



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 167 277**

⑫ Número de solicitud: 200002544

⑬ Int. Cl.⁷: C12N 9/08

C12N 9/02

C02F 3/32

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **23.10.2000**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2002**

Fecha de concesión: **15.07.2003**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2003**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.08.2003

⑲ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta
Edf. de la Convalecencia
30003 Murcia, ES

⑳ Inventor/es: **Rodríguez López, José Neptuno;**
Tudela Serrano, José Bautista y
García Cánovas, Francisco

㉑ Agente: **Fernández Prieto, Angel**

㉒ Título: **Extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) y su empleo en la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados.**

㉓ Resumen:

Extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) y su empleo en la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados.

El extracto de alcachofa comprende enzimas con actividad peroxidasa y polifenol oxidasa, puede ser obtenido a partir de desechos (tallos, hojas y brácteas) de alcachofas mediante homogeneización de dichos desechos en un medio acuoso, y puede ser utilizado para descontaminar medios líquidos, sólidos y semisólidos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados, mediante tratamiento con peróxido en presencia de dicho extracto de alcachofa.

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 167 277 B1

DESCRIPCION

Extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) y su empleo en la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados.

Campo de la invención

La invención se refiere a un extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) que comprende enzimas con actividad peroxidasa y polifenol oxidasa, a un procedimiento para su obtención, y a un método para la descontaminación de medios líquidos, sólidos y semisólidos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados, utilizando dicho extracto de alcachofa o el material de alcachofa del que procede.

Antecedentes de la invención

Los vertidos industriales y las aguas residuales contienen frecuentemente fenoles, haluros orgánicos, aminas aromáticas y/o metales pesados, sustancias contaminantes y tóxicas para los seres vivos que se incorporan a la cadena alimentaria generando importantes problemas medioambientales. Algunos métodos para la eliminación de estos compuestos utilizan microorganismos, carbón activo u oxidación química. Sin embargo, estos métodos presentan algunos inconvenientes tales como poca eficacia, alto costo o generación de productos incluso más tóxicos que los iniciales. El tratamiento de estos vertidos líquidos con enzimas con actividad peroxidasa (PODs) y con enzimas con actividad polifenol oxidasa (PPOs) es una nueva e interesante estrategia para resolver este problema (Klibanov et al., 1983; Wada et al., 1995; Tatsumi et al., 1996). De hecho, las PODs y las PPOs son enzimas que se utilizan ampliamente en el tratamiento de vertidos industriales, aguas residuales, lodos y suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados.

Las enzimas con actividad peroxidasa (EC 1.11.1.7) son óxidorreductasas que se encuentran ampliamente distribuidas en toda la escala filogenética y que catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno. Además de su interés académico y fisiológico estas enzimas son ampliamente utilizada en laboratorios clínicos y en la industria. Sin embargo, lo que hace realmente interesante a las PODs, y que ha hecho que la Comisión Científica de la Unión Europea las defina como una de las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI, es su aplicación para conservar el medio ambiente. En esta línea, las PODs pueden sustituir a algunos reactivos y catalizadores químicos usados actualmente en cierto tipo de industrias. Así, pueden sustituir al cloro en el proceso de blanqueamiento del papel durante su reciclaje (patente norteamericana US 5.370.770) y también al formaldehído (mutagénico y cancerígeno) utilizado en la fabricación de resinas fenólicas (patente norteamericana US 5.112.752). Otra aplicación de las PODs en este apartado es su empleo en el tratamiento de vertidos líquidos o suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y/o metales pesados (patente norteamericana US

5.178.762). En estos casos las PODs parecen actuar convirtiendo estos compuestos en otros de mayor peso molecular y más fáciles de eliminar por procesos físicos tales como filtración, decantación, etc.

La enzima con actividad polifenol oxidasa (PPO) o tirosinasa (EC 1.14.18.1) es una cu-proteína ampliamente distribuida en la naturaleza y es la responsable de la melanogénesis que origina la pigmentación en animales y el pardeamiento enzimático en vegetales. La PPO cataliza dos reacciones en presencia de oxígeno molecular, la hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles (actividad monofenolasa) y la oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas (actividad difenolasa). A continuación, las *o*-quinonas evolucionan mediante diversas reacciones no enzimáticas acopladas hasta la formación de melaninas. La PPO oxida a un amplio número de monofenoles, *o*-difenoles y aminas aromáticas por lo que se trata de una enzima útil para el tratamiento de vertidos industriales, aguas residuales y suelos contaminados por este tipo de compuestos (Wada et al., 1995). Sin embargo, la aplicación de PPO en este sentido presenta una serie de inconvenientes tales como limitaciones por la concentración del oxígeno disuelto y su baja actividad catalítica o nula con monofenoles, aminas aromáticas y metales pesados.

