor que la del hidroxitirosol, y que en consecuencia se incorporan al aceite, como la oleuropeína aglicona (AOA), 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA, en mayor contenido que el hidroxitirosol, y que son estos polifenoles de oliva los responsables mayoritariamente del sabor amargo y la pungencia. La incorporación de esos secoiridoides, capaz de producir cambios indeseables en las propiedades organolépticas del aceite de oliva, está de hecho directamente relacionada con las fuentes de polifenoles de oliva utilizadas en todas las técnicas anteriormente mencionadas, que de hecho presentan un bajo contenido en hidroxitirosol y/o un bajo grado de pureza.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención, que está definido por las reivindicaciones, es resolver los problemas anteriormente mencionados y proporcionar aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos para ser usados como una fuente de hidroxitirosol para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico, pero evitando alteraciones indeseables de las propiedades organolépticas de los alimentos enriquecidos.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos caracterizados por un alto contenido en hidroxitirosol, para ser usados como una fuente de hidroxitirosol para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos que, aunque caracterizados por un alto contenido de hidroxitirosol, están en forma de emulsión estable y duradera.

De nuevo, un objetivo de la presente invención es proporcionar aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos caracterizados por un alto contenido de hidroxitirosol de gran pureza. Dichos objetivos se consiguen mediante la presente invención que proporciona aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos con extractos de oliva.

El proceso de producción de tales extractos naturales de oliva libres de disolventes, obtenidos a partir de los frutos del olivo así como también a partir de subproductos de la extracción del aceite de oliva, permite incrementar, en un grado nunca descrito hasta ahora, la capacidad antioxidante, aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos, pero evitando alteraciones indeseables de las propiedades organolépticas de los alimentos enriquecidos.

Un aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar un extracto de oliva rico en el antioxidante hidroxitirosol.

Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para preparar aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos con extracto de oliva, que comprende mezclar una disolución de agua que contiene hidroxitirosol con dicho aceite y decantar la fase de agua, opcionalmente en la presencia de emulsificantes y opcionalmente llevando a cabo una homogenización.

Descripción de las realizaciones preferidas de la invención

Como ya se ha mencionado un aspecto de la invención se refiere a un producto nutricional, que es un aceite comestible, que comprende al menos 30 ppm de hidroxitirosol, y preferiblemente entre 30 ppm y 30000 ppm de hidroxitirosol y un contenido de forma aldehídica de oleuropeína aglicona de menos de 120 ppm. Un rango preferido, cuando el producto nutricional está, por ejemplo, en la forma de un aceite comestible enriquecido, en forma de emulsión homogeneizada, preferiblemente una microemulsión, así como cuando el producto nutricional es un producto alimentario enriquecido conteniendo un aceite comestible, es entre 30 y 300 ppm, donde el contenido en hidroxitirosol está preferiblemente en el rango entre 45 ppm y 70 ppm y más preferiblemente entre 50 ppm y 60 ppm. Cuando el producto nutricional está, por ejemplo en la forma de un suplemento dietario consistente en un aceite comestible enriquecido encapsulado, como cápsulas de gelatina blanda que contienen una emulsión homogeneizada, preferiblemente una microemulsión, el contenido en hidroxitirosol está en el rango de 300 a 30000 ppm, preferiblemente 500 a 3000 ppm.

El valor de K225 de un aceite enriquecido según la invención (ver la siguiente explicación para los ejemplos 13 y 14) es de 0.28 o menos y preferiblemente es de 0.25 o menos. Adicionalmente, el contenido de AOA de dichos aceites enriquecidos es menor que 120 ppm, preferiblemente menor que 85 ppm y más preferiblemente menor que 55 ppm.

El producto de aceite comestible según la presente invención y que comprende el mencionado extracto de oliva añadido, muestra una capacidad antioxidante mejorada.

Finalmente, un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de nutricionales, aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos, para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico. Como se menciona previamente el primer aspecto de la invención se refiere a la preparación de un extracto de oliva rico en el antioxidante hidroxitirosol en forma muy pura. El problema que se encontró fue mejorar la incorporación del hidroxitirosol, que es muy hidrofílico en el aceite; este problema se resolvió por medio de la presente invención que hace uso de un proceso de extracción de hidroxitirosol en ausencia de disolventes y es capaz de proporcionar un extracto de oliva rico en hidroxitirosol y caracterizado por un alto grado de pureza, con respecto a subproductos, azúcares o sales.

En una realización de la invención, subproductos de la extracción de aceite de oliva o pulpas de oliva molturadas (orujo, alpeorujos y orujillos) pueden usarse como material de partida para la extracción de hidroxitirosol. Este proceso se describe en la WO 2008/090460 en nombre del solicitante de la presente invención. En otra realización de la invención, se usan aceitunas como material de partida para la producción de extracto de oliva, preferiblemente olivas verdes y más preferiblemente olivas verdes enteras.

En el proceso, siguiendo las instrucciones de las solicitudes anteriormente mencionadas, los residuos de extracción o las olivas enteras o las olivas molturadas son homogeneizadas/mezcladas con agua desmineralizada. Una vez que las olivas enteras, la masa de pulpa de oliva o la masa de residuos de extracción, mezclada con agua está preparada, el próximo paso es la hidrólisis ácida en agua de esta mezcla, llevada a cabo a una temperatura comprendida entre 20°C y 140°C, preferiblemente entre 70°C y 140°C, y más preferiblemente en un sistema de esterilización en continuo a temperatura entre 110°C y 140°C. El pH de la mezcla acidificada que se hidroliza está en el rango de 1 a 6. La mezcla tras la hidrólisis se clarifica mediante métodos físicos conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo por filtración y/o centrifugado, para retirar las olivas enteras o los sólidos en suspensión del producto hidrolizado y obtener una solución clarificada mayoritariamente libre de sólidos en suspensión.

De acuerdo a una forma de realización preferida, tras los pasos descritos anteriormente se continúa con la carga del producto que se obtiene de las etapas anteriores en al menos una columna cromatográfica conteniendo una resina seleccionada entre resinas de intercambio aniónico activadas con un ácido y resinas de absorción no iónicas y la elución de los productos retenidos en las mencionadas columnas con agua.

Según otro aspecto, el producto líquido es concentrado por ejemplo mediante concentración por osmosis inversa. Según un paso posterior después de la purificación cromatográfica y la concentración por osmosis inversa, el producto líquido resultante es, según otra realización de la invención, llevado a forma sólida, mediante secado por atomización, con ayudas de secado como por ejemplo maltodextrinas.

El extracto de oliva así obtenido es muy rico en hidroxitirosol y tiene un bajo contenido en los productos de partida y en subproductos, y en general, tiene un contenido muy bajo en azúcares y sales.

Los extractos que se pueden obtener según el proceso anteriormente mencionado pueden obtenerse tanto en forma líquida como sólida, y se caracterizan por tener un contenido de hidroxitirosol de al menos el 0,5% (p/p) y una pureza de al menos 40%, y preferiblemente un contenido de al menos 10% y una pureza de al menos 80% y más preferiblemente un contenido de al menos 35% y una pureza de al menos 90% (determinado mediante HPLC, siendo el área de los picos medida a 280 nm). De acuerdo a un aspecto preferido, el producto líquido conteniendo hidroxitirosol (extracto de oliva en forma líquida) que se puede obtener según la invención, tiene un contenido en hidroxitirosol de al menos 35% (p/p) o incluso más preferiblemente de al menos 45% (p/p), una pureza de al menos 90% (determinada por HPLC a 280 nm) y un contenido en fenoles totales de al menos 35%. Según un aspecto más preferido de la invención, el producto sólido conteniendo hidroxitirosol (extracto de oliva en forma sólida), tiene un contenido en hidroxitirosol de al menos 20% (p/p), una pureza de al menos 90% (determinada por HPLC a 280 nm) y un contenido en fenoles totales de al menos 20%.

Según un aspecto preferente, el producto sólido conteniendo hidroxitirosol, tiene un contenido en hidroxitirosol de al menos 40% (p/p) y una pureza de al menos 90% (determinada por HPLC a 280 nm).

Estos extractos están libres de disolventes orgánicos y sustancialmente libres de azúcares y sales.

Los extractos obtenidos a partir de oliva verde son preferidos a los extractos obtenidos a partir de subproductos de extracción de aceite de oliva en vista de su mayor contenido en hidroxitirosol y el reducido contenido en hidroximetilfurfural. Estos extractos pueden ser usados para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico. También pueden ser empleados en la preparación de suplementos dietarios.

Un segundo aspecto de la invención es el concerniente al proceso para preparar aceites comestibles y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos con extracto de oliva, por ejemplo para preparar los llamados alimentos funcionales.

5 El primer paso consiste en la selección de un extracto de oliva apropiado. Para el enriquecimiento de aceite normalmente se selecciona un extracto de oliva en forma líquida. Dicho extracto tiene un contenido en hidroxitirosol de al menos un 35% (p/p) o incluso más preferiblemente de al menos 45% (p/p) y una pureza de al menos 90% (determinada por HPLC a 280 nm.) y un contenido en fenoles totales de al menos 35%. El uso de dichos extractos de oliva es preferible para el enriquecimiento de aceite de oliva debido al hecho de que la emulsión estable del extracto de oliva puede prepararse sin un incremento significativo de agua residual en el aceite debido a la pequeña cantidad de extracto de oliva que se necesita para alcanzar la capacidad antioxidante deseada en el aceite enriquecido.

10 De hecho, el extracto de oliva que contiene un alto contenido en hidroxitirosol, un bajo contenido en subproductos indeseables (ejemplo: AOA, 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA) y que está sustancialmente libre de azúcares y sales, forma emulsiones estables cuando se incorpora al aceite de oliva para su enriquecimiento. De hecho, como está caracterizado por tener un alto contenido en hidroxitirosol, por ejemplo no menos de 35% (p/p), pequeñas cantidades de extracto de oliva son adecuadas para obtener un aceite de oliva enriquecido caracterizado por un alto contenido en hidroxitirosol. Además, debido a la pureza del extracto de oliva descrito en la invención, que resulta sustancialmente libre de azúcares y sales, cuando es incorporado al aceite para enriquecerlo, se obtienen emulsiones estables incluso en ausencia de emulsionantes u otros aditivos, con la ventaja de que el aceite enriquecido resultante puede usarse en alimentación, medicina y cosmética.

20 Los aceites enriquecidos así obtenidos contienen al menos 30 ppm de hidroxitirosol y mantienen sus propiedades organolépticas sin verse adversamente afectadas

25 Para el enriquecimiento de productos conteniendo un aceite que comprende al menos un 10% de agua, normalmente se selecciona un extracto de oliva en polvo. Dicho extracto de oliva tendrá un contenido en hidroxitirosol de al menos 20% (p/p). Las ayudas de secado adecuadas son por ejemplo maltodextrinas, lactosa, caseinatos, etc. El uso de dichos extractos de oliva es preferible para el enriquecimiento de productos conteniendo un aceite que contienen al menos un 10% de agua, debido al hecho de que dicho polvo es fácilmente manejable y se disuelve completamente en dichos productos nutricionales en el rango empleado para alcanzar la capacidad antioxidante deseada para estos productos que contienen aceite.

30 El segundo paso consiste en la incorporación del extracto de oliva seleccionado en el aceite comestible y/o alimentos conteniendo un aceite. La incorporación del extracto de oliva a los productos nutricionales se obtiene por mezcla y homogeneización según los procesos tecnológicos adecuados para preparar cada producto.

35 El enriquecimiento de un aceite consiste en la incorporación del extracto de oliva durante su preparación tecnológica. En general, el extracto de oliva en forma líquida se añade en el porcentaje en peso deseado al aceite y se mezcla completamente, bajo parámetros controlados de temperatura y agitación; seguidamente es necesario dejar el producto reposar para retirar el exceso de extracto. Para ello se puede usar algún método conocido como por ejemplo una decantación convencional. De hecho, durante la producción de aceites vegetales se realizan normalmente diferentes etapas consecutivas de decantación para eliminar el agua residual, y de forma fácil el antioxidante de oliva podría ser incorporado al aceite justo antes de la última etapa de decantación que normalmente se lleva a cabo durante su producción.

45 Debido a la alta concentración de hidroxitirosol en el extracto acuoso así como a su alto grado de pureza, es posible transferir en cada etapa de mezcla una gran cantidad de hidroxitirosol al aceite. La fase acuosa decantada normalmente contiene algo de hidroxitirosol y es recuperada para su posterior uso.

