



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 283 191**

② Número de solicitud: 200502143

⑤ Int. Cl.:
A61K 36/63 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A23L 1/302 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.09.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2007**

Fecha de la concesión: **12.09.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.10.2008**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

⑰ Titular/es: **ANTAS PHARMA, S.A.**
Cantarera, 9
04638 Mojacar, Almería, ES

⑱ Inventor/es: **Esteban Morales, Manuel**

⑳ Agente: **Carpintero López, Francisco**

⑳ Título: **Biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos, procedimiento de obtención, formulaciones y usos de las mismas.**

㉑ Resumen:

Biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos, procedimiento de obtención, formulaciones y usos de las mismas.

La presente invención proporciona una biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos tales como tirosol, ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxifenilacético, ácido p-hidroxifenilpropiónico, ácido vanillico, hidroxitirosol, ácido protocatéquico, 3,4-dihidroxifenilglicol, ácido beta-fenil-láctico, ácido p-hidroxicinámico, ácido cis-cafeico o ácido trans-cafeico, en unas concentraciones determinadas. Dicha biomasa se obtiene mediante un procedimiento que comprende añadir una mezcla de vitamina E y ascorbil palmitato a la pasta de olivas trituradas previamente a su centrifugación para separar el aceite de la biomasa. Asimismo, la invención proporciona también formulaciones que comprenden dicha biomasa y el uso de las mismas en aplicaciones farmacéuticas, alimentarias o cosméticas.

ES 2 283 191 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos, procedimiento de obtención, formulaciones y usos de las mismas.

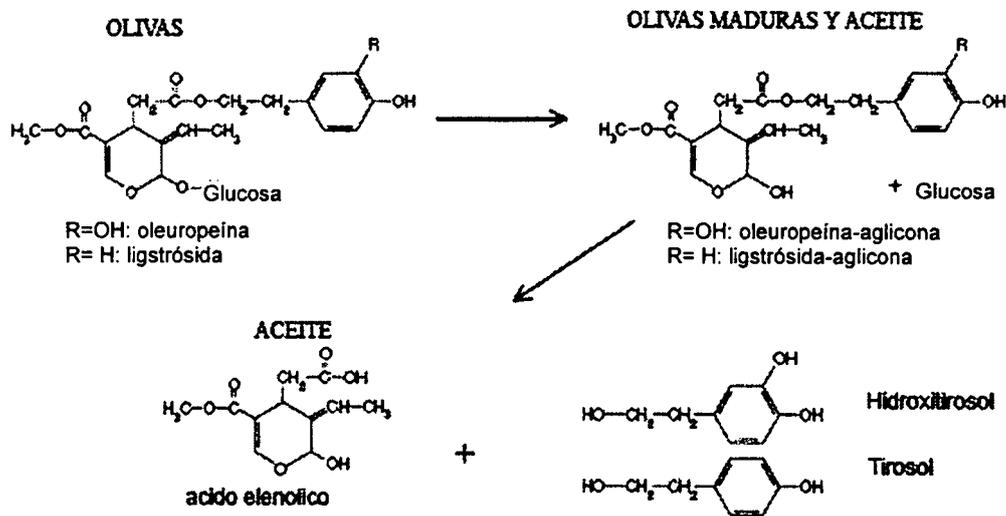
Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de las biomazas de origen vegetal y, más en particular, a las biomazas procedentes de la pulpa de la oliva. La invención se refiere en concreto a una biomasa de pulpa de oliva con propiedades antioxidantes naturales, a un procedimiento para su obtención, a formulaciones que comprenden dicha biomasa, y al uso de estas formulaciones en aplicaciones farmacéuticas, alimentarias o cosméticas.

Antecedentes de la invención

El fruto de la oliva es muy conocido en la cuenca del Mediterráneo, siendo uno de sus ingredientes esenciales en la dieta, tanto en la cocina como en crudo. La composición de la oliva es compleja, rica en oligoelementos y otros nutrientes y de propiedades muy saludables. Por ello, resulta de interés mantener inalterados y estabilizados los componentes tanto de la oliva como de sus derivados para su uso posterior en alimentación, farmacia y cosmética. La presente invención describe una biomasa de pulpa de oliva que es homogénea y estable, que mantiene las propiedades de sus antioxidantes naturales y que es totalmente natural.

Existen diferentes tipos de polifenoles en función del tipo de olivas. Éstas pueden contener principalmente compuestos polares como los glicósidos oleuropeína y ligstrósida que son los precursores de los derivados aglicona, compuestos más polares aún. La oleuropeína-aglicona es el éster del ácido elenólico con el 3,4-o-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) y la ligstrósida-aglicona es el éster del ácido elenólico con el 4-hidroxifeniletanol (tirosol) y se forman cuando se pierde una molécula de glucosa del correspondiente glicósido en el proceso de maduración de la oliva. Las agliconas y sus diferentes derivados son los fenoles más abundantes en las olivas maduras y en el aceite. Los derivados difieren en sus estructuras químicas, pudiéndose abrir o cerrar el anillo, siendo los polifenoles tirosol e hidroxitirosol los productos finales de la hidrólisis de los derivados aglicona de la oleuropeína y la ligstrósida.



Estos son los polialcoholes más importantes aunque también se pueden destacar otros productos como los descritos en la Tabla I.

ES 2 283 191 B1

TABLA I

Composición de la fracción no saponificable de la oliva.

Compuesto	Concentración
Hidrocarburos totales	300-700 mg/100 g
escualeno	300-700 mg/100 g
Pigmentos	
clorofilas	0-9,7 mg/kg
Carotenoides	0,50-10 mg/kg (en β -caroteno)
luteína	30-60%
β -caroteno	5-15%
Tocoferoles	70-300 mg/kg
α -tocoferol	> 93%
β y γ -tocoferol	< 10%
γ -tocoferol	< 1,5%
Esteroles	80-240 mg/100 g
β -sitosterol	75-95 %
campesterol	2-4%
estigmasterol	1-2%
Δ 5-avenasterol	3-14%
Δ 7-avenasterol	< 0,7%
Compuestos fenólicos	50-800 mg/kg (en ácido cafeico)
Alcoholes triterpénicos	100-300 mg/100 mg
Compuestos aromáticos	
Alcoholes	
Cetonas	
Ésteres	
Éteres	
derivados furánicos	

Cabe destacar la composición en esteroides, vitamina E y luteína que son potentes antioxidantes.

La concentración de fenoles en las olivas varía de 50 a 800 mg/kg con un valor medio de 180 mg/kg. La concentración de fenoles varía en función del clima, el tipo de oliva, el área de cultivo y la madurez de la fruta. Los fenoles en general y, en particular el orto-dihidroxifenol, contribuyen de forma importante a la estabilidad de los caldos.

El interés farmacológico de estos productos se centra principalmente en el hecho de exhibir importantes propiedades antioxidantes, principalmente los orto-dihidroxifenólicos, como la oleuropeína y el hidroxitirosol, ya que son grandes inhibidores de la oxidación del LDL *in Vitro* (Visioli y cols. Lipid 1999, suple S315). La actividad antioxidante del hidroxitirosol se debe tanto a un efecto quelante de iones de metales como a un efecto secuestrador de radicales libres (Violi y cols. Nutr Rev 1998;142-47).

La oleuropeína y el hidroxitirosol han demostrado su actividad como secuestradores de radicales libres con una potencia semejante a la de la vitamina E, vitamina C y el butil-hidroxitolueno (Violi y cols. Nutr Rev 1998;142-47).

Otros antioxidantes presentes en la pulpa de la oliva, como los lignanos, han demostrado su actividad antioxidante *in vitro* (Owen y cols. Food Chem Toxicol. 2000; 38,647- 59), exhibiendo la más alta capacidad antioxidante, seguidos por el hidroxitirosol y el tirosol (Owen y cols. Euro. J. Cancer; 2000; 36,1235-47).

Estos compuestos son difícilmente extraíbles de la pulpa de la oliva, manteniéndose como tales en la biomasa de pulpa.

Actualmente se ha demostrado que los rayos UV inducen graves lesiones en la piel por la generación de especies químicas altamente reactivas y la disminución de los antioxidantes endógenos. Estos estudios demuestran que el

hidroxitirosol y sus derivados metilados poseen una gran capacidad antioxidante produciendo un comportamiento celular diferenciado de las células de melanoma humano al protegerse frente a la radiación, de aquí su interés en alimentos funcionales y cosméticos (D'Angelo y cols. *Free Radic. Biol. Med* 2005, April 1: 38(7):908-19).

5 Legar y cols. (*Eur J Clin Nutr.* 2005 May; 59(5):727-30) han demostrado una correlación entre los polifenoles y la actividad antitrombótica e igualmente la actividad antiagregante plaquetario, favoreciendo así la circulación sanguínea.

Esta actividad antioxidante está presente en las diferentes partes de la oliva incluida la pulpa, como lo demuestran los trabajos realizados por Morillo y cols. (*J Agric Food Chem.* 2005 Mar 23;53(6):2002-8.).

10 Esta actividad antioxidante se ha descrito en la patente US 6746706 para su uso como aditivos en alimentación. En efecto, la fase hidrofílica de la extracción de la pulpa se utiliza como un todo en preparados de salsas y en alimentación.

15 Igualmente, se ha demostrado recientemente que los procesos involucrados en la producción de las pulpas pueden influir sobre la concentración de los antioxidantes de la oliva. Así, Romero y cols. (*J Agric Food Chem.* 2004 Feb 11;52(3):479-84) han demostrado que la composición de fenoles en cada fase son muy diferentes pues el hidroxitirosol y el tirosol están presentes en el jugo de la oliva por ser más hidrofílicos, mientras que el acetato de tirosol, de hidroxitirosol y lignanos (1-acetoxipinoresina y el pinoresinol) quedan en el residuo sólido, siendo muy sensibles a las oxidaciones propias del proceso.

20 Sorprendentemente, se ha descubierto que la adición de antioxidantes naturales tales como la vitamina E y el ascorbil palmitato durante el procedimiento de obtención de la pulpa evita dichas oxidaciones indeseadas y permite obtener una biomasa de pulpa de oliva con un alto contenido en componentes fenólicos con propiedades antioxidantes.