Por otra parte, la industria conservera de la alcachofa origina una gran cantidad de desechos agrícolas o industriales, constituidos principalmente por las hojas, el tallo y la parte externa de la flor (brácteas) de la alcachofa, no aptos para el consumo humano. A modo de ejemplo, el 70 % en peso de la flor de la alcachofa corresponde a desechos no destinados al consumo humano. Sin embargo, tales desechos se utilizan para la alimentación animal y están destinados a la elaboración de forrajes ensilados. En la búsqueda de nuevas aplicaciones para tales desechos se ha encontrado, sorprendentemente, que esos subproductos poseen una elevada concentración de PODs y PPOs.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en primer lugar, con el problema de buscar nuevas aplicaciones a los desechos de alcachofas, los cuales, aunque no son aptos para el consumo humano, se utilizan para la alimentación animal y están destinados a la elaboración de forrajes ensilados.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han encontrado, sorprendentemente, que los desechos de alcachofas (*Cynara scolymus*, L.), que comprenden hojas, tallo y la parte externa de la flor (brácteas) de la alcachofa, poseen una elevada concentración de PODs y PPOs.

Puesto que las PODs y las PPOs son enzimas que se utilizan ampliamente en el tratamiento de vertidos industriales, aguas residuales, lodos y suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados, la invención proporciona, además, un método alternativo para el tratamiento de dichos medios contaminados basado que comprende el empleo de un peróxido y un extracto de alcachofa que contiene PODs y PPOs, o del material del que

procede dicho extracto.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye un extracto de alcachofa que comprende PODs y PPOs.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la obtención de dicho extracto de alcachofa que comprende PODs y PPOs.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicho extracto de alcachofa que comprende PODs y PPOs para oxidar una sustancia tóxica seleccionada entre un fenol, una amina aromática, un haluro orgánico, un metal pesado, y sus mezclas, por reacción con un peróxido en presencia de dicho extracto de alcachofa hasta convertir a dicha sustancia tóxica en un material no contaminante o menos contaminante.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la descontaminación total o parcial de medios, líquidos, sólidos y semisólidos, contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados que comprende la adición opcional de un peróxido al medio a tratar en presencia de dicho extracto de alcachofa que comprende PODs y PPOs.

Una ventaja de esta invención radica en que permite extraer un extracto rico en PPOs y PODs a partir de un desecho agrícola e industrial, útil en aplicaciones medioambientales, y, por otra parte, el residuo sólido obtenido tras la extracción de dichas actividades enzimáticas se puede utilizar como material enriquecido en fibra para el consumo animal y humano, o bien como fuente para la obtención de otros bioproductos con aplicaciones sanitarias, agroalimentarias o industriales.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica que muestra la evolución de la concentración de 4-clorofenol con el tiempo en las fracciones descritas en el Ejemplo 2.

La Figura 2 es una gráfica que muestra la evolución de la concentración de L-dopa con el tiempo en las fracciones descritas en el Ejemplo 3.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración de extracto de alcachofa sobre la oxidación de paracetamol y muestra la evolución de la concentración de paracetamol con el tiempo en las fracciones descritas en el Ejemplo 4.

La Figura 4 es una gráfica que muestra el efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno sobre la oxidación de paracetamol y muestra la evolución de la concentración de paracetamol con el tiempo en las fracciones descritas en el Ejemplo 4.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un extracto de alcachofa, en adelante extracto de la invención, que comprende enzimas con actividad peroxidasa (PODs) de alcachofa y enzimas con actividad polifenol oxidasa (PPOs) de alcachofa.

El extracto de la invención puede obtenerse a partir de tejidos de alcachofa, en particular, tallos, hojas y brácteas de alcachofa, mediante un procedimiento que comprende la extracción de la

fracción soluble en un medio acuoso, rica en dichas actividades enzimáticas, mediante un procedimiento que se describirá detalladamente más adelante.

En una realización particular, dichos tallos, hojas y brácteas de alcachofa forman parte de los desechos de alcachofa generados por la industria conservera, por lo que esta invención supone el aprovechamiento de un producto de interés (extracto que comprende PODs y PPOs de alcachofa) a partir de un desecho industrial que constituye una fuente nueva y económica de dichas actividades enzimáticas.

De forma más concreta, el extracto de la invención puede obtenerse mediante un procedimiento en el que material vegetal de alcachofa, incluyendo hoja, tallo y la parte externa de la flor (brácteas) se somete a trituración y homogeneización en un medio acuoso constituido por agua o por una disolución acuosa salina, opcionalmente tamponado en un intervalo de pH comprendido entre 3 y 10. Adicional y opcionalmente, dicho medio acuoso puede contener uno o más secuestradores de fenoles, por ejemplo polivinilpirrolidona soluble o carbón activo.

Tras la homogeneización, la parte soluble se separa del residuo sólido por medio de cualquier técnica convencional de separación sólido-líquido, por ejemplo, por centrifugación o filtración, para obtener una primera fracción soluble (que contiene ambas actividades enzimáticas POD y PPO) y un primer residuo sólido (que contiene retenido algo de dichas actividades). Dicho primer residuo sólido se somete a uno o más (generalmente dos) ciclos adicionales de lavado, homogeneización en el medio acuoso previamente mencionado y separación sólido-líquido para obtener un segundo residuo sólido y unas segundas fracciones solubles (que contienen ambas actividades enzimáticas POD y PPO) que, si se desea, se mezclan con la primera fracción soluble. Dicha primera fracción soluble junto con, opcionalmente, dichas segundas fracciones solubles, constituyen el extracto crudo. Una vez finalizado el proceso de extracción, una cantidad igual o superior al 90 % de las unidades de POD, e igual o superior al 60 % de las unidades de PPO se encuentra en dicho extracto crudo. Si se deseara aumentar la concentración de POD y PPO en dicho extracto crudo se podría efectuar una extracción asistida con detergentes: entre ellos, detergentes no iónicos, tales como Triton X-100 o Triton X-114, que se adicionarían, por ejemplo, en una relación del 1 % (p/v) a las disoluciones previamente descritas. El extracto crudo, así como el extracto crudo enriquecido en POD y PPO, presentan actividades POD y PPO de alcachofa y constituyen el extracto de la invención.