50 En una realización preferida de la invención un extracto de oliva en forma líquida es añadido al aceite, premezclado bajo atmósfera inerte (ejemplo: bajo atmósfera de nitrógeno) según parámetros controlados de temperatura y agitación. El producto es alimentado en un homogeneizador operado según un proceso de homogeneización de doble etapa, llevándose a cabo la primera etapa a unos valores de presión comprendidos entre 200 y 700 bar y la segunda etapa es llevado a cabo manteniendo unos valores de presión entre 30 y 50 bar. La homogeneización de la pre-emulsión permite obtener una emulsión estable.

55 En una realización de la invención, hidroxitirosol puro se añade a agua y la solución resultante es mezclada y homogeneizada con aceite para transferir hidroxitirosol a la fase oleosa.

60 Preferiblemente se usan extractos naturales obtenidos según la invención para evitar trazas de disolventes orgánicos en el producto final, especialmente en vista de su uso para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico.

65 El enriquecimiento de productos nutricionales sólidos conteniendo un aceite consiste en la incorporación y mezcla del extracto de oliva durante su preparación tecnológica. En general el proceso de preparación de productos conteniendo aceite se caracteriza por: a) la presencia de una fase oleosa, que comprende aceite comestible y/o grasa comestible y opcionalmente otros componentes lipofílicos b) una etapa de emulsión que comprende la adición a a) de un emulsificante en rangos controlados de agitación y temperatura c) la presencia de una fase acuosa, que contiene agua y

opcionalmente otros constituyentes hidrofílicos; la proporción en peso de la fase oleosa con respecto a la fase acuosa varía entre 9:1 y 1:9.

5 El extracto de oliva en polvo se añade en el porcentaje en peso deseado a la fase acuosa (c) y se disuelve completamente, bajo parámetros muy controlados de agitación y temperatura, después la fase oleosa (a), a la cual previamente se le adicionó el emulsificante es añadida a la fase acuosa (c) para crear una matriz oleosa/acuosa estable.

10 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un producto nutricional al que se ha añadido hidroxitirosol, preferentemente en forma del extracto de oliva definido previamente, para producir aceites y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos. En el contexto de la presente invención producto nutricional hace referencia a cualquier alimento, producto comestible o suplemento alimenticio que es un aceite comestible o que contiene al menos un aceite comestible.

15 Los productos nutricionales de la invención comprenden preferiblemente una concentración del extracto de oliva de la invención comprendida entre 0.01% y 93% (p/p). Un rango más preferente comprende entre 0.01% y 30% (p/p) del extracto de oliva de la invención. Productos nutricionales que son aceites comestibles conteniendo esta cantidad de extracto de oliva añadido pueden ser por ejemplo:

20 a) aceites vegetales obtenidos de diversas fuentes como oliva (aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva, aceite de oliva lampante, aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva crudo, aceite de orujo de oliva refinado), girasol, maíz, soja, semilla de lino, almendra, canola, cártamo, palma, coco, colza, por nombrar algunos, derivados tecnológicamente modificados de los anteriormente mencionados o mezclas de dos o más de ellos podrían ser usadas para su enriquecimiento.

25 b) aceites de pescado u otros organismos marinos obtenidos de varias fuentes como algas, krill, lacha, anchoa, atún, arenque, sardina, caballa o bacalao, por nombrar algunos, derivados tecnológicamente modificados de los anteriormente mencionados o mezclas de dos o más de ellos podrían ser usados para su enriquecimiento.

30 Un rango más preferente comprende de 0.05% a 35% (p/p) del extracto de oliva de la invención. Productos nutricionales, que contengan al menos un aceite comestible, conteniendo la cantidad anteriormente indicada de extracto de oliva añadido pueden ser, por ejemplo: productos que contienen aceite tales como margarina, mayonesa, salsa alioli, gazpacho andaluz, salsas para untar, aliños para ensalada, por nombrar algunos, derivados tecnológicamente modificados de los anteriormente mencionados o mezclas de dos o más de ellos podrían ser usados para su enriquecimiento.

35 Finalmente un cuarto aspecto de la invención concierne al uso de los productos nutricionales de la invención, aceites y/o alimentos conteniendo un aceite enriquecidos, en la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico.

40 En una realización preferida de la invención, una emulsión de extracto de oliva (en forma líquida) y aceite comestible es usada para preparar cápsulas de gelatina blanda.

45 Varios aspectos deben tomarse en consideración cuando se fabrican cápsulas de gelatina blanda. Un aspecto está relacionado con el tamaño de la cápsula. El límite superior de tamaño que muchos consumidores encuentran aceptable es de 1 ó 2 gramos, que representa el tamaño comúnmente utilizado para otros suplementos dietarios con aceite. El segundo aspecto lo representa el número de cápsulas que es necesario tomar por día. Generalmente, el límite superior es 4 a 6 cápsulas por día. Cuando el mayor tamaño de cápsula es considerado, se prefiere una forma oblonga (1000 mg o más) por ser más fácil de tragar. La presente invención no está limitada por estos parámetros.

50 Otra consideración es la dosis mínima necesaria para ser eficaz. La dosis mínima preferida para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, formación de plaquetas en las arterias, hipertensión arterial, y síndrome metabólico es de 2 g de aceite comestible enriquecido, proporcionando desde 3 a 50 mg de hidroxitirosol por día, pudiéndose, por ejemplo, administrar, en dos dosis de 1 g de aceite comestible enriquecido por día.

55 Breve descripción de las figuras

La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle con referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras adjuntos y no limitativos.

60 - las figuras 1-5 son gráficos que muestran la correlación lineal entre la capacidad antioxidante de diferentes productos nutricionales obtenidos según la presente invención (ver ejemplos 3 a 7) y su contenido en hidroxitirosol medido por HPLC como resultado de su enriquecimiento con cantidades crecientes de extractos de oliva obtenidos según la presente invención.

65 - la figura 6 es un gráfico que compara las curvas de distribución de tamaño de partícula de las emulsiones de extracto

líquido de oliva y aceite de oliva extra virgen, preparada con o sin el uso de un homogenizador.

5 - las figuras 7-9 son gráficos que muestran los efectos en ratas del aceite de oliva virgen extra enriquecido con extracto de oliva según la presente invención, en los triglicéridos, índice aterogénico (colesterol total/HDL) y capacidad antioxidante total en plasma, respectivamente.

- la figura 10 es un gráfico que muestra el efecto en ratas del aceite de oliva virgen extra enriquecido con extracto de oliva según la presente invención, en la presión sanguínea sistólica.

10 - la figura 11 es un gráfico que muestra los efectos de un extracto de oliva rico en hidroxitirosol de alta pureza según la presente invención, en el índice aterogénico (colesterol total/HDL) de ratas. La figura 11 hace referencia al ejemplo 12, donde los grupos de animales se organizaron según la Tabla 6.

La presente invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos:

15

EJEMPLO 1

Producción de extractos de oliva a partir de olivas

20 25 Kg de olivas se mezclan con 50 L de agua desmineralizada. La mezcla resultante se mezcla durante unos minutos, y después se añadieron 636 g de ácido sulfúrico (98 %). La mezcla obtenida se guarda en autoclave a 15 psi (sobre la presión atmosférica) a 121 °C durante 30 minutos. Después la fase acuosa se separa del residuo sólido por filtración. La fase sólida, retenida en el filtro, se lava con 12,5 L de agua desmineralizada, y el agua procedente de esta operación de lavado se une a la fase acuosa previamente recogida. La fase acuosa, aproximadamente 56 L, se centrifuga para eliminar las partículas sólidas que pasaron a través del filtro. Tras la eliminación de los sólidos, se obtienen 52 L de extracto acuoso crudo, que contiene 141 g de hidroxitirosol con una pureza HPLC de 50,5 %.

25

Después, el extracto crudo acuoso se carga en una columna de cromatografía que contiene una resina de intercambio iónico de tipo aniónica, activada previamente hasta ciclo acetato. Por ejemplo se podría usar la resina IRA-67. La fase líquida recogida a la salida de la columna no contiene hidroxitirosol, que en cambio es eluido continuamente con agua desmineralizada hasta que al menos el 90 % del hidroxitirosol inicialmente cargado es recogido.

30

El eluido de la primera columna es preferiblemente cargado en otra columna cromatográfica que contiene una resina de adsorción no iónica. Por ejemplo se podría usar la resina XAD-118. La fase líquida recogida a la salida de la segunda columna no contiene hidroxitirosol. El hidroxitirosol se eluye de la resina con agua desmineralizada hasta que al menos el 90 % del hidroxitirosol inicialmente cargado se recoge.

35

El eluido obtenido contiene aproximadamente 114 g de hidroxitirosol con una pureza HPLC de alrededor del 96,7 %.

40 Entonces, la fracción de 461 L de extracto purificado en la planta piloto, que contiene 114 g de hidroxitirosol, se concentra mediante osmosis inversa, con una planta piloto equipada con una membrana polimérica de 2,5 m² para reducir el volumen hasta 10 L de producto concentrado. Después, se utiliza una membrana de 0,35 m² para obtener un concentrado al 3,5% de hidroxitirosol.

40

45 Finalmente, el concentrado obtenido mediante osmosis inversa se somete a rotaevaporación a 78 °C bajo un vacío de 245 mbar para alcanzar una concentración de aproximadamente 10 veces del extracto de oliva en forma líquida con una concentración final de 37,2 % (p/p) con una pureza HPLC de 93,3 %.

45

EJEMPLO 2

50

Preparación de un extracto de oliva en polvo mediante atomización

Una muestra de 260 ml de extracto de oliva purificado en forma líquida que contiene 19,5 g de hidroxitirosol obtenida de acuerdo al Ejemplo 1, es agitada lentamente con 58 g de maltodextrina previamente disuelta en 260 ml de agua desmineralizada. Se puede usar por ejemplo maltodextrina de patata. El atomizador, es equilibrado previamente a una temperatura de 150 °C en el aire de entrada, utilizándose una bomba peristáltica para alimentarlo. La velocidad de alimentación se ajusta para obtener una temperatura de aire de salida menor de 100 °C. Se obtienen 76 g de un polvo blanco, con una humedad de 5,4 % (Karl Fischer) y una riqueza del 21,9 % (p/p) de hidroxitirosol.

55

EJEMPLO 3

60

Preparación de un aceite de oliva virgen extra enriquecido con extracto de oliva

Una muestra de extracto de oliva purificado en forma líquida con una concentración de 40,6 % (p/p) de hidroxitirosol obtenida con un proceso de acuerdo al Ejemplo 1, se selecciona para el enriquecimiento de un aceite de oliva virgen

65

5 extra. Se prepararon 6 muestras de 400 g de aceite de oliva virgen extra cada una. Cantidades crecientes de extracto de oliva en forma líquida se añadieron en relación al peso al aceite de oliva virgen extra y se mezclaron, bajo parámetros muy controlados de temperatura y agitación durante 1 hora. Trascorrida 1 hora se corta la agitación y la mezcla se pasó a un embudo de decantación y se dejó reposar durante 72 horas. Posteriormente, el extracto de oliva en exceso había formado una capa en el fondo que se separa de la fase superior para la obtención del aceite de oliva virgen extra enriquecido.

10 Inmediatamente después, una alícuota de cada una de las 6 muestras de aceite de oliva virgen extra se utilizaron para medir la capacidad antioxidante (capacidad de absorción del radical ABTS medido a 734 nm utilizando Trolox como estándar) y el contenido de hidroxitirosol por HPLC.

15 Cuando los resultados se representaron gráficamente (ver figura 1) como capacidad antioxidante v.s. concentración de hidroxitirosol se obtuvo una correlación lineal. Concretamente la capacidad antioxidante del aceite de oliva virgen extra no enriquecido era 0,24 mM equivalentes de Trolox por gramo y la capacidad antioxidante del aceite de oliva virgen extra enriquecido con la mayor concentración de hidroxitirosol era 5,05 mM de equivalentes de Trolox por gramo, lo que significa un incremento de 21 veces en la capacidad antioxidante del aceite de oliva virgen extra.

