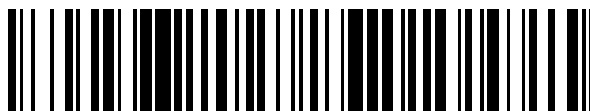


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 069**

51 Int. Cl.:

A23L 33/105 (2006.01)

A23L 11/00 (2006.01)

C02F 1/04 (2006.01)

C02F 1/34 (2006.01)

A61K 36/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12169465 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2526785**

54 Título: **Procedimiento para producir un fitoextracto a partir de aguas de vegetación y orujos de aceite de oliva**

30 Prioridad:

25.05.2011 IT MI20110941

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

07.11.2017

73 Titular/es:

**PHENOFARM S.R.L. (100.0%)
Piazza Giuseppe Mazzini 27
00195 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**GERMANI, STEFANO;
VITAGLIANO, MASSIMO;
PIZZICHINI, DANIELE y
PIZZICHINI, MASSIMO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 641 069 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 para producir un fitoextracto a partir de aguas de vegetación y orujos de aceite de oliva

- 5 Se describe el procedimiento para obtener un fitoextracto de aguas de vegetación (VW) y orujos que proceden de la molienda de aceitunas. Dicho procedimiento se basa en la combinación de métodos de pretratamiento fisicoquímicos y enzimáticos, filtración tangencial en membrana y evaporación a vacío. El método permite la extracción ecosostenible y eficaz de los componentes activos implicados. El extracto final se caracteriza por la presencia de un alto recuento de polifenoles y se aplica en las industrias alimentaria, cosmética y fitoterapéutica.

10

Estado de la técnica

- 15 El cultivo de las aceitunas representa una industria de producción crucial para toda la zona del mediterráneo y en Italia en particular. En Italia, los olivos se distribuyen sobre una superficie principalmente montañosa que representa en total aproximadamente una quinta parte de la superficie designada para los olivos en todo el mundo. Sin embargo, esta industria adolece del inconveniente de una generación considerable de residuos que, en particular, comprenden tejidos vegetales (hojas y podas) y residuos reales de la producción de aceite de oliva (VW, orujos húmedos y usados). Estos últimos se caracterizan por una fuerte carga de contaminantes, por lo que requieren procedimientos adecuados para poder desecharlos según las leyes medioambientales en vigor (en lo que respecta a Italia, DL 574 con fecha de 11/11/96). A lo largo de los últimos diez años, la comunidad científica e industrial ha multiplicado los esfuerzos para proporcionar una solución al problema en cuanto a la eliminación de aguas residuales del aceite de oliva. Entre las soluciones propuestas, las más interesantes tienen como objetivo valorar estas aguas residuales recuperando una recuperación de sustancias de alto valor añadido, particularmente sustancias de polifenol a las que se han asociado numerosas propiedades biomédicas y funcionales. El uso de desechos y residuos que se derivan de la cadena de producción del aceite de oliva puede permitir la generación de recursos económicos partiendo de materiales de partida no convencionales (orujos húmedos, VW, orujos usados sin semilla) derivados de la comercialización de componentes activos en industrias de producción tales como la industria alimentaria, cosmética y fitoterapéutica.

- 30 Se sabe que los compuestos de origen vegetal pueden expresar diferentes propiedades biológicas (por ejemplo, propiedades antioxidantes, antirradicales, antimicrobianas) y, en muchos casos, la molécula individual es menos activa con respecto a la mezcla de los compuestos, sugiriendo, por tanto, una acción sinérgica entre ellos. En realidad, a menudo sucede que los extractos de partida de origen vegetal revelan una bioactividad mayor con respecto a la observable cuando se usan los compuestos simples presentes en los mismos. Respecto a esto, la actividad antirradical de los extractos vegetales se mide por medio de una prueba *in vitro* que usa el radical estable DPPH (difenilpicrilhidrazilo) que simula la actividad de tales extractos frente a radicales oxigenados endógenos, tales como los radicales hidróxido y superóxido. El uso del radical DPPH permite estudiar la cinética de reducción de radicales y también calcular la CE₅₀, es decir, la concentración de extracto que reduce el 50% del radical. Se sabe que el hidroxitirosol y la oleuropeína aglicona son potentes agentes antioxidantes y cardioprotectores. La oleuropeína revela una actividad de dilatación coronaria, hipoglucémica y anticolesterolemica y, de manera similar al hidroxitirosol, retrasa la oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad). Se ha demostrado que el hidroxitirosol reduce la expresión génica de las líneas celulares de iNOS y COX-2, evitando por tanto la activación de los factores de la transcripción NF-KB, el factor clave en la aterosclerosis, STAT-1α e IRF-1. También se observó una prevención de la activación de NF-KB en un estudio *ex vivo* de monocitos de voluntarios sanos expuestos al consumo de aceite de oliva, lo que sugiere un posible efecto antiinflamatorio por el aceite. Existen numerosos estudios respecto a las actividades biológicas de las moléculas con una estructura de fenilpropanoide, demostrando una actividad antioxidante, antiinflamatoria, antivírica y antifúngica de las mismas. Dichos estudios se centran principalmente en evaluar los efectos del verbascósido o acteósido, uno de los fenilpropanoides más estudiados hasta la fecha. El verbascósido también reveló actividad inmunomoduladora *in vitro*, en particular, aumenta la actividad quimiotáctica de los neutrófilos. El mismo verbascósido reveló, en un cultivo de células neuronales PC12, tener una actividad de protección frente a la neurotoxicidad inducida por la 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), un ion que, al activar caspasa-3, provoca estrés oxidativo grave en las células. También se indicaron actividades antineoplásicas tanto respecto al verbascósido como al isómero del mismo, el isoacteósido. Las pruebas *in vivo* en las células de leucemia murina P-388, revelaron que los dos fenilpropanoides mostraron una acción citotóxica de ED₅₀ equivalente a 10 µg/ml para el isoacteósido y 26 µg/ml respecto al verbascósido. Una subclase de polifenoles adicional (más específicamente, una subclase de flavonoides) de interés biológico particular, presente específicamente en las pulpas de aceitunas pigmentadas, es la clase de compuestos de antocianósido o antocianinas que consisten, en particular, en derivados de glucósido de cianidina, siendo el más abundante de ellos cianidina-3-O-rutinósido. Los antocianósidos son pigmentos presentes específicamente en la piel de uvas y pequeñas frutas, comercializados como extractos normalizados de residuos de orujo o bayas, y ampliamente estudiados en vista de su actividad biológica. El término antocianidinas, referido a la clase de los compuestos no glucosilados correspondientes (siendo la cianidina uno de los principales representantes de los mismos), se ha creado para designar a las sustancias responsables del color de las flores, y es relevante para un grupo de pigmentos solubles en agua responsables de los colores rojo, rosa, violeta y azul de la mayor parte de las flores y frutas. Los fármacos que contienen antocianidinas se usaron en preparaciones galénicas para el tratamiento de la sintomatología relacionada con la fragilidad capilar. Tales compuestos también muestran un alto poder antioxidante y pueden proteger a las células de

daños oxidativos provocados por radicales libres.

Los documentos US2002198415 (A1), US2008090000 (A1), US2010216874 (A1) describen, partiendo de residuos de la industria de producción de aceite de oliva, cómo obtener extractos a base de polifenoles, mediante tratamiento con ácido de las VW y un almacenamiento prologando de los mismos de hasta 12 meses a un pH comprendido entre 1 y 6 con el objetivo de determinar la conversión de oleuropeína en hidroxitirosol. Tras dicha incubación, se convirtió la oleuropeína inicial en un 75-90% en hidroxitirosol. El documento WO2007/013032 describe un procedimiento para recuperar un concentrado rico en hidroxitirosol de residuos de la industria de producción de aceite de oliva, particularmente aguas de vegetación y residuos de podas (hojas). Dicho procedimiento proporciona el uso, tras la extracción usando un disolvente (agua o alcohol), de sistemas de extracción con fluidos supercríticos, nanofiltración o, alternativamente, ósmosis inversa para recuperar hidroxitirosol y compuestos polares minoritarios. El producto así obtenido es un extracto a base de hidroxitirosol. El compuesto WO2005/123603 describe un procedimiento de separación basado en tecnologías de membrana específicamente dirigido a recuperar compuestos de interés de las VW. En tal procedimiento, a las diversas operaciones de separación por filtración en membrana tangencial, se les introdujo una filtración inicial dirigida a maximizar el contenido en polifenol útil comercial (tal como hidroxitirosol) en detrimento de la posible oleuropeína aún presente en las VW. El pretratamiento consiste en acidificar VW aún recientes hasta un pH de aproximadamente 3 - 4,5, seguido por una hidrólisis enzimática. A la separación del producto líquido así tratado mediante centrifuga le siguen una serie de operaciones de filtración tangencial en cascada, que comprenden una microfiltración seguido por nanofiltración y, por último, por un procedimiento de ósmosis inversa, que se obtiene de las diversas fracciones de polifenol retenidas con diferente grado de purificación y del agua purificada del permeado de ósmosis inversa que puede usarse para producir bebidas. El documento WO2008/090460 describe un ejemplo adicional de un procedimiento para recuperar el componente hidroxitirosol de los residuos de la industria de producción del aceite de oliva, en el que no hay residuos de molienda usados solos sino una cantidad dada de aceitunas verdes con el objeto de obtener un producto particularmente enriquecido en hidroxitirosol. El texto propone un primer tratamiento de hidrólisis ácida a una temperatura mayor que la temperatura de reflujo para el material inicial (orujos y pulpas de aceitunas verdes), seguido por una clarificación del producto resultante (por ejemplo mediante filtración), a su vez seguido por un tratamiento en una resina de cromatografía de intercambio iónico. El producto adsorbido en tal columna, tras la elución, puede proporcionarse a su vez a una segunda columna de cromatografía cargada con una resina adsorbente no iónica. El producto adsorbido en esta última resina, tras la elución, se concentra adicionalmente en hidroxitirosol, si es necesario, mediante una filtración tangencial en membrana, específicamente ósmosis inversa, cuyo material retenido es el producto deseado. El documento WO2009/016482 describe un procedimiento para el tratamiento de materia vegetal, incluyendo las VW de aceitunas. Los autores proponen un procedimiento que comprende acidificación, dos etapas de lisis enzimática, que proporciona un paso para la separación de los sólidos entre las dos etapas de lisis enzimática, microfiltración y evaporación a vacío.