El extracto de la invención, si se desea, se puede desecar o liofilizar por métodos convencionales, o bien se puede someter a precipitación salina, por ejemplo, precipitación con sulfato amónico en una concentración comprendida entre 50 % y 90 %. En este último caso, el precipitado se puede someter posteriormente, si se desea, a un proceso de desalado por cualquier técnica convencional.

En general, se obtienen, aproximadamente

unas 21.000 unidades de POD (1 unidad de POD se define como la cantidad de enzima que oxida 1 micromol de ABTS por minuto a pH 4,5 y 25°C) y 3.700 unidades de PPO (1 unidad de PPO se define como la cantidad de enzima que oxida 1 micromol de ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico por minuto a pH 4,5 y 25°C) por kilogramo de alca-

chofa.
Por otra parte, mediante un simple lavado con agua de dicho segundo residuo sólido se obtiene un material rico en fibra apto para la fabricación de piensos compuestos para animales, como fuente de fibra en la alimentación humana o como fuente para la obtención de otros bioproductos con aplicaciones sanitarias, agroalimentarias o industriales.

El extracto de la invención, líquido o desecado, debido a que comprende PODs y PPOs, presenta no solo las aplicaciones propias de ambas actividades enzimáticas sino que, además, como se mencionará más adelante, la combinación de ambas actividades enzimáticas en un mismo extracto ejerce un efecto sinérgico sobre la descontaminación de medios contaminados con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos y/o metales pesados.

Así, de acuerdo con la presente invención, una sustancia tóxica seleccionada entre un fenol, una amina aromática, un haluro orgánico, un metal pesado y sus mezclas, puede ser oxidada haciéndola reaccionar con un peróxido en presencia de un extracto de la invención hasta convertirla en un material menos contaminante. Por tanto, el extracto de la invención es útil para el tratamiento de medios líquidos, semisólidos y sólidos, por ejemplo, vertidos o efluentes industriales, aguas residuales, fangos o suelos, contaminados con fenoles, aminas aromáticas, compuestos halogenados, metales pesados o una mezcla de ellos.

La composición del extracto de la invención, rica en PPOs y PODs, supone una ventaja respecto a los métodos de descontaminación de medios contaminados que usan sólo PPOs o PODs, por ejemplo, de soja o de rábano picante, ya que se amplía la gama de contaminantes que pueden ser oxidados y, además, permite la disminución de la concentración de peróxido a añadir en el tratamiento, el cual, en elevadas concentraciones, puede inhibir tanto a la POD como a la PPO, inactivando dichas enzimas. La POD y la PPO de alcachofa oxidan a los compuestos fenólicos y aminas aromáticas a una mezcla de polímeros o melaninas, mucho menos tóxicos, y que pueden ser fácilmente separados de los medios líquidos a tratar por filtración o sedimentación. La POD de alcachofa también cataliza la oxidación unielectrónica de haluros orgánicos y metales pesados. En el primer caso se producen haluros no tóxicos y en el segundo los metales pesados son oxidados a sus formas iónicas las cuales pueden ser separadas por intercambio iónico, quelatación u otros procesos. De forma más concreta, la PPO oxida con más eficacia a los *o*-difenoles que a los monofenoles o a las aminas aromáticas. Sin embargo, la POD oxida eficientemente a todos estos sustratos y a los metales pesados. Además, la POD genera, por oxidación de monofenoles, compuestos

difenólicos que son rápidamente oxidados por la PPO. Esta acción sinérgica entre ambas enzimas supone una reducción de la concentración necesaria de peróxido y amplía el grupo de sustancias contaminantes que pueden ser oxidadas. Debido a la acción de ambas enzimas, las sustancias contaminantes son transformadas a compuestos menos tóxicos y/o polímeros de alto peso molecular que cuales pueden ser separados por procesos físicos como filtración, intercambio iónico, precipitación o decantación.

En otro aspecto, la invención se refiere al empleo del extracto de la invención para oxidar una sustancia tóxica seleccionada entre un fenol, una amina aromática, un haluro orgánico, un metal pesado, y sus mezclas, por reacción con un peróxido en presencia del extracto de la invención, hasta convertir a dicha sustancia tóxica en un material no contaminante o menos contaminante.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "fenol" se refiere a un compuesto orgánico que contiene uno o varios grupos hidroxilo unidos a átomos de carbono de un anillo bencénico o de cualquier otro ciclo aromático, opcionalmente sustituido en cualquier posición libre por cualquier sustituyente.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "amina aromática" se refiere a un compuesto aromático que contiene uno o varios grupos amino unidos a átomos de un anillo aromático, opcionalmente sustituido en cualquier posición libre por cualquier sustituyente, y en el que uno o los dos hidrógenos del grupo amino pueden estar, opcionalmente, sustituidos por cualquier sustituyente.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "haluro orgánico" se refiere a un compuesto orgánico resultante de sustituir uno o más átomos de hidrógeno de un compuesto orgánico por uno o más átomos de halógeno.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "metal pesado" se refiere a metales y metaloides de la Tabla Periódica de elementos con propiedades metálicas y potencialmente tóxicos, por ejemplo, Cd, Hg, Pb, etc. Este término incluye a cualquier forma química de dicho metal en la que se pueda encontrar.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "oxidar una sustancia tóxica... hasta convertir a dicha sustancia tóxica en un material no contaminante o menos contaminante" se refiere a que la sustancia tóxica, que es un sustrato de POD y/o de PPO y ejerce un efecto tóxico sobre el medio ambiente, es oxidada hasta un punto en el que deja de ser sustancialmente tóxica para el medio ambiente.