EJEMPLO 4

20 Preparación de un aceite de girasol enriquecido con extracto de oliva

25 Una muestra de extracto de oliva purificado en forma líquida con una concentración de 40,6 % (p/p) de hidroxitirosol obtenida con un proceso de acuerdo al Ejemplo 1, se selecciona para el enriquecimiento de un aceite de girasol. Se prepararon 6 muestras de 400 g de aceite de girasol cada una. Cantidades crecientes de extracto de oliva en forma líquida se añadieron en relación al peso al aceite de girasol y se mezclaron, bajo parámetros muy controlados de temperatura y agitación durante 1 hora. Trascorrida 1 hora se corta la agitación y la mezcla se pasó a un embudo de decantación y se dejó reposar durante 72 horas. Posteriormente, el extracto de oliva en exceso había formado una capa en el fondo que se separa de la fase superior para la obtención del aceite de girasol enriquecido.

30 Inmediatamente después, una alícuota de cada una de las 6 muestras de aceite de girasol se utilizaron para medir la capacidad antioxidante (capacidad de absorción del radical ABTS medido a 734 nm utilizando Trolox como estándar) y el contenido de hidroxitirosol por HPLC.

35 Cuando los resultados se representaron gráficamente (ver figura 2) como capacidad antioxidante v.s. concentración de hidroxitirosol se obtuvo una correlación lineal. Concretamente la capacidad antioxidante del aceite de girasol no enriquecido era 0 mM equivalentes de Trolox por gramo y la capacidad antioxidante del aceite de girasol enriquecido con la mayor concentración de hidroxitirosol era 5,42 mM de equivalentes de Trolox por gramo.

EJEMPLO 5

40 Preparación de un aceite de maíz enriquecido con extracto de oliva

45 Una muestra de extracto de oliva purificado en forma líquida con una concentración de 40,6 % (p/p) de hidroxitirosol obtenida con un proceso de acuerdo al Ejemplo 1, se selecciona para el enriquecimiento de un aceite de maíz. Se prepararon 6 muestras de 400 g de aceite de maíz cada una. Cantidades crecientes de extracto de oliva en forma líquida se añadieron en relación al peso al aceite de maíz y se mezclaron, bajo parámetros muy controlados de temperatura y agitación durante 1 hora. Trascorrida 1 hora se corta la agitación y la mezcla se pasó a un embudo de decantación y se dejó reposar durante 72 horas. Posteriormente, el extracto de oliva en exceso había formado una capa en el fondo que se separa de la fase superior para la obtención del aceite de maíz enriquecido.

50 Inmediatamente después, una alícuota de cada una de las 6 muestras de aceite de maíz se utilizaron para medir la capacidad antioxidante (capacidad de absorción del radical ABTS medido a 734 nm utilizando Trolox como estándar) y el contenido de hidroxitirosol por HPLC. Cuando los resultados se representaron gráficamente (ver figura 3) como capacidad antioxidante v.s. concentración de hidroxitirosol se obtuvo una correlación lineal. Concretamente la capacidad antioxidante del aceite de maíz no enriquecido era 0 mM equivalentes de Trolox por gramo y la capacidad antioxidante del aceite de girasol enriquecido con la mayor concentración de hidroxitirosol era 5,23 mM de equivalentes de Trolox por gramo.

EJEMPLO 6

60 Preparación de margarina enriquecida con extracto de oliva

65 Una muestra de extracto de oliva purificado en forma sólida que contiene una concentración de 23.3 % (p/p) de hidroxitirosol obtenida de acuerdo al Ejemplo 2, se selecciona para el enriquecimiento de margarina. Se prepararon 6 muestras de 200 g cada una de margarina de la siguiente manera. Cantidades crecientes de extracto de oliva en forma

sólida se añadieron a la fase acuosa junto con otros ingredientes normales de la margarina (suero de leche, salmuera, etc.). Después la fase acuosa y el aceite refinado mezclado con emulsionantes (lecitina) se mezclaron a temperaturas de 50 – 60 °C agitando suavemente. Finalmente la mezcla se refrigeró para que solidificara.

5 Inmediatamente después, una alícuota de cada una de las 6 muestras de margarina se utilizaron para medir la capacidad antioxidante (capacidad de absorción del radical ABTS medido a 734 nm utilizando Trolox como estándar) y el contenido de hidroxitirosol por HPLC. Cuando los resultados se representaron gráficamente (ver figura 4) como capacidad antioxidante v.s. concentración de hidroxitirosol se obtuvo una correlación lineal. Concretamente la capacidad antioxidante de la margarina no enriquecida era 0 mM equivalentes de Trolox por gramo y la capacidad antioxidante de la margarina enriquecida con la mayor concentración de hidroxitirosol era 189,05 mM de equivalentes de Trolox por gramo.

EJEMPLO 7

15 Preparación de una mayonesa enriquecida con extracto de oliva

Una muestra de extracto de oliva purificado en forma sólida que contiene una concentración de 23.3 % (p/p) de hidroxitirosol obtenida de acuerdo al Ejemplo 2, se selecciona para el enriquecimiento de mayonesa. Se prepararon 5 muestras de 400 g cada una de mayonesa de la siguiente manera. En primer lugar las yemas de huevo se mezclaron en un recipiente y se mezclaron bien a velocidad 3. En otro recipiente se añadieron el extracto de oliva (cantidades crecientes del extracto en forma sólida se añaden de acuerdo al ratio en peso deseado a la fase acuosa), agua destilada, jugo de limón, vinagre y sal. Se mezcló bien hasta que el extracto de oliva se disuelve. A esta mezcla se le añadieron las yemas de huevo y se mezclaron a velocidad 3 durante 2 a 3 minutos. Finalmente se añadió el aceite lentamente y se incrementó la velocidad a 6, para realizar la emulsión.

25 Inmediatamente después, una alícuota de cada una de las 5 muestras de mayonesa enriquecida se utilizaron para medir la capacidad antioxidante (capacidad de absorción del radical ABTS medido a 734 nm utilizando Trolox como estándar) y el contenido de hidroxitirosol por HPLC. Cuando los resultados se representaron gráficamente (ver figura 5) como capacidad antioxidante v.s. concentración de hidroxitirosol se obtuvo una correlación lineal. Concretamente la capacidad antioxidante de la mayonesa no enriquecida era 0 mM equivalentes de Trolox por gramo y la capacidad antioxidante de la mayonesa enriquecida con la mayor concentración de hidroxitirosol era 148,33 mM de equivalentes de Trolox por gramo.

EJEMPLO 8

35 Preparación de un aceite de oliva virgen extra enriquecido por emulsión del extracto de oliva utilizando un homogeneizador

40 Una muestra de extracto de oliva purificado en forma líquida que contiene una concentración de 31,1 % (p/p) de hidroxitirosol obtenido de acuerdo al Ejemplo 1, se selecciona para el enriquecimiento de un aceite de oliva virgen extra. Se prepararon 3 muestras de 1000 g cada una de aceite de oliva virgen extra enriquecido preparado según el diseño experimental que se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1

Cantidad extracto oliva, μL extracto oliva/ L aceite	Presión total, bar 1ª etapa/2ª etapa	Comentarios
230	No	(Control sin homogeneizador)
230	300/30	
230	500/30	

45 El contenido de una botella de aceite de oliva virgen extra de 1 L se echó en un recipiente y se conectó la agitación. Después, se añadieron al aceite 230 microlitros de extracto de oliva en forma líquida y se mezcló con agitación moderada a 100 rpm. Tras 30 minutos se formó una pre-emulsión. La pre-emulsión se echó en la tolva de alimentación de un homogenizador operado de acuerdo a un procedimiento de homogenización de doble etapa. La homogenización de la pre-emulsión permitió la obtención de una emulsión estable.

50 Inmediatamente después, una alícuota de cada una de las 3 muestras de aceite de oliva virgen extra enriquecido se utilizó para medir la eficiencia de homogeneización con un analizador láser de tamaño de partículas, y el contenido de hidroxitirosol se evaluó por HPLC.

55 Se trazaron las curvas de distribución del tamaño de partículas (ver figura 6) y se calculó el tamaño medio de partícula. Los resultados se resumen en la Tabla 2:

Tabla 2

Muestra	[hidroxitirosol], ppm	Tamaño medio de partícula, μm
No homogeneizada	51	1,999
300/30	60	1,259
500/30	59	0,849

5 Teniendo en cuenta las curvas de distribución del tamaño de partículas (Figura 6), el tamaño medio de partícula y el contenido de hidroxitirosol (tabla 2), se puede concluir que la tecnología de homogeneización produce un rendimiento muy bueno, permitiendo la preparación de microemulsiones estables del extracto de oliva líquido en aceites, por ejemplo cuando se homogeneiza la pre-emulsión a 500/30 bares.

EJEMPLO 9

10 Preparación de cápsulas de gelatina blanda de aceite de oliva virgen extra enriquecido con extracto de oliva

Una muestra de extracto de oliva purificado en forma líquida que contiene una concentración de 35,6 % (p/p) de hidroxitirosol obtenido de acuerdo al Ejemplo 1, se selecciona para el enriquecimiento de un aceite de oliva virgen extra.

15 El contenido de una botella de aceite de oliva virgen extra de 1 L se echó en un recipiente y se conectó la agitación. Después, 4,68 g de extracto de oliva en forma líquida se añadieron al aceite y se mezclaron con agitación moderada a 100 rpm. Tras 30 minutos se formó una pre-emulsión. La pre-emulsión se echó en la tolva de alimentación de un homogenizador operado a 10 L/h y 500 bar para la primera etapa de homogenización y 30 bar para la segunda etapa de homogenización.

20 La emulsión preparada se encapsuló con una gelatina alimentaria que contenía glicerina, agua, dióxido de titanio como agente opacificante y un agente colorante. La forma de la cápsula utilizada fue oblonga. Las cápsulas se secaron durante dos días a temperatura ambiente antes de su envasado.

25 La creación y fabricación comercial de cápsulas de gelatina blanda es bien conocida en el arte, y no se describe en detalle en este documento. Las cápsulas de gelatina blanda con aceite de oliva virgen extra enriquecido con extracto de oliva obtenidas de acuerdo a la presente invención, pueden por lo tanto ser preparadas de acuerdo a ello.

EJEMPLO 10

30 Uso de aceite de oliva virgen enriquecido con extracto de oliva para la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

10.1 Animales

35 Se utilizaron 48 ratas machos Sprage Dawley (de peso aproximado 150-180 g) de Harlan Iberica interfauna, Barcelona, España, los animales permanecieron durante todo el experimento en las instalaciones del animalario de la Universidad de Murcia. Se dividieron al azar en seis grupos experimentales de 8 ratas cada uno y fueron colocados en cajas de 4 animales bajo condiciones estándar de luz (ciclos de 12 horas luz/oscuridad), humedad (60%) y temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

10.2 Dietas

Se utilizaron las siguientes dietas en el estudio:

- 45
- DIETA CONTROL (C): 97 % de dieta estándar rata (Panlab) suplementada con 3 % de aceite refinado de girasol.
 - DIETA ATEROGÉNICA (A): 95,5% de dieta estándar rata (Panlab) suplementada con 1.5 % de colesterol (Aldrich) y 3 % de manteca de cerdo para inducir la aterosclerosis.
 - ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA (aove) (O): 97% de dieta estándar rata (Panlab) suplementada con 3 % de aceite de oliva virgen extra (aove) con un contenido natural de hidroxitirosol (HT) de 5,7 mg HT/Kg aove.
- 50
- DIETA ESTÁNDAR + ALIMENTACIÓN POR Sonda (5 mg HT/ Kg peso corporal) DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA ENRIQUECIDO (G5): Dieta estándar rata (Panlab) más alimentación por sonda diariamente de aceite de oliva virgen extra enriquecido (preparado de acuerdo al ejemplo 3 de la presente invención). La cantidad precisa de aceite de oliva virgen extra enriquecido se administró mediante alimentación por sonda oral cada día para administrar a cada rata una dosis diaria de 5 mg de hidroxitirosol (HT)/ Kg de peso corporal.

- DIETA ESTÁNDAR + ALIMENTACIÓN POR Sonda (8 mg HT/ Kg peso corporal) DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA ENRIQUECIDO (G8): Dieta estándar rata (Panlab) más alimentación por sonda diariamente de aceite de oliva virgen extra enriquecido (preparado de acuerdo al ejemplo 3 de la presente invención). La cantidad precisa de aceite de oliva virgen extra enriquecido contenía 8 mg de hidroxitirosol (HT) / Kg de peso corporal y se administró mediante alimentación por sonda oral cada día para aportar a cada rata 8 mg de HT por Kg de peso corporal.