La descripción anterior, revela que los estudios respecto a las actividades de fitocomplejos extraídos de los residuos del procesamiento de aceitunas se concentran en el hidroxitirosol mientras que los estudios recientes (Cardinali *et al*/ J Agric Food chem vol 58 n.º 15, 2010) muestran que la actividad de una fracción con tamaño molecular mayor de 5000 Da y sin moléculas de bajo peso molecular, tales como hidroxitirosol y tirosol, revela una mayor acción antioxidante.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento innovador para tratar residuos de molienda que puede obtener extractos ricos en componentes biológicamente activos de alto peso molecular, perdiéndose estos componentes al aplicar los métodos de tratamiento de residuos de molienda conocidos en la bibliografía. En una realización adicional, el procedimiento de la presente invención, aplicado a las VW y orujos que proceden de la molienda de aceitunas de las variedades *Leccino* y *Carboncella*, conduce a la obtención de un producto cuya composición y características funcionales constituyen una parte integrante de la presente invención.

50 Descripción de la invención

La invención se describe mejor mediante el procedimiento según la reivindicación 1 y la reivindicación de producto 12. La presente invención tiene como objetivo definir el procedimiento para obtener un extracto rico en componentes biológicamente activos de alto peso molecular (PM > 500 Da), partiendo de las VW y orujos que proceden de la molienda de aceitunas. El método propuesto en el presente documento se basa en la combinación de los métodos de pretratamiento fisicoquímicos y enzimáticos, de la tecnología de filtración tangencial en membrana (microfiltración) y evaporación a vacío. En particular, el presente procedimiento proporciona una etapa de agitación hidráulica durante el procedimiento enzimático que permite, operando usando aguas de vegetación, la formación de una capa superficial sólida, denominada tapón, que se retira posteriormente de manera mecánica. En realidad, es la separación de dicho tapón, cuya composición se describe en el presente documento, la que permite obtener el producto final que tiene la composición deseada. En una realización preferida, dicho procedimiento se aplica a las VW y orujos que proceden de la molienda de aceitunas de las variedades *Leccino* y *Carboncella*. El extracto así obtenido se caracterizó a partir de un punto de vista funcional y de composición y se reivindican las propiedades del mismo para aplicaciones específicas en la industria alimentaria, cosmética, fitoterapéutica en el presente documento.

Descripción de las figuras

Figura 1: esquema del procedimiento de tratamiento para orujos y VW.

5 Figura 2: (a) curva de productividad para el procedimiento de microfiltración llevado a cabo en VW. (b) Curva de productividad para el procedimiento de microfiltración llevado a cabo en orujos.

Figura 3: Factor de estabilidad, expresado en %, del extracto denominado *Phenolea Complex* evaluado en aceite de oliva (a, b) y en manteca (c).

10

Figura 4: peso húmedo del tapón medido al final de tres procedimientos de pretratamiento.

Figura 5: imagen de representación y grosor del tapón obtenido en un procedimiento a escala de laboratorio que se opera usando un agitador mecánico (a) o usando un agitador hidráulico (b).

15

Figura 6: esquema del circuito de recirculación accionado en el reactor.

Descripción detallada de la invención:

20 El procedimiento consiste en adoptar tecnologías complementarias (reactor enzimática de recirculación, filtración tangencial, evaporación a vacío) para la extracción y la concentración de polifenoles contenidos en las matrices de interés (VW y orujos). Dicho procedimiento comprende: 1) recoger aguas de vegetación y orujos después del procedimiento de molienda de aceitunas; 2) pretratamiento físico-químico-enzimático; 3) filtración tangencial, preferiblemente microfiltración cerámica (MF); 4) evaporación a vacío con reducción del extracto líquido obtenido en la etapa 3) para dar una pasta semisólida. Se indica un esquema de dicho procedimiento en la figura 1.

25

Para los fines de la presente descripción, la expresión agitación hidráulica se usa para indicar la agitación de la masa líquida obtenida operando un procedimiento para la recirculación del mismo líquido de manera excéntrica con respecto a las paredes del reactor. Se indica un esquema de dicha recirculación en la figura 6. Una apertura dispuesta en la base inferior del reactor permite la salida del líquido del reactor introduciéndolo en un conducto. Dicho conducto regresa al reactor a través una apertura dispuesta en la base superior y desciende de nuevo a lo largo del reactor hasta la reintroducción del líquido en el fondo de dicho reactor, en una posición excéntrica con respecto a las paredes del reactor. El líquido puede circular en dicho conducto debido a un sistema de bombeo adecuado, seleccionado preferiblemente de entre una bomba de centrífuga y una bomba peristáltica, indicado por una flecha en la figura 6. El producto que se obtiene mediante el procedimiento de la presente invención es un extracto seco o suave que contienen todo el contenido polifenólico en las matrices iniciales, caracterizado por un contenido en polifenoles total comprendido entre 40 y 100 ppm. Dicho producto se destina a las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

30

35

40 Dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

1) recogida de las aguas de vegetación y los orujos después del procedimiento de molienda de aceitunas;

2) pretratamiento, que comprende las siguientes etapas:

45

a) acidificación hasta un pH comprendido entre 2,5 y 4;

b) tratamiento enzimático añadiendo una reserva de enzimas pectolíticas y celulolíticas y manteniendo con agitación hidráulica;

50

c) eliminación del residuo sólido o semisólido que se recoge en la superficie al final de dicha etapa b);

3) filtración tangencial, preferiblemente microfiltración cerámica (MF) con subsiguiente obtención de una fracción de concentrado y una fracción de permeado;

55

4) evaporación a vacío de la fase de permeado obtenida en la etapa 3).

Dicho pretratamiento 1) se lleva a cabo tanto en las aguas de vegetación como en los orujos con el objetivo de i) reducir y separar parte de la carga para dar suspensiones sólidas presente en la matriz (fibras celulósicas, glóbulos de aceite, residuos de pulpa), mejorar la capacidad de filtración del extracto de partida; ii) solubilizar los componentes polifenólicos y antocianicos que, al permanecer unidos a los residuos de la pared celular, son difíciles de recuperar. Tal como se sabe, los orujos y las aguas de vegetación se caracterizan por un alto contenido en sólidos que tienen un impacto negativo sobre el procedimiento de filtración tangencial, reduciendo los valores de productividad observados en la etapa de MF en aproximadamente el 50%. Además, la matriz celulósica atrapa los polifenoles evitando el paso de los mismos a la disolución y determinando la falta de expresión de la acción antioxidante de los mismos.

60

65

Las aguas de vegetación y los orujos se tratan inmediatamente tras terminar la producción de los mismos en el molino, en el plazo de 24 horas desde la producción de los mismos, preferiblemente en el plazo de 12 horas, para reducir el fenómeno de oxidación por los biofenoles. Las aguas de vegetación y los orujos producidos se recogen por separado en los tanques de almacenamiento y se pretratan por separado usando la combinación de enzimas pectolíticas y celulolíticas, enzimas de despolimerización que aumentan la liberación de los compuestos de interés de la estructura compleja, típica de las paredes celulares de las aceitunas, en las que se incluyen. Esta etapa proporciona un proceso de acidificación para inhibir las actividades de la oxidoreductasa tal como polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD), ambas facilitadas por la exposición de la disolución de aire. Al operar usando aguas de vegetación, el procedimiento de pretratamiento permite reducir los sólidos en suspensión comprendidos entre el 40/60% y un aumento del contenido polifenólico total (expresado en equivalentes de ácido gálico, GAE) comprendido entre el 20/30%. Al operar usando orujos, el pretratamiento permite recuperar aproximadamente el 70-80% de los polifenoles presentes en la matriz inicial. El panel derivado de los mismos (orujos usados) debido a la composición de los mismos en una sustancia de nitrógeno puede constituir un agente de mejora del suelo orgánico válido para su uso en agricultura.

En particular, dicho procedimiento 2) para el pretratamiento de las aguas de vegetación y los orujos comprende:

- a) acidificación hasta un pH comprendido entre 2,5 y 4;
- b) tratamiento enzimático añadiendo una reserva de enzimas pectolíticas y celulolíticas y mantenimiento en agitación hidráulica (recirculación);
- c) eliminación del residuo sólido o semisólido, denominado tapón, que se recoge en la superficie al final de dicha etapa b), en donde dicho residuo tiene una densidad comprendida entre 0,7 y 0,85 g/cm³.