Entre las sustancias tóxicas que pueden ser oxidadas, en medio líquido, por un peróxido en presencia del extracto de la invención se incluyen, a título meramente ilustrativo, paracetamol, 4-fluorofenol, 3-fluorofenol, 2-fluorofenol, 4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 4-bromofenol, 3-bromofenol, 2-bromofenol, 4-iodofenol, 3-iodofenol, 2-iodofenol, fenol, *p*-cresol, 4-etilfenol, 4-isopropilfenol, 4-terc-butilfenol, guayacol, *p*-hidroxianisol, *m*-hidroxianisol, dime-

nol, 3,4-dimetoxifenol, p-hidroxialcohol bencílico, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico, anilina, p-toluidina, o-toluidina, m-toluidina, 4-amino-N,N'-dimetilnilina, catecol, 4-metilcatecol, 4-terc-butilcatecol, dopamina, dopa, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, cadmio, mercurio o plomo.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la descontaminación total o parcial de un medio contaminado con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos, metales pesados y sus mezclas, en adelante, método de descontaminación de la invención, que comprende poner en contacto dicho medio contaminado a tratar con un peróxido y con un material de alcachofa que comprende PODs y PPOs, en una cantidad adecuada y bajo unas condiciones apropiadas para descontaminar total o parcialmente el medio contaminado.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "descontaminación total o parcial de un medio contaminado" significa que mediante el tratamiento aplicado desaparece totalmente el contaminante o que éste se mantiene a unos niveles prácticamente indetectables o bien que éste se mantiene a una concentración inferior a la que se puede considerar tóxica o nociva para el medio ambiente.

En una realización particular del método de descontaminación de la invención, dicho medio contaminado es un medio líquido seleccionado entre efluentes o vertidos industriales, aguas residuales y sus mezclas, y puede contener sólidos tanto en disolución como en suspensión. En otras realizaciones particulares, dicho medio contaminado es un medio semisólido, por ejemplo, un lodo, o un medio sólido, por ejemplo, un suelo.

El material de alcachofa que comprende PODs y PPOs se selecciona entre tejidos de alcachofa, en particular, tallo, hojas y brácteas de alcachofas, desechos de alcachofas y el extracto de la invención, preferentemente este último. Aunque la invención contempla la posibilidad de tratar los medios contaminados directamente con los desechos de alcachofa, los cuales también comprenden PODs y PPOs, en general se prefiere el empleo del extracto de la invención ya que parte del material presente en los desechos de alcachofa se puede utilizar como suplemento de fibra en alimentación animal y humana, con lo que se podría obtener un mayor rendimiento económico si se extrajera la parte soluble rica en PODs y PPOs de acuerdo con el procedimiento proporcionado por esta invención.

La cantidad de extracto de alcachofa necesario para realizar el método de descontaminación de la invención viene determinada por la actividad enzimática del extracto utilizado y por la naturaleza del material contaminante. Aunque las enzimas (PODs y PPOs) no son consumidas en la reacción, ya que actúan como catalizadores, siempre es posible una pérdida de actividad por inactivación. En una realización particular, la cantidad de POD está comprendida entre 0,2 y 10 unidades de POD por litro de medio líquido contaminado. En caso de que se añadiera directamente el tejido vegetal (tallo, hojas y/o brácteas) de alcachofa, bien como tal o bien contenido en desechos de

alcachofa, sobre el medio líquido contaminado a tratar, la cantidad de tejido vegetal o desecho estaría comprendida entre 2,5 y 25 gramos de tejido de alcachofa o desecho por litro de medio líquido contaminado.

Para el tratamiento de medios líquidos contaminados, mediante el método de descontaminación de la invención, el extracto de alcachofa se debe de adicionar en presencia de un peróxido.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "peróxido" incluye a cualquier compuesto químico que contiene el agrupamiento bivalente -O-O-, tal como un alquil-peróxido, por ejemplo, metil-peróxido, etil-peróxido, terc-butil-peróxido, etc., peróxido de hidrógeno y sus mezclas, preferentemente peróxido de hidrógeno.

En general, es aconsejable añadir el peróxido gradualmente con el tiempo para, por una parte, impedir la inactivación de POD y PPO, y, por otra, suministrar al sistema uno de los sustratos necesarios para la catálisis. La concentración de peróxido puede estar comprendida entre 0,1 y 10 mmoles de peróxido por litro de medio líquido contaminado, preferiblemente entre 0,2 y 2 mmoles por litro de medio líquido contaminado. Si la contaminación es debida a un compuesto o-difenoílico, el método proporcionado por esta invención podría realizarse sin necesidad de adicionar el peróxido. Sin embargo, se ha visto que la adición de peróxido, incluso en estos casos, facilita la polimerización de los productos de oxidación, probablemente por reacción de POD con intermediarios de la ruta de oxidación de estos o-difenoles.