El agua de bebida y el alimento se administraron “*ad libitum*”. Durante el estudio el consumo por animal estimado de alimento fue de 30 gramos/día (el consumo real de alimento por animal se desconoce). Por otra parte, la cantidad exacta de aceite de oliva extra virgen (fortificado aove) se administró por alimentación por sonda a las ratas de los grupos G5 y G8 para suministrarles diariamente 5 y 8 mg de HT por kg de peso corporal, respectivamente. Para evitar la oxidación de las grasas, todas las dietas se prepararon diariamente mezclando las cantidades correctas de dieta estándar rata (Panlab) y aceites/grasas y se mantuvieron a 4 °C y en la oscuridad hasta su uso, y la dieta no consumida del día anterior se retiró. Las concentraciones de hidroxitirosol (HT) en las dietas O, G5 y G8 utilizadas en el estudio se cuantificaron por HPLC.

10.3 Diseño experimental

El diseño del experimento se muestra en la siguiente Tabla 3

Tabla 3

GRUPO	Día 1 a 30	Día 31 a 60	Observaciones
1	Dieta C	Dieta C	Dieta resultante: CC (dieta control)
2	Dieta A	Dieta A	Dieta resultante: AA (dieta aterogénica, control negativo)
3	Dieta A	Dieta C	Dieta resultante: AC (efecto de dieta control, después de tomar dieta aterogénica)
4	Dieta A	Dieta O	Dieta resultante: AO (efecto de dieta aove que naturalmente contiene 5,7 mg/HT/Kg, después de tomar dieta aterogénica)
5	Dieta A	Dieta G5	Dieta resultante: AG5 (efecto de dieta de aove enriquecido con HT asegurando un consumo de 5mg/HT/peso corporal, después de tomar dieta aterogénica)
6	Dieta A	Dieta G8	Dieta resultante: AG8 (efecto de dieta aove enriquecido con HT asegurando un consumo de 8mg/HT/peso corporal, después de tomar dieta aterogénica)

- Los animales tratados con las dietas CC, AA, AC, AO, AG5 y AG8 fueron alimentados de la siguiente manera:
- Los animales tratados con las dietas CC y AA fueron alimentados durante 2 meses con dieta C o A, respectivamente.
- Los animales tratados con la dieta AC fueron alimentados el primer mes con dieta A (dieta aterogénica, control negativo) y el mes siguiente con dieta C (solo dieta estándar rata Panlab fue suministrada sin adición alguna de aceite de girasol).
- Los animales tratados con la dieta AO fueron alimentados el primer mes con dieta A (dieta aterogénica, control negativo) y el mes siguiente con dieta O (aove que naturalmente contiene 5,7 mg/HT/Kg).
- Los animales tratados con la dieta G5 fueron alimentados el primer mes con dieta aterogénica (dieta aterogénica, control negativo) y el mes siguiente con dieta G5 (dieta aove enriquecido con HT asegurando un consumo de 5mg/HT/peso corporal) suministrada por alimentación por sonda.
- Los animales tratados con la dieta G8 fueron alimentados el primer mes con dieta aterogénica (dieta aterogénica, control negativo) y el mes siguiente con dieta G8 (dieta aove enriquecido con HT asegurando un consumo de 8mg/HT/peso corporal) suministrada por alimentación por sonda.
- Al finalizar el experimento los animales permanecieron en ayuno, fueron anestesiados e inmediatamente después de la eutanasia se le extrajo la sangre por punción cardiaca. El plasma se separó por centrifugación para su análisis.

10.4 Determinación de lípidos y capacidad antioxidante en plasma (CAP)

La concentración plasmática de colesterol total (CT), HDL colesterol (HDL-C) y triglicéridos (TG) se cuantificó colorimétricamente usando un kit de la empresa Biosystems (Barcelona, España), según las instrucciones del fabricante.

La CAP se cuantificó de acuerdo a lo descrito por Re y otros (1999) usando Trolox como estándar. La muestra de plasma se diluyó con PBS, se adicionaron 20 µl de plasma a 980 µl de radical ABTS+ (ácido 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurridos los 10 minutos se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 734 nm. La solución madre de catión ABTS+ se preparó mezclando 440 µl de persulfato de potasio a 25 ml de una solución de ABTS (Sigma A-1808) 7 mM en agua ultra pura y se incubó 12-14 horas en la oscuridad. Para realizar las determinaciones se diluyó la solución madre en PBS hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 ± 0.02 a 734 nm.

10.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el test de ANOVA de una vía y expresados como la media \pm desviación estándar (S.E.M). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por el test de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor P fue menor que 0.05. Los datos fueron analizados utilizando el programa Sigma Stat (Versión 2.03).

10.6 Discusión

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras adjuntas 7 a 9, donde los niveles de triglicéridos, índice aterogénico y la capacidad antioxidante total (CAT) se han correlacionado con los diferentes grupos de animales.

En la Figura 7 se observa la correlación entre los niveles de triglicéridos y los diferentes animales, divididos según los diferentes esquemas de dietas. De acuerdo a dicha figura, el grupo 1 de animales tratados con la dieta CC (dieta de control) muestra los niveles más bajos de triglicéridos, mientras que el grupo 2 de animales, tratados con dieta AA (dieta aterogénica, control negativo) muestra el mayor valor de triglicéridos, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre los grupos 1 y 2, con un valor de $P < 0,001$. Un resultado interesante se muestra entre los tratamientos de los animales de los grupos 5 y 6, que fueron tratados con las dietas G5 y G8, respectivamente. Los valores de triglicéridos muestran que, incluso en aquellos animales alimentados con una dieta aterogénica durante el primer mes, en el mes subsiguiente de tratamiento, donde fueron alimentados con una dieta estándar más alimentación por sonda de aceite de oliva virgen extra enriquecido según la presente invención, no se observa diferencia estadísticamente significativa en los niveles de triglicéridos entre los grupos 5 y 1 ó 6 y 1. En otras palabras, después del mes de tratamiento con la dieta aterogénica se observó en los grupos de animales que tomaron las dietas G5 y el G8 una reducción significativa de los niveles de triglicéridos hasta unos valores comparables con el nivel de triglicéridos obtenido con la dieta control. El mismo efecto no se observó cuando sólo aceite de oliva virgen extra (aove) fue suministrado a los animales, además de una dieta estándar en el mes siguiente al mes de tratamiento con la dieta aterogénica (animales del grupo 4). En este caso, el nivel de triglicéridos (aunque más bajo que el del grupo control negativo, 2), resultó en una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los niveles de triglicéridos detectados en los animales alimentados con la dieta de control (grupo 1) con un valor $P < 0,001$. Además, fueron detectadas diferencias estadísticamente significativas en el nivel de triglicéridos entre los grupos 3 y 1, con un valor $P < 0,001$, lo que significa que el efecto del aceite de oliva no enriquecido (grupo 4) no son significativamente mejores que los de una dieta normal, después de un mes de dieta aterogénica (grupo 3).

En la Figura 8 se observa la correlación entre el índice aterogénico y los diferentes animales, divididos según los diferentes esquemas de dieta. Como se puede apreciar en la figura, los animales del grupo 1 tratados con dieta CC (dieta de control) muestran el valor más bajo de índice aterogénico, mientras que los animales del grupo 2, tratados con dieta AA (dieta aterogénica control negativo) muestran el mayor, siendo estadísticamente significativa la diferencia de los valores del índice aterogénico entre los grupos 1 y 2, con un valor $P < 0,001$. Un resultado interesante se muestra con los grupos de animales 5 y 6, que fueron tratados con las dietas G5 y G8, respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa del valor del índice aterogénico entre los grupos 5 y 1 o 6 y 1. En otras palabras, después del mes de tratamiento con la dieta aterogénica se observó una reducción significativa del valor del índice aterogénico en los animales de los grupos G5 y el G8 hasta valores comparables con el valor del índice aterogénico obtenido en los animales que siguieron la dieta control. Por el contrario, el mismo efecto no se observó cuando sólo aceite de oliva virgen extra (aove), fue suministrado a los animales, además de una dieta estándar en el mes siguiente al mes de tratamiento con la dieta aterogénica (animales del grupo 4). En este caso, el valor índice aterogénico (aunque estadísticamente significativa la diferencia con los del grupo control negativo, 2), se tradujo en una diferencia estadísticamente significativa en relación con el valor del índice aterogénico detectado en los animales alimentados con la dieta de control (grupo 1) con un valor $P < 0,05$. Los niveles de índice aterogénico derivados de los animales de los grupos 5 y 6 sugieren un posible efecto sinérgico debido al aceite de oliva virgen extra enriquecido según la presente invención.

En la Figura 9 se muestra la correlación entre los valores plasmáticos de CAT y los diferentes animales, divididos según los diferentes esquemas de dietas. Como se puede ver en la figura, los animales de los grupos 5 y 6 muestran la mayor capacidad antioxidante total, siendo estadísticamente significativa la diferencia del valor de CAT entre los grupos 5 y 1 (valor de $P < 0,001$) y 6 y 1 (valor de $P < 0,001$). Este resultado confirma una vez más que los productos nutricionales enriquecidos con hidroxitirosol (aceites y alimentos que contienen un aceite enriquecidos de acuerdo a la presente

invención), y particularmente el aceite de oliva virgen extra enriquecido, presenta varias ventajas y se pueden utilizar en la protección del sistema cardiovascular.

De hecho, los niveles de colesterol y triglicéridos elevados, niveles bajos de colesterol HDL y los niveles elevados de LDL oxidado son factores de riesgo asociados con la placa aterosclerótica que se acumula en las arterias y el síndrome metabólico. Resumiendo los resultados anteriores, se realizaron estudios sobre el efecto que un producto alimenticio enriquecido con un extracto de oliva tiene sobre biomarcadores de eventos cardiovasculares, y los resultados obtenidos se compararon con los resultados obtenidos con productos alimenticios similares sin enriquecimiento con extracto de oliva según la presente invención. Teniendo en cuenta todos los parámetros medidos (ver las figuras 7 a 9), se puede concluir que los componentes del producto alimenticio enriquecido (que contiene el extracto de oliva) muestran un efecto sinérgico. También se puede concluir que la administración regular del producto alimenticio enriquecido (que contiene el extracto de oliva según la presente invención) protege el sistema cardiovascular lo cual, en mayor o menor medida, impide la aparición de eventos cardiovasculares adversos y por lo tanto puede ser considerado como un producto alimenticio con beneficios saludables para la salud.

15 EJEMPLO 11

Uso de aceite de oliva extra virgen (aove) enriquecido con el extracto de oliva según la invención) en el tratamiento de la hipertensión.

20 11.1. Animales

Treinta seis ratas macho Sprage Dawley (de aproximadamente 200 gramos de peso al principio del experimento) que se obtuvieron de Harlan Interfauna Iberica SA (Barcelona, España) y mantenidas durante todo el experimento en las instalaciones del servicio de animales de la Universidad de Murcia. Los animales fueron distribuidos al azar en seis grupos experimentales de 6 ratas cada uno, alojados bajo condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 h), temperatura (22±2 °C) y humedad (60%).

11.2. Dieta

30 Durante el período de aclimatación y los períodos experimentales, las ratas fueron alimentadas con dieta sólida estándar para ratas (Panlab). El Agua y la comida fueron proporcionadas *ad libitum*. Después de un período de aclimatación de 7 días, se comenzaron los tratamientos de acuerdo al diseño experimental.

35 11.3. Diseño experimental

Para determinar el efecto del aceite de oliva virgen extra enriquecido (aove añadido con el extracto de oliva de acuerdo a la presente invención) se usó el modelo de hipertensión inducido L-NAME (N-nitro-L-arginine-methylester). Después del período de aclimatación, pero antes del comienzo del tratamiento de hipertensión inducido por L-NAME, se realizaron mediciones basales (D0) de la presión arterial sistólica usando un equipo Letica 5002.