En dicha etapa a), la acidificación se produce añadiendo un ácido, seleccionado preferiblemente de entre ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o mezcla de los mismos. En dicha etapa b), dichas enzimas son de calidad alimentaria y se producen preferiblemente a partir de cepas seleccionadas de entre *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum* y se añaden en cantidades comprendidas entre el 0,02 y el 0,1% peso/peso. En el caso de operación usando aguas de vegetación, dicha agitación hidráulica se mantiene durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 6 h, preferiblemente durante aproximadamente 4 h a una T comprendida entre 30-50°C; en el caso de operación usando orujos, dicha agitación hidráulica se mantiene durante aproximadamente 12-24 h a una T comprendida entre 50-80°C.

La agitación hidráulica y las condiciones de temperatura usadas en el pretratamiento conducen a una inclusión progresiva de aire y partículas de aceite en la fase sólida, determinando el flotamiento de dicha fase sólida sobre la parte líquida, con una separación espontánea de los sólidos. La fase sólida, el tapón, que se acumula en la parte superior de la masa de reacción también recoge las inclusiones de aceite que permanecen en la masa de reacción, conduciendo, por tanto, a una separación en fases de agua/aceite que contribuye al flotamiento espontáneo observado. Dicho tapón está constituido principalmente por sustancias coloidales, grasas, fibras vegetales, sales, azúcares y trazas de polifenol (0,5 - 1 mg/g de polifenol total expresado en GAE) y constituye el 2-7% en peso con respecto a la masa total del agua de vegetación. En esta fracción se recoge parte de los sólidos en suspensión presentes en el agua de vegetación, aproximadamente el 20% de los sólidos presentes en las aguas de vegetación iniciales. Dicho tapón tiene una estructura rica en inclusiones de aire que aumentan el grosor del mismo reduciendo la densidad aparente del mismo, que llega hasta estar comprendido entre aproximadamente 0,7 y aproximadamente 0,84 g/cm³. Según avanza el procedimiento, la superficie tiende a enfriarse y se vuelve pesada, las inclusiones de aire se reducen y por tanto la masa de flotamiento se comprime y la densidad aparente se aproxima de nuevo a la de las aguas de vegetación (1,00 g/cm³). Debido a este motivo, si el procedimiento de agitación hidráulica se prolonga más allá de 6 horas cuando se trabaja con VW o más allá de 24 horas cuando se trabaja con orujos, la masa tiende a recomprimirse depositándose en el fondo. Por tanto, es esencial para el presente procedimiento la retirada de dicho tapón de la superficie de la masa de reacción durante la etapa de engrosamiento, preferiblemente después de aproximadamente 4 h de agitación hidráulica cuando se trabaja con VW y después aproximadamente 24 h cuando se trabaja con orujos.

Dicha etapa c) se lleva a cabo bombeando y enviando a la sección de filtración posterior la masa líquida que se recoge en el fondo del tanque de pretratamiento.

En una realización adicional, después de dicha etapa de evaporación 4, llevada a cabo hasta obtener una humedad comprendida entre el 50 y el 80%, se lleva a cabo la siguiente etapa:

- 4¹) atomización hasta obtener un producto final con una humedad comprendida entre el 3 y el 6%.

El producto que se deriva de la etapa de pretratamiento tanto para los orujos como para las aguas de vegetación está constituido por un líquido (extracto) caracterizado tal como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1

Parámetro	Valores medidos en la masa líquida tras la etapa de pretratamiento
pH	3-5,0
Conductividad eléctrica (mS/cm)	10-20
Agua	86-94%
Salinidad (g/l)	8-12
P ₂ O ₅	1-2,2
K ₂ O	5-8
FeO, MgO	Aproximadamente 0,6
Materia seca (105°C)	6-14%
Ácidos orgánicos (g/l)	5-12
BOD ₅ * (g/l de O ₂)	50-150
COD *(g/l de O ₂)	80-180
Grasas (g/l)	0,3-23
Azúcares (g/l)	20-35
Polifenoles totales (g/l)	3-24
*BOD: demanda biológica de oxígeno	
*COD: demanda química de oxígeno	

La masa líquida obtenida mediante el pretratamiento se somete, por tanto, a dicha etapa 3) de filtración tangencial.

5 La masa líquida que se deriva de la etapa de pretratamiento se somete a una etapa de filtración perpendicular en una bolsa filtrante (punto de corte de 60 micrómetros) y el extracto se envía a la sección de microfiltración. Dicha microfiltración se lleva a cabo usando módulos de membrana de cerámica con un tamaño molecular comprendido preferiblemente en el intervalo de entre 0,1-1,4 micrómetros con una superficie de filtración activa comprendida entre 0,20 y 1 m² por módulo individual. Los módulos de cerámica pueden tener una estructura interna constituida por de 8 a 85 canales. El extracto se filtra a una T comprendida entre 15 y 60°C, preferiblemente entre aproximadamente 45 y 10 aproximadamente 50°C a una presión comprendida entre 3 y 10 bares, preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6 bares y conduce a concentración progresiva. Durante la prueba, el flujo del permeado con respecto al tiempo y la superficie de membrana está comprendido entre 15 y 100 l/m²h, preferiblemente entre 19 y 90 l/m²h. La variabilidad de punto de corte y la configuración del módulo permiten minimizar el impacto sobre el rendimiento de la filtración que se deriva de las oscilaciones de composición naturales de la matriz entrante (contenido en sólidos y contenido en polifenoles, factores relacionados con la estacionabilidad de la matriz) y maximizan simultáneamente la productividad en cuanto a la cantidad de permeado a lo largo del tiempo. La temperatura de funcionamiento seleccionada permite una permeación óptima de la sustancia orgánica y conduce a un producto final enriquecido en cuanto a las sustancias polifenólicas. Dicha temperatura se mantiene bajo control mediante una unidad de refrigeración. Al final de la microfiltración, la fracción de concentrado comprende todas las partículas corpusculares (fibras celulósicas, glóbulos de aceite, bacterias y células vegetales) mientras que el permeado está constituido por una disolución, de color rojo normalmente intenso debido a la presencia de pigmentos antociánicos que tienen un peso molecular comprendido entre 400 y 500 Da, y comprende toda la reserva de polifenoles y sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas (azúcar, proteínas, sales). La fase de microfiltración se lleva a cabo hasta la obtención de un factor de concentración comprendido entre 5 y 20, tras alcanzar la VCR preestablecida el procedimiento continúa a través de un procedimiento de diafiltración (DF). La DF comprende i) añadir al volumen de concentrado obtenido volúmenes equivalentes de agua osmótica; ii) nueva filtración hasta la permeación de todo el volumen de agua añadida. La DF permite aumentar el contenido molecular polifenólico en la fracción de permeación. El equivalente de volumen de agua añadido al concentrado obtenido en la VCR preestablecida se define como "diavolumen". Por último, el permeado se envía a la unidad de evaporación a vacío.

35 Durante la filtración, los módulos pueden experimentar obstrucción, por tanto, se lleva a cabo un procedimiento para controlar y contener este fenómeno, denominado impulso de retorno ("*backpulsing*"). Este procedimiento proporciona un régimen de flujo definido del permeado de contracorriente, con el objetivo de retirar el depósito que se forma progresivamente sobre la superficie de la membrana. El régimen de impulso de retorno permite mantener la productividad dentro de niveles aceptables y reducir los procedimientos de lavado y la concentración de las disoluciones de detergente.

40 En la posterior etapa de evaporación a vacío 4, el permeado se coloca en un concentrador/evaporador que funciona con los siguiente parámetros: T comprendida entre 30 y 40°C, de manera preferible aproximadamente 35°C, velocidad de flujo del destilado: 5-50 l/h, presión de descarga del compresor comprendida entre 15 y 35 bares, de manera preferible aproximadamente 20,5-21,5 bares, presión de aspiración del compresor comprendida entre 4 y 9 bares, de manera preferible aproximadamente 5,6-5,9 bares, vacío: 90-95 mbares, preferiblemente 92 mbares, VCR: 5-20. La evaporación continúa hasta obtener un producto final con una humedad comprendida entre el 10 y el 45 30%, preferiblemente entre aproximadamente el 20 y aproximadamente el 30%.

El producto final se obtiene sin requerir soportes tecnológicos tales como maltodextrinas, goma arábica u otros

habitualmente usados en fitoextractos pero con el solo uso de medios mecánicos y a baja temperatura.

Alternativamente, la etapa 4 puede ir seguida por una etapa atomización para obtener un extracto seco que tiene un contenido de humedad comprendido entre el 3 y el 6%.