25 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra el espectro de masas del ácido p-hidroxibenzoico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

30 La Figura 2 muestra el espectro de masas del ácido p-hidroxifenilacético (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 3 muestra el espectro de masas del vanillol (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

35 La Figura 4 muestra el espectro de masas del hidroxitirosol silanizado (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

40 La Figura 5 muestra el espectro de masas del ácido p-cumárico silanizado (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 6 muestra el espectro de masas del ácido p-2-OH-glutárico silanizado (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

45 La Figura 7 muestra el espectro de masas del tirosol silanizado (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 8 muestra el espectro de masas del siringaldehído (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

50 La Figura 9 muestra el espectro de masas del ácido p-hidroxifenilpropiónico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

55 La Figura 10 muestra el espectro de masas del ácido vaníllico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 11 muestra el espectro de masas del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

60 La Figura 12 muestra el espectro de masas del ácido protocatéquico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 13 muestra el espectro de masas del ácido siríngico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

65 La Figura 14 muestra el espectro de masas del ácido p-cumárico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

ES 2 283 191 B1

La Figura 15 muestra el espectro de masas del ácido p-sinápico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 16 muestra el espectro de masas del ácido ferúlico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 17 muestra el espectro de masas del derivado escualetina (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

La Figura 18 muestra el espectro de masas del derivado ácido cafeico (superior) y de la referencia (inferior) de la biblioteca Wiley 275.

Objeto de la invención

La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar una biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para obtener dicha biomasa.

Asimismo, otro objeto de la invención es proporcionar una formulación para aplicaciones farmacéuticas, alimentarias o cosméticas que comprende dicha biomasa.

Por último, otro objeto de la invención es proveer el uso de dicha formulación para aplicaciones farmacéuticas, cosméticas o alimentarias.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos (en adelante "biomasa de la invención") que comprende los siguientes compuestos con una concentración igual o menor a la indicada a continuación:

Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
Tirosol	172
Ac. p-OH-benzoico	27
Ac. p-OH-Ph-acético	18
Ac. p-OH-Ph-propiónico	32
Ac. Vaníllico	34
OH-tirosol	408
Ac. protocatéquico	93
3,4-di-OH-Ph-glicol	39
Ac. beta-Ph-láctico	12
Ac. p-OH-cinámico	107
Ac. cis-cafeico	47
Ac. trans-cafeico	12
Fenólicos totales	1001

Ac. p-OH-benzoico = Ácido p-hidroxibenzoico

Ac. p-OH-Ph-acético = Ácido p-hidroxifenilacético

Ac. p-OH-Ph-propiónico = Ácido p-hidroxifenilpropiónico

OH-tirosol = hidroxitirosol

3,4-di-OH-Ph-glicol = 3,4-dihidroxifenilglicol

Ac. beta-Ph-láctico = Ácido beta-fenil-láctico

Ac. p-OH-cinámico = Ácido p-hidroxicinámico

ES 2 283 191 B1

En el contexto de la invención, el término “biomasa de pulpa de oliva” se refiere a un material natural orgánico, homogéneo, pastoso y viscoso procedente de la trituración de la oliva, que es rico en agua, aceites y principios activos naturales, y que presenta un fuerte olor a aceite de oliva y un sabor amargo característico.

5 En una realización particular, la biomasa de la invención comprende los siguientes compuestos con una concentración igual a la indicada:

Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
Tirosol	115
Ac. p-OH-benzoico	15
15 Ac. p-OH-Ph-acético	11
Ac. p-OH-Ph-propiónico	25
Ac. Vanílico	23
20 OH-tirosol	260
Ac. protocatéquico	80
3,4-di-OH-Ph-glicol	20
25 Ac. beta-Ph-láctico	9
Ac. p-OH-cinámico	95
Ac. cis-cafeico	30
30 Ac. trans-cafeico	5
Fenólicos totales	688

35 En otra realización particular, la biomasa de la invención comprende los siguientes compuestos con una concentración igual a la indicada:

Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
Tirosol	164
45 Ac. p-OH-benzoico	27
Ac. p-OH-Ph-acético	18
Ac. p-OH-Ph-propiónico	21
50 Ac. Vanílico	32
OH-tirosol	397
Ac. protocatéquico	91
55 3,4-di-OH-Ph-glicol	14
Ac. beta-Ph-láctico	9
Ac. p-OH-cinámico	107
60 Ac. cis-cafeico	46
Ac. trans-cafeico	9
Fenólicos totales	935

ES 2 283 191 B1

En otra realización particular, la biomasa de la invención comprende los siguientes compuestos con una concentración igual a la indicada:

Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
Tirosol	172
Ac. p-OH-benzoico	21
Ac. p-OH-Ph-acético	14
Ac. p-OH-Ph-propiónico	32
Ac. Vanílico	34
OH-tirosol	408
Ac. protocatéquico	93
3,4-di-OH-Ph-glicol	39
Ac. beta-Ph-láctico	12
Ac. p-OH-cinámico	98
Ac. cis-cafeico	47
Ac. trans-cafeico	12
Fenólicos totales	982

En otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la obtención de la biomasa de la invención que comprende las siguientes etapas:

- eliminación de hojas y otros residuos de las olivas a tratar;
- lavado de las olivas;
- triturado de las olivas lavadas para formar una pasta homogénea;
- adición de vitamina E y ascorbil palmitato a dicha pasta; y
- centrifugación de la mezcla obtenida en (d) para separar el aceite de la biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos.

En una realización particular de dicho procedimiento, en la etapa (d) se adiciona una mezcla de vitamina E y ascorbil palmitato en una proporción de 1 g/kg de biomasa a temperatura ambiente y en atmósfera inerte.

Dicho procedimiento es un proceso sencillo e industrial que se realiza a temperatura ambiente y en atmósfera de N₂, en reactores de acero inoxidable.

Más en particular, mediante un separador se eliminan las hojas y otros residuos como roca, arena etc., que acompañan a las olivas cuando se cosechan. Posteriormente, las olivas se lavan a temperatura ambiente con agua de red en el mismo separador. A continuación, se añaden las olivas lavadas a un molino metálico (de martillo o de bolas, por ejemplo) de cierre hermético y con carga de N₂, pues mantiene mejor la estabilidad de los antioxidantes y de los aceites, hasta conseguir una pasta homogénea. Posteriormente, se dispone la mencionada pasta en un mezclador de pasta, donde se le añaden 1 g/kg de Vitamina E y ascorbil palmitato confiriendo un mayor poder antioxidante a la mezcla. Este proceso de mezcla se realiza durante 20 minutos y en atmósfera de nitrógeno para preservar las propiedades antioxidantes de la biomasa ya estabilizada. Después, si es necesario, se calienta la pasta a 20°C aumentando así su fluidez. Dicha pasta se añade a una separadora centrífuga de doble fase donde se centrifuga a 5000 rpm, por ejemplo, extrayendo el aceite y quedando retenida una pasta oleosa/hidrofílica estabilizada, rica en fibras, material orgánico, micro-nutrientes y oligoelementos, y con los antioxidantes de interés.

Por último, la biomasa así obtenida se dosifica y se envasa en atmósfera de nitrógeno en dosis de 1 Kg y, finalmente, se pasteuriza.

ES 2 283 191 B1

En otro aspecto de la invención, se proporciona una formulación para aplicaciones farmacéuticas, alimentarias o cosméticas que comprende la biomasa de la invención.

5 En una realización particular, dicha formulación comprende además una o más vitaminas liposolubles: vitaminas A, E, D y K, solas o en combinación.

En otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de una formulación tal y como se ha descrito previamente para aplicaciones farmacéuticas, cosméticas o alimentarias.

10 En el caso de aplicaciones farmacéuticas, la formulación se emplea en forma de comprimidos, cápsulas, píldoras, grageas, elixires, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, granulados, sobres, viales bebibles, pomadas, cremas, geles, ungüentos, bálsamos o parches transdérmicos, por ejemplo. Para ello, se combina la biomasa de la invención con los excipientes y/o vehículos adecuados.

15 En el caso de aplicaciones cosméticas, la formulación se emplea en forma de geles de baño, champús, suavizantes, mascarillas, jabones, desodorantes, cremas de afeitar, lociones, cremas cosméticas hidratantes, cremas cosméticas nutritivas, cremas limpiadoras, tónicos faciales, leches corporales, cremas solares, polvos de talco, maquillajes o barras de labios, por ejemplo. Para ello, la biomasa se formula con los excipientes adecuados y con escualeno, facilitando la absorción de los polifenoles en la piel. En particular, esta biomasa pasteurizada es de gran interés para su uso en
20 balnearios Spa para el tratamiento de enfermedades de la piel y relajación.

Asimismo, en el caso de aplicaciones alimentarias, la formulación se emplea en forma de platos preparados, productos dietéticos, cereales, productos lácteos, productos de panadería y pastelería, gelatinas, bebidas, refrescos, helados, mantequilla, sopas, caldos, zumos, aliños de ensalada o salsas, por ejemplo. Para ello, la biomasa se formula con los ingredientes adecuados en función del tipo de producto a preparar.
25

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

30 Ejemplos

Obtención de la biomasa

35 Se pesaron 100 Kg de olivas cosechadas y se añadieron a un lavador de olivas tipo Pieralisi[®], separando las hojas, piedras y demás objetos extraños. Las olivas lavadas y sin secar se añadieron a un molino metálico, y se molieron durante 10 minutos hasta conseguir una pasta homogénea en atmósfera inerte. A continuación, se añadió la pasta a un mezclador durante 20 minutos en atmósfera inerte y a 20°C con objeto de tener una masa homogénea. Posteriormente, se centrifugó en una centrífuga tipo Westfalia[®] de doble fase a 5000 rpm separando el aceite de la biomasa. Se recuperó
40 así una biomasa húmeda y oleosa de unos 75 Kg de peso, rica en polifenoles.

Se pasteurizó dicha biomasa a 60°C durante 30 minutos y después se enfrió a 3°C de forma rápida.

45 Por último, se formuló una crema para cosmética al 10% (p/p) con un contenido de 1/1000 de escualeno.

Las características de la biomasa media obtenida se describen en la Tabla II.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 283 191 B1

TABLA II

Propiedades Químicas de la Biomasa

Parámetros Físicos-Químicos	Valor
pH	6,8
Conductividad eléctrica CE (mS/cm)	1,2
Materia Orgánica (%)	60,3
Carbono orgánico (%)	35,5
Nitrógeno Orgánico (%)	1,1
C/N	32,2
P (%)	0,03
Ca (%)	1,2
Mg (%)	0,96
Na (ppm)	180,0
K (%)	0,29
Fe (g/kg)	2,6
Cu (ppm)	13,3
Zn (ppm)	9,8

Identificación de derivados fenólicos

Método analítico utilizado en la identificación de compuestos fenólicos en la biomasa obtenida.