Otro aspecto no necesario, pero que aumenta la eficacia del método de descontaminación de la invención es la agitación y/o aireación continua del medio líquido contaminado a tratar. Esto produce un mejor contacto del material de alcachofa que comprende PODs y PPOs, en particular, del extracto enzimático de la invención, con las sustancias tóxicas o contaminantes presentes en el medio a tratar y, además, proporciona un suministro de oxígeno al sistema, importante para la actuación de la PPO.

Se ha comprobado que la POD de alcachofa es estable a temperaturas de 65°C aproximadamente durante más de 24 horas, mientras que la PPO solo pierde un 40 % de su actividad en ese tiempo y a esa temperatura, por lo que el método de descontaminación de la invención se puede realizar a una temperatura comprendida entre 10°C y 70°C, aunque, en general, estará condicionado por la temperatura del medio líquido a descontaminar ya que en la mayoría de casos ésta es difícil de controlar.

La actividad de PPO y POD de los extractos de alcachofa es dependiente del pH aunque dichas enzimas presentan una elevada estabilidad en un amplio intervalo de pH. Aunque estas enzimas pueden actuar a un pH comprendido entre 3 y 9, el método de descontaminación de la invención es más efectivo en un intervalo de pH comprendido entre 3,5 y 7. Por tanto, en general, antes de iniciar el método de descontaminación de la invención, se contempla la posibilidad de medir el pH del medio líquido a tratar y efectuar las correcciones apropiadas, mediante la adición

de los ácidos o bases necesarios, para mantener el medio líquido a tratar en un intervalo de pH apropiado para la realización del método de descontaminación de la invención.

En una realización particular del método de descontaminación de la invención, especialmente aplicable en el tratamiento de medios líquidos, consiste en la inmovilización de las PODs y/o PPOs en soportes sólidos para la fabricación de biorreactores. Aunque, en principio, esto puede suponer un encarecimiento del método de descontaminación de la invención, la inmovilización presenta una serie de ventajas, tales como mayor aprovechamiento de las enzimas y mejor control del proceso catalítico, que podrían justificar esta realización. En este caso, el extracto de la invención se puede utilizar como fuente de PPOs y PODs para su inmovilización por distintos métodos, como el enlace a soportes sólidos, el atrapamiento en geles, la encapsulación en vesículas, el entrecruzamiento de moléculas de enzimas y el confinamiento en biorreactores de membranas. Entre ellos, estaría el enlace a soportes como magnetita o concanavalina-A. A modo de ejemplo, se ha observado que más del 65 % de la actividad peroxidasa de un extracto de la invención se retiene en concanavalina-A, lo que indica que una alta fracción de esta enzima está glicosilada. La inmovilización del extracto de la invención también facilitaría la separación continua de los productos finales de la reacción, ya que el biorreactor podría estar acoplado a sistemas de filtración, afinidad, interacción hidrofóbica, intercambio iónico, quelatación o reparto.

Algunas sustancias contaminantes que pueden ser eliminadas de un medio líquido contaminado mediante el método de descontaminación de la invención son: paracetamol, 4-fluorofenol, 3-fluorofenol, 2-fluorofenol, 4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 4-bromofenol, 3-bromofenol, 2-bromofenol, 4-iodofenol, 3-iodofenol, 2-iodofenol, fenol, *p*-cresol, 4-etilfenol, 4-isopropilfenol, 4-terc-butilfenol, guayacol, *p*-hidroxianisol, *m*-hidroxianisol, dimetoxifenol, 2-cloro-4-metoxifenol, 3,5-dimetoxifenol, 3,4-dimetoxifenol, *p*-hidroxialcohol bencílico, *p*-hidroxibenzaldehído, ácido *p*-hidroxibenzoico, anilina, *p*-toluidina, *o*-toluidina, *m*-toluidina, 4-amino-*N,N'*-dimetilánilina, catecol, 4-metilcatecol, 4-terc-butilcatecol, dopamina, dopa, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, cadmio, mercurio o plomo. Asimismo, otras sustancias contaminantes que no sean sustratos de las PODs o PPOs de alcachofa también podrían ser oxidadas secundariamente por los radicales libres generados en la actuación de POD sobre sus sustratos primarios.

En una realización particular del método de descontaminación de la invención, el medio contaminado a tratar es un medio semisólido, tal como un lodo, o un medio sólido, por ejemplo, un suelo.

Para el tratamiento de lodos y suelos contaminados por el método de descontaminación de la invención es más recomendable la adición de desechos de alcachofas (tallos, hojas y brácteas) directamente sobre el lodo o el suelo a tratar. En estos casos el peróxido podría ser añadido simplemente por pulverización. Una vez descompuesto

el material vegetal, las PODs y PPOs contenidas en los tejidos se liberarían y actuarían sobre los contaminantes, convirtiéndolos en compuestos menos tóxicos, los cuales no tendrían que ser, necesariamente, extraídos del suelo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma. El Ejemplo 1 describe la obtención de un extracto de alcachofa rico en POD y PPO, el Ejemplo 2 describe el tratamiento de agua contaminada por un clorofenol, el Ejemplo 3 describe el tratamiento de agua contaminada por un difenol, y el Ejemplo 4 muestra el efecto de la concentración de extracto de alcachofa y peróxido de hidrógeno en el tratamiento de agua contaminada por paracetamol.