5 La aplicación del presente procedimiento a aguas de vegetación y orujos que proceden de la molienda de aceitunas de las variedades *Leccino* y *Carboncella* permite obtener un producto que tiene la pigmentación característica de las variedades *Carboncella*, debido a la presencia de antocianinas que caracterizan el producto. Dicho producto se denomina *Phenolea Complex*. Los compuestos identificados en el extracto de *Phenolea Complex* comprenden
10 ácidos fenólicos, fenilpropanoides tales como verbascósido y los derivados del mismo y compuestos de flavonoide, principalmente luteolina y glucósido de apigenina, pero también quercetina y crisoeriol así como hidroxitirosol. El perfil nutricional típico del extracto obtenido mediante el procedimiento reivindicado en el presente documento que opera en aguas de vegetación y orujos que proceden de la molienda de aceitunas de las variedades *Leccino* y *Carboncella* se resume en la tabla 2 a continuación:

15 Tabla 2:

proteínas	2,00-3,00 g/100 g
grasas	0,05-0,15 g/100 g
fibras alimentarias	1,5-2,5 g/100 g
cenizas	5,5-6,5 g/100 g
hidratos de carbono	59,00-63,00 g/100 g
azúcares	11,00-13,00 g/100 g
sodio	340-380 mg/kg
metales pesados:	<0,1 mg/kg
productos fitofarmacéuticos:	Ninguno
mohos	<10 UFC/1 g
levaduras	<10 UFC/1 g

20 La combinación de dichas moléculas polifenólicas que se encuentra en el extracto que opera en aguas de vegetación y orujos de las variedades *Leccino* y *Carboncella* mediante el método descrito en el presente documento confiere de manera sorprendente características distintivas a dicho extracto. Dichas características hacen que sea particularmente adecuado para aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética y fitoterapéutica. Los extractos obtenidos usando la molécula reivindicada en el presente documento, más en particular, el extracto denominado *Phenolea Complex*, reveló ser eficaz para su uso en la preparación de productos nutricéuticos, como agentes
25 antioxidantes para equilibrar y reforzar el sistema inmunitario frente a daños provocados por radicales libres, como agentes antioxidantes para la protección de ADN, proteínas y lípidos frente al daño oxidativo, como componentes para alimentos y bebidas funcionales destinados para el consumo humano y veterinario. Dichos extractos, preferiblemente *Phenolea Complex*, se aplican en la industria de producción alimentaria, como antioxidantes para evitar la rancidificación y como conservantes antimicrobianos en carne fresca y/o congelada, productos de salchicha,
30 productos de horneado, salsas y condimentos generalmente en productos alimentarios que contienen una parte de grasa sujeta a rancidificación y/o en los productos alimentarios sujetos a proliferación bacteriana. Lo mismo puede usarse en la preparación de cosméticos o medicamentos para uso tópico con acción detoxificante y suavizante para reparar daños relacionados con la edad y/o daños provocados por agentes de estrés externos o internos. Algunas de estas actividades se indican en los ejemplos que siguen y que son una parte integrante de la presente invención
35 sin limitar el campo de protección de la misma.

El procedimiento reivindicado en el presente documento comprende una serie de etapas que, solas o en combinación entre sí, ofrecen ventajas considerables con respecto a lo que se conoce en el estado de la técnica.

40 La etapa de pretratamiento asociada con la formación del residuo sólido o semisólido (tapón) representa una etapa crucial del procedimiento tanto en cuanto a la optimización del rendimiento del sistema de producción como en cuanto al rendimiento y calidad del producto. En particular, la retirada de dicho tapón al final de dicha etapa 2), sin requerir el uso de etapas de pretratamiento adicionales, conduce a:

45 1) una mejora de aproximadamente el 50-60% de la productividad (cantidad de permeado durante el tiempo) de la posterior etapa de MF;

2) mejora del rendimiento de la sección de MF en cuanto a la concentración: tras la retirada de dicho tapón se observa en realidad un aumento del 60-80% en la razón de concentración en volumen (VCR),
50

3) reducción de incrustación (obstrucción) de los filtros de membrana con consiguiente reducción de los procedimientos de lavado y menor impacto medioambiental asociado con la eliminación de las disoluciones de detergente usadas para reacondicionar los módulos;

4) obtención de un producto en pasta semisólido potencial, constituido por dicho tapón, que va a destinarse para cosmética, cría de animales o para producir energía. En realidad, tal producto puede aplicarse como pienso o complemento en la industria alimentaria animal, o también puede constituir una biomasa útil para la producción de fertilizantes o energía y/o como lodos de belleza para uso cosmético.

5 La etapa de evaporación permite obtener una melaza que contiene solamente el 10-30% de agua y una reserva de polifenoles (simples y complejos) para facilitar la sinergia entre las diferentes moléculas y crear las mejores condiciones para la aparición de la actividad biológica. En realidad, el 10-30% de contenido de humedad reproduce la composición química original presente en la aceituna. La evaporación que elimina aproximadamente el 70-90% del agua presente en el suministro cargado, concentra el contenido polifenólico hasta obtener un título de polifenoles total equivalente al 4-10%. Además, dicha etapa permite una concentración de la fracción de líquido sin suministrar calor, evitando el estrés térmico del producto final y garantizando la conservación de la reserva original de moléculas polifenólicas y antocianicas. La ausencia de oxígeno dentro de la caldera de ebullición protege parcialmente el producto frente a contaminaciones biológicas. La retirada de agua del producto postevaporado facilita una mayor capacidad de conservación y una reducción de la contaminación biológica. El producto así obtenido mantiene la solubilidad en agua de los compuestos presentes inalterada, facilitando la aplicación de los mismos. Además, debido a la etapa de evaporación llevada a cabo mediante el procedimiento descrito en el presente documento, el producto final se obtiene sin requerir soportes tecnológicos generalmente usados tales como maltodextrinas, goma arábiga, sílice, y evitando por tanto los fenómenos relacionados con la modificación de las sustancias químicas presentes. Las posibles modificaciones incluyen cristalización de azúcares, formación de laca, precipitación de sales, fenómenos que podrían poner en peligro la funcionalidad de las moléculas polifenólicas de interés y la posibilidad de interacción de las mismas. Además, la adición de soportes tecnológicos conduce a una desventaja inherente relacionada con la adición de solutos adicionales dentro del extracto original que conduciría a una reducción del título de las sustancias de interés.

25 Una ventaja adicional se encuentra en la posibilidad de reutilizar el agua evaporada en los procedimientos de tratamiento evitando así el consumo de agua del sistema de suministro de agua o pozo. Por último, el concentrador/evaporador funciona a vacío, optimizando el rendimiento de la energía aplicada.

30 Se suministra una cantidad de destilado al sistema de microfiltración para la técnica de diafiltración. Se ha prestado atención al destilado producido, caracterizado por sustancias volátiles inicialmente presentes en el producto introducido en una caldera que imita el aroma de aceitunas frescas y, por tanto, al papel que esta fracción puede desempeñar en la industria cosmética y alimentaria.

35 Ejemplos:

Ejemplo 1: Pretratamiento de las VW, condiciones de agitación hidráulica (escala de laboratorio).

40 Se llevaron a cabo tres procedimientos en paralelo. A partir de un único lote de VW, se tomaron 3 muestras de 1 litro cada una. Se trataron las tres muestras a pH 3-3,5, a una temperatura de 50°C. A cada una de las tres muestras se le añadió una preparación enzimática, que consistía en pectinasa y celulasa obtenida partiendo de moho (*Aspergillus niger*), a una concentración del 0,064% peso/peso. Se seleccionaron también dichas enzimas para la mejor separación de las partículas de aceite en la etapa de rotura llevada a cabo de ese modo. En realidad, las enzimas, que destruyen la matriz pecto-celulósica de las VW, permiten que los sólidos en suspensión se agreguen en la parte superior de la masa de reacción, extrayéndose los mismos hacia arriba junto con las burbujas de aire y las partículas de aceite. La alteración de la parte fibrosa por las enzimas constituye la base de la agregación del tapón que no se produce en ausencia de enzimas, a menos que sea en porciones muy pequeñas. La característica distintiva de los tres procedimientos consiste en el tipo de agitación llevada a cabo tras la adición de la preparación enzimática en cada una de las tres muestras. Se sometió la muestra 1 a una agitación mecánica central, en la que se mantuvo un anclaje magnético en agitación centralmente en el fondo de la masa de reacción a un régimen de aproximadamente 100 revoluciones/minuto. Se sometió la muestra 2 a una agitación mecánica lateral, en la que se dispuso un anclaje magnético en una posición descentrada en el fondo de la masa de reacción y se mantuvo en agitación a un régimen de aproximadamente 100 revoluciones/minuto. Se sometió la muestra 3 a agitación hidráulica, en la que un sistema de bombeo peristáltico operó una recirculación de líquido en posición excéntrica con respecto a la masa de reacción, extrayendo el líquido de la base inferior de la masa de reacción y reintroduciendo el mismo, a través de un conducto, en una posición excéntrica inferior con respecto a dicha masa. Se continuó la agitación durante 120 minutos.

60 La figura 4 indica el peso promedio del tapón húmedo tal como se mide en cada una de las tres muestras. La muestra 1 reveló la formación de un vórtice que no permitió el engrosamiento del tapón. La muestra 2 reveló la formación de una zona de calma y una zona de turbulencia, con la consiguiente formación de un tapón superior cuyo peso húmedo fue de aproximadamente 40 g. En cambio, la muestra 3 reveló una recuperación de sólidos en el tapón equivalente a al menos el 20% de los sólidos contenidos en dichas VW. En particular, el peso del tapón recuperado es de aproximadamente 90 g.

65 La figura 5 indica una imagen del tapón tal como se obtiene en la muestra 2, sometida a agitación mecánica lateral,

y en la muestra 3, sometida a agitación hidráulica. El segmento indica la altura del tapón obtenido, equivalente a 0,8 cm en la muestra 2 y a 4,5 cm en la muestra 3.

5 Se obtuvieron resultados totalmente comparables operando en las condiciones descritas anteriormente, encontrándose la única variante en el uso de una preparación enzimática al 0,1% peso/peso.

Ejemplo 2: Pretratamiento de las VW, condiciones de agitación hidráulica (planta de viabilidad).

10 Se introdujeron VW en un reactor y se sometieron a las condiciones descritas en el ejemplo 1: pH 3-3,5, 50°C. A dichas VW se les añadió una preparación de pectinasa y celulasa obtenida partiendo de moho (*Aspergillus niger*), a una concentración del 0,064% peso/peso. Se sometió la masa líquida a agitación hidráulica, tal como se define en la presente invención. Se monitorizó la formación y la altura del tapón a intervalos posteriores. Se observó que se alcanzó el pico de altura del tapón tras 4 h de agitación hidráulica.