Preparación de la muestra

Se partió de 100 g de muestra de tres biomásas procedentes de tres variedades de oliva (alberquina, picual y hojiblanca), que posteriormente se acidificaron hasta pH 3,0 con HCl (1 N) y se saturaron con NaCl (Panreac), procediendo después a la extracción de los compuestos de estudio con 50 ml de dietil-éter (Lab-Scan grado HPLC). La extracción se realizó de forma secuenciada y continua y los extractos orgánicos obtenidos se recogieron conjuntamente en un matraz (donde se desecaron con c.s. de sulfato sódico anhidro) (Panreac), y posteriormente se procedió a la retirada del disolvente en un rotavapor (Buchi-R) a 30°C. Una vez obtenido el residuo seco, se recogió en un vial, en 10 ml de metano (Lab-Scan grado HPLC), se liofilizó y el extracto seco se volvió a disolver en 1 ml de piridina (Panreac). Por último, las muestras se analizaron por cromatografía de gases/espectrometría de masas en la siguiente proporción:

- 100 microlitros de muestra + 50 microlitros de agente silanizante
- *Agente silanizante:* N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) (Fluka)

De la muestra preparada se analizaron 5 microlitros.

Descripción del equipo

- Cromatógrafo de gases modelo HEWLETT-PACKARD HP 6890 Series GS system.
- Columna HP-5MS (30 m - 0,25 mm), Crosslinked 5% PH ME, Siloxano.
- Inyector automático capilar Split/Splitless acoplado al sistema.
- Espectrómetro de masas modelo HEWLETT PACKARD HP 5973 mass selective detector.
- Cuádruplo de oro. Rango de Masas 0-800 umas.

ES 2 283 191 B1

- Sistema informático HEWLETT PACKARD modelo Vectra, Pentium 5/150.

Condiciones de trabajo

5 Los resultados de GC/MS se obtuvieron de acuerdo a las siguientes condiciones de trabajo:

- Columna GC. Flujo de 1 ml/ml. Gas portador Helio y volumen de inyección 5 microlitros.
- Horno del cromatógrafo a la temperatura inicial de 80°C.
- Inyector a 250°C.
- Rampa de temperatura: Inicial de 80°C. Aumento de 5°C/min hasta 220°C. Aumento de 10°C/min hasta 310°C.
- Tiempo final de cromatografía 47 min.
- Calibración diaria.
- Fuente de ionización de 0-70 eV
- Rango de masas de 0-400 uma.
- Tratamiento de resultados: Espectroteca Wiley 275.

Patrones comerciales

Previo al análisis de las biomásas ensayadas, se realizó un estudio de derivados fenólicos con patrones comerciales Sigma.

30

Compuesto fenólico	Tiempo de retención (min)
p-hidroxibenzaldehído	10,93
Tirosol	15,64
Ac. 3-OH-Ph-acético	16,52
Ac. p-OH-benzoico	16,92
Ac. p-OH-Ph-acético	17,20
Vanillol	17,25
Siringaldehído	18,55
Ac. p-OH-Ph-propiónico	19,77
Ac. vanílico	19,92
Ac. 3,4,5-trimetoxibenzoico	21,15
Ac. protocatéquico	21,16
Ac. siríngico	22,73
Ac. p-cumárico	23,36
Ac. sinápico	25,80
Ac. ferúlico	26,30
Esculetina	26,35
Ac. cafeico	24,38

65

ES 2 283 191 B1

En las figuras 1-18 se muestran los espectros de masas de estos patrones comerciales.

Resultados

Los siguientes compuestos fenólicos fueron identificados en las biomásas procedentes de las variedades de oliva alberquina, picual y hojiblanca:

- Tirosol
- Ac. beta-Ph-láctico
- Ac. p-OH-benzoico
- Ac. p-OH-Ph-acético
- Vanillol
- Ac. p-OH-Ph-propiónico
- Ac. Vanílico
- OH-tirosol
- Ac. p-cumárico
- Ac. protocatéquico
- 3,4-di-OH-Ph-glicol
- Ac. p-OH-cinámico
- Ac. cis-cafeico
- Ac. 3,4-di-metoxibenzoico
- Ac. trans-cafeico

Cuantificación de derivados fenólicos

Contenido en derivados fenólicos totales

Los contenidos en fenoles totales de las biomásas para las variedades estudiadas estuvieron en los siguientes valores:

Alberquina:	3,51 g/l
Hojiblanca:	6,39 g/l
Picual:	7,25 g/l

La metodología seguida para la cuantificación de los diferentes compuestos fenólicos de las biomásas fue la técnica de Patrón Interno, referido a una curva de calibración externa del mismo. El patrón interno utilizado en el estudio de las biomásas no debía estar presente en las muestras, por lo que previamente se cromatografiaron 18 biomásas, identificándose el contenido fenólico. Se comprobó que en ninguna muestra estaba presente el ácido 6,7-dihidroxicumárico (esculetina), por lo que se utilizó este compuesto como referencia interna para el estudio cuantitativo.

La técnica de preparación de muestras fue la anteriormente descrita con la diferencia de la adición del patrón interno previa extracción de la muestra. De esta forma se desestiman las pérdidas por extracción al ser similares tanto para Patrón Interno como para los derivados fenólicos de estudio.

ES 2 283 191 B1

Resultados

Derivado fenólico	Alberquina	Hojiblanca	Picual
Tirosol	115	164	172
Ac. p-OH-benzoico	15	27	21
Ac. p-OH-Ph-acético	11	18	14
Ac. P-OH-Ph-propiónico	25	21	32
Ac. Vanílico	23	32	34
OH-tirosol	260	397	408
Ac. protocatéquico	80	91	93
3,4-di-OH-Ph-glicol	20	14	39
Ac. beta-Ph-láctico	9	9	12
Ac. p-OH-cinámico	95	107	98
Ac. cis-cafeico	30	46	47
Ac. trans-cafeico	5	9	12

La concentración mostrada es la media de tres determinaciones y está expresada en mg/kg.

REIVINDICACIONES

1. Biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos **caracterizada** porque comprende los siguientes compuestos con una concentración igual o menor a la indicada:

Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
Tirosol	172
Ac. p-OH-benzoico	27
Ac. p-OH-Ph-acético	18
Ac. p-OH-Ph-propiónico	32
Ac. Vanílico	34
OH-tirosol	408
Ac. protocatéquico	93
3,4-di-OH-Ph-glicol	39
Ac. beta-Ph-láctico	12
Ac. p-OH-cinámico	107
Ac. cis-cafeico	47
Ac. trans-cafeico	12
Fenólicos totales	1001

2. Biomasa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque comprende:

Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
Tirosol	115
Ac. p-OH-benzoico	15
Ac. p-OH-Ph-acético	11
Ac. p-OH-Ph-propiónico	25
Ac. Vanílico	23
OH-tirosol	260
Ac. protocatéquico	80
3,4-di-OH-Ph-glicol	20
Ac. beta-Ph-láctico	9
Ac. p-OH-cinámico	95
Ac. cis-cafeico	30
Ac. trans-cafeico	5
Fenólicos totales	688

ES 2 283 191 B1

3. Biomasa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque comprende:

5	Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
	Tirosol	164
	Ac. p-OH-benzoico	27
10	Ac. p-OH-Ph-acético	18
	Ac. p-OH-Ph-propiónico	21
	Ac. Vanílico	32
15	OH-tirosol	397
	Ac. protocatéquico	91
	3,4-di-OH-Ph-glicol	14
20	Ac. beta-Ph-láctico	9
	Ac. p-OH-cinámico	107
	Ac. cis-cafeico	46
25	Ac. trans-cafeico	9
	Fenólicos totales	935

30 4. Biomasa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque comprende:

35	Compuesto fenólico	Concentración (mg/kg)
	Tirosol	172
	Ac. p-OH-benzoico	21
40	Ac. p-OH-Ph-acético	14
	Ac. p-OH-Ph-propiónico	32
	Ac. Vanílico	34
45	OH-tirosol	408
	Ac. protocatéquico	93
	3,4-di-OH-Ph-glicol	39
50	Ac. beta-Ph-láctico	12
	Ac. p-OH-cinámico	98
	Ac. cis-cafeico	47
55	Ac. trans-cafeico	12
	Fenólicos totales	982

60 5. Procedimiento para la obtención de una biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) eliminación de hojas y otros residuos de las olivas a tratar;
- 65 b) lavado de las olivas;
- c) triturado de las olivas lavadas para formar una pasta homogénea;

ES 2 283 191 B1

d) adición de vitamina E y ascorbil palmitato a dicha pasta; y

e) centrifugación de la mezcla obtenida en (d) para separar el aceite de la biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos.

5

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque en la etapa (d) se adiciona vitamina E y ascorbil palmitato en una proporción de 1 g/kg de biomasa a temperatura ambiente y en atmósfera inerte.

10 7. Formulación para aplicaciones farmacéuticas, alimentarias o cosméticas **caracterizada** porque comprende la biomasa de pulpa de oliva con alto contenido en antioxidantes fenólicos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

8. Formulación según la reivindicación 7, **caracterizada** porque comprende al menos una vitamina liposoluble.

15 9. Uso de una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 para aplicaciones farmacéuticas, **caracterizado** porque la formulación se emplea en forma de comprimidos, cápsulas, píldoras, grageas, elixires, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, granulados, sobres, viales bebibles, pomadas, cremas, geles, ungüentos, bálsamos o parches transdérmicos.

20 10. Uso de una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 para aplicaciones cosméticas, **caracterizado** porque la formulación se emplea en forma de geles de baño, champús, suavizantes, mascarillas, jabones, desodorantes, cremas de afeitar, lociones, cremas cosméticas hidratantes, cremas cosméticas nutritivas, cremas limpiadoras, tónicos faciales, leches corporales, cremas solares, polvos de talco, maquillajes o barras de labios.

25 11. Uso de una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 para aplicaciones alimentarias, **caracterizado** porque la formulación se emplea en forma de platos preparados, productos dietéticos, cereales, productos lácteos, productos de panadería y pastelería, gelatinas, bebidas, refrescos, helados, mantequilla, sopas, caldos, zumos, aliños de ensalada o salsas.