Ejemplo 1

Extracción y valoración económica

En este ejemplo se describe un método para la extracción de un extracto de alcachofa rico en POD y PPO. Además, se realiza una comparación económica entre este método y los descritos para el tratamiento de sustancias tóxicas con peroxidasa de rábano y con peroxidasa de soja.

Para la obtención de un extracto de alcachofa rico en POD y PPO, 150 gramos de brácteas de alcachofa se congelaron en nitrógeno líquido para favorecer la trituración y homogeneización de este material rico en fibra. La homogeneización se realizó en 300 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7,0 conteniendo cloruro sódico 1M y 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona soluble. Después de homogeneizar, la parte soluble se separa del residuo sólido por centrifugación (9.000 r.p.m. durante 30 minutos). El residuo sólido se somete a dos ciclos más de lavado, homogeneización y centrifugación en las disoluciones anteriores. Los sobrenadantes de estas fracciones se juntaron constituyendo el extracto crudo rico en actividad POD y PPO.

Se realizó una extracción igual a la anterior pero utilizando 150 gramos de raíz de rábano picante. Hasta la fecha, y de acuerdo con las últimas publicaciones, la raíz del rábano picante es la materia vegetal que posee mayor contenido de peroxidasa. Los inventores han determinado y comparado la cantidad de peroxidasa extraída de la raíz del rábano y de las brácteas de la alcachofa. Sorprendentemente, este último tejido sólo tiene la mitad de unidades (21.000 unidades por kilogramo) que la raíz del rábano picante (43.000 unidades por kilogramo). Por lo tanto, los desechos de alcachofa presentan una cantidad de POD comparable a la raíz del rábano picante. Pero lo que no es comparable es el precio de estos dos productos. El precio del rábano picante, utilizado para el consumo humano, oscila entre las 300 y 700 pesetas/kg, mientras que los desechos de alcachofa, usados para la alimentación animal, tienen un precio medio de 0,5 pesetas/kg. Esto significa que el tratamiento de vertidos industriales, aguas residuales y suelos contaminados mediante extractos de alcachofa resulta unas 500 veces más económico que el tratamiento con peroxidasa de rábano picante. Otra peroxidasa más económica usada con este fin es la extraída de los brotes de soja. Según una valoración económica anterior (patente norteamericana US 5.178.762) usar esta proteína es aproximadamente 100 veces

más económico que hacerlo con la de rábano. Por lo tanto el método propuesto en esta invención es unas 5 veces más económico que el propuesto usando la peroxidasa de soja.

Ejemplo 2

Tratamiento de agua contaminada por un clorofenol

Se disolvieron 0,07 g de 4-clorofenol en 1 ml de acetona y la disolución resultante se añadió a 0,4 litros de agua corriente. La disolución fenólica se dividió en 4 fracciones de 100 ml y se mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación continua. A tiempo cero se les añadieron los siguientes componentes:

- FRACCION CONTROL: 2,1 ml de agua destilada

- FRACCION 1: 2 ml de agua destilada + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 7,5 % (2 mM en la disolución)

- FRACCION 2: 0,1 ml de agua destilada + 2 ml de extracto crudo de alcachofa (0,2 unidades de POD en la disolución)

- FRACCION 3: 2 ml de extracto crudo de alcachofa (0,2 unidades de POD en la disolución) + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno 7,5 % (2 mM en la disolución).

Se recogieron alícuotas de 1 ml a distintos tiempos. La reacción se paró por adición de 0,01 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %. Las muestras fueron filtradas y analizadas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La concentración de 4-clorofenol se determinó de acuerdo a una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de ese compuesto. Como se puede observar en la Figura 1, la mayor conversión de 4-clorofenol correspondió a aquellas fracciones que contenían el extracto crudo de alcachofa y el peróxido de hidrógeno, lo que significa que la POD es especialmente activa sobre este monofenol clorado. La PPO oxida mucha más lentamente a este fenol como lo pone de manifiesto su desaparición lenta en aquella fracción a la que se le adicionó extracto de alcachofa pero no el peróxido de hidrógeno.

Considerando largos tiempos de reacción, la Tabla 1 muestra la concentración de 4-clorofenol (tanto por ciento respecto a la concentración inicial) a las 2 horas de reacción en las condiciones descritas anteriormente. Después de 10 horas las fracciones control y 1 no mostraron ningún cambio en su color. La fracción a la cual se le habla añadido únicamente extracto crudo de alcachofa (Fracción 2), presentó una coloración marrón en ese tiempo, mientras que en la que se añadió conjuntamente el extracto crudo de alcachofa y el peróxido de hidrógeno (Fracción 3) se formó un compuesto de color amarillo, insoluble y fácilmente separable de la disolución acuosa por centrifugación o filtración.

