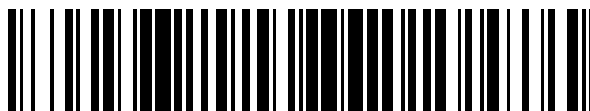


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 999**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)
C07C 39/11 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A61K 8/34 (2006.01)
C07C 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2006 E 06780204 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 1910257**

54 Título: **Procedimiento de obtención de un concentrado natural rico en hidroxitirosol a partir de residuos y subproductos de olivo que usa tecnologías limpias**

30 Prioridad:

27.07.2005 PT 10332605

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2014

73 Titular/es:

DE MAGALHAES NUNES DA PONTE, MANUEL LUIS (16.7%)
Rua Dr. Archer de Lima 56
P-1495-682 Cruz Quebrada, PT;
CARDADOR DOS SANTOS, JOSE LUIS (16.7%);
FIGUEIREDO MATIAS, ANA ALEXANDRA (16.7%);
MORGADO MARQUES NUNES, ANA VITAL (16.7%);
MARTINS DUARTE, CATARINA MARIA (16.7%) y
SEREJO GOULAO CRESPO, JOAO PAULO (16.7%)

72 Inventor/es:

DE MAGALHAES NUNES DA PONTE, MANUEL LUIS;
CARDADOR DOS SANTOS, JOSE LUIS;
FIGUEIREDO MATIAS, ANA ALEXANDRA;
MORGADO MARQUES NUNES, ANA VITAL;
MARTINS DUARTE, CATARINA MARIA y
SEREJO GOULAO CRESPO, JOAO PAULO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 455 999 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

Procedimiento de obtención de un concentrado natural rico en hidroxitirosol a partir de residuos y subproductos de olivo que usa tecnologías limpias.

Objeto y ámbito de la invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para la obtención de un concentrado natural bioactivo a partir de residuos y subproductos de olivo que usa tecnologías limpias. Estas tecnologías comprenden la nanofiltración y la ósmosis inversa. Particularmente, la invención proporciona un procedimiento de obtención de un extracto de olivo que contiene hidroxitirosol.

10 El concentrado rico en hidroxitirosol tiene un importante valor añadido como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y anticarcinógeno. Las aplicaciones industriales comprenden las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Antecedentes de la invención

15 Durante los últimos años varios estudios epidemiológicos han correlacionado la dieta mediterránea con la baja frecuencia de enfermedades cardíacas, aterosclerosis y unos tipos definidos de cáncer. Una característica particular de la dieta mediterránea es el uso del aceite de oliva, consumido directamente o usado para cocinar (Visioli y col., 2002; Owen y col., 2000).

20 Los estudios relacionados con los compuestos biofenólicos presentes en las olivas y en las hojas de olivo permitieron a los investigadores reconocer sus propiedades biológicas, que también estaban asociadas con las propiedades positivas para la salud del aceite de oliva. Por lo tanto, los compuestos bioactivos presentes en las olivas y en el aceite de oliva fueron reconocidos como importantes objetivos de la industria farmacéutica y alimentaria (Schieber y col., 2001). Sin embargo, el 98 % de estos compuestos biofenólicos se pierden durante la producción del aceite de oliva y permanecen en el agua vegetal y/o en los residuos sólidos resultantes del procesado de la oliva (Rodis y col., 2002).

25 Los compuestos presentes en mayores concentraciones en los residuos sólidos son secoiridoides glucosilados, mientras que en el agua vegetal, los compuestos con una mayor concentración son los derivados de secoiridoides, principalmente hidroxitirosol y oleoeuropeína (Mullinacci y col., 2001).

30 Se han estudiado las propiedades de los residuos sólidos obtenidos durante la producción del aceite de oliva, así como los extractos obtenidos a partir de ellos (Visioli y col., 1999); en particular, se ha demostrado su actividad antibacteriana (Ramos-Cormenzana y col., 1996) asociada con la presencia de oleoeuropeína e hidroxitirosol; este último compuesto fue señalado como el compuesto con una mayor bioactividad (Bisignano y col., 1999).

35 También se ha señalado el hidroxitirosol como un potente agente quimiopreventivo (Manna y col., 2000), y se ha considerado como el componente presente en los residuos del aceite de oliva con la mayor potencia antioxidante. Las primeras propiedades reconocidas del hidroxitirosol fueron su capacidad para prevenir la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) (Visioli y Galli, 1998) y la agregación de las plaquetas sanguíneas (Petroni y col., 1995). Mana y col. (2000) probaron que este compuesto es capaz de proteger varios sistemas celulares humanos de la toxicidad inducida por especies de oxígeno reactivas. También se ha investigado la capacidad del hidroxitirosol de inducir modificaciones en el ADN (Aruoma y col., 1999 y Deima y col., 1999).

Visioli y col. (2000) también han demostrado que, dependiendo de la dosis, el compuesto bifenólico es bien absorbido por los humanos, siendo secretado en la orina en forma de conjugados de glucuronato.