40 Los animales se trataron de acuerdo a un diseño experimental como se muestra en la siguiente tabla 4:

Tabla 4

GRUPO	AGUA CON L-NAME	ALIMENTACIÓN POR Sonda	OBSERVACIONES
1	No	No	Sin hipertensión inducida
2	40 mg/L-NAME/Kg*	No	Hipertensión inducida (control negativo)
3	40 mg/L-NAME/Kg*	0,2 ml de aceite de oliva virgen extra (aove)	Hipertensión inducida con administración paralela de aceite de oliva virgen extra (aove) que contiene naturalmente 5,7 ppm de HT/Kg aove
4	40 mg/L-NAME/Kg*	0,2 ml de aove enriquecida que fue añadida al extracto de oliva de la invención, resultando en una dosis diaria de 5mg/HT/Kg peso corporal	Hipertensión inducida con administración paralela de aove, que resulta en una dosis diaria de 5mg/Kg peso corporal de HT.
5	40 mg/L-NAME/Kg*	0,2 ml de aove enriquecida que fue	Hipertensión inducida con administración en

		añadida al extracto de oliva de la invención, resultando en una dosis diaria de 8mg/HT/Kg peso corporal	paralelo de aove fortificada, que resulta en una dosis diaria de 8mg/HT/Kg peso corporal.
6	40 mg/L-NAME/Kg*	100 mg Captopril/Kg	Control positivo: Hipertensión inducida en paralelo con la administración de 100 mg de Captopril (agente hipotensor)

*: El tratamiento con L-NAME fue administrado a todos los grupos a través de la toma de agua *ad libitum*, tomando en consideración un peso de 200 g por animal y estandarizando el suministro medio de agua a 40 mL/por día por animal (la toma real de agua mineral por animal se desconoce).

5

11.4. Cronograma de actividades

Para conseguir que las ratas se acostumbraran, se realizaron mediciones de la presión arterial utilizando la grabación de pulsaciones de la arteria de la cola con un equipo Letica 5002, durante el período de aclimatación.

10

El cronograma de mediciones/tratamientos experimentales se resumen en la siguiente tabla 5:

Tabla 5

Día	Mediciones de la Presión Arterial sistólica	Agua suplementada con L-NAME	Alimentación por sonda
0	Si	Si	No
1	No	Si	Si
2	Si	Si	Si
3	No	Si	Si
4	Si	Si	Si
5	No	Si	Si
6	No	Si	Si
7	Si	Si	Si

15

11.5. Determinación de la presión arterial sistólica.

La presión arterial fue medida con una periodicidad de acuerdo al cronograma de arriba, mediante el método de la cola. Antes de la medición, las ratas fueron expuestas a 37 °C durante 10 minutos para hacer que se detectaran las pulsaciones de la arteria de la cola. El equipo usado en este estudio, LE 5002 (Letica, Hospitalet, Barcelona, España), tiene un transductor de pulsaciones de alta sensibilidad sumado a un preciso programa microprocesador, y permite mediciones precisas de la presión arterial. Las mediciones de la presión arterial se desarrollaron en el mismo momento del día para evitar cualquier influencia del ciclo circadiano.

20

25

11.6. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media ± error estándar (S.E.M.), y fueron analizados utilizando el programa Sigma Stat (Versión 2.03).

30

11.7. Discusión.

La figura 10 muestra la correlación entre los valores detectados de presión arterial y los animales, divididos de acuerdo a los diferentes esquemas de tratamiento. De acuerdo a dicha figura, el grupo 1 no muestra hipertensión, mientras que el grupo 2 mostró valores de presión arterial altos y crecientes, inducido por el tratamiento L-NAME. El grupo 6 (control positivo) al unísono con la inducción de hipertensión L-NAME, se trató con Captopril, un conocido y altamente eficiente regulador de la presión arterial, y mostró una reducción significativa de los valores de presión arterial. El grupo 3, al unísono con la inducción de hipertensión L-NAME, fue tratado con aceite de oliva extra virgen (aove) mientras que los grupos 4 y 5, al unísono con la inducción de hipertensión L-NAME, fueron tratados con aceite de oliva virgen extra fortalecido (aove fortalecido). Los niveles de presión arterial de los grupos 4 y 5 fueron más bajos de manera significativa que los niveles de presión arterial del grupo 3, de este modo resultando en una acción mejor sobre la hipertensión explotada por el aceite de oliva virgen extra de acuerdo a la presente invención con respecto a la acción observada por el aove no enriquecido.

40

Los resultados arriba indicados son muy interesantes, ya que la hipertensión arterial está entre los factores de riesgo asociados con la placa aterosclerótica y el síndrome metabólico. El efecto que el aceite de oliva virgen extra

5 enriquecido según la presente invención tiene sobre la presión arterial ha sido estudiado, y comparado con grupos control que no recibieron el tratamiento con extracto de oliva. Teniendo en cuenta las mediciones de la presión arterial sistólica (figura 10), se puede concluir que el extracto de oliva, y la administración regular del producto nutricional que contiene extracto de oliva según la presente invención, muestra actividad antihipertensiva que, en mayor o menor grado, previene la aparición de acontecimientos cardiovasculares. El producto nutricional que contiene extracto de oliva de acuerdo a esta invención, puede ser bien considerado como un suplemento de dieta para mejorar la salud y puede ser una estrategia exitosa para producir alimentos funcionales, como el aceite de oliva virgen extra enriquecido con actividad antihipertensiva.

10 EJEMPLO 12

Uso del extracto de oliva rico en hidroxitirosol altamente puro en la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

15 12.1. Animales

Treinta y dos ratas macho Sprage Dawley (de peso aprox. 150-180 g) se obtuvieron de Harlan Interfauna Iberica SA (Barcelona, España) y se mantuvieron durante todo el experimento en las instalaciones del servicio de animales de la Universidad de Murcia. Los animales fueron distribuidos al azar en cuatro grupos experimentales de 8 ratas cada uno, y cada subgrupo de 4 ratas alojados bajo condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 h), temperatura (22±2 °C) y humedad (60%).

12.2. Dietas

25 Las dietas usadas en este estudio fueron las siguientes:

- DIETA CONTROL (C): 97 % de dieta estándar rata (Panlab) suplementada con 3 % de aceite refinado de girasol.
- DIETA ATEROGÉNICA (A): 95,5% de dieta estándar rata (Panlab) suplementada con 1.5 % de colesterol (Aldrich) y 3 % de manteca de cerdo para inducir la aterosclerosis.
- DIETA ATEROGÉNICA + ALIMENTACIÓN POR Sonda (8 mg HT / Kg (peso corporal) DE HIDROXITIRO SOL (A-G8): 95,5% de dieta estándar rata (Panlab) suplementada con 1.5 % de colesterol (Aldrich) y 3 % de manteca de cerdo para inducir la aterosclerosis más extracto con hidroxitirosol (8 mg de hidroxitirosol/kg por peso corporal) que se administró por alimentación por sonda cada día para suministrar a cada rata 8 mg de hidroxitirosol (HT)/kg de peso corporal.

El agua de bebida y el alimento se administraron "ad libitum". Durante el estudio el consumo por animal estimado de alimento fue de 30 gramos/día (el consumo real de alimento por animal se desconoce).

Para evitar la oxidación de la grasa, todas las dietas fueron preparadas diariamente mezclando las cantidades correctas de la dieta de rata estándar (Panlab) y grasas/aceites y se mantuvieron a 4°C y en la oscuridad hasta su uso, y la dieta no consumida del día anterior se eliminó.

45 Las concentraciones de hidroxitirosol (HT) en la dieta A-G8 usadas en el estudio fueron medidas por HPLC.

12.3. Diseño experimental

El diseño experimental se muestra en la siguiente tabla 6:

Tabla 6

Grupo	Del día 1 al 30	Del día 31 al 60	Comentarios
1	Dieta C	Dieta C	Dieta resultante: CC (Dieta control)
2	Dieta A	Dieta A	Dieta resultante: AA; (Dieta aterogénica - control negativo)
3	Dieta A	Dieta C	Dieta resultante: AC; (efecto de la dieta de control posterior a una dieta aterogénica)
4	Diet A-G8	Diet A-G8	Dieta resultante: AG8-AG8; (efecto del HT 8 mg/kg peso corporal simultáneamente a una dieta aterogénica)

Los grupos de animales tratados con las dietas CC, AA, AC, y s A-G8 fueron alimentados tal como se describe a continuación.

55

Los grupos de animales tratados con dietas CC y AA, fueron alimentados durante 2 meses con la dieta C o A respectivamente.

5 El grupo de animales tratado con dieta AC fue alimentado durante 1 mes con la dieta A (dieta aterogénica, control negativo) seguido de otro mes con dieta C (donde sólo se dio dieta de rata estándar (Panlab) sin adición de aceite de girasol).

10 El grupo de animales tratado con dieta AG8-AG8 fue alimentado durante 2 meses con la dieta A-G8 (dieta aterogénica más alimentación por sonda diaria de 8 mg HT/kg de peso corporal)

15 Al finalizar el experimento los animales permanecieron en ayuno, fueron anestesiados e inmediatamente después de la eutanasia se le extrajo la sangre por punción cardiaca. El plasma se separó por centrifugación para su análisis.

12.4. Análisis estadístico

15 Los datos fueron analizados utilizando el test de ANOVA de una vía y expresados como la media \pm desviación estándar (S.E.M). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas por el test de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor P fue menor que 0.05. Los datos fueron analizados utilizando el programa Sigma Stat (Versión 2.03).

12.5. Discusión.

25 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11 adjunta, donde se observa la correlación entre el índice aterogénico y los diferentes grupos de animales, que como se ha mencionado, se indican en la Tabla 6.

30 La figura 11 muestra la correlación entre el índice aterogénico y los animales, divididos según los diferentes esquemas de dieta. Como se puede apreciar en la figura, los animales del grupo 1 tratados con dieta CC (dieta de control) muestran el valor más bajo de índice aterogénico, mientras que los animales del grupo 2, tratados con dieta AA (dieta aterogénica control negativo) muestran el mayor, siendo estadísticamente significativa la diferencia de los valores del índice aterogénico entre los grupos 1 y 2, con un valor $P < 0,001$. Un resultado interesante se muestra para los animales del grupo 4, que en este experimento, fueron tratados con la dieta A-G8. No se ha observado diferencia estadística significativa en el valor de índice aterogénico entre el grupo 4 y 1. En otras palabras, tras dos meses de tratamiento con la dieta aterogénica más un suplemento de extracto de oliva rico en hidroxitirosol, se observó para los grupos de animales A-G8 un valor de índice aterogénico inalterado que es comparable al nivel obtenido con la dieta control. Por el contrario, el mismo efecto no se observó cuando sólo una dieta estándar de rata, fue suministrado a los animales del grupo 3, en el mes siguiente al mes de tratamiento con la dieta aterogénica (animales del grupo 3). En este caso, el valor de índice aterogénico (incluso siendo estadísticamente significativa la diferencia con el valor obtenido para los animales del grupo 2), resultó en una diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor de índice aterogénico obtenido para los animales alimentados con la dieta de control (grupo 1) con un valor $P < 0,05$. El valor de índice aterogénico derivado de grupo de animales 4 sugiere un efecto preventivo debido al extracto de oliva rico en hidroxitirosol obtenido según la presente invención.

45 Tomando todos los parámetros de medida en cuenta, se puede concluir que la administración regular del extracto de oliva según la presente invención, protege el sistema cardiovascular lo cual, en mayor o menor medida, previene la aparición de algunos factores de riesgo que se consideran asociados con la formación de plaquetas en las arterias y el síndrome metabólico, y por tanto, bien puede ser considerado un extracto natural promotor de la salud, para ser usado en la preparación de complementos alimenticios.

50 Como se ha mencionado previamente, el aceite comestible de la invención mantiene las propiedades organolépticas, es decir, no hay incremento del índice de amargor y de los subproductos de la hidrólisis de polifenoles complejos (por ejemplo oleuropeína, que es un éster de hidroxitirosol) tales como la oleuropeína aglicona (ej: forma aldehídica oleuropeína aglicona, AOA) y azúcares (como la glucosa, que es el azúcar presente en la oleuropeína).

55 A continuación se explican resumidamente los tests de calidad llevados a cabo en aceites, y en particular en aceites de oliva.

1) Acidez

60 La acidez expresa el contenido (como porcentaje en peso) de los ácidos grasos libres en el aceite bajo estudio. Los ácidos grasos libres están normalmente presentes también en aceites obtenidos de aceitunas en buenas condiciones: cuando se forman los triglicéridos, hay un aumento progresivo de acidez debido a la acción de enzimas (lipasa) presentes de forma natural en la fruta, que catalizan la liberación de los ácidos grasos desde la molécula del triglicérido (lipólisis). El mismo fenómeno lipótico puede ser causado por enzimas producidas por microorganismos que crecen en la fruta. Por ello, para obtener un producto que sea organolépticamente mejor y que tenga menos acidez, es necesario preservar las olivas correctamente durante su almacenamiento.

2) El valor de peróxido.