TABLA 1

Porcentaje de 4-clorofenol

Fracción	4-clorofenol (%)
Control	100
1	99
2	64
3	13

Ejemplo 3

Tratamiento de agua contaminada por un difenol

Se disolvieron 0,04 g del *o*-difeno, L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-dopa), en 0,4 litros de agua corriente y se repartieron en 4 fracciones de 100 ml cada una, manteniéndose a temperatura ambiente y en agitación continua. A tiempo cero se les añadieron los siguientes componentes:

- FRACCION CONTROL: 1,1 ml de agua destilada

- FRACCION 1: 1 ml de agua destilada + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 7,5 % (2 mM en la disolución)

- FRACCION 2: 0,1 ml de agua destilada + 1 ml de extracto crudo de alcachofa (0,1 unidades de POD en la disolución)

- FRACCION 3: 1 ml de extracto crudo de alcachofa (0,1 unidades de POD en la disolución) + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 7,5 % (2 mM en la disolución).

Se recogieron alícuotas de 1 ml a distintos tiempos. La reacción se paró por adición de 0,01 mL de TCA al 20 %. Las muestras se filtraron y analizaron por HPLC. La concentración de L-dopa se determinó de acuerdo a una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de este *o*-difeno. La Figura 2 representa la desaparición de L-dopa con el tiempo en todas las fracciones. En este caso la adición de peróxido de hidrógeno no mostró diferencias significativas en catálisis de este *o*-difeno por los extractos de alcachofa. Por lo tanto, en este caso, la PPO fue la que mayoritariamente oxidó al compuesto fenólico. Este ejemplo muestra cómo la adición de peróxido de hidrógeno no es estrictamente necesaria cuando se quiere limpiar un agua contaminada por un *o*-difeno con extracto de alcachofa.

Después de 10 horas de reacción las Fracciones 2 y 3 evolucionaron a la formación de compuestos de color marrón -oscuro e insolubles en medio acuoso, características que definen a las melaninas formadas a partir de L-dopa.

Ejemplo 4

Efecto de la concentración de extracto de alcachofa y peróxido de hidrógeno en el tratamiento de un agua contaminada por un fármaco

En este ejemplo se describe el efecto de la concentración de extracto de alcachofa y de peróxido de hidrógeno en el tratamiento de un agua contaminada por paracetamol (4-acetaminofenol).

Se disolvieron 0,1 g de paracetamol en 0,6 litros de agua corriente. La disolución conteniendo este fármaco se dividió en 6 fracciones de 100 ml y se mantuvieron a temperatura ambiente y en agitación continua. Tres de estas disoluciones se usaron para determinar el efecto de la concentración de extracto de alcachofa y las otras tres para estudiar el efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno.

4.1 Efecto de la concentración de extracto de alcachofa

Las unidades enzimáticas añadidas están referidas a las unidades de POD. A los 100 ml de disolución se les añadieron:

- FRACCION CONTROL: 2 ml de agua destilada + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % (8 mM en la disolución)

- FRACCION 1: 1 ml de agua destilada +

1 ml de extracto crudo de alcachofa (0,1 unidades de POD en la disolución) + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % (8 mM en la disolución)

- FRACCION 2: 2 ml de extracto crudo de alcachofa (0,2 unidades de POD en la disolución) + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % (8 mM en la disolución).

Se recogieron alícuotas de 1 ml a distintos tiempos. La reacción se paró por adición de 0,01 ml de TCA al 20 %. Estas muestras fueron filtradas y analizadas por HPLC. La concentración de paracetamol se determinó de acuerdo a una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de este fármaco. Los resultados se muestran en la Figura 3. Se puede observar cómo la adición de 2 unidades de POD por litro de agua contaminada elimina prácticamente el 90 % de paracetamol presente en esta agua en aproximadamente 1 hora de reacción.

4.2 Efecto de la concentración de peróxido de hidrógeno

Las tres fracciones restantes de 100 ml de agua contaminada conteniendo ese fármaco se sometieron al siguiente tratamiento:

- FRACCION CONTROL: 0,1 ml de agua destilada + 1 ml de extracto crudo de alcachofa (0,1 unidades de POD en la disolución)

- FRACCION 1: 0,075 ml de agua destilada + 1 ml de extracto crudo de alcachofa (0,1 unidades de POD en la disolución) + 0,025 ml de peróxido

de hidrógeno al 30 % (2 mM en la disolución)

- FRACCION 2: 1 ml de extracto crudo de alcachofa (0,1 unidades de POD en la disolución) + 0,1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % (8 mM en la disolución).

La concentración de paracetamol se valoró como en el caso anterior y los resultados se muestran en la Figura 4. Esta Figura muestra la necesidad de adicionar pequeñas concentraciones del peróxido para obtener mejores resultados. Esto es debido al bien conocido efecto de inactivación de las peroxidasas por el peróxido. Para evitar este fenómeno de inactivación, en algunos casos, es más conveniente añadir pequeñas concentraciones del peróxido e ir adicionando éste gradualmente con el tiempo.

Bibliografía

- **Klibanov**, A.M.; **Tu**, T. y **Scott**, K.P. (1983) "Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters", *Science* 221, 259-261.

- **Tatsumi**, K.; **Wada**, S. y **Ichikawa**, H. (1996) "Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase", *Biotechnology & Bioengineering* 51, 126-130.

- **Wada**, S.; **Ichikawa**, H. y **Tatsumi**, K. (1995) "Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant", *Biotechnology & Bioengineering* 45, 304-309.