40 Actualmente el aceite de oliva se produce exclusivamente mediante el uso de procedimientos mecánicos y físicos, que consisten en prensar el fruto (pulpa y huesos) hasta la obtención de una suspensión homogénea, que a continuación es procesada para la separación de fases.

45 La etapa de separación de fases tradicional usa prensas hidráulicas, que han sido sustituidas por una centrifugación continua. El proceso continuo también se denomina proceso en tres fases, cuando se obtienen como productos finales el aceite de oliva, el agua vegetal y la torta de oliva, o un proceso en dos fases cuando las corrientes de producto final son aceite de oliva y torta de oliva.

En el sistema en tres fases se añade a agua a la suspensión de oliva, y esta mezcla se procesa después mediante una centrífuga horizontal, donde la fase sólida se separa del mosto oleoso. Este mosto es procesado a continuación mediante una centrífuga vertical, donde el aceite de oliva se separa del agua vegetal.

Actualmente el procedimiento más común es el procedimiento en dos fases porque implica un menor consumo de agua. Consecuentemente produce una menor cantidad de agua residual. Este proceso usa centrifugas en dos fases que separan el aceite de oliva y la torta de oliva. La torta de oliva es un residuo semisólido con un aspecto similar a una suspensión.

5 Se han publicado numerosas patentes que presentan procedimientos para la recuperación de compuestos fenólicos a partir de los residuos del olivo. La Patente de EE.UU. Nº 6.361.803 describe un procedimiento para la recuperación de compuestos antioxidantes a partir de residuos de oliva. Este procedimiento consiste en una extracción preliminar con un disolvente acuoso, siendo el extracto producido suministrado a una columna de adsorción con objeto de retener los compuestos de interés. Estos compuestos son recuperados subsiguientemente mediante la dilución con
10 un disolvente orgánico a través de una columna de adsorción. La Patente de EE.UU. Nº 6.849.770 describe un procedimiento para la recuperación de hidroxitirosol mediante un procedimiento cromatográfico que usa metanol o mezclas de agua / etanol como disolventes de elución. El documento patente WO 0218310 describe un procedimiento para la obtención de una composición rica en hidroxitirosol a partir del agua vegetal mediante el uso de un procedimiento previamente patentado (Patente de EE.UU. Nº 5.490.884), conocido como Porocrit. La
15 extracción de los compuestos objetivo partir del agua vegetal se consigue mediante el uso de fluidos supercríticos tales como dióxido de carbono, y membranas porosas en lugar de columnas de contacto. En lugar de dispersar las fases, el líquido es suministrado de forma continua a través de membranas porosas de polipropileno configuradas como haces de fibras huecas o láminas espirales tejidas. El líquido pasa a través de las membranas porosas en un módulo presurizado, mientras que el dióxido de carbono supercrítico fluye a contracorriente en el otro lado de la
20 membrana. Es importante apreciar, según los autores de esta patente, que la presión en el módulo es esencialmente la misma, de forma que la extracción es guiada por el gradiente de concentración entre el fluido y el dióxido de carbono supercríticos, y no por un gradiente de presión entre los dos lados de la membrana. El extracto puede ser recuperado mediante la vaporización del dióxido de carbono para su reciclado. Adicionalmente, la Patente de EE.UU. Nº 5.714.150 describe un procedimiento para la extracción de oleuropeína a partir de hojas de olivo
25 mediante el uso de mezclas de agua / etanol.

El uso de procedimientos de filtración a través de membrana y su integración con otras técnicas, tales como la centrifugación, han sido notificados por grupos de investigación que aspiran a desarrollar procesos para el tratamiento de las aguas de desecho de la molienda de la oliva.

30 Drouiche y col. (2004) describen el uso de una ultrafiltración para eliminar las partículas y los compuestos orgánicos del agua vegetal. El trabajo publicado por Turano y col. (2002) describe un proceso que integra la centrifugación y la ultrafiltración para el tratamiento del agua vegetal. En este proceso integrado, la centrifugación permite eliminar la fracción de sólidos suspendida, protegiendo la membrana de ultrafiltración de importantes problemas de taponamiento causados por estos particulados.

35 DellaGreca y col. (2001 y 2004) notifican un procedimiento analítico desarrollado para la caracterización del agua vegetal. Este procedimiento implica el fraccionamiento del agua vegetal con objeto de obtener los componentes aislados individuales presentes en el agua. Para este propósito se usa una serie de técnicas de membrana. El documento EP 1 623 960 A1 describe un proceso para el tratamiento de las aguas de desecho de la molienda de la oliva que permite la recuperación de tirosol e hidroxitirosol altamente puros, que también usa técnicas de membrana. Este proceso aspira a la obtención de compuestos altamente puros en lugar de extractos complejos naturales
40 procedentes de los subproductos del aceite de oliva.

Skaltsounis y col. ("Minos project: Process development for an integrated olive oil mill waste management recovering natural antioxidants and producing organic fertilizer", 2004) desvelan un proceso de adsorción en el que se usa una resina de adsorbancia para capturar polifenoles a partir de las aguas de desecho de la molienda del aceite de oliva. Entonces los polifenoles son liberados de la resina mediante el uso de un disolvente orgánico, y recuperados
45 mediante cromatografía.