30

35

40

45

50

55

60

65

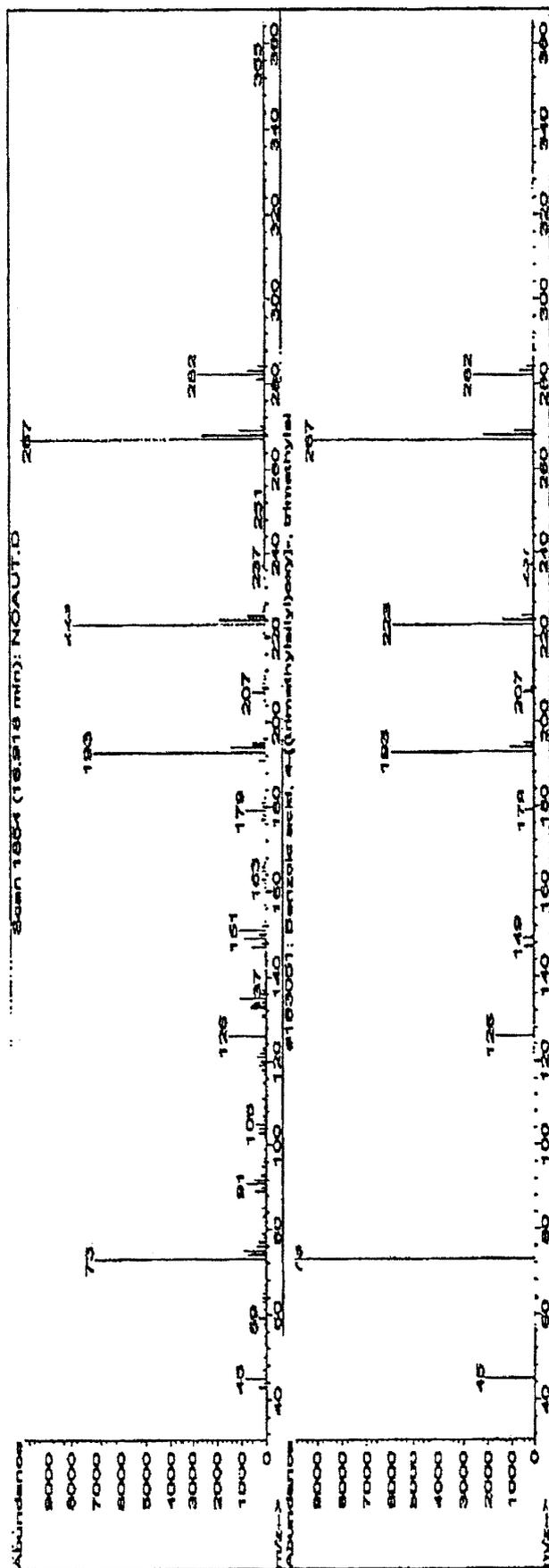


Figura 1

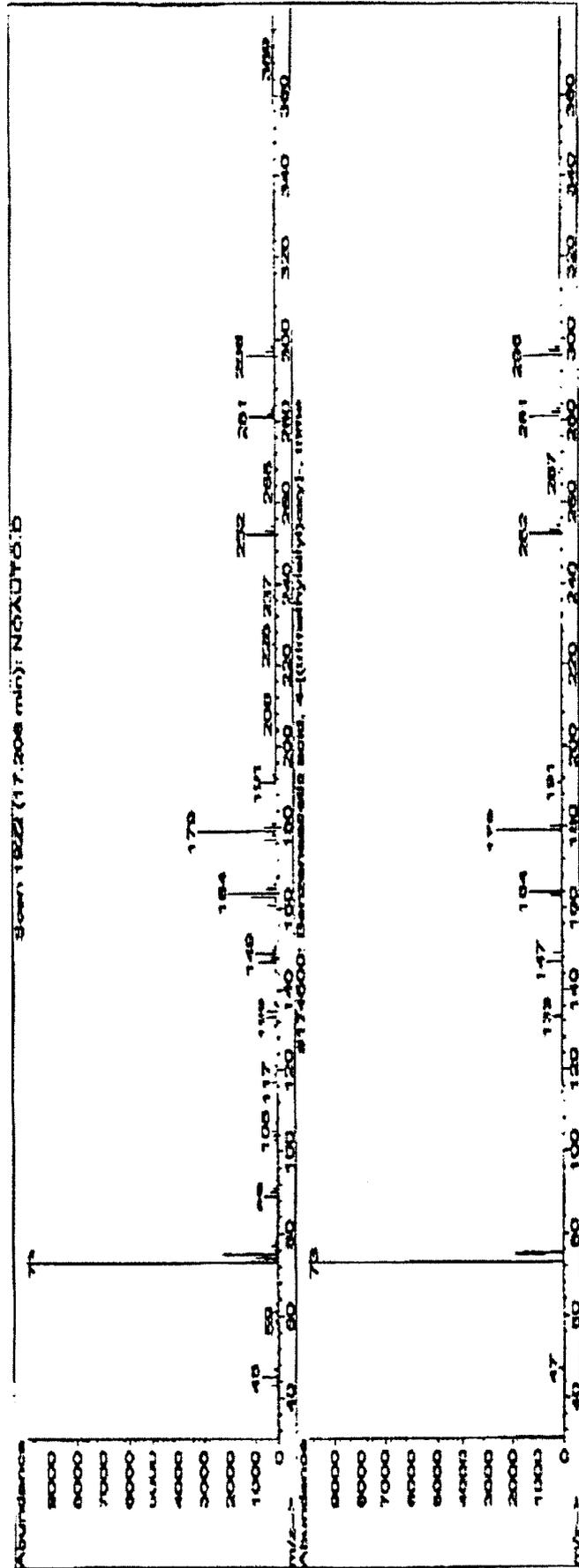


Figure 2

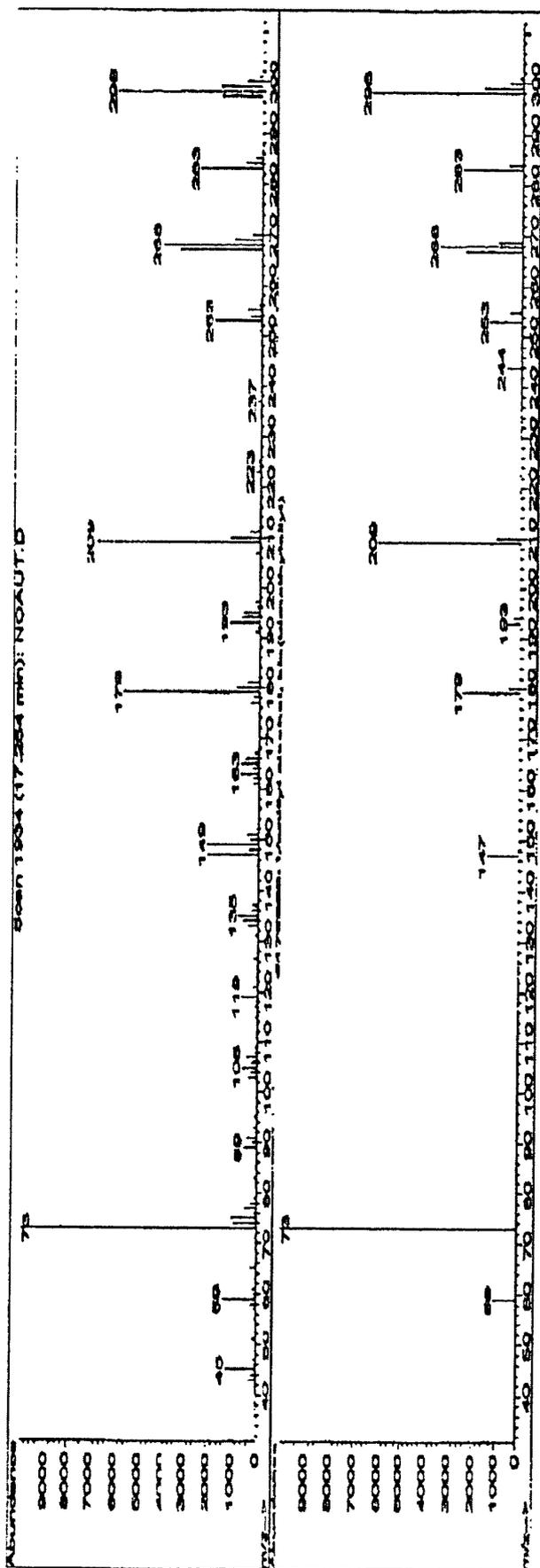


Figure 3

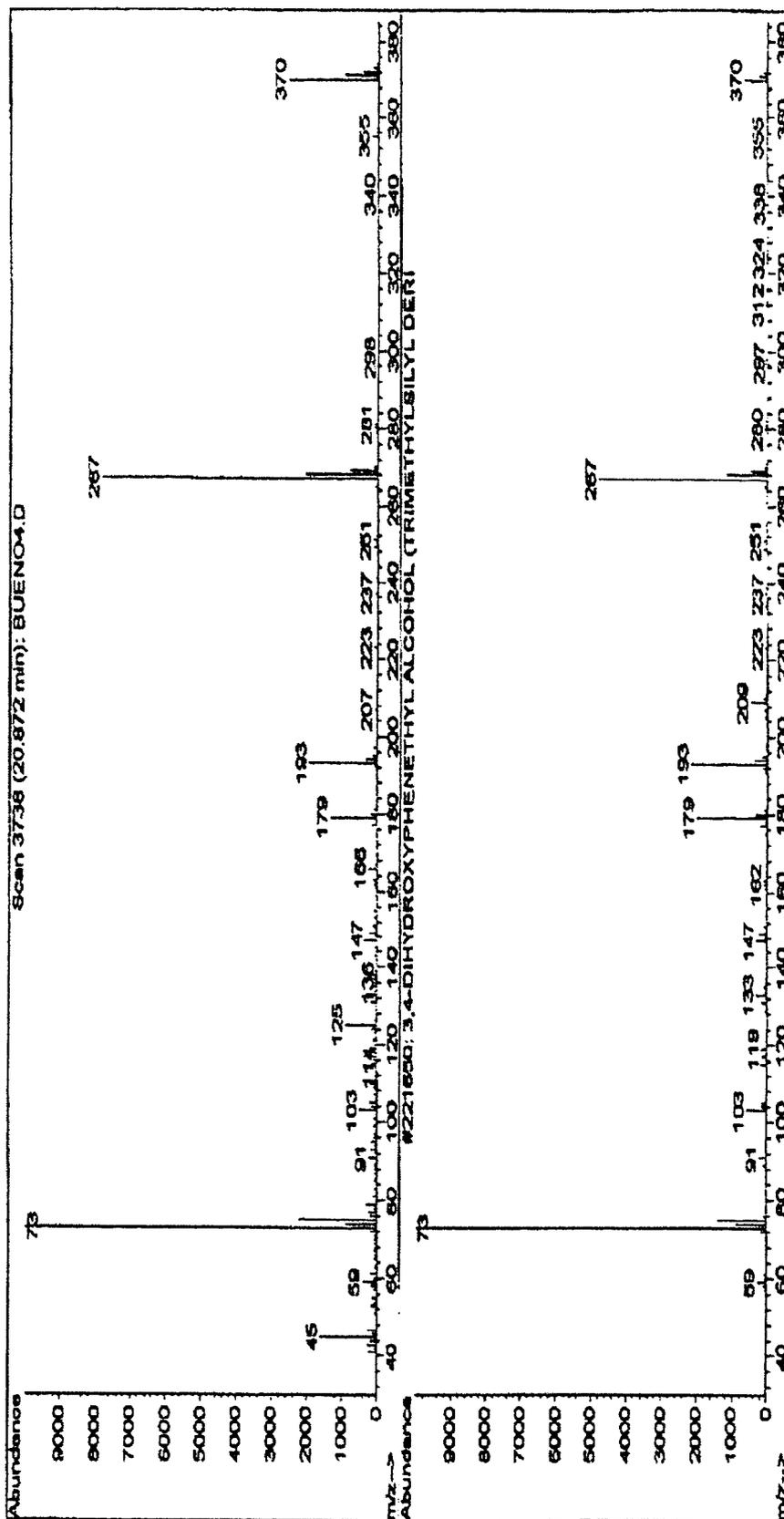


Figura 4

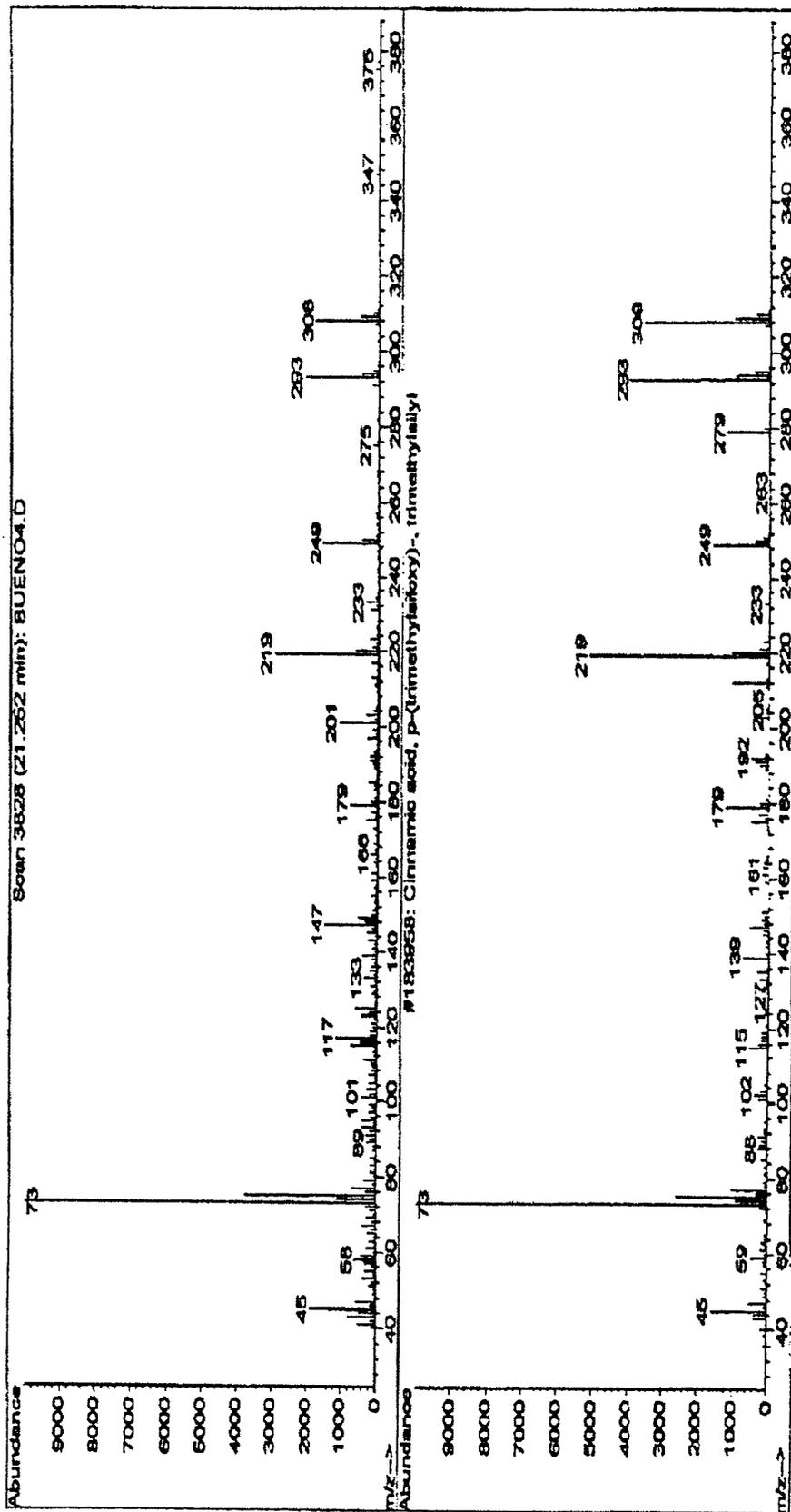


Figure 5

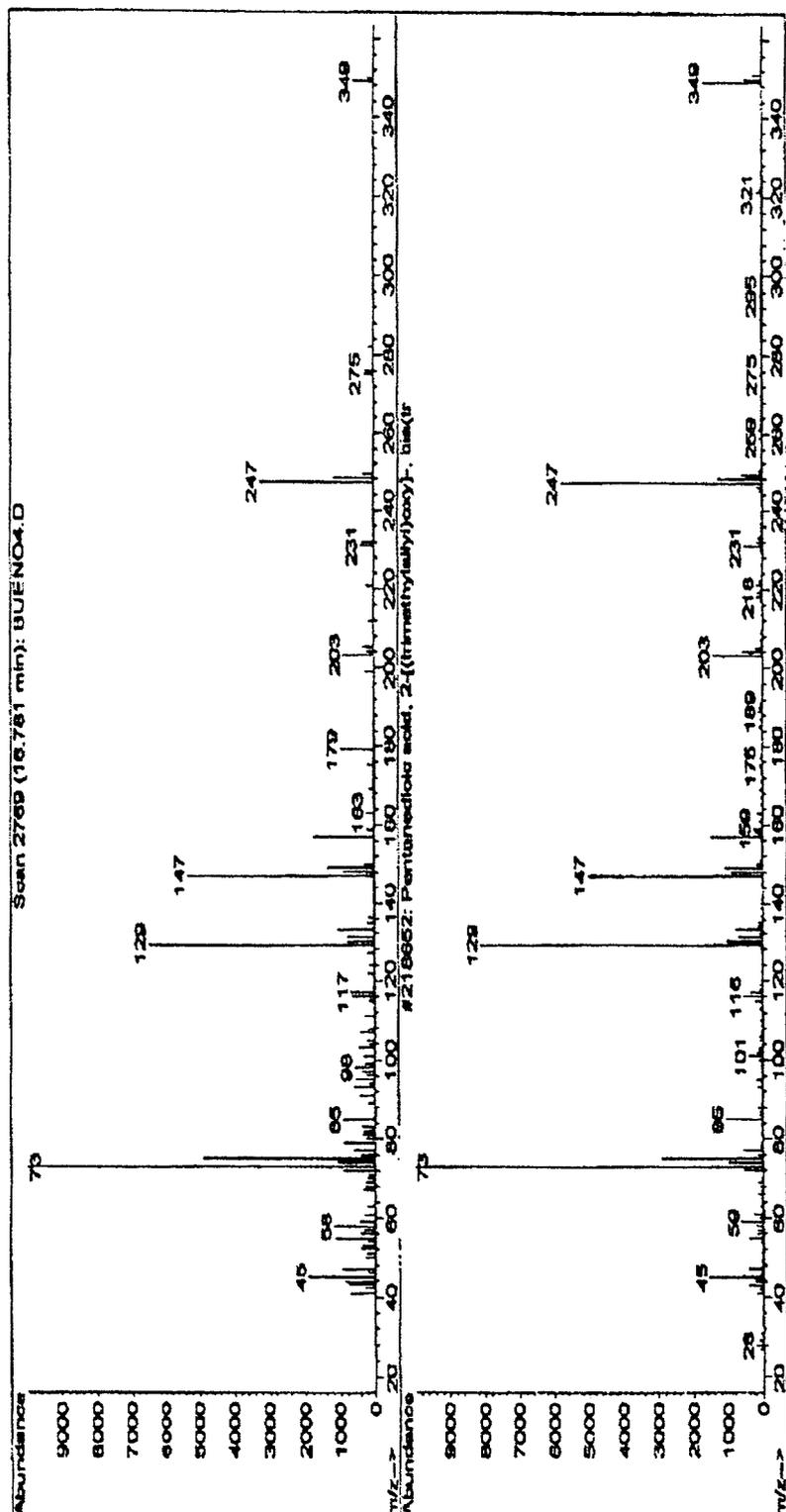


Figura 6

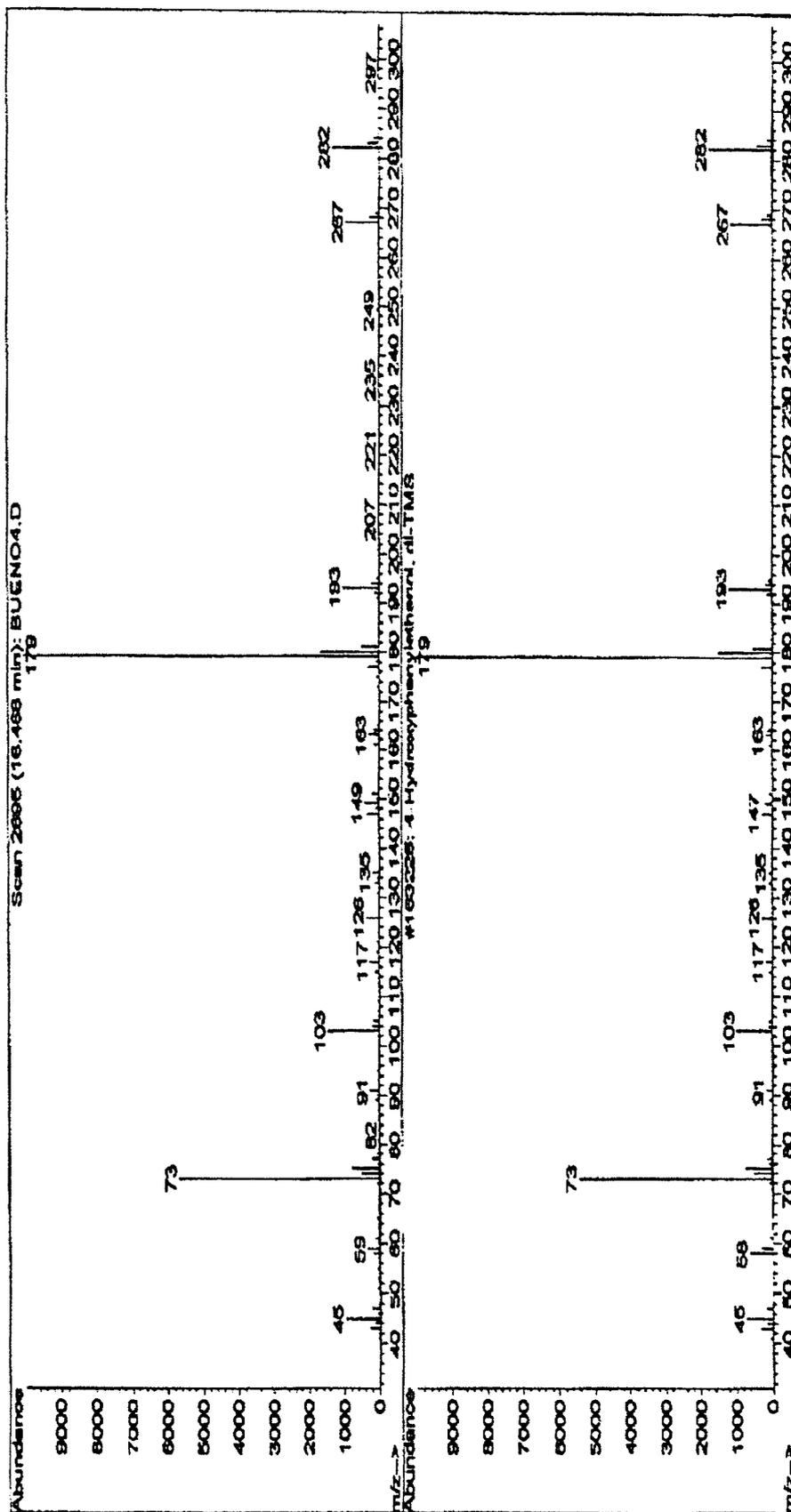


Figura 7