El contenido de peróxidos en el aceite bajo estudio se expresa como el valor peróxido. Cuanto mayor sea el valor, mayor es la degradación debido a la oxidación del aceite. En su ciclo, los peróxidos están sujetos a una mayor oxidación que incrementa la formación de otros compuestos que son determinables de varias formas (aldehídos, cetonas, etc.) Estos compuestos, llamados compuestos de oxidación secundaria, son responsables del enranciamiento del aceite. Debido a la oxidación y a las enzimas presentes en el tejido de la fruta (lipoxigenasas), una cierta concentración de peróxidos está ya presente en la fruta antes de prensarla. Circunstancias naturales particulares (como temperaturas bajo cero, infestaciones por mosca del olivo, sequía, etc.) u olivas mal cosechadas y conservadas pueden favorecer una mayor formación de peróxidos. Incluso durante la molturación los peróxidos pueden aumentar considerablemente debido a un mal procesamiento o debido a una limpieza incorrecta en la prensa de la oliva y/o los depósitos. Finalmente, la exposición prolongada del aceite a la luz o fuentes de calor es otra causa del incremento de peróxidos. Los peróxidos se determinan mediante titración.

3) Investigación espectrofotométrica en ultravioleta.

Este test consiste en medir tres parámetros (K232, K270, ΔK) determinados durante el mismo procedimiento analítico. Cuando mayor es el valor de K232, mayor es la concentración de dienos conjugados, mientras K270 es proporcional a la concentración de trienos conjugados. Sin embargo, los compuestos de oxidación de los dienos conjugados contribuye a K232 mientras que los compuestos de oxidación secundaria (aldehídos, cetonas, etc.) contribuyen a K270.

Es por este motivo que si el valor de K270 excede del límite de la categoría al que se cree que pertenece el aceite, las regulaciones EC proveen un pretratamiento particular de la muestra (con alúmina) antes de un segundo test espectrofotométrico. Si el nuevo valor excede ese límite, el aceite debe ser declarado no puro.

4) Amargor.

Este test se lleva a cabo según Gutiérrez y otros, J.Am.Oil.Chem.Soc. 1992, 69(4), 394-395, que encontraron una correlación lineal entre la absorción a 225 nm (test K225) y el sabor amargo del aceite.

La experiencia ha demostrado que pueden surgir problemas del consumo directo de aceite cuando el valor K225 excede de 0.300 o más. Además, los valores de K225 del orden de 0.360 o superiores corresponden a aceites bastante amargos que son rechazados por la mayoría de consumidores.

EJEMPLO 13

Ejemplo comparativo: preparación de aceite de oliva virgen extra enriquecido con diferentes fuentes de polifenoles de oliva.

Con propósitos comparativos, una muestra de extracto de oliva purificado obtenido con un proceso según el ejemplo 1 y muestras comerciales de extracto de oliva de hoja de olivo y de aguas de vegetación fueron seleccionados para enriquecer un aceite de oliva virgen extra. Las especificaciones de cada extracto se muestran en la siguiente Tabla C1:

Tabla C1.

Extracto	[HT], %	[oleuropeína], %	Pureza HT (por HPLC 280nm)	Disolventes orgánicos residuales, ppm.
Extracto de oliva purificado (según Ej.1)	34,5	N.D.	93,4	N.D.
Extracto de hoja de olivo	0,4	35,6	5,2	Etanol: 156 ppm
Extracto de agua de vegetación de almazara	2,5	0,2	51,3	Acetona 105 ppm

N.D.: no detectada

Se compró en el supermercado una botella de 3 L de aceite de oliva virgen extra (Hojiblanca) y fue utilizado para las diferentes pruebas.

4 muestras, de 500 ml cada una, del citado aceite de oliva virgen extra fueron vertidas en vasos de cristal. Los diferentes extractos fueron añadidos según la Tabla C2:

Tabla C2.

Extracto	Peso del extracto añadido, g	Incremento teórico máximo de [HT] en el aceite, ppm.
A) Extracto de oliva purificado (según Ej.1)	0,1	69
B) Extracto de hoja de olivo	20	160
C) Extracto de agua de vegetación de almazara	20	1000
D) No adición de extracto (control)	-	-

Entonces, cada test A, B, C y D fue llevado a cabo como sigue:

5

A) Se añadió 0.11 g de extracto de oliva purificado líquido (según ejemplo 1) a 500 ml de muestra de aceite de oliva virgen extra y se mezcló suavemente a 100 rpm. A los 30 minutos se ha formado una pre-emulsión. La pre-emulsión es introducida en la tolva de alimentación del homogeneizador operado según un proceso de homogeneización en dos etapas. La homogeneización de la pre-emulsión, operada a una presión de 300/30, bar para la 1ª etapa/ 2ª etapa respectivamente permite obtener una emulsión estable.

10

B) 20 g de extracto de hoja de olivo se añadieron a 500 ml de la muestra de aceite de oliva virgen extra y se agitó magnéticamente durante 2 h a 60° (para comparar con Ej. Comparativo 1 de IT1326553). Tras completarse el tratamiento de calor, la muestra tiene un color verde oscuro y todavía contiene mucho material sólido. Entonces, el sólido es decantado y el aceite enfriado a temperatura ambiente, finalmente la muestra es centrifugada para quitar los sólidos.

15

C) 20 g de extracto de agua de vegetación de almazara se añadieron a la muestra de 500 ml de aceite de oliva virgen extra y se agitó magnéticamente durante 2 h a 60° (para comparar con Ej. Comparativo 3 de IT1326553). Tras completarse el tratamiento de calor, la muestra todavía contiene mucho material sólido. Entonces, el sólido es decantado y el aceite enfriado a temperatura ambiente, finalmente la muestra es centrifugada para quitar los sólidos.

20

Más adelante, una parte de cada una de las 4 muestras, 3 muestras de aceite de oliva virgen extra enriquecido (muestras A, B y C) y 1 alícuota de control de aceite de oliva virgen extra (muestra D), se utilizaron para medir el índice de amargor (K225), medido según Gutiérrez y otros, J.Am.Oil.Chem.Soc. 1992, 69(4), 394-395, y el contenido de hidroxitirosol y oleuropeína por HPLC. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla C3:

25

Tabla C3

Extracto	K225	[HT] en el aceite, ppm.	[oleuropeína] en el aceite, ppm.	Rendimiento de incorporación de HT en el aceite, %
A) Extracto de oliva purificado (según Ej.1)	0,24	71	N.D.	92,8
B) Extracto de hoja de olivo	0,35	28	10	13,1
C) Extracto de agua de vegetación de almazara	0,32	38	1	3,1
D) No adición de extracto (control)	0,25	7	N.D.	-

30

El test preliminar referido a la tabla anterior mostró que la fuente y pureza del extracto de oliva es crítico para aumentar el nivel de hidroxitirosol al tiempo que para evitar la alteración de las propiedades organolépticas del aceite, causando un sabor no placentero debido a un excesivo amargor y/o astringencia.

Es más, el uso de extractos de hojas de olivo y agua de vegetación de almazara y el uso de las técnicas arriba mencionadas (calentar a 60° durante 2 h) según el IT patente 1326553, son demasiado duras, técnicamente complejas y no prácticas (mucho extracto sólido permanece en el aceite tras el tratamiento) o no es económicamente viable (muy poco contenido de hidroxitirosol incorporado al aceite de oliva) para el campo alimentario. Además, la cantidad de hidroxitirosol incorporado en el aceite vegetal es muy baja para una protección efectiva de LDL contra la modificación oxidativa en un grado importante.

40

EJEMPLO 14

Ejemplo comparativo: determinación de propiedades organolépticas de aceites comestibles enriquecidos con diferentes extractos.

45

Las muestras A-C y el control según el ejemplo 13 fueron testados para las siguientes propiedades de calidad,

resumidas en la Tabla C4

Tabla C4.

Extracto	Acidez libre, como % ácido oleico NMT 0.8 %	Índice peróxido, como meq O ₂ /Kg NMT 20.	K270, NMT 0,22.	K232, NMT 2,5.
A) Extracto de oliva purificado (según Ej.1)	0,22	7	0,17	1,76
B) Extracto de hoja de olivo	0,35	9,5	0,27	2,13
C) Extracto de agua de vegetación de almazara	0,40	7,9	0,18	1,91
D) No adición de extracto (control)	0,22	7,2	0,15	1,85

- 5 Se encontraron cambios en parámetros de calidad, tales como, valores de acidez libre, valor peróxido, K270 y K232. El valor K270 de 0.27 para el aceite de oliva enriquecido con extractos de hoja de olivo es muy alto y excede el valor máximo aceptado para aceites de oliva virgen extra según la Comisión de Regulación (EC) No 702/2007 de 21 de junio de 2007.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un producto nutricional, que es un aceite comestible que tiene un valor K225 de 0.28 o menos, medido según Gutiérrez y otros, J.Am.Oil.Chem.Soc. 1992, 69(4), 394-395, caracterizado por que tiene un contenido de al menos 30 ppm de hidroxitirosol y un contenido de forma aldehídica de la oleuropeína aglicona de menos de 120 ppm.
2. Un producto nutricional según la reivindicación 1 que contiene de 30 ppm a 300 ppm de hidroxitirosol, preferiblemente de 50 ppm a 60 ppm de hidroxitirosol.
- 10 3. Un producto nutricional según la reivindicación 1 que contiene de 300 ppm a 30000 ppm de hidroxitirosol.
- 15 4. Un producto nutricional según las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho aceite es un aceite vegetal preferiblemente seleccionado entre aceite de oliva virgen, aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva, aceite de oliva lampante, aceite de oliva refinado, aceite de orujo de oliva crudo, aceite de orujo de oliva refinado, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de semilla de lino, aceite de almendra, aceite de canola, aceite de cártamo, aceite de palma, aceite de coco, aceite de colza, derivados tecnológicamente modificados de los aceites anteriormente mencionados o mezclas de dos o más de los mismos.
- 20 5. Un producto nutricional según las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho aceite es un aceite marino o de pescado preferiblemente obtenido de varias fuentes tales como algas, krill, lacha, anchoa, atún, arenque, sardina, caballa o bacalao, derivados tecnológicamente modificados de los aceites anteriormente mencionados o mezclas de dos o más de los mismos.
- 25 6. Un producto nutricional, que es un alimento conteniendo un aceite comestible según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y que contiene de 30 ppm a 300 ppm de hidroxitirosol.
7. Un producto nutricional según la reivindicación 6 seleccionado entre margarina, mayonesa, salsa alioli, gazpacho andaluz, salsas para untar, aliños para ensalada.
- 30 8. Un producto nutricional, que es un complemento alimenticio, en la forma de una cápsula de gelatina blanda que encapsula un aceite comestible según la reivindicación 3.
- 35 9. Un producto nutricional según las reivindicaciones 1 a 8 para la prevención o tratamiento de enfermedades cardiovasculares.
- 40 10. Un producto nutricional según las reivindicaciones 1 a 8 para la prevención o tratamiento de la formación de plaquetas en las arterias.
- 45 11. Un producto nutricional según las reivindicaciones 1 a 8 para la prevención o tratamiento del síndrome metabólico.
12. Un producto nutricional según las reivindicaciones 1 a 8 para la prevención o tratamiento de la hipertensión arterial.
13. Un proceso para preparar un producto nutricional según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende mezclar una solución acuosa conteniendo hidroxitirosol con dicho aceite y decantar la fase acuosa, opcionalmente en presencia de emulsificantes y opcionalmente llevando a cabo una homogenización.
- 50 14. Un proceso según la reivindicación 13, caracterizado porque dicha homogenización es llevada a cabo en una primera etapa y en una segunda etapa, siendo llevada a cabo dicha primera etapa a una presión entre 200 y 700 bar y dicha segunda etapa siendo llevada a cabo a una presión entre 30 y 50 bar, preferiblemente dicha primera etapa es llevada a cabo a una presión entre 300 y 500 bar y dicha segunda etapa es llevada a cabo a una presión de 30-35 bar.