No hay disponible un proceso que use en tecnologías limpias capaces de recuperar, a partir de residuos del aceite de oliva, un extracto natural complejo rico en hidroxitirosol y que contenga otros compuestos bioactivos con unas propiedades deseables, que asegure a la vez el rechazo de los compuestos con un mayor peso molecular y unas propiedades biológicas perjudiciales.

50 Los concentrados ricos en hidroxitirosol están disponibles en el mercado como un complemento dietético. Uno de estos productos es producido según el proceso patentado del documento WO 0218310 mencionado previamente. Se reivindica que este concentrado puede usarse como un agente natural antibacteriano, antivírico y/o antifúngico en la agricultura, así como un agente terapéutico o un aditivo alimentario.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la obtención de un concentrado natural bioactivo rico en hidroxitirosol, a partir de residuos y subproductos de olivo mediante el uso de tecnologías limpias, según se define en las reivindicaciones.

- 5 El extracto natural comprende una concentración mínima del 15 % (fracción en masa) en hidroxitirosol y una concentración máxima del 98 % (fracción en masa) de este compuesto. El concentrado rico en hidroxitirosol muestra unas actividades antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y anticarcinógena, que son superiores a las actividades observadas para el hidroxitirosol aislado, a una concentración equivalente. El concentrado rico en hidroxitirosol puede ser preparado en forma de partículas sólidas, como una disolución acuosa, como una emulsión
10 o como nanopartículas basadas en lípidos. La aplicación industrial comprende las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Descripción de los dibujos

Para complementar esta descripción y con el objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se realizará una descripción detallada de una forma de realización preferida.

- 15 La Figura 1 muestra la estructura química de algunos de los compuestos fenólicos presentes en los residuos bifásicos.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático del proceso integrado que se ha usado en la forma de realización del proceso objeto de la presente invención.

- 20 La Figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía líquida de: (a) un concentrado enriquecido obtenido mediante una extracción supercrítica; (b) la correspondiente disolución de suministro. Además del hidroxitirosol, es apreciable la presencia, entre otros, en el extracto, de luteolina y ácidos hidroxicinámicos, tales como el ácido cafeico y el ácido p-cumárico.

- 25 La Figura 4 muestra una comparación entre los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía líquida de: (a) el extracto acuoso obtenido a partir de la lixiviación de una torta de oliva con agua a temperatura ambiente, suministrado al proceso de nanofiltración (b) la corriente concentrada obtenida mediante nanofiltración / ósmosis inversa. Es apreciable el aumento en la concentración de hidroxitirosol y tirosol en la corriente producida mediante nanofiltración / ósmosis inversa.

La Figura 5 muestra el efecto antibacteriano del extracto rico en hidroxitirosol obtenido mediante nanofiltración / ósmosis inversa integradas. El cultivo bacteriano era de *Ehrlichia ruminantum*.

- 30 La Figura 6 muestra el efecto del extracto enriquecido en hidroxitirosol obtenido mediante nanofiltración / ósmosis inversa integradas como un agente capaz de reducir la proliferación de células cancerosas. Las células usadas en este ejemplo proceden de la línea celular HT 29 (células humanas de adenocarcinoma de colon).

Descripción detallada de la invención

- 35 La presente invención se refiere a un proceso de obtención de un concentrado natural bioactivo rico en hidroxitirosol, a partir de residuos y subproductos de olivo mediante el uso de tecnologías limpias. Estas tecnologías comprenden la nanofiltración y la ósmosis inversa, que se usan de acuerdo con el proceso reivindicado. Mediante el uso de este proceso, se recuperan en el extracto uno o más solutos bioactivos presentes en los residuos y subproductos de la oliva. Las estructuras químicas de algunos de estos compuestos se muestran en la Figura 1.

- 40 Los residuos y subproductos del olivo incluyen: i) aguas vegetales y residuos sólidos de la molienda de la oliva que operan de acuerdo con el proceso en tres fases; ii) residuos semisólidos procedentes de la molienda de la oliva que operan de acuerdo con el proceso en dos fases; iii) huesos de oliva y hojas de olivo.

- 45 La Figura 2 muestra un diagrama esquemático del proceso integrado que se ha usado en la forma de realización del proceso descrito en este documento. Esta figura comprende las siguientes operaciones: extracción con disolventes biocompatibles, recuperación selectiva de soluto(s) bioactivo(s) mediante nanofiltración y ósmosis inversa. La primera etapa consiste en el procesamiento de los residuos sólidos y semisólidos procedentes del olivo (A) mediante una extracción con agua o con otros disolventes biocompatibles (B), tales como mezclas hidroalcohólicas. El extracto resultante es suministrado directamente a la unidad de nanofiltración (E), o como alternativa, se mezcla con las aguas vegetales procedentes de la molienda de la oliva y se centrifuga (D) con objeto de eliminar las partículas y otros sólidos suspendidos. En este último caso, el sobrenadante de la centrifugación es suministrado a la unidad de
50 nanofiltración (E). La operación de nanofiltración separa el hidroxitirosol y otros compuestos bioactivos con bajo

peso molecular, que son recuperados en la corriente de permeado producida, de los compuestos con mayor peso molecular que son retenidos en la corriente de retenido. Con objeto de aumentar la concentración de hidroxitirosol y de los otros componentes bioactivos presentes en el permeado, esta corriente puede ser suministrada a una unidad de ósmosis inversa (F). Esta operación produce una corriente de retenido rica en hidroxitirosol y en los otros compuestos bioactivos de interés (G), y una corriente acuosa (H) que puede ser reutilizada en la etapa de extracción (B) o desechada en el medio ambiente.