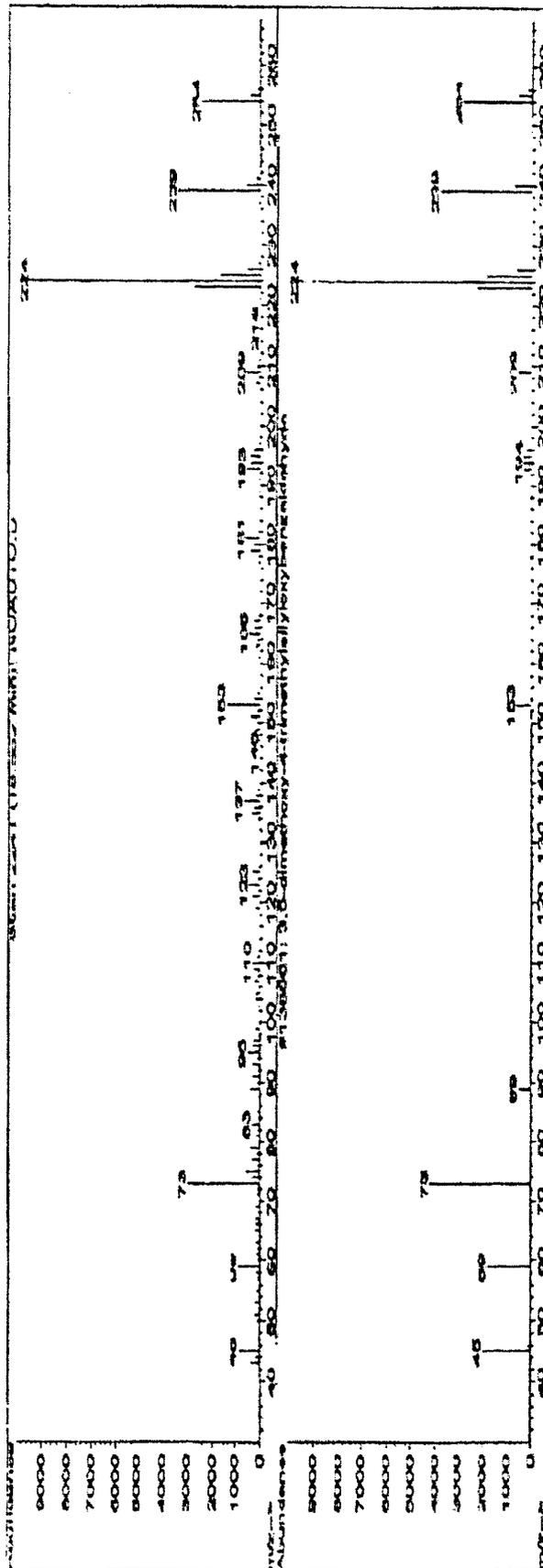


Figure 8

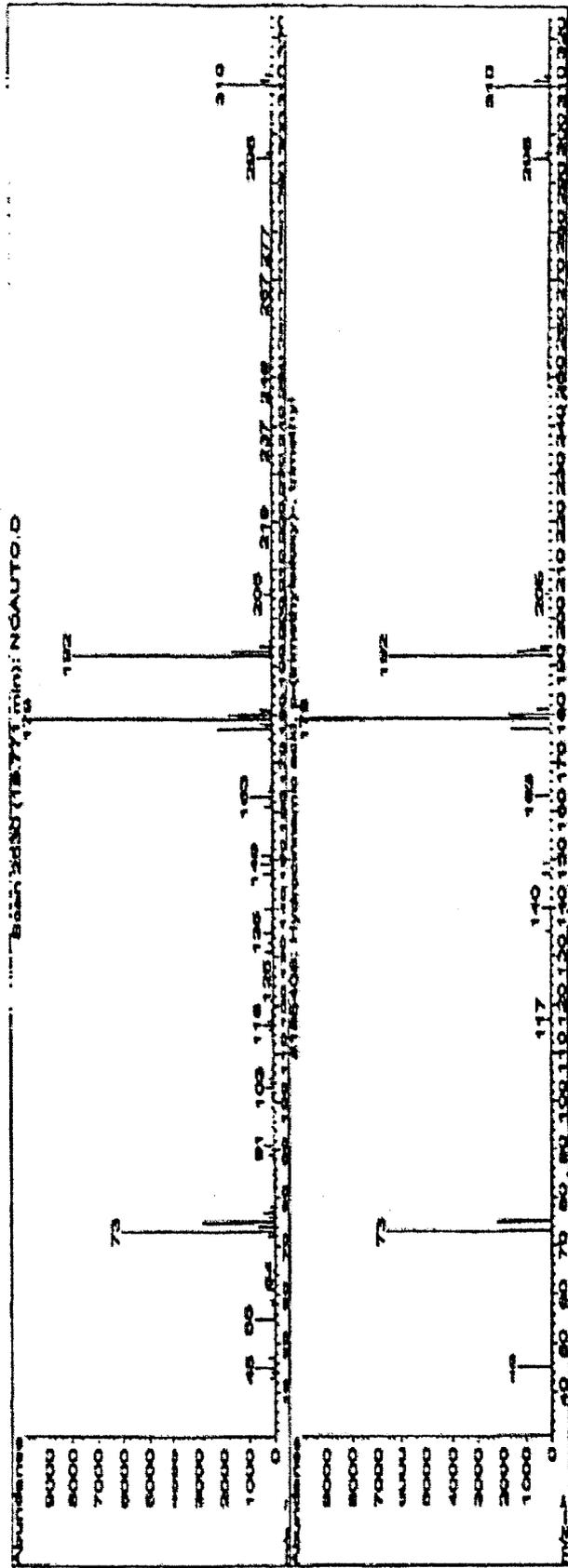


Figura 9

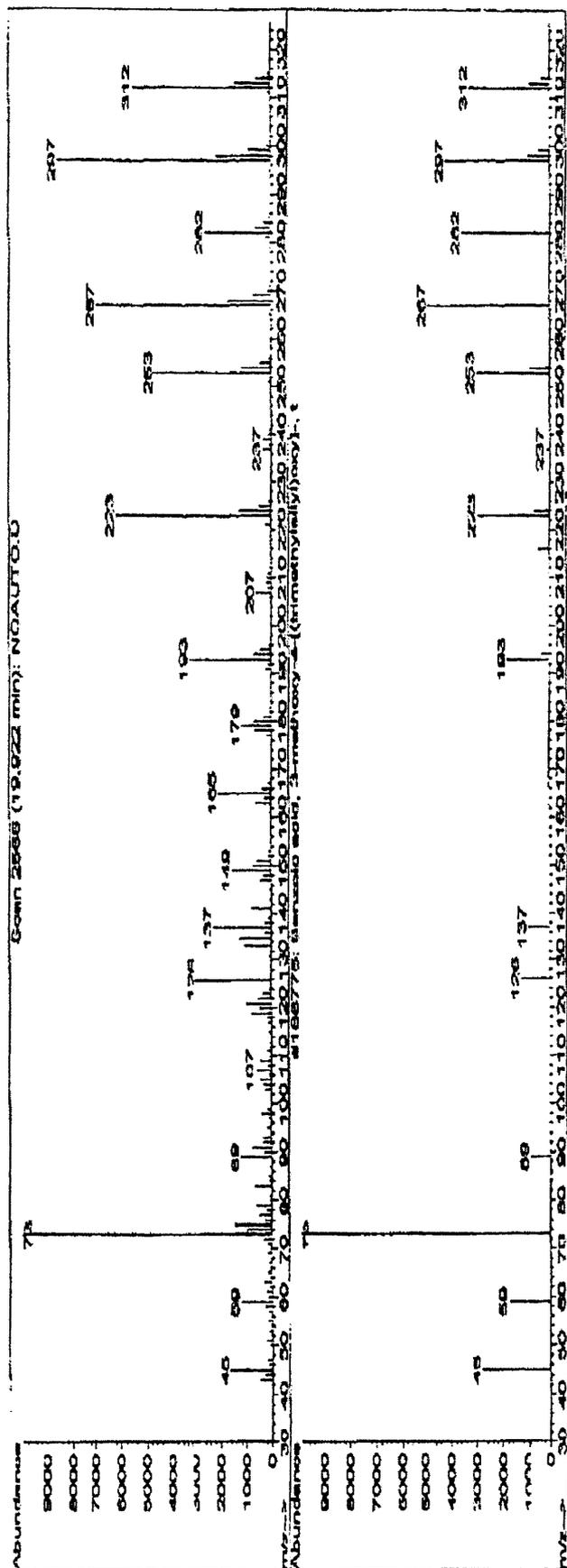


Figura 10

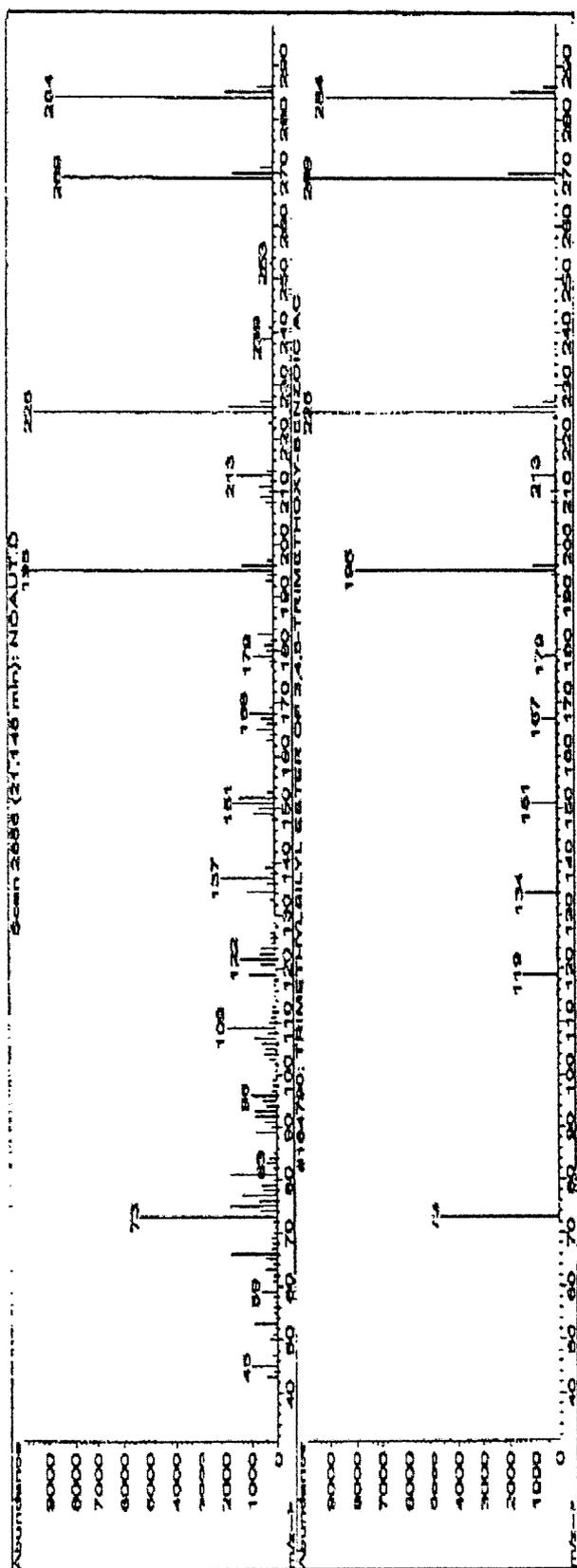


Figure 11

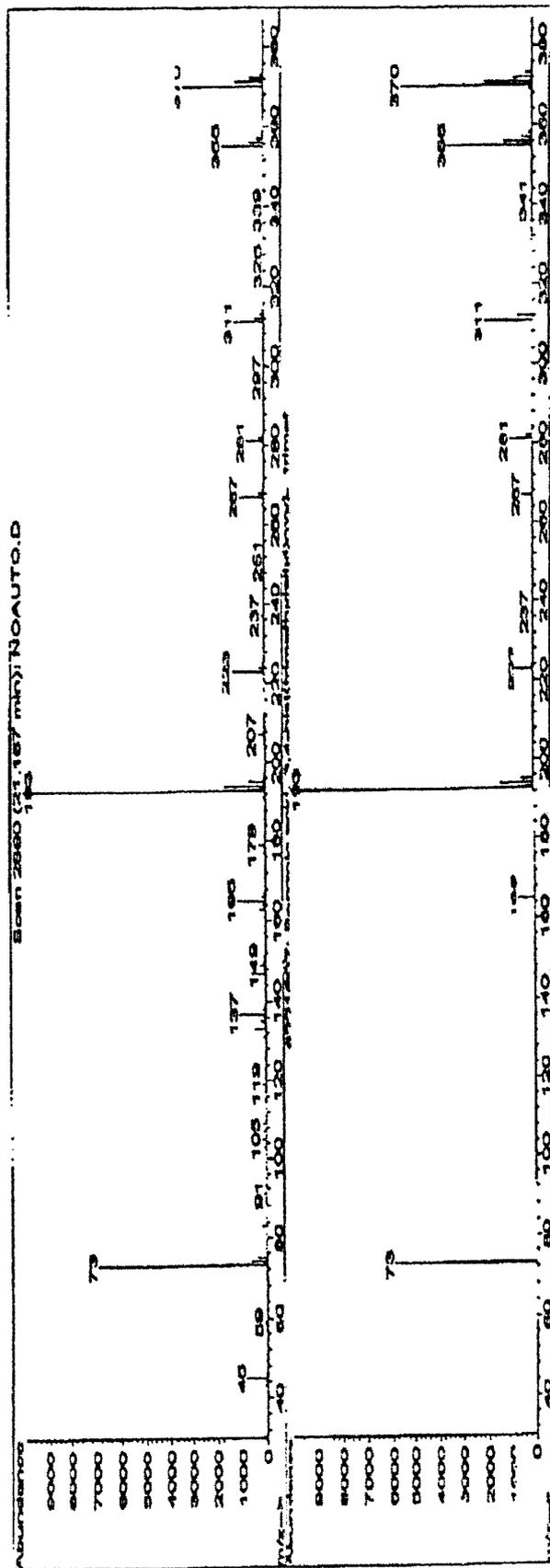


Figure 12

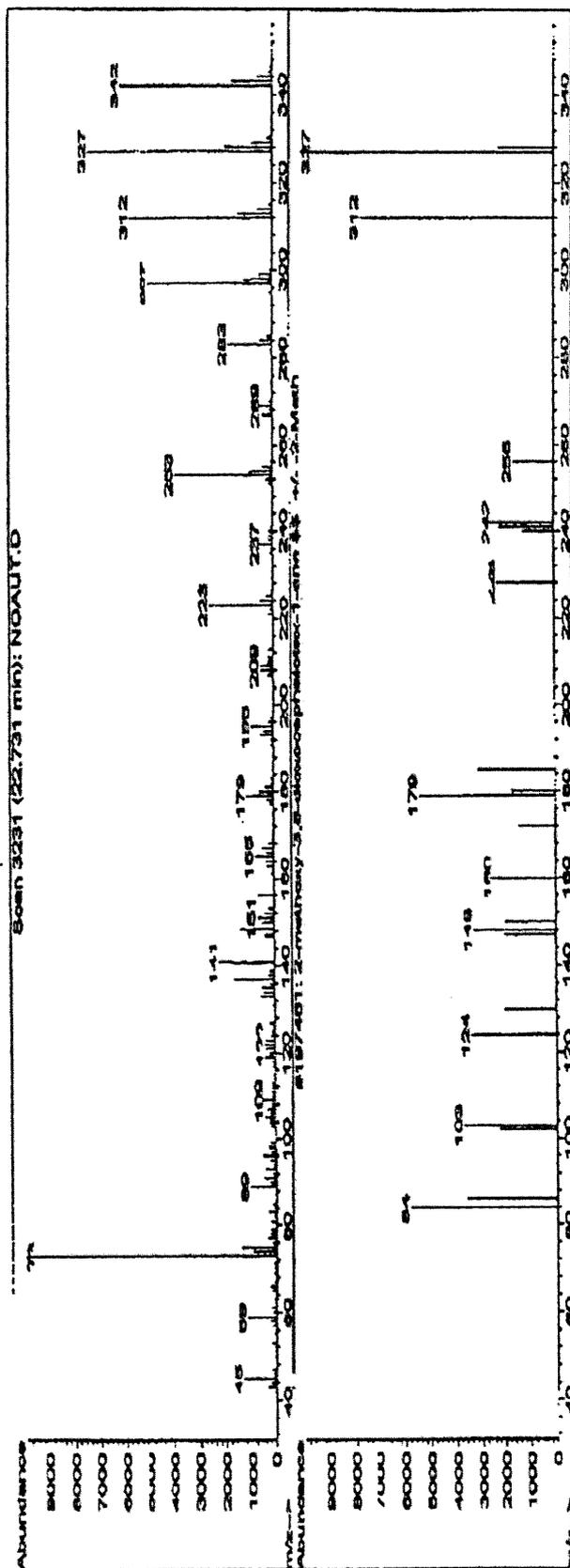


Figura 13

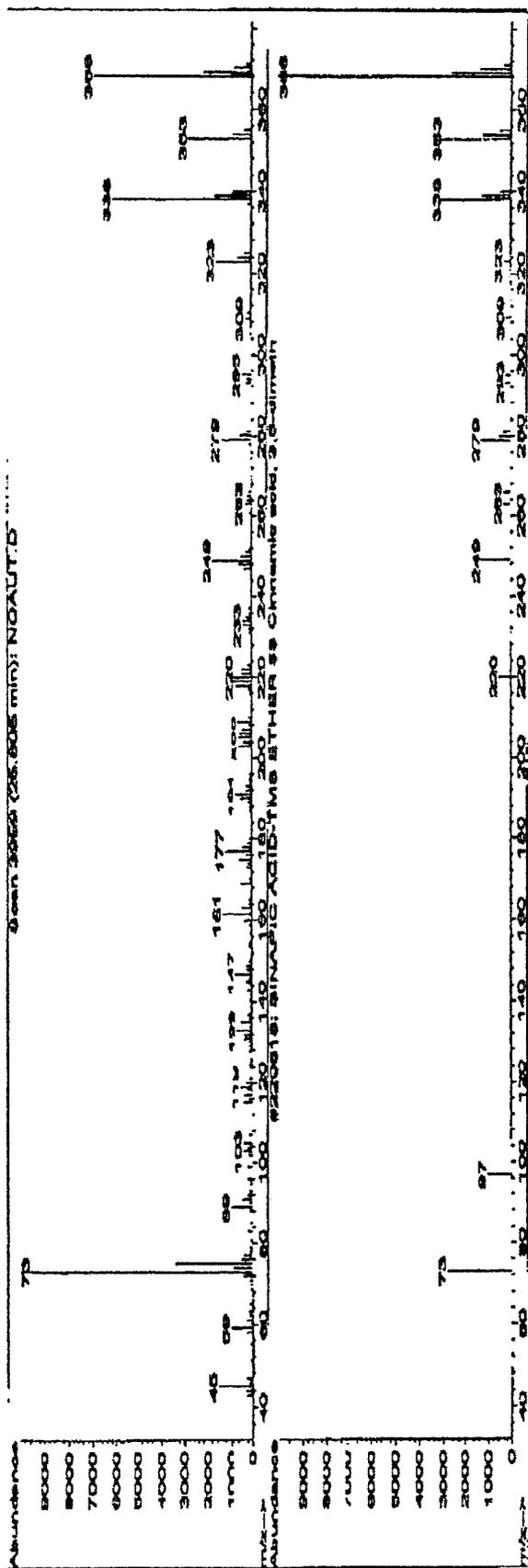


Figure 15

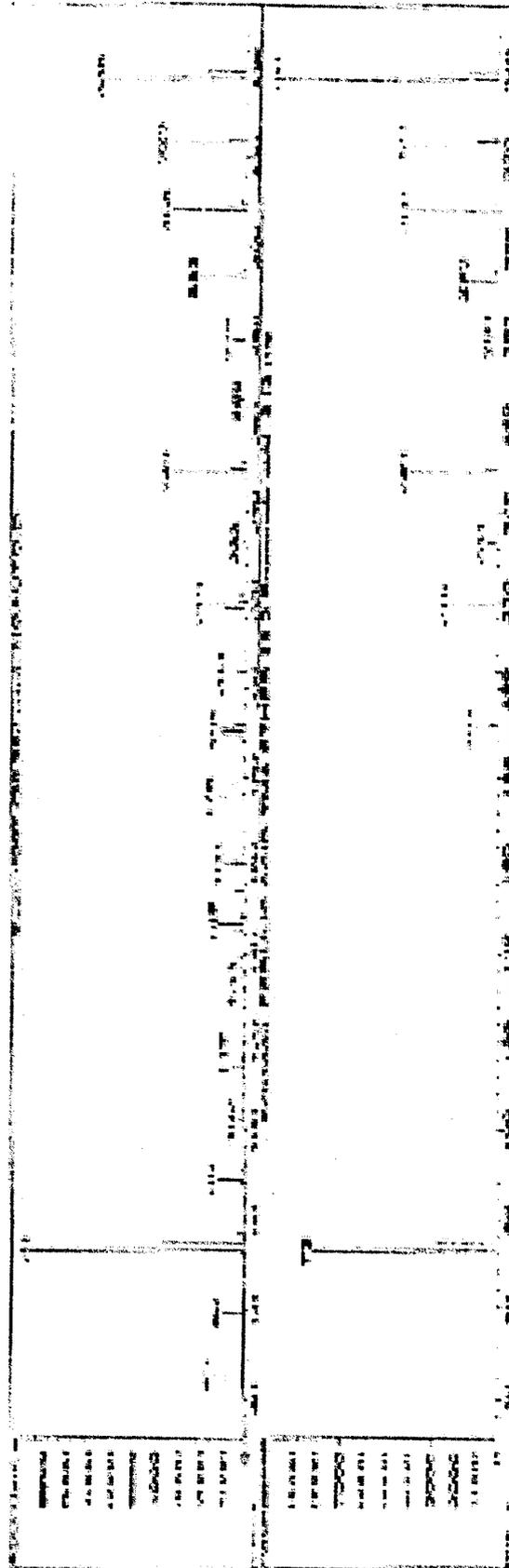


Figura 16