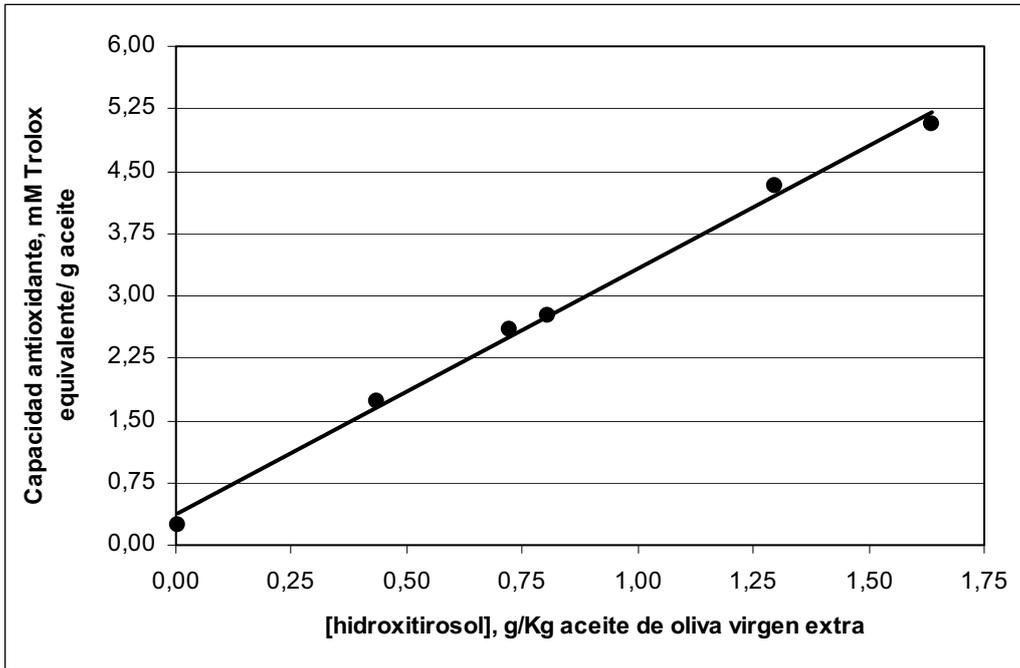


FIG.1

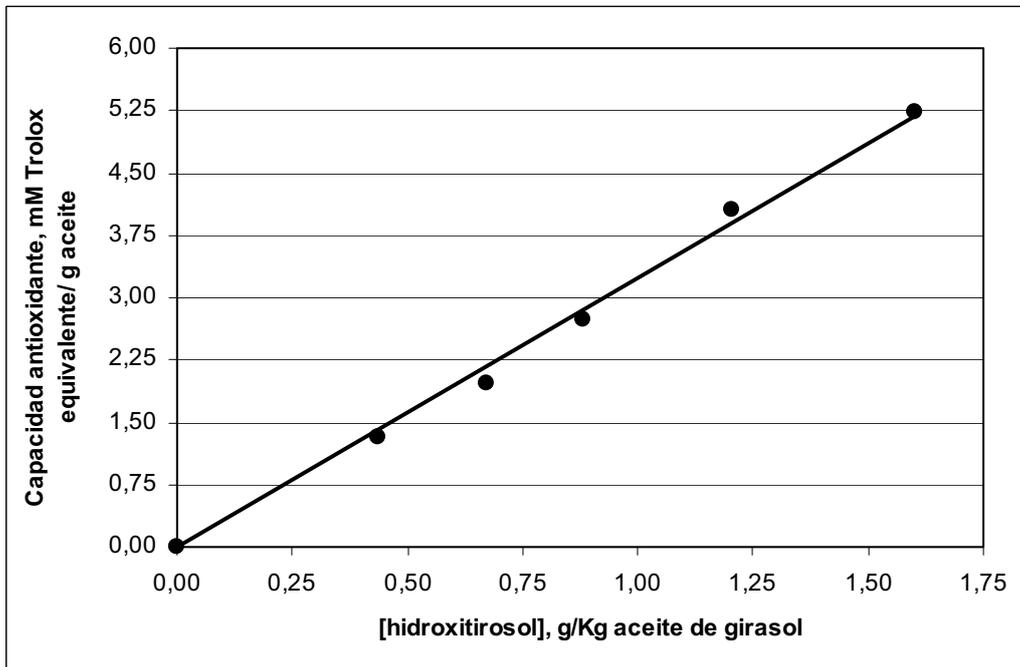


FIG.2

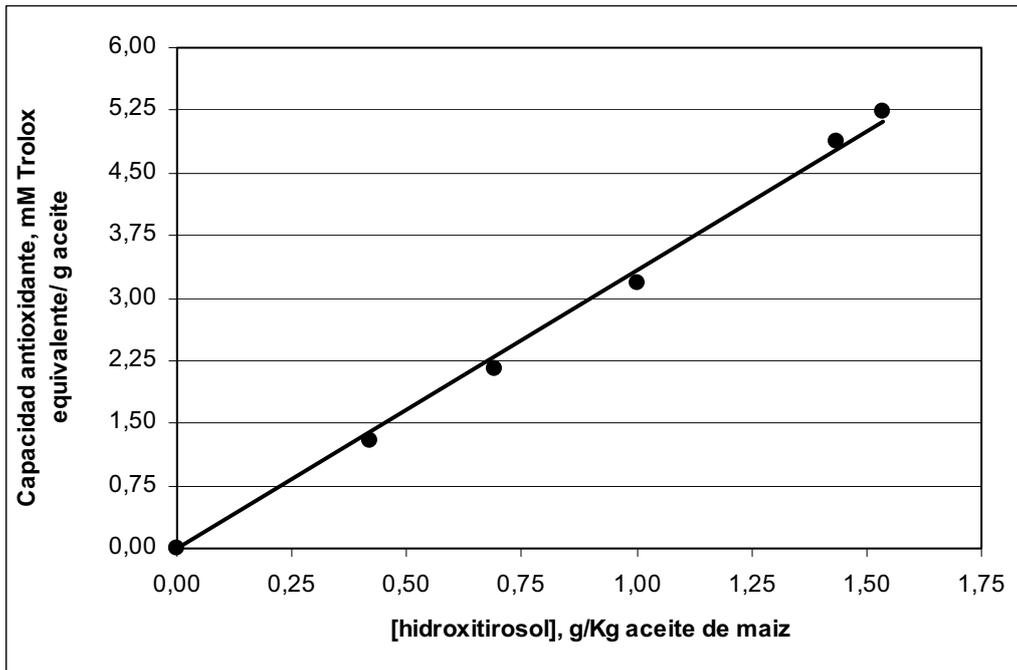


FIG.3

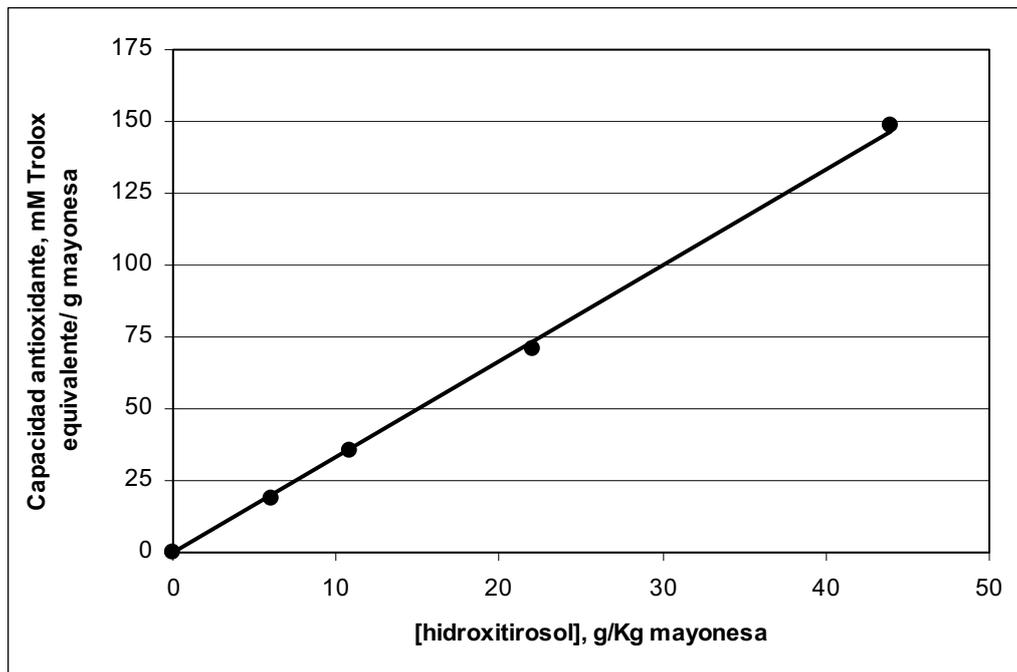


FIG.4

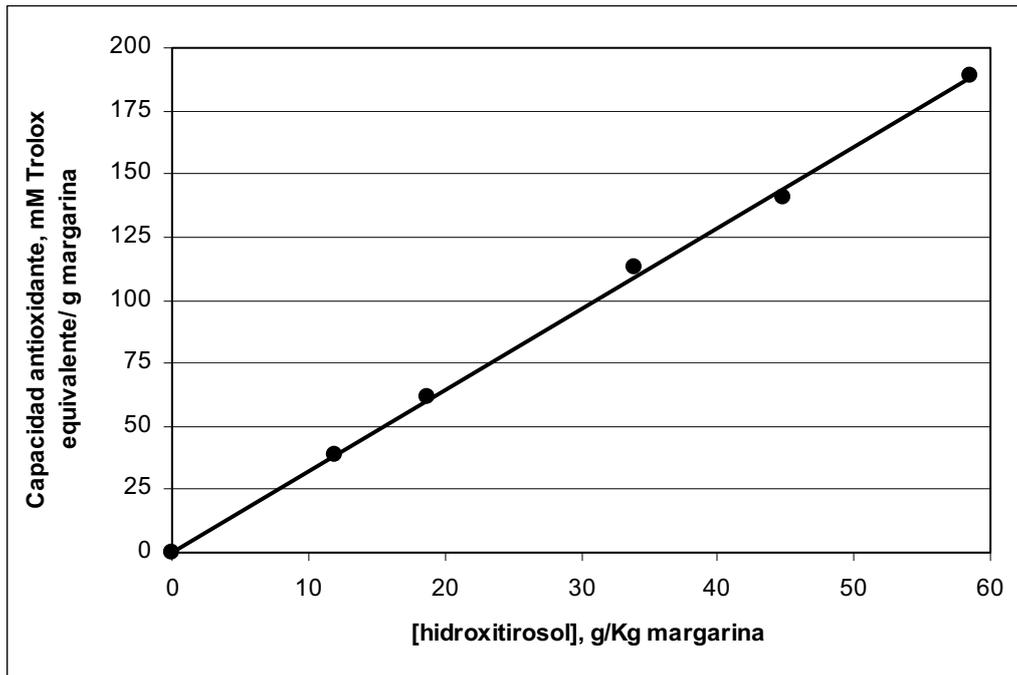


FIG.5

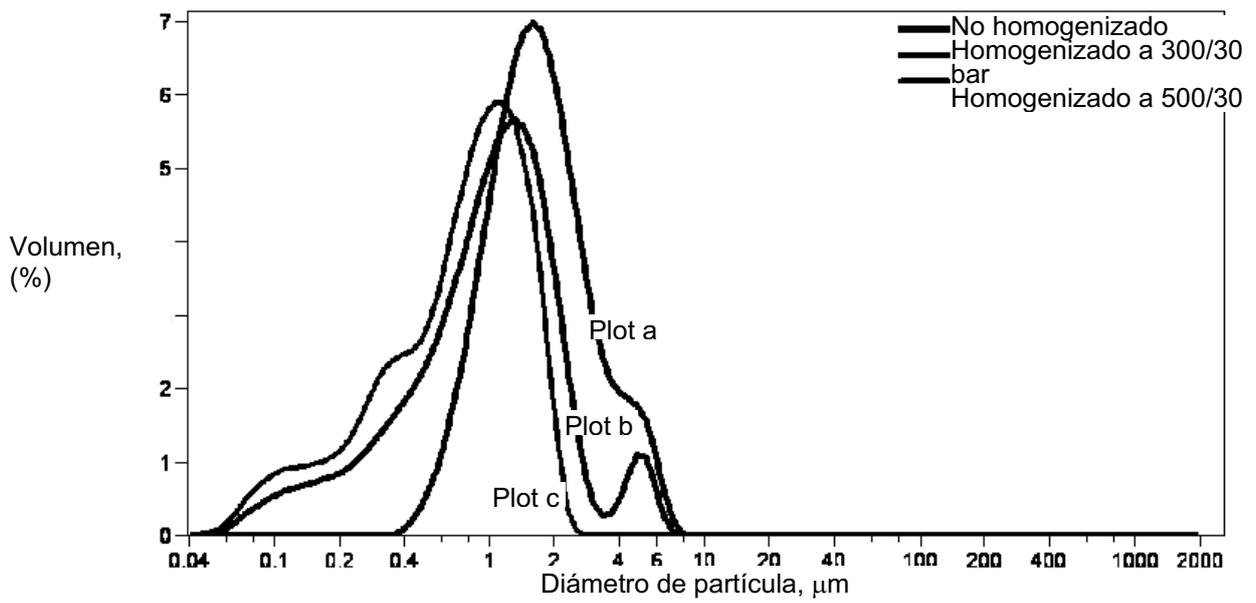


FIG.6

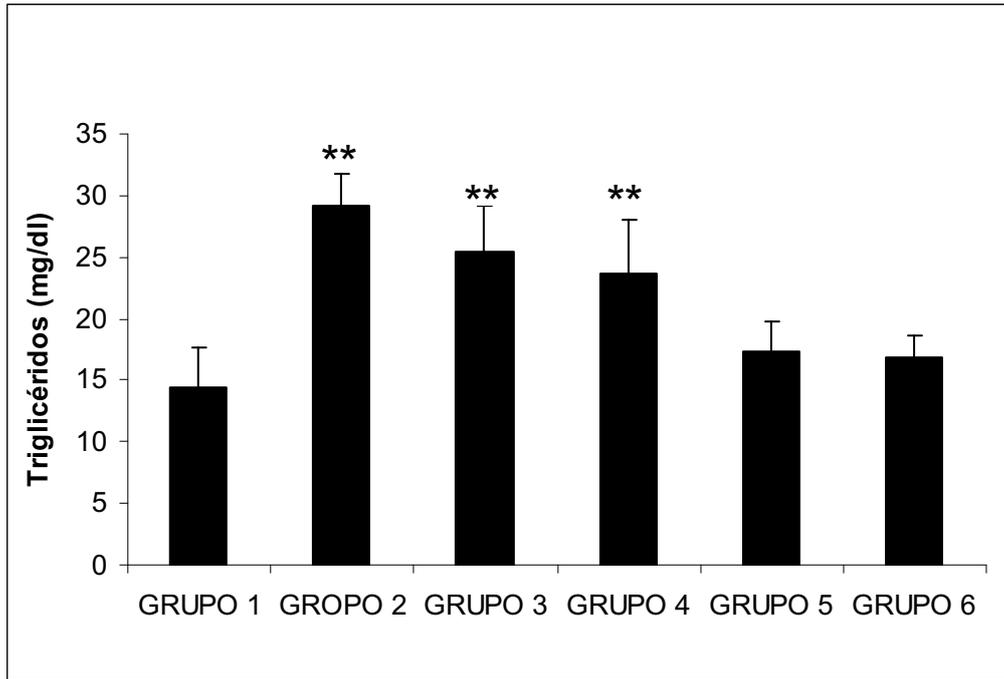


FIG.7

** indica diferencia con el control, grupo 1, evaluada mediante el test de Tukey con una P <0.001

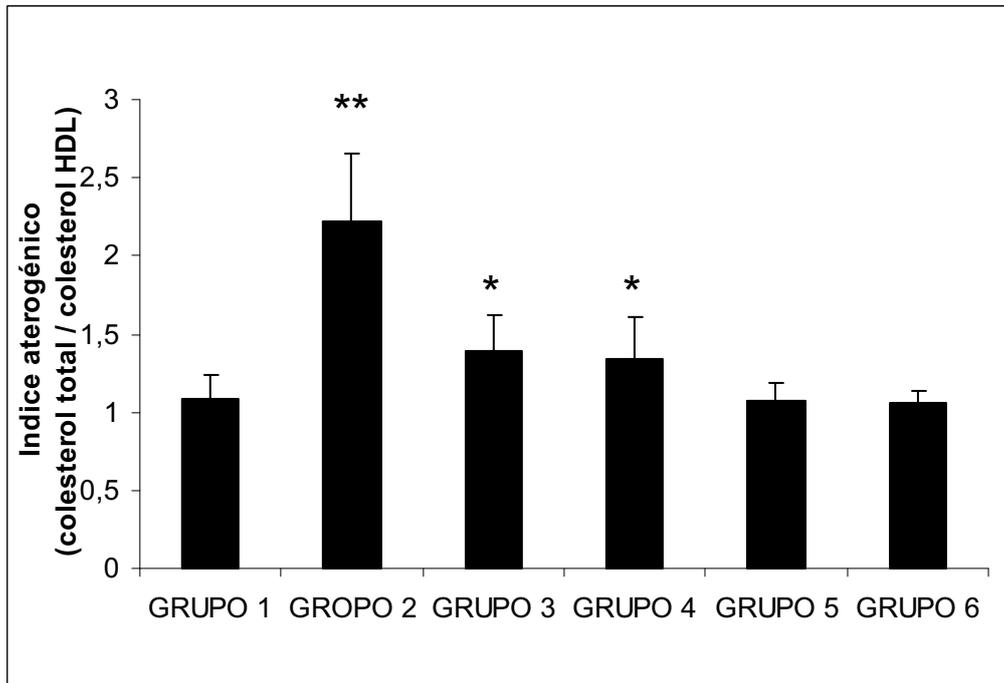


FIG.8

*: indica diferencia con el control, grupo 1, evaluada mediante el test de Tukey con una P <0.05