Con objeto de diseñar un proceso que permita una eficaz recuperación de los compuestos bioactivos de interés con altos rendimientos y alta selectividad, es necesario definir las condiciones óptimas para la integración de las diferentes etapas implicadas. Esta interacción implica la selección de un disolvente adecuado y biocompatible para la extracción, y la selección de las condiciones operativas de las etapas de nanofiltración y de ósmosis inversa.

La nanofiltración y la ósmosis inversa son técnicas de separación con membrana para el procesamiento de corrientes líquidas, en las que la fuerza directriz del transporte es la diferencia de presión eficaz entre el compartimento de suministro (también del retenido) y del permeado. Una correcta selección de las membranas de nanofiltración y de ósmosis inversa, y de las condiciones operativas del equipo relacionado, permite la obtención de un transporte selectivo del (los) soluto(s) objetivo y el (los) pertinente(s) flujo(s) de permeación.

Las unidades de nanofiltración y de ósmosis inversa incluyen un recipiente de suministro que contiene la disolución con los solutos que se van a recuperar. El contenido del recipiente de suministro es proporcionado por una bomba centrífuga o por una bomba de desplazamiento positivo hacia el (los) módulo(s) de ósmosis inversa que comprende(n) un compartimento de suministro / retenido, la membrana seleccionada a través de la cual permeará(n) el (los) soluto(s) objetivo, y un compartimento de permeado. El permeado puede ser extraído de forma continua o intermitente. Después de entrar en contacto con la membrana, la corriente de retenido puede ser reciclada al recipiente de suministro.

La corriente de suministro consiste en una disolución acuosa o hidroalcohólica. Esta disolución puede ser agua vegetal o un extracto obtenido durante el procesamiento de residuos de la oliva. Los solutos objetivo que se van a recuperar comprenden cualquier tipo de soluto bioactivo.

La corriente de suministro puede estar, preferiblemente, a una temperatura inferior a 150 °C si se emplean membranas poliméricas, pero puede ser procesada a una temperatura mayor si se usan membranas termoestables, tales como membranas cerámicas o metálicas.

Las membranas de nanofiltración y de ósmosis inversa deben actuar como una barrera selectiva con objeto de evitar la permeación de componentes indeseables desde la corriente de suministro, permitiendo la permeación del (los) soluto(s) con una bioactividad deseable. Las membranas deben tener unas características que conduzcan a un elevado flujo del (los) soluto(s) objetivo y un flujo bajo o nulo de los componentes indeseables de la corriente de suministro.

La membrana puede ser polimérica o inorgánica. También puede comprender tanto materiales poliméricos como inorgánicos. En lo que respecta a su estructura, también puede ser homogénea o de composite; en el último caso puede incluir diferentes capas constituidas por diferentes materiales y/o con diferentes características morfológicas. Cada una de esas capas puede tener un espesor diferente.

En lo que respecta a su naturaleza química, las membranas pueden presentar un carácter hidrófobo, lo que significa que son más permeables a las especies químicas hidrófobas, es decir, a especies químicas que presentan un coeficiente de actividad infinita mayor de la unidad en disolución acuosa. Las membranas también pueden presentar un carácter hidrófilo, lo que significa que son más permeables al agua que a los compuestos orgánicos.

Las membranas pueden tener una geometría plana o tubular, y pueden estar dispuestas en un módulo de placa y marco, en un módulo de espiral enrollada, en un módulo de fibra hueca, en un módulo capilar o en un módulo tubular.

La corriente de suministro puede ser suministrada de forma continua, semicontinua o por lotes. El (los) módulo(s) de membrana puede estar sumergidos en uno o más recipientes de suministro, o estar ubicados externamente al recipiente de suministro. En el caso de que se use más de un módulo de membrana, pueden estar dispuestos en serie o en paralelo.

Para establecer la fuerza directriz necesaria para promover el transporte del (los) soluto(s) a través de la membrana, se establece una diferencia de presión entre los dos compartimentos (suministro / retenido y permeado) del (los) módulo(s) de membrana. El valor de la diferencia de presión absoluta debería estar en el intervalo de 0,5 MPa a 3,0 MPa, preferiblemente en el intervalo de 1,0 MPa a 1,5 MPa para la operación de nanofiltración; en la operación de ósmosis inversa, el intervalo de diferencia de presiones absolutas permanece entre 3 MPa y 8 MPa, preferiblemente

en el intervalo de 4 MPa a 6 MPa.