15 Ejemplo 3: Composición del tapón

Se sometieron VW a un procedimiento de pretratamiento tal como se describe en el ejemplo 1, operando con agitación hidráulica. Se retiró la fracción sólida del tapón y se analizó la composición de la misma. La composición de dicha fracción se indica en la tabla 3.

20 Tabla 3

Composición centesimal del "tapón" de la fracción sólida	
	%
HUMEDAD	76,02
PROTEÍNAS	4,73
GRASAS	9,84
FIBRAS ALIMENTARIAS	4,3
CENIZAS	1,02
SALES, AZÚCARES Y OTROS ELEMENTOS TRAZA	5,1

25 Ejemplo 4: Microfiltración llevada a cabo en la masa líquida obtenida del pretratamiento de las VW y los orujos.

Se llevó a cabo microfiltración usando módulos de membrana de cerámica con tamaño molecular equivalente a 0,14 micrómetros. Los parámetros de funcionamiento usados se indican en la tabla 4 a continuación:

30 Tabla 4:

Parámetros del procedimiento	Valor
Velocidad de flujo de suministro	0,5 m ³ /hora
Presión transmembrana	1,35 bares
Presión de funcionamiento	5-6 bar
Temperatura	20-50°C
Velocidad de flujo	6-7 m/s
VCR (razón de concentración en volumen)	alrededor de 8-10

Los resultados obtenidos operando en las VW y en los orujos en cuanto a productividad surgen de las curvas indicadas en las figuras 2a y 2b, respectivamente.

35 Ejemplo 5: Procedimiento de extracción aplicado a la variedad *Carboncella*

La tabla 5 indica el perfil polifenólico promedio observado en las VW de la variedad *Carboncella*, antes de someterse a procedimientos de extracción, tal como se evalúa mediante HPLC/DAD.

40 Tabla 5:

Aguas de vegetación de la variedad <i>Carboncella</i>	mg/l
deriv. gluc. oleósido (390)	682,9
gluc. oleósido (390)	2238,9
ácido elenólico AE (242)	471,6
glic. OH-Tyr (170)	55,3
der. OH-Tyr	71,9
OH-Tyr (hidroxitirosol)	228,6
gluc. OH-Tyr (316)	268,6

Tyr	74,3
gluc. Tyr (300)	0,0
der. Tyr	48,3
ácido vanílico (168)	0,0
desmetil-oleurop. (526)	0,0
derivado secoiridoide (320)	0,0
DACOLAG (320)	768,2
oleocantal (304)	0,0
derivado de ácido cafeico	34,7
ácido cafeico	0,0
ácido p-cumárico (164)	0,0
bOH verbascósido (isómeros) (640)	63,7
verbascósido (624)	68,7
isoverbascósido	10,6
éster cafeoílico de secologanósido (552)	62,0
éster p-cumaróilico de secologanósido (536)	78,3
total	5226,7

Ejemplo 6: Procedimiento de extracción partiendo de VW que proceden de las variedades *Leccino* y *Carboncella* y análisis nutricional del extracto obtenido.

- 5 Se pretrataron 4.500 l de aguas de vegetación procedentes de la molienda de aceitunas de las variedades *Leccino* y *Carboncella* mediante acidificación usando ácido clorhídrico hasta alcanzar un pH de 2,5. Se aplicó un tratamiento enzimático posterior a las mismas añadiendo enzimas pectolíticas y celulolíticas producidas por las cepas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum* en cantidades totales equivalentes al 0,05% peso/peso. Se mantuvo la suspensión con agitación hidráulica durante 4 h, a una T de 37°C. Se eliminó el residuo semisólido
- 10 presente en la superficie al final de las 4 h. Se filtró el líquido obtenido del pretratamiento en una bolsa filtrante (punto de corte de 60 micrómetros) y se envió el extracto a la sección de microfiltración. Se llevó a cabo dicha microfiltración usando módulos de membrana de cerámica con tamaño molecular equivalente a aproximadamente 0,14 micrómetros con superficie de filtración activa comprendida entre 0,20 y 1 m² por módulo individual. El extracto se filtra a una T de 47°C a una presión de 5 bares. Se obtiene un volumen de concentrado equivalente a
- 15 aproximadamente 450 l, al que se le añade un volumen igual de agua desmineralizada antes de llevar a cabo una nueva filtración usando filtros como los usados en la etapa previa para el procedimiento de diafiltración (DF) definido que se lleva a cabo hasta que el volumen de agua añadido al concentrado esté totalmente permeado por la membrana. Se dispone el permeado así obtenido (V= 4.050 + 450 l) en un evaporador a vacío, donde se llevan a cabo operaciones a 35°C, con una presión de descarga del compresor de aproximadamente 21 bares y una presión
- 20 de aspiración del compresor de aproximadamente 5,7 bares, con un vacío de aproximadamente 92 mbares. Se lleva a cabo evaporación hasta alcanzar un nivel de humedad equivalente a aproximadamente el 27%. De una cantidad inicial de 4.500 l de VW, se obtienen aproximadamente 220 kg de extracto en forma de pasta semisólida. Los valores en cuanto a volúmenes de las fracciones líquidas de procedimiento, además del volumen del extracto final, se indican en la tabla 6.
- 25

Tabla 6:

FRACCIONES DEL PROCEDIMIENTO	
VW	4.500
CONCENTRADO DE MF	450 l
PERMEADO DE MF	4.050 l
DIAVOLUMEN	450 l
EXTRACTO LÍQUIDO DE PREEVAPORACIÓN	4.500 l
EXTRACTO FINAL	220 kg

- 30 El producto así obtenido, denominado *Phenolea Complex*, tiene las siguientes características químicas y nutricionales.

Tabla 7:

proteínas	2,50 g/100 g
grasas	0,10 g/100 g
fibras alimentarias	2,0 g/100 g
cenizas	6,00 g/100 g
hidratos de carbono	61,00 g/100 g
azúcares	12,00 g/100 g
sodio	360 mg/kg

metales pesados:	<0,1 mg/kg
productos fitofarmacéuticos:	Ausentes
moho	<10 UFC/1 g
levadura	<10 UFC/1 g
polifenoles totales (expresados en equivalentes de ácido gálico)	45/100 mg/g

El perfil por espectrometría de masas del producto así obtenido se indica en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8

5

DETERMINACIÓN DE BIOFENOLES MEDIANTE HPLC	<i>Phenolea Complex</i>		
BIOFENOLES TOTALES	280 nm	mg/kg	45261
PERFIL DE FENOLES NATURALES			
FENOLES NATURALES TOTALES	280 nm	mg/kg	39257
ALCOHOLES AROMÁTICOS TOTALES	280 nm	mg/kg	21328
Hidroxitirosol	280 nm	mg/kg	20131
Tirosol	280 nm	mg/kg	1197
DERIVADOS DE OLEUROPEÍNA	280 nm	mg/kg	23005
DERIVADOS DE LIGSTRÓSIDO	280 nm	mg/kg	1710
VERBASCÓSIDO	280 nm	mg/kg	1089
OLEOCANTAL	280 nm	mg/kg	1020
LIGNANOS TOTALES (pinorresinol y acetoxipinorresinol)	280 nm	mg/kg	36
ÁCIDOS FENÓLICOS TOTALES ácido protocatético, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico	280 nm	mg/kg	4784
FLAVONOIDES TOTALES	280 nm	mg/kg	222
Luteolina	280 nm	mg/kg	222
Apigenina	280 nm	mg/kg	n.d.
ÁCIDOS SECOIRIDOIDES TOTALES	240 nm	mg/kg	7695
Ácido descarboximetil-elenólico	240 nm	mg/kg	2408
Ácido elenólico	240 nm	mg/kg	5287

Ejemplo 7: Evaluación de las propiedades antioxidantes de aceites vegetales y grasas animales del extracto *Phenolea Complex* en comparación con dos extractos comerciales de romero.

- 10 Con el objetivo de evaluar las propiedades antioxidantes en productos alimentarios, en particular en aceites vegetales y grasas animales, del extracto vegetal denominado *Phenolea Complex* en comparación con dos tipos de extractos comerciales de romero (tipo I y tipo II definidos), se prepararon muestras con diferentes niveles de adición de extracto para definir la eficacia en el control de la oxidación lipídica del producto.
- 15 Cuando se sometió a prueba en aceite de oliva, el factor de protección del extracto *Phenolea Complex*, añadido al aceite de oliva en cantidades equivalentes a 0,75 g/kg o 1 g/kg, en ambas concentraciones usadas, supera los dos tipos de extractos comerciales de romero usados, en las mismas concentraciones, en la comparación (figuras 3a, 3b).
- 20 En manteca, tal como se indica en la figura 3c, el extracto *Phenolea Complex* alcanza un índice de estabilidad marcadamente superior que los dos extractos comerciales de romero.

El método Rancimat (Metrohm mod. 679) se usó para determinar la estabilidad como función de la descomposición oxidativa.

25

Los datos indicados en este caso revelan la actividad considerable del extracto denominado *Phenolea Complex*, que puede usarse, por tanto, por ejemplo, en la industria de producción de salchichas, con el objetivo de proteger el producto y especialmente reemplazar algunos aditivos (antioxidantes).