 **: indica diferencia con el control, grupo 1, evaluada mediante el test de Tukey con una P <0.001

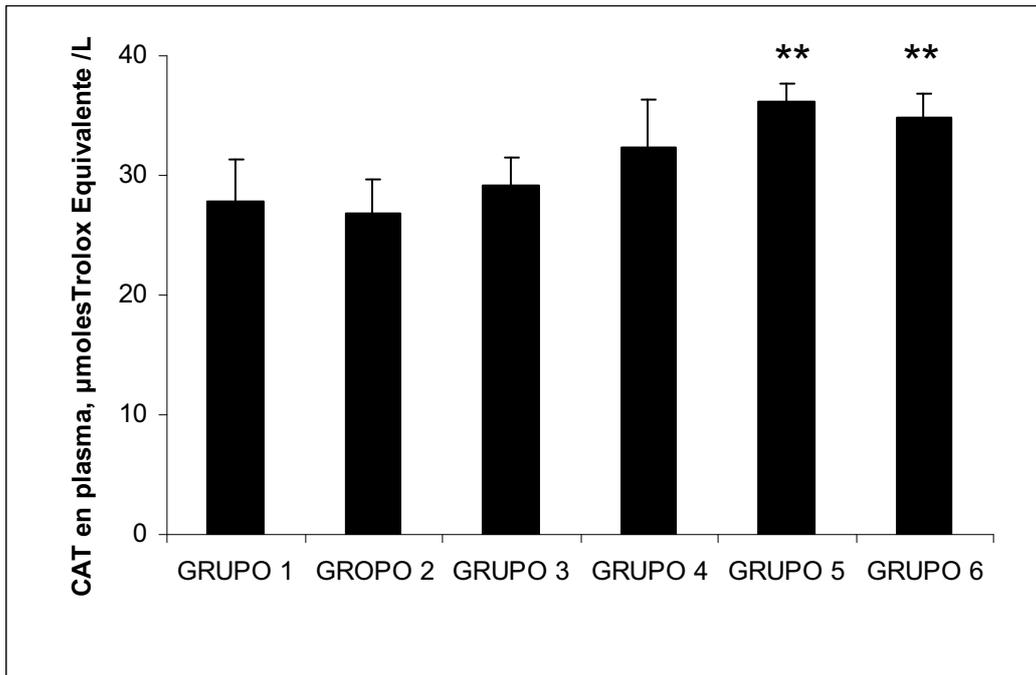


FIG.9

** indica diferencia con el control, grupo 1, evaluada mediante el test de Tukey con una P <0.001

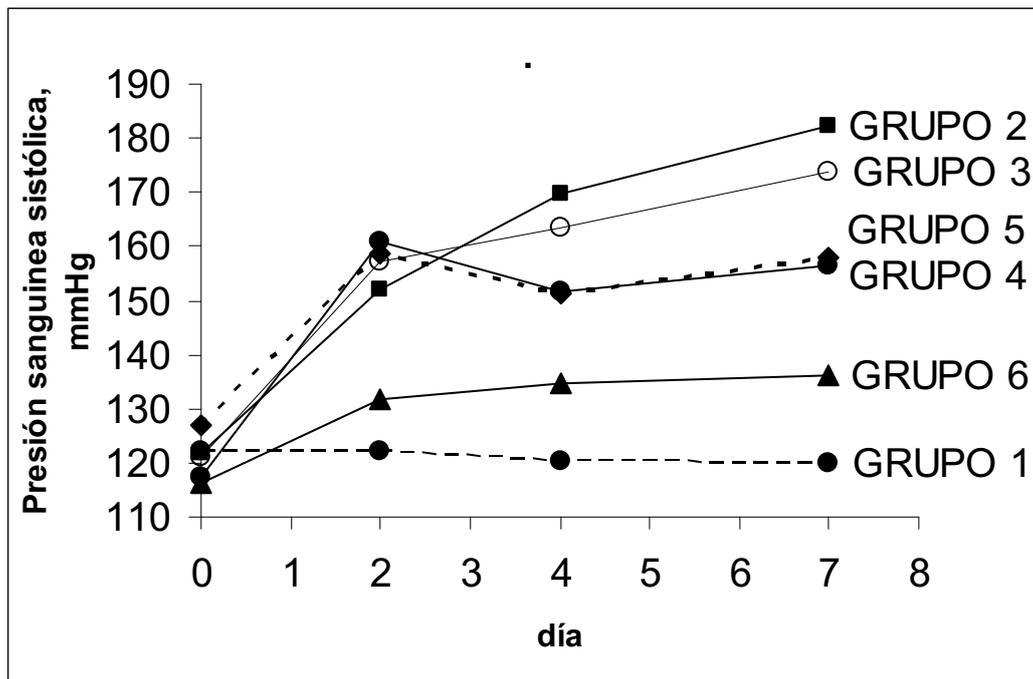


FIG.10

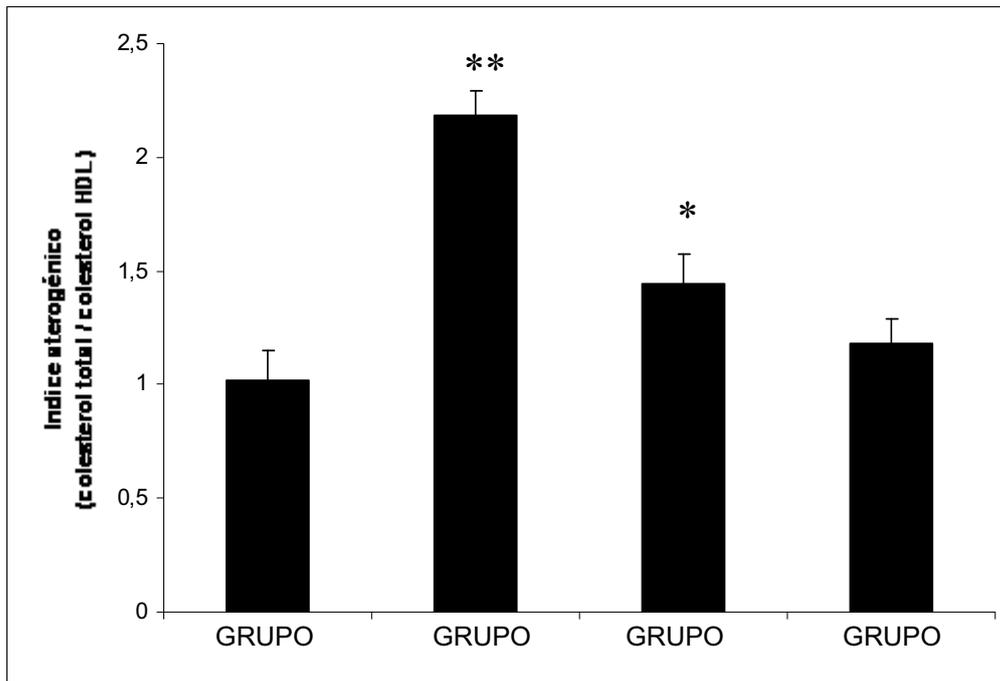


FIG.11

*: indica diferencia con el control, grupo 1, evaluada mediante el test de Tukey con una $P < 0.05$
 **: indica diferencia con el control, grupo 1, evaluada mediante el test de Tukey con una $P < 0.001$