El concentrado natural rico en hidroxitirosol (corrientes G y L en la Figura 2) obtenido mediante el proceso descrito en este documento contiene una fracción mínima en masa del 15 % en hidroxitirosol y una fracción máxima en masa del 98 % de este compuesto. La selección de las condiciones operativas y de las características de la membrana de nanofiltración, tales como su peso molecular de corte, permiten permear selectivamente los compuestos bioactivos con las propiedades deseadas, asegurando a la vez la retención de los compuestos con un mayor peso molecular, que pueden mostrar una actividad biológica perjudicial. Aspirando a este fraccionamiento selectivo de los compuestos bioactivos presentes en la corriente de suministro, el peso molecular de corte de la membrana de nanofiltración está por debajo de 300 Da. El valor del peso molecular de corte de las membranas de nanofiltración se calcula mediante la determinación del rechazo de solutos de referencia, tales como glucosa y sacarosa, desde disoluciones acuosas.

Los extractos concentrados contienen otros compuestos bioactivos además del hidroxitirosol, presentes originalmente en el fruto o en las hojas de olivo, dependiendo del material de partida usado. La presencia concomitante de hidroxitirosol y de otros compuestos bioactivos deseados, resultante del proceso descrito en este documento, origina una sinergia entre ellos que se refleja en la actividad biológica global de los extractos concentrados. Como consecuencia, este concentrado rico en hidroxitirosol muestra unas actividades antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y anticarcinógena que son superiores a las actividades observadas para el hidroxitirosol aislado a una concentración equivalente.

El concentrado rico en hidroxitirosol puede prepararse en forma de un líquido, de un sólido o de una emulsión. La forma líquida se refiere a una disolución acuosa, que puede ser evaporada, liofilizada o atomizada con objeto de producir partículas sólidas. Adicionalmente, pueden prepararse diferentes formulaciones específicas mediante el uso de excipientes y matrices lipídicas biocompatibles, con objeto de proteger la bioactividad de los compuestos recuperados.

Alternativamente, el concentrado rico en hidroxitirosol puede prepararse en forma de una emulsión, con objeto de facilitar su incorporación en diferentes productos. Estas emulsiones pueden prepararse mediante el uso de ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de glicerol de ácidos grasos, lecitina o combinaciones de estos emulsionantes. Estas formulaciones deberían tener una fracción en volumen de entre el 5 % y el 60 % de hidroxitirosol, preferiblemente de entre el 30 % y el 55 %. También puede añadirse ácido cítrico a estas emulsiones con objeto de estabilizarlas.

Las aplicaciones del concentrado rico en hidroxitirosol en sus diversas formas de administración incluyen las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Ejemplo

Aspirando a ilustrar la presente desvelación, se proporcionan cuatro ejemplos sobre el uso de los procesos descritos.

Ejemplo 1 (comparativo)

Producción de un concentrado rico en polifenoles que contiene hidroxitirosol a través de un procedimiento integrado que comprende una extracción con disolventes biocompatibles y un subsiguiente fraccionamiento mediante una extracción con fluidos supercríticos.

Se extrajeron 300 g de residuo semisólido desde un proceso de aceite de oliva bifásico con 900 ml de una disolución hidroalcohólica con una proporción en volumen de 90:10 (etanol:agua). El extracto recuperado se centrifugó, y el sobrenadante se suministró a una columna de extracción de fluidos supercríticos con un empaquetamiento estructurado proporcionado por Sulzer; la columna tenía 4 m de alto con un diámetro interno de 4 cm. El suministro líquido se extrajo a contracorriente con dióxido de carbono supercrítico. Se recuperaron 500 ml de extracto desde la columna. Este extracto fue analizado mediante cromatografía líquida, y el correspondiente cromatograma se presenta en la Figura 3. Esta figura muestra los cromatogramas obtenidos para: (a) un concentrado enriquecido obtenido mediante una extracción supercrítica; (b) la correspondiente disolución de suministro. A partir de la Figura 3 (a) puede observarse que el pico correspondiente al hidroxitirosol y sus derivados representa el 35 % del área de todos los picos. Además del hidroxitirosol, es notable la presencia, entre otros, en el extracto, de luteolina y ácidos hidroxicinámicos con una elevada actividad biológica, tales como el ácido cafeico y el ácido p-cumárico.

Ejemplo 2 (de acuerdo con la invención):

Producción de un concentrado rico en polifenoles que contiene hidroxitirosol mediante el uso de un procedimiento integrado de nanofiltración / ósmosis inversa.

Se suministraron 250 ml de un extracto acuoso obtenido a partir de la lixiviación de una torta de oliva con agua a temperatura ambiente, a una unidad de nanofiltración en la que fue procesado a una diferencia de presión absoluta de 1 MPa. Se obtuvieron 240 ml de permeado con un rendimiento de recuperación de hidroxitirosol del 70 %. El permeado obtenido fue adicionalmente procesado mediante una ósmosis inversa operada a 2,5 MPa. El retenido resultante fue caracterizado mediante cromatografía líquida. La Figura 4 muestra los cromatogramas obtenidos para (a) el extracto acuoso suministrado al proceso de nanofiltración, y (b) el retenido concentrado obtenido tras el procedimiento de nanofiltración / ósmosis inversa descrito. Es notable el aumento en la concentración de hidroxitirosol y de tirosol en la corriente producida mediante nanofiltración / ósmosis inversa. La membrana de filtración era una Desal DK, de General Electric, con un peso molecular de corte de 250 Da. La membrana de ósmosis inversa era una Filmtec SW 30 de Dow.