30 Ejemplo 8: Tipo de composición polifenólica del extracto *Phenolea Complex*.

La composición polifenólica en cuanto a ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, secoiridoideos y flavonoides medida en el extracto *Phenolea Complex* debe considerarse equivalente (desde un punto de vista de la calidad) con respecto a la composición polifenólica del aceite de oliva virgen extra. Respecto a la cantidad, el extracto obtenido mediante el procedimiento reivindicado en el presente documento tiene una concentración polifenólica mayor. La tabla 9 indica el contenido en compuestos polifenólicos identificados en el extracto *Phenolea Complex* con el análisis de espectrometría de masas CL/EM en comparación con las composiciones promedio de un aceite de oliva virgen extra de Sabina.

40

Tabla 9:

Comparación de los principales biofenoles de las variedades <i>Carboncella/Leccino</i>	<i>Phenolea Complex</i>	ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE SABINA
DETERMINACIÓN DE BIOFENOLES MEDIANTE HPLC	mg/kg	mg/l
BIOFENOLES TOTALES incluyendo:	45261	389,56
Hidroxitirosol	20131	1,72
Tirosol	1197	1,12
Derivados de oleuropeína	23005	51,88
OLEOCANTAL	1020	25,65
LIGNANOS TOTALES (pinorresinol y acetoxipinorresinol)	36	116,43
Luteolina	222	4,10
Ácido elenólico	5287	65,94

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la extracción y concentración de compuestos polifenólicos contenidos en aguas de vegetación y/u orujos obtenidos del procesamiento de aceitunas que comprende:
 - 1) recogida del líquido que consiste en aguas de vegetación y/u orujos después del procedimiento de molienda de aceitunas;
 - 2) pretratamiento químico, físico y enzimático;
 - 3) filtración tangencial a una T en el intervalo de 45 a 50°C, preferiblemente microfiltración cerámica (MF), obteniendo así una fracción de concentrado y una fracción de permeado;
 - 4) evaporación a vacío de la fase de permeado obtenida en 3);

en el que dicho pretratamiento 2) comprende:

 - a) acidificación hasta un pH de entre 2,5 y 4;
 - b) tratamiento enzimático mediante la adición de una reserva de enzimas celulolíticas y pectolíticas, caracterizado porque durante dicho tratamiento el líquido se mantiene con agitación hidráulica operando un procedimiento para la recirculación del mismo líquido de manera excéntrica con respecto a la pared del reactor, en el que dicha agitación se mantiene durante un tiempo de 2 a 6 h, preferiblemente durante aproximadamente 4 h a una T en el intervalo de 30 a 50°C cuando se trabaja con aguas de vegetación, y dicha agitación hidráulica se mantiene durante 12-24 h a una T en el intervalo de 50 a 80°C cuando se trabaja con orujos;
 - c) eliminación del residuo sólido o semisólido, denominado tapón, que se recoge en la superficie al final de dicha etapa b) donde dicho residuo tiene una densidad comprendida entre 0,7 y 0,85 g/cm³, en el que dicha eliminación tiene lugar bombeando y enviando la masa líquida recogida en el fondo del tanque de pretratamiento a la sección de filtración posterior y dicho tapón constituye el 2-7% en peso con respecto a la masa total del agua de vegetación y contiene aproximadamente el 20% de los sólidos presentes en las aguas de vegetación iniciales.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, después de dicha etapa 3) de filtración tangencial, también se lleva a cabo la siguiente etapa:
 - 3') adición de agua, preferiblemente agua osmótica, a dicho concentrado, y diafiltración posterior hasta la permeación de todo el volumen de agua añadido obteniendo así una fracción de permeado que se envía a la etapa de evaporación 4), junto con la fracción de permeado obtenida en 3);

en el que dicho volumen de agua añadido es preferiblemente igual al volumen de dicho concentrado.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de evaporación 4) continúa hasta que se obtiene un producto final que tiene niveles de humedad en el intervalo del 10 al 30%, preferiblemente desde el 20 hasta el 30%.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de evaporación 4) continúa hasta que se obtiene un producto que tiene niveles de humedad en el intervalo del 50 al 80%, y también se lleva a cabo la siguiente etapa:
 - 4') atomización hasta un producto final que tiene niveles de humedad en el intervalo del 3 al 6%.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas aguas de vegetación y/u orujos se recogen y se procesan en el plazo de 24 horas desde su producción, preferiblemente en el plazo de 12 horas.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha acidificación tiene lugar añadiendo un ácido, seleccionado preferiblemente de ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o mezclas de los mismos.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas enzimas son enzimas de calidad alimentaria y se producen preferiblemente por cepas seleccionadas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma longibrachiatum* y se añaden en cantidades en el intervalo del 0,02-0,1% peso/peso.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho residuo recogido en la superficie al final de dicha etapa b), el tapón, consiste principalmente en sustancias coloidales, grasas, fibras vegetales, sales,

azúcares y trazas de polifenoles.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha masa líquida que se deriva de la etapa de pretratamiento 2) se somete a una etapa de filtración perpendicular en una bolsa filtrante, preferiblemente con un punto de corte de aproximadamente 60 micrómetros y luego se envía a dicha sección de filtración tangencial.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha filtración se lleva a cabo con módulos de membrana de cerámica con un punto de corte molecular que oscila preferiblemente entre 0,1 y 1,4 micrómetros que tienen una superficie de filtración activa comprendida entre 0,20 y 1 m² por módulo individual a una presión comprendida entre 3 y 10 bar, preferiblemente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 6 bar con un flujo de permeado en el tiempo en el intervalo de 15 a 100 l/m²h, preferiblemente desde 19 hasta 90 l/m²h, en el que dicha filtración se continúa hasta que se obtiene un factor de concentración en el intervalo de 5 a 20.
11. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que en dicha etapa 4) de evaporación a vacío, el permeado obtenido en dichas etapas 3) y/o 3') se coloca en un concentrador/evaporador que funciona con los siguiente parámetros: T en el intervalo de 30 a 40°C, de manera preferible aproximadamente a 35°C, velocidad de flujo del destilado: 5-50 l/h, altura de descarga del compresor en el intervalo de 15 a 35 bar, de manera preferible aproximadamente 20,5-21,5 bar, presión de aspiración del compresor en el intervalo de 4 a 9 bar, de manera preferible aproximadamente 5,6-5,9 bar, vacío: 90-95 mbar, preferiblemente 92 mbar.
12. Producto obtenido de aguas de vegetación y/u orujos del procesamiento de aceitunas según el procedimiento reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dichas aguas de vegetación y/u orujos se exponen a un pretratamiento que determina el flotamiento de una fase sólida sobre la parte líquida con una separación espontánea de los sólidos, en el que dicha fase sólida se elimina entonces bombeando y enviando la masa líquida recogida en el fondo del tanque de pretratamiento a la sección de filtración posterior y dicha fase sólida contiene aproximadamente el 20% de los sólidos presentes en las aguas de vegetación iniciales, en el que dicha filtración es una filtración tangencial que se opera a una T en el intervalo de 45 a 50°C, preferiblemente es microfiltración cerámica (MF).
13. Producto según la reivindicación 12, en el que dichas aguas de vegetación y/u orujos proceden de la operación de molienda de aceitunas de las variedades *Leccino* y *Carboncella*.
14. Producto según las reivindicaciones 13 que comprende una cantidad de fibras alimentarias de entre 1,5 y 2,5 g/100 g.
15. Producto según la reivindicación 13, denominado *Phenolea Complex*, caracterizado por el perfil químico nutricional indicado en la tabla:

proteínas	200-3,00 g/100 g
grasas	0,05-0,15 g/100 g
fibras alimentarias	1,5-2,5 g/100 g
cenizas	5,5-6,5 g/100 g
hidratos de carbono	59,00-63,00 g/100 g
azúcares	11,00-13,00 g/100 g
sodio	340-380 mg/kg
metales pesados:	<0,1 mg/kg
productos fitofarmacéuticos:	Ninguno
mohos	<10 UFC/1 g
levaduras	<10 UFC/1 g

16. Producto según la reivindicación 15, caracterizado por el siguiente perfil de HPLC:

DETERMINACIÓN DE BIOFENOLES MEDIANTE HPLC	<i>Phenolea Complex</i>		
BIOFENOLES TOTALES	280 nm	mg/kg	45261
PERFIL DE FENOLES NATURALES			
FENOLES NATURALES TOTALES	280 nm	mg/kg	39257
ALCOHOLES AROMÁTICOS TOTALES	280 nm	mg/kg	21328
Hidroxitirosol	280 nm	mg/kg	20131
Tirosol	280 nm	mg/kg	1197
DERIVADOS DE OLEUROPEÍNA	280 nm	mg/kg	23005
DERIVADOS DE LIGSTRÓSIDO	280 nm	mg/kg	1710
VERBASCÓSIDO	280 nm	mg/kg	1089
OLEOCANTAL	280 nm	mg/kg	1020

LIGNANOS TOTALES (pinorresinol y acetoxipinorresinol)	280 nm	mg/kg	36
ÁCIDOS FENÓLICOS TOTALES ácido protocatético, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico	280 nm	mg/kg	4784
FLAVONOIDES TOTALES	280 nm	mg/kg	222
Luteolina	280 nm	mg/kg	222
Apigenina	280 nm	mg/kg	n.d.
ÁCIDOS SECOIRIDOIDES TOTALES	240 nm	mg/kg	7695
Ácido descarboximetil-elenólico	240 nm	mg/kg	2408
Ácido elenólico	240 nm	mg/kg	5287