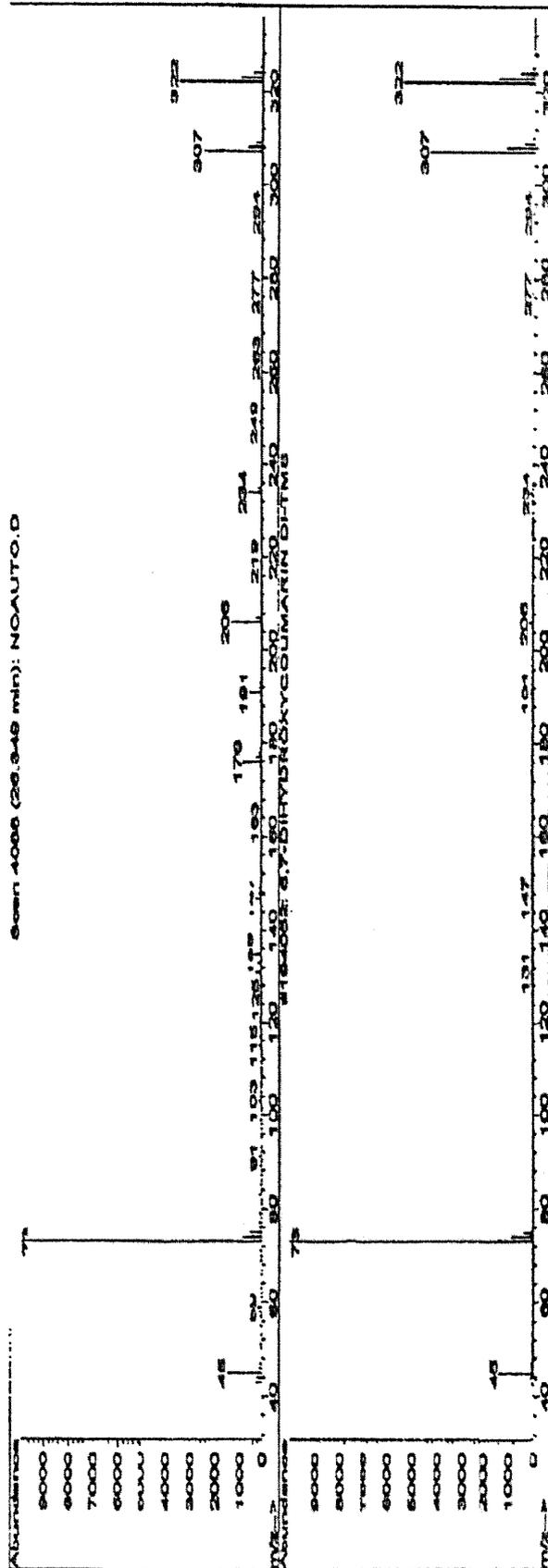


Figure 17

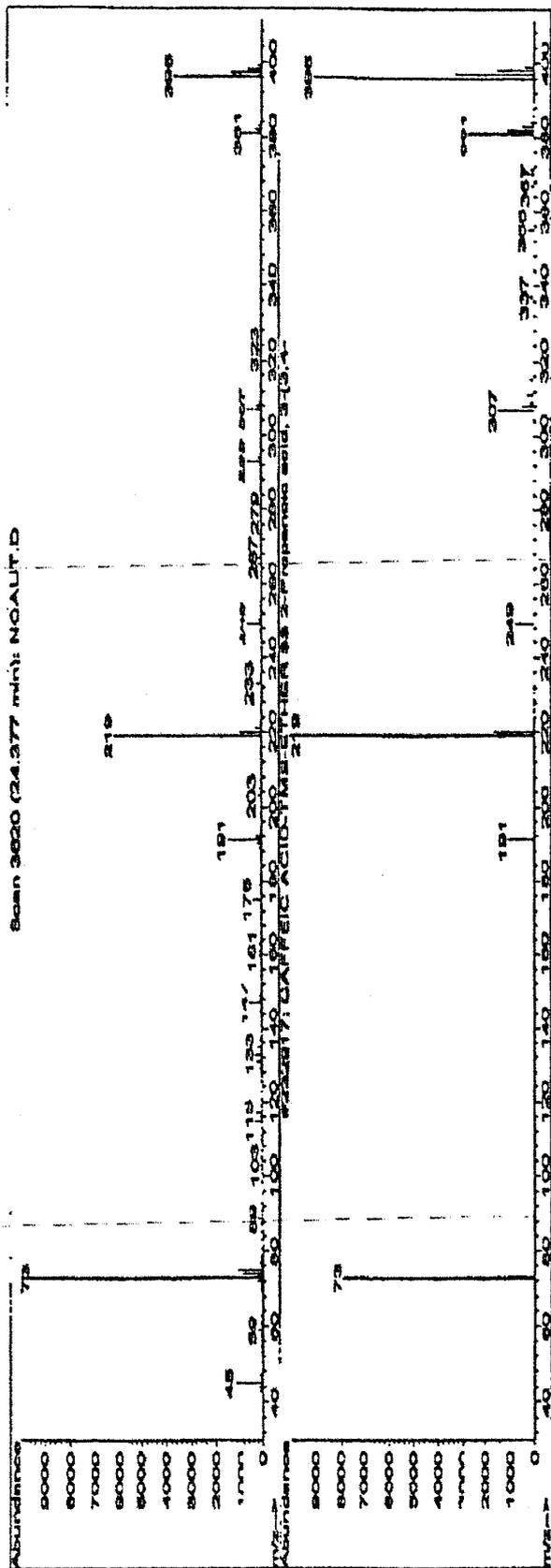


Figura 18



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 283 191

② Nº de solicitud: 200502143

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.09.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004009206 A1 (CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGÉTICA, MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLÓGICAS (C.I.E.M.A.T)) 29.01.2004, todo el documento, en particular, ver página 4, líneas 14-18.	1-6
X	ES 2111498 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 01.03.1998, todo el documento.	1-6
X	LESAGE-MEESSEN, L. et al.: "Simple Phenolic Content in Olive Oil Residues as a Function of Extraction Systems", Food Chemistry (2001) vol. 75, pp.: 501-507, todo el documento.	1-6
A	WO 9932589 A1 (UNILEVER PLC) 01.07.1999, todo el documento.	1-11
A	EP 0849353 A1 (UNILEVER N.V.) 24.06.1998, todo el documento.	1-11
A	ES 2084564 A1 (TRATAMIENTO INTEGRAL DE ALPECHINES BAENA S.L.) 01.05.1996, todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.09.2007

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 36/63 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A23L 1/302 (2006.01)