Ejemplo 3:

Caracterización de la actividad antimicrobiana de un extracto concentrado rico en hidroxitirosol, producido mediante nanofiltración / ósmosis inversa.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de un extracto concentrado rico en hidroxitirosol obtenido mediante una nanofiltración / ósmosis inversa integradas, mediante la adición de diferentes concentraciones de este extracto a cultivos de células animales infectados con la bacteria *Ehrlichia ruminantum*. La Figura 5 muestra que el porcentaje de células bacterianas muertas asciende hasta el 80 % tras la exposición al extracto.

Ejemplo 4:

Caracterización de la actividad antineoplásica de un extracto concentrado rico en hidroxitirosol, producido mediante nanofiltración / ósmosis inversa.

Se evaluó la actividad antineoplásica de un extracto concentrado rico en hidroxitirosol obtenido mediante una nanofiltración / ósmosis inversa integrada, mediante la adición de diferentes concentraciones de este extracto a cultivos de células humanas de adenocarcinoma de colon (línea celular HT 29). La Figura 6 muestra que el porcentaje de células cancerosas viables disminuye hasta menos del 20 % tras la exposición al extracto.

Referencias

Patentes

Documento US 6.361.803

Documento US 6.849.770

Documento US 5.714.150

Documento WO 0218310

Documento EP 1 623 960 A1

Otras referencias

Allouche y col. 'Toward a High Yield Recovery of Anti-oxidants and Purified Hidroxitirosol from Olive Mill Wastewaters', J. Agric. Food Chem. 52 (2) (2004) 267 - 273

Ryan y col. 'Recovery of fenolic compounds from Olea europaea' Anal. Chim. Acta 445 (2001) 67 - 77

DellaGreca y col. 'Low-molecular-weight components of olive oil mill wastewaters', Phytochem. Anal. 15 (2004) 184 - 188

DellaGreca y col. 'Phytotoxicity of low-molecular-weight fenols from olive mill waste waters', Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67 (2001) 352 - 359

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

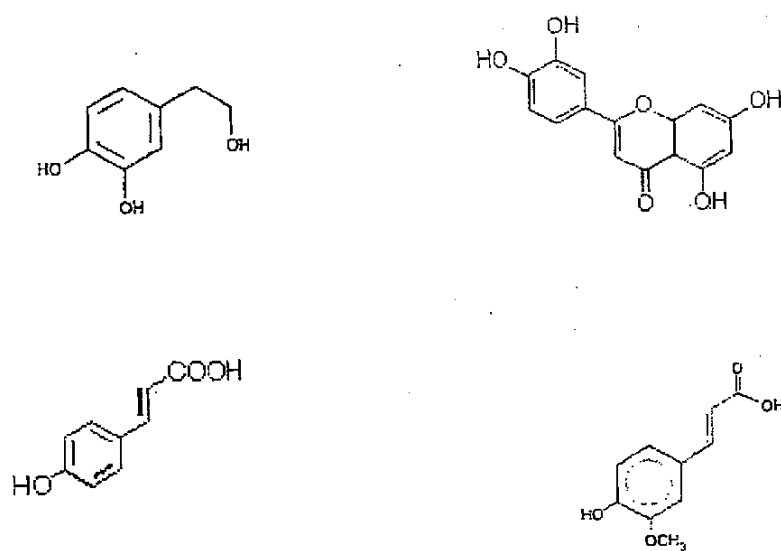
Fernandez-Bolanos y col. 'Production in Large Quantities of Highly Purified Hydroxytyrosol from Liquid-Solid Waste of Two-Phase Olive Oil Processing or Alperujo', J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6804 - 6811