17. Producto según la reivindicación 12 ó 13 para su uso en los sectores alimentario, cosmético y fitoterápico.
- 5 18. Producto según la reivindicación 12 ó 13 para su uso en la preparación de productos nutracéuticos, tales como antioxidantes para equilibrar y reforzar el sistema inmunitario frente a daños provocados por radicales libres, tales como antioxidantes para la protección de ADN, proteínas y lípidos frente al daño oxidativo, tales como componentes para alimentos y bebidas funcionales destinados para el consumo humano y veterinario.
- 10 19. Producto según la reivindicación 12 ó 13 para su uso en tecnología de los alimentos, como antioxidante para evitar la rancidez y como conservante antimicrobiano, o bien solo o bien en combinación con otros aditivos alimentarios seleccionados preferiblemente de ácido ascórbico, ascorbato de sodio, en carnes frescas y congeladas, salchichas de tipo salami, productos horneados, aderezos y condimentos y en alimentos que contienen una parte grasa sujetos a rancidez y/o en alimentos sujetos a proliferación bacteriana en general y deterioro del color.
- 15 20. Producto según la reivindicación 12 ó 13 para su uso en la preparación de cosméticos o medicamentos para uso tópico que tiene una acción antioxidante, detoxificante y calmante dirigida a la reparación del daño relacionado con la edad y/o el daño provocado por agentes estresantes externos o internos.
- 20

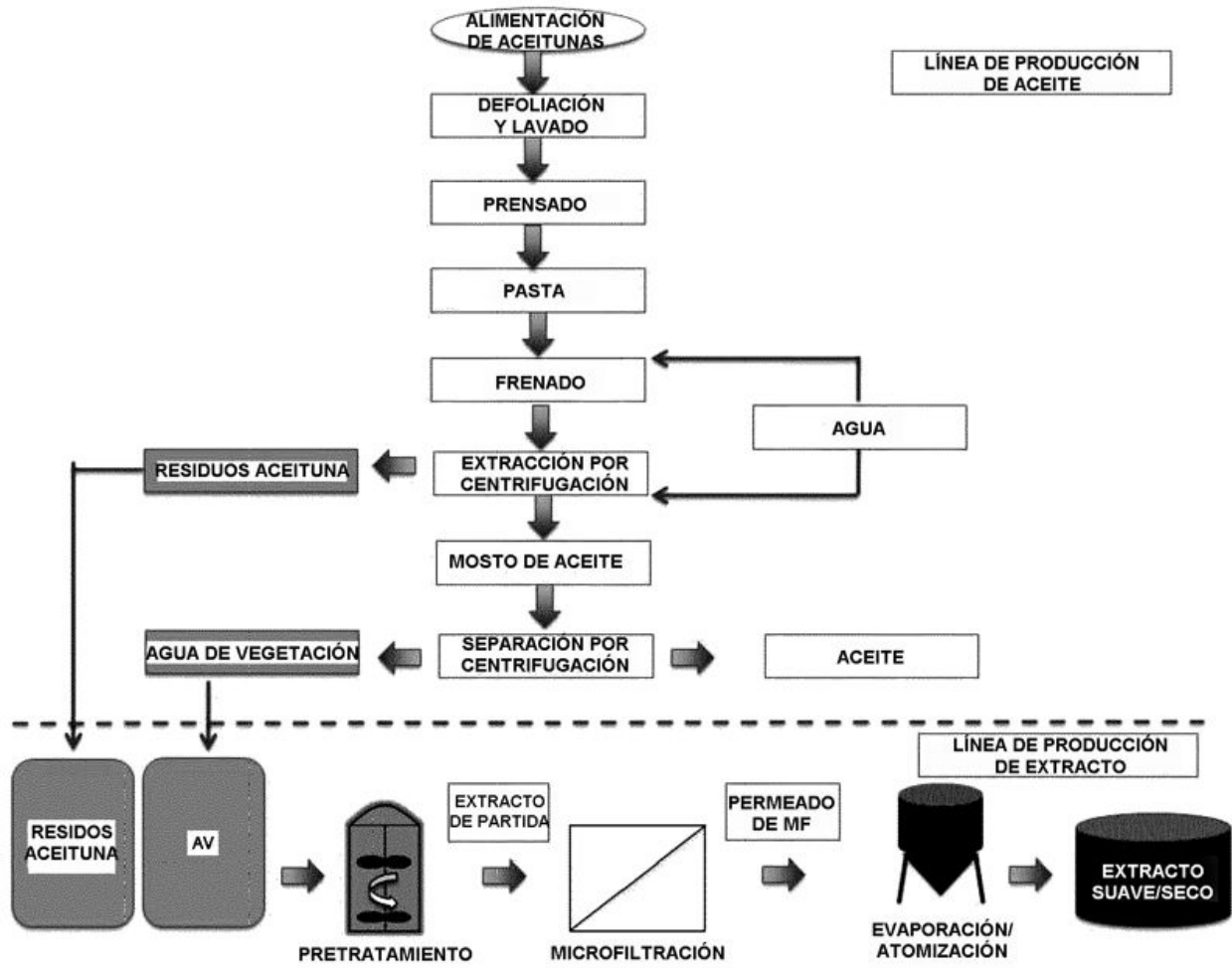


FIG.1

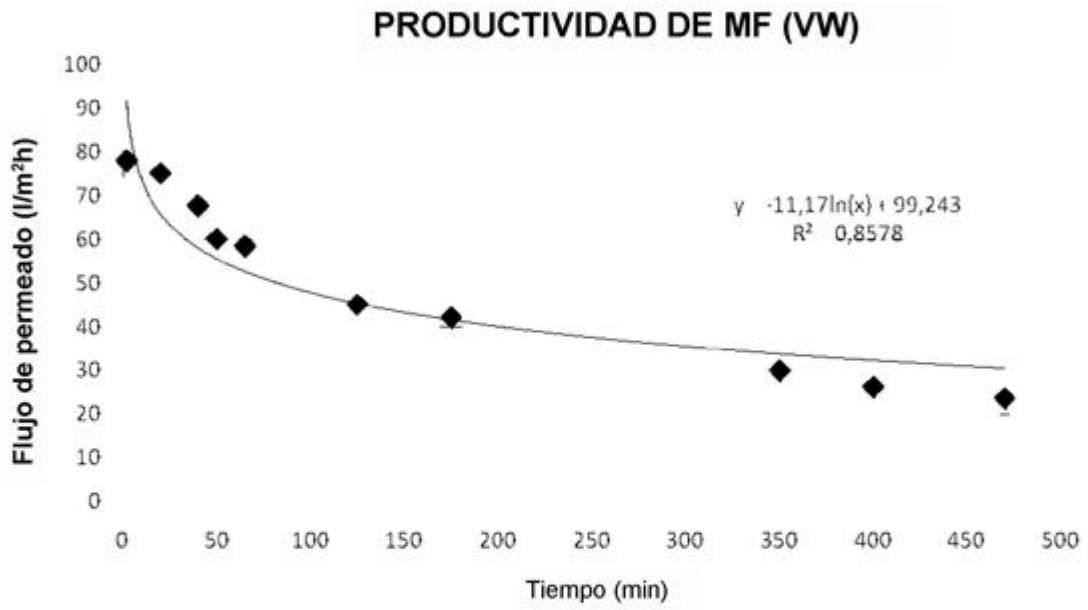


FIG. 2A

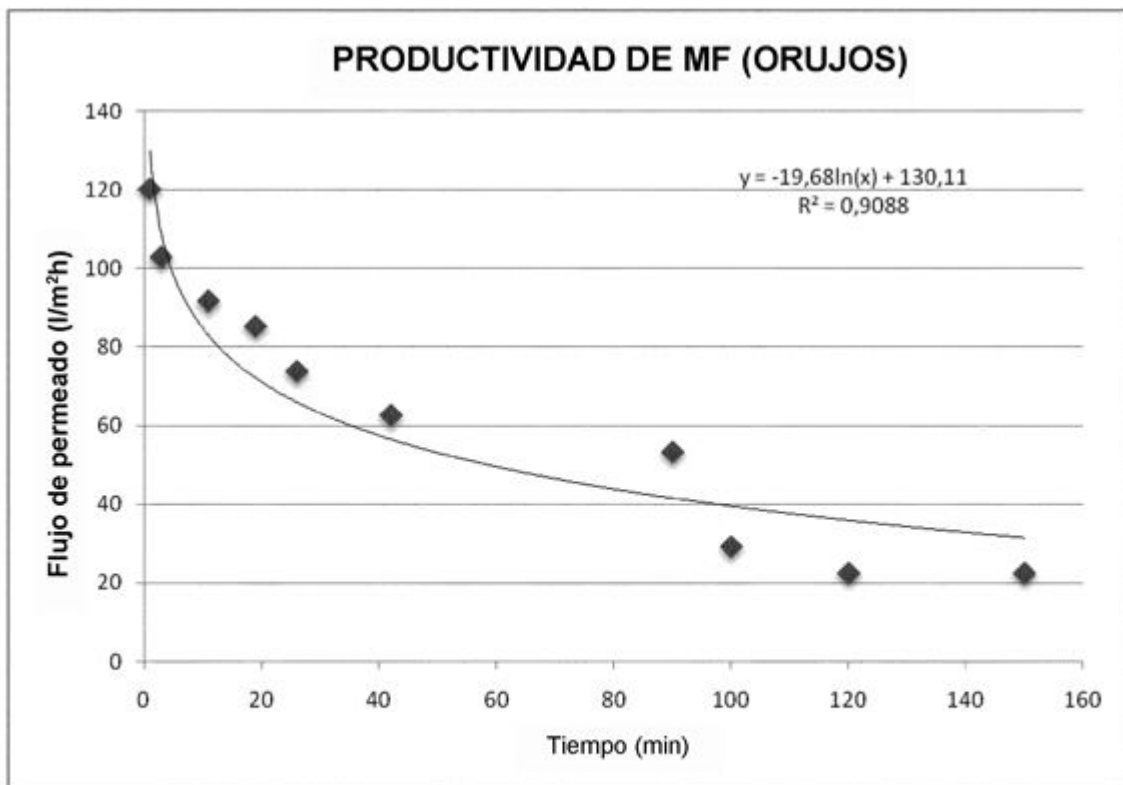


FIG. 2B

Índice de estabilidad en aceite de oliva (ROO)