- Fernandez-Bolanos y col. 'Total Recovery of the Waste of Two-Phase Olive Oil Processing: Isolation of Added-Value Compounds', J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 5849 - 5855
- Lesage-Meessen y col. 'Simple fenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems', Food Chemistry 75 (2001) 501 - 507
- 5 Marrugat y col. 'Effects of differing fenolic content in dietary olive oils on lipids y LDL oxidation. A randomized controlled trial', Eur J Nutr. 43 (2004) 140 - 147
- Manna y col. 'Transport mechanism and metabolism of olive oil hydroxytyrosol in Caco-2 cells', FEBS Lett. 470 (2000) 341 - 344
- 10 Mullinacci y col. 'Polyfenolic content in olive oil wastewaters and related olive samples', J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 3509 - 3514
- Obied y col. 'Bioactivity and Analysis of Biofenols Recovered from Olive Mill Waste', J. Agric. Food Chem. (Review) 53 (2005) 823 - 837
- Quiles y col. 'Olive oil fenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells', British Journal of Nutrition 88 (2002) 225 - 234
- 15 Bouzid y col. 'Fungal enzymes as a powerful tool to release simple fenolic compounds from olive oil by-product', Process Biochemistry 40 (2005) 1855 - 1862
- Owen y col. 'Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants', Lancet Oncol. 1 (2000) 107 - 112
- Rodis y col. 'Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases', J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 596 - 601
- 20 Schieber y col. 'By-products of plant food processing as a source of functional compounds recent developments', Trends in Food Science & Technology 12 (2001) 401 - 413
- Tuck y col. 'Major fenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects', Journal of Nutritional Biochemistry 13 (2002) 636 - 644
- 25 Turano y col. 'An integrated centrifugation-ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater', J. Membr. Sci. 209 (2002) 519 - 531
- Visioli y col. 'Antioxidant and other biological activities of olive mill wastewaters', J. Agric Food Chem. 47 (1999) 3397 - 3401
- Visioli y col. 'Olive oil fenolics are dose dependently absorbed in humans', FEBS Letters 468 (2000) 159 - 160
- 30 Visioli y col. 'Antioxidant and other biological activities of fenols from olives and olive oil', Medicinal Research Reviews 22 (2002) 65 - 75
- Visioli y col. 'Biological activities and metabolical fate of olive oil fenols', Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104 (2002) 677 - 684.

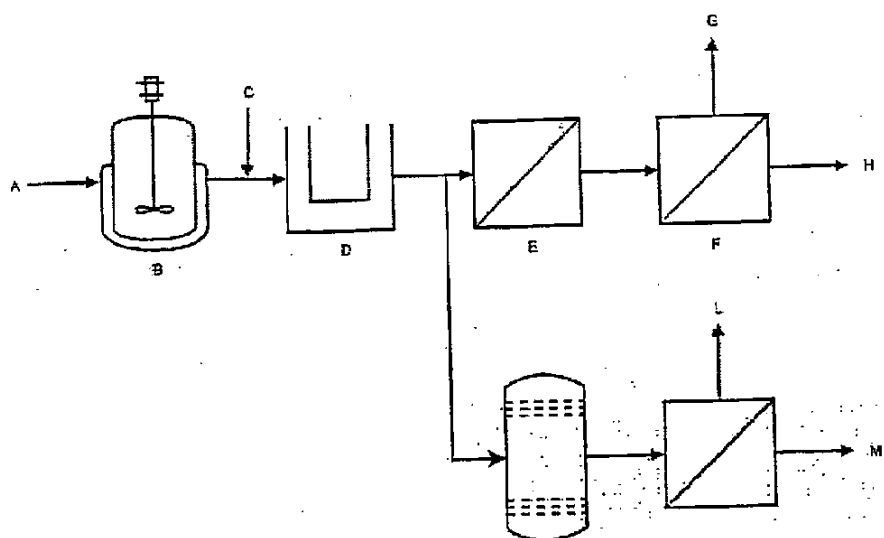
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la obtención de un concentrado natural rico en hidroxitirosol a partir de residuos y subproductos del olivo, que consiste en la siguiente etapas: (a) procesar los residuos sólidos y semisólidos procedentes del olivo mediante una extracción con agua o con mezclas hidroalcohólicas, (b) bien suministrar el extracto que contiene el hidroxitirosol y otros compuestos bioactivos procedentes del olivo directamente a una unidad de nanofiltración con un peso molecular de corte menor de 300 Da, o bien mezclar el extracto obtenido en la etapa (a) con las aguas vegetales de las moliendas de la oliva y centrifugar con objeto de eliminar las partículas y otros sólidos suspendidos, y suministrar el sobrenadante obtenido de la centrifuga a dicha unidad de nanofiltración, en el que dicho hidroxitirosol y otros compuestos bioactivos de bajo peso molecular son recuperados en una corriente de permeado de dicha unidad de nanofiltración, y (c) suministrar la corriente de permeado de dicha unidad de nanofiltración al compartimento de suministro de una unidad de ósmosis inversa, en el que dicho hidroxitirosol y otros compuestos bioactivos son retenidos y concentrados en una corriente de retenido.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la unidad de nanofiltración se opera a una diferencia de presión absoluta entre el compartimento del retenido suministrado y el compartimento del permeado en el intervalo de 0,5 MPa a 3,0 MPa, y en el que la unidad de ósmosis inversa se opera a una diferencia de presión absoluta en el intervalo de 3 MPa a 8 MPa.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en el que las membranas de nanofiltración y de ósmosis inversa son homogéneas o de composite, en el que las membranas son poliméricas o inorgánicas o comprenden materiales tanto poliméricos como inorgánicos.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en el que las membranas de nanofiltración y de ósmosis inversa tienen una geometría plana o una geometría tubular, estando dispuestas en un módulo de placa y marco, en un módulo de espiral enrollada, en un módulo de fibra hueca, en un módulo capilar o en un módulo tubular.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que se usan uno o más módulos de membrana, dispuestos en serie o en paralelo.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el al menos un módulo de membrana está sumergido en uno o más en recipientes de suministro, o está ubicado externamente al recipiente de suministro.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que la corriente de suministro es suministrada a la membrana de la unidad de nanofiltración y de ósmosis inversa de una forma continua, semicontinua o por lotes.