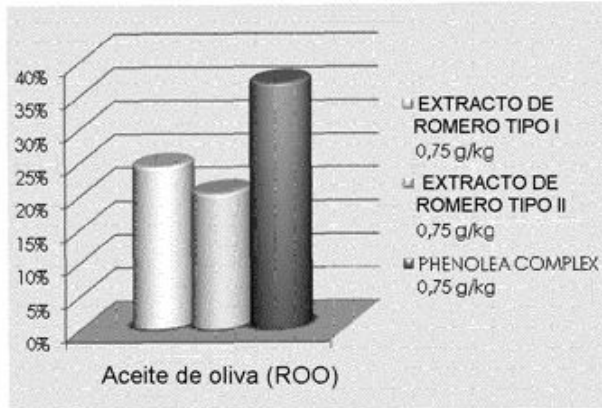


FIG. 3A

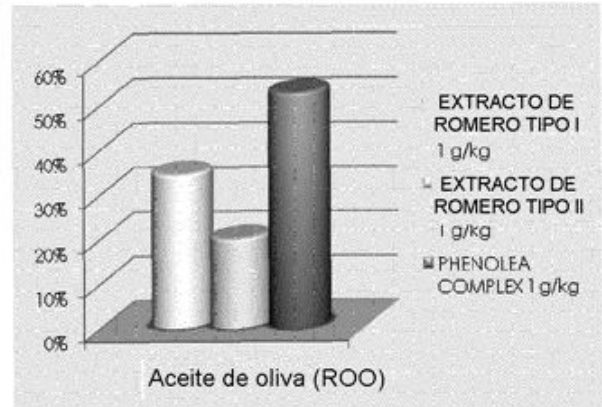


FIG. 3B



FIG. 3C

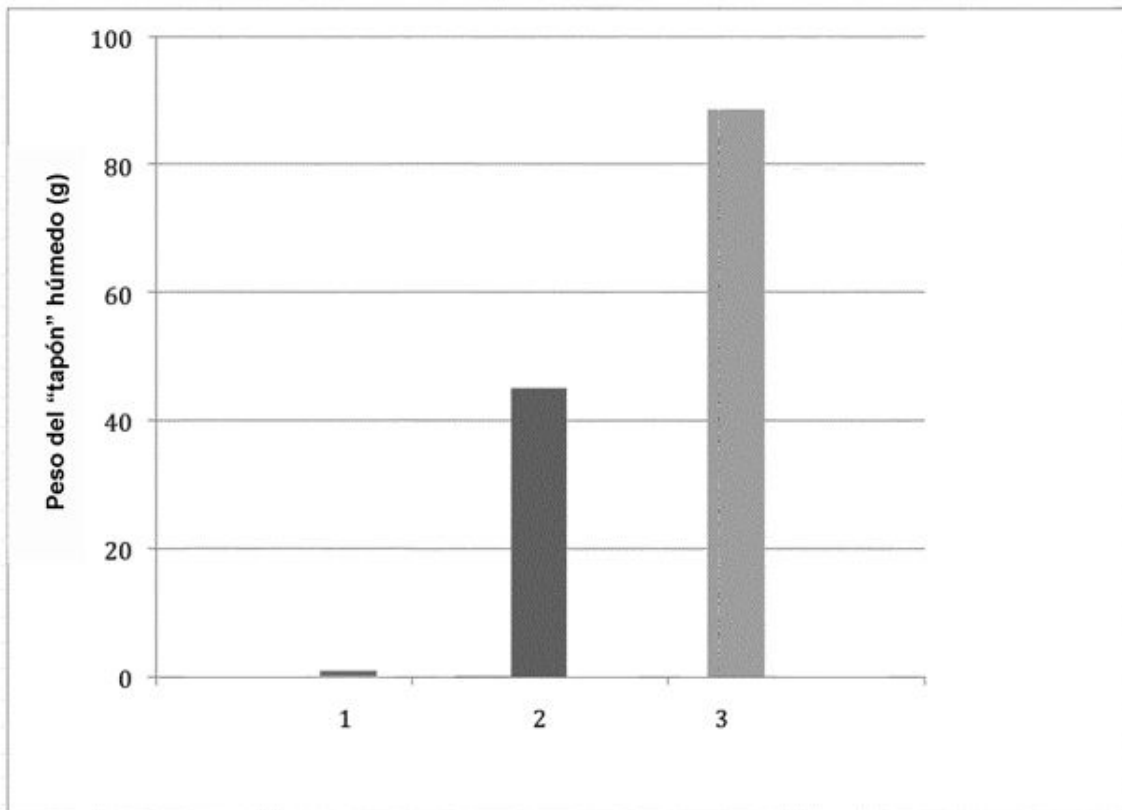


FIG. 4

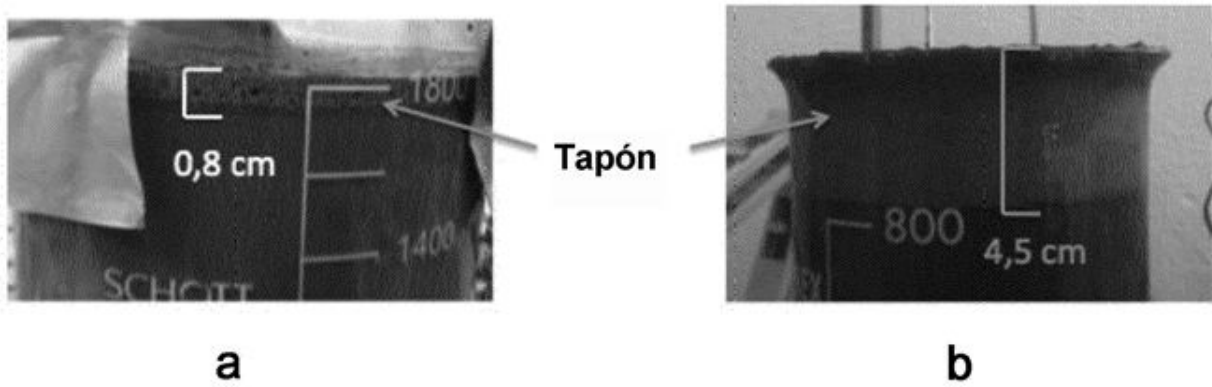


FIG. 5

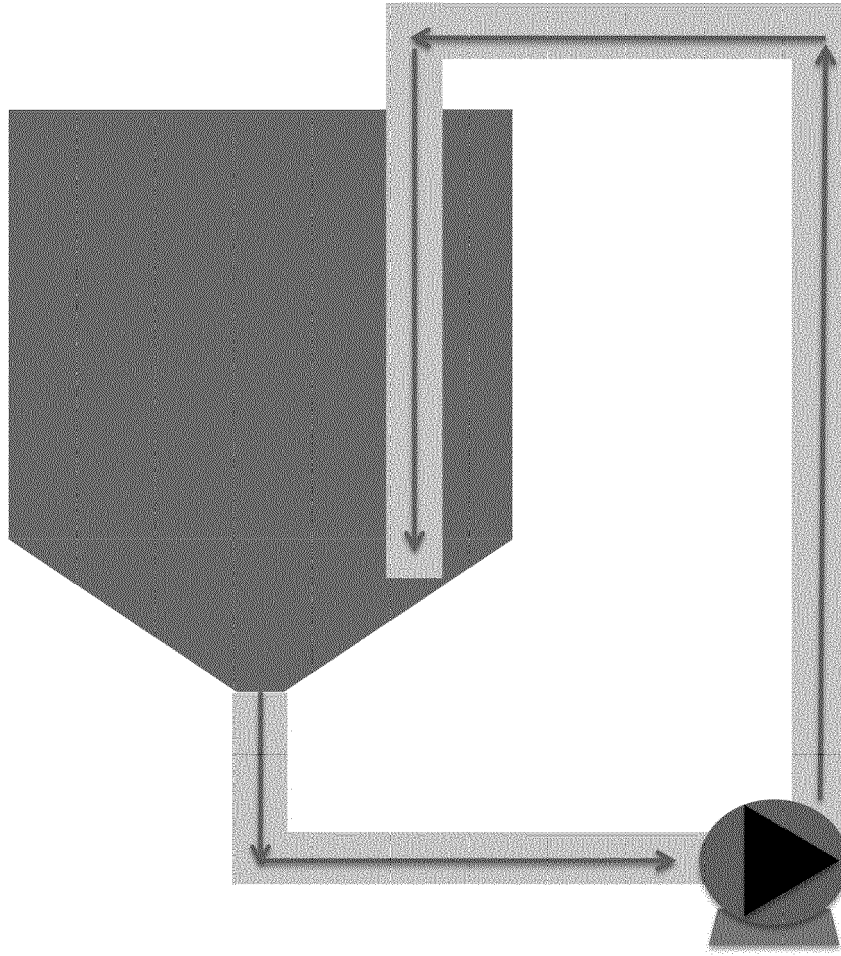


FIG. 6