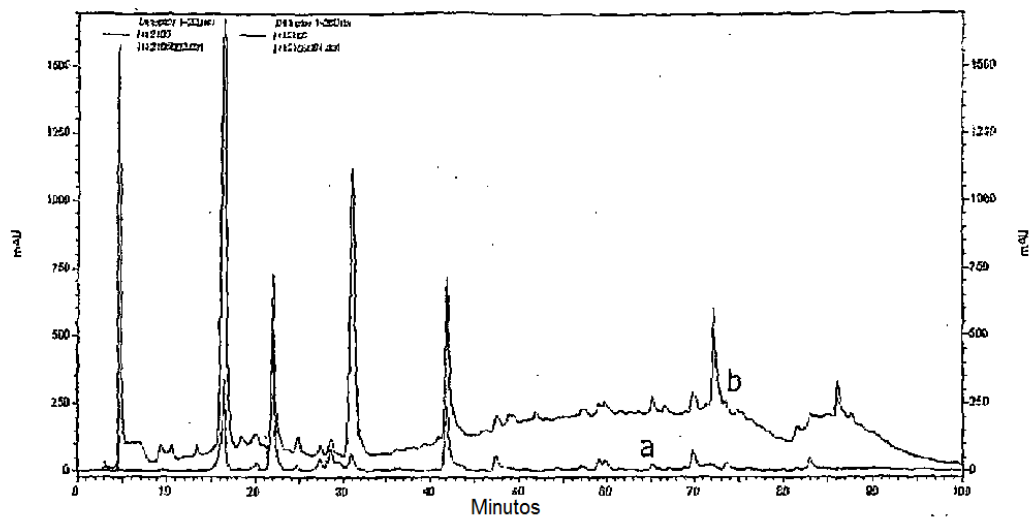
[Fig. 1]



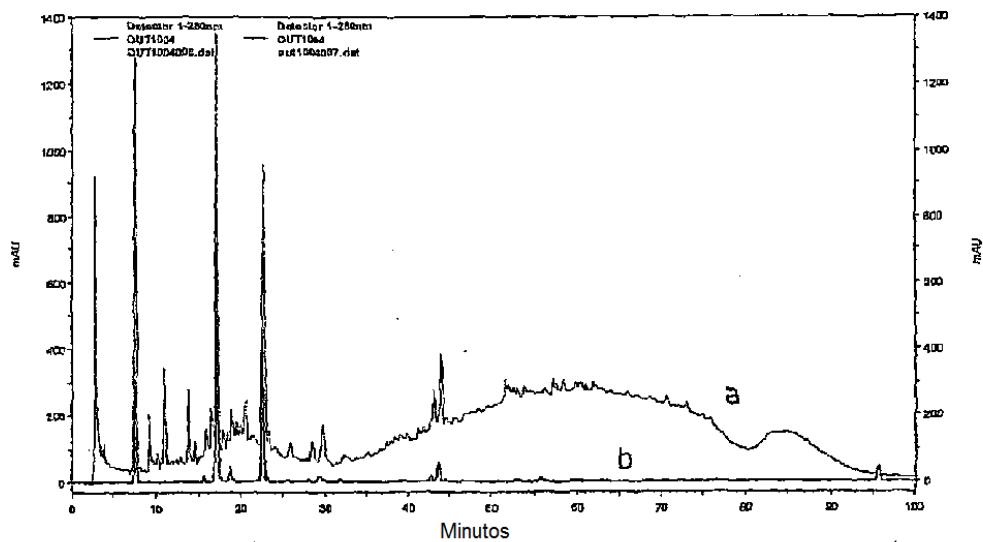
[Fig. 2]



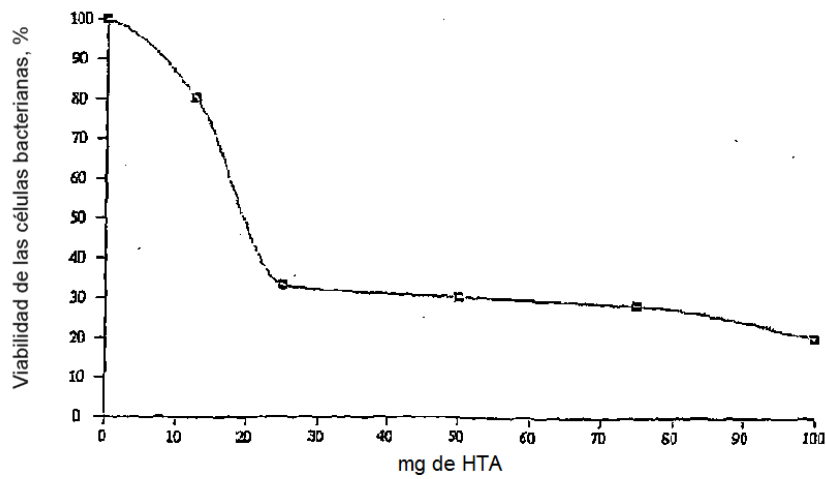
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