REIVINDICACIONES

1. Un extracto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) que comprende enzimas con actividad peroxidasa (PODs) de alcachofa y enzimas con actividad polifenol oxidasa (PPOs) de alcachofa.

2. Un procedimiento para la obtención de un extracto de alcachofa según la reivindicación 1, que comprende la extracción de dicho extracto mediante homogeneización de tejidos de alcachofa en un medio acuoso.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dichos tejidos de alcachofa comprenden tallos, hojas y brácteas de alcachofa.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dichos tallos, hojas y brácteas de alcachofa forman parte de los desechos de alcachofa generados por la industria conservera de alcachofas.

5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho medio acuoso está constituido por agua o por una disolución acuosa salina, opcionalmente tamponado en un intervalo de pH comprendido entre 3 y 10.

6. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho medio acuoso comprende, además, uno o más secuestradores de fenoles.

7. Procedimiento según la reivindicación 2, que comprende la trituración de dichos tejidos de alcachofa previa a la homogeneización de los mismos.

8. Procedimiento según la reivindicación 2, que comprende la separación, tras la homogeneización, de la parte soluble del residuo sólido, mediante un proceso de separación sólido-líquido convencional, para obtener una primera fracción soluble y un primer residuo sólido.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha separación sólido-líquido se realiza por centrifugación o por filtración.

10. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicho primer residuo sólido se somete a uno o más ciclos adicionales de lavado, homogeneización en medio acuoso y separación sólido-líquido, para obtener un segundo residuo sólido y unas segundas fracciones solubles que, opcionalmente se mezclan con dicha primera fracción soluble y constituyen un extracto crudo que comprende PODs y PPOs.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende, además, efectuar sobre dicho extracto crudo una extracción con detergentes.

12. Procedimiento según la reivindicación 2, que comprende, además, desecar o liofilizar el extracto obtenido.

13. Procedimiento según la reivindicación 2, que comprende, además, someter a precipitación salina al extracto obtenido, seguido de, opcionalmente, desalado del producto resultante.

14. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho segundo residuo sólido se somete a un lavado con agua para obtener un material rico en fibra adecuado para la fabricación de piensos compuestos para animales, como fuente de fibra en la alimentación humana o como fuente para la obtención de bioproductos con aplicaciones sanitarias, agroalimentarias o industriales.

15. Un procedimiento para oxidar una sustancia tóxica seleccionada entre un fenol, una amina

aromática, un haluro orgánico, un metal pesado, y sus mezclas, que comprende hacer reaccionar dicha sustancia tóxica con un peróxido en presencia de un extracto de alcachofa según la reivindicación 1, u obtenible por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, hasta convertir a dicha sustancia tóxica en un material no contaminante o menos contaminante.

16. Un método para la descontaminación total o parcial de un medio contaminado con fenoles, aminas aromáticas, haluros orgánicos, metales pesados y sus mezclas, que comprende poner en contacto dicho medio contaminado a tratar con un peróxido y con un material de alcachofa que comprende PODs y PPOs, seleccionado entre desechos de alcachofas y un extracto de alcachofa según la reivindicación 1, u obtenible por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en una cantidad adecuada y bajo unas condiciones apropiadas para descontaminar total o parcialmente el medio contaminado.

17. Método según la reivindicación 16, en el que dicho medio contaminado es un medio líquido seleccionado entre efluentes o vertidos industriales, aguas residuales y sus mezclas.

18. Método según la reivindicación 17, en el que dicho material de alcachofa que comprende PODs y PPOs es dicho extracto de alcachofa.

19. Método según la reivindicación 18, en el que el extracto de alcachofa se añade sobre el medio líquido a tratar en una cantidad tal que contiene entre 0,2 y 10 unidades de POD por litro de medio líquido contaminado.

20. Método según la reivindicación 17, en el que dicho material de alcachofa que comprende PODs y PPOs es dicho desecho de alcachofa.

21. Método según la reivindicación 20, en el que el desecho de alcachofa se añade sobre el medio líquido a tratar en una cantidad comprendida entre 2,5 y 25 gramos de desecho de alcachofa por litro de medio líquido contaminado.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, en el que dicho peróxido se selecciona entre un alquil-peróxido, peróxido de hidrógeno y sus mezclas.

23. Método según la reivindicación 22, en el que dicho peróxido se adiciona de forma gradual con el tiempo.

24. Método según la reivindicación 22, en el que dicho peróxido se adiciona en una concentración comprendida entre 0,1 y 10 mmoles de peróxido por litro de medio líquido contaminado.

25. Método según la reivindicación 24, en el que dicho peróxido se adiciona en una concentración comprendida entre 0,2 y 2 mmoles de peróxido por litro de medio líquido contaminado.

26. Método según la reivindicación 17, que comprende, además, la agitación y/o aireación continua del medio líquido contaminado a tratar.

27. Método según la reivindicación 17, en el que la temperatura está comprendida entre 10°C y 70°C.

28. Método según la reivindicación 17, en el que el pH del medio líquido contaminado a tratar está comprendido entre 3 y 9.

29. Método según la reivindicación 28, en el que el pH del medio líquido contaminado a tratar está comprendido entre 3,5 y 7.

30. Método según la reivindicación 17, que comprende, además, medir previamente el pH del medio líquido a tratar y efectuar las correcciones apropiadas, mediante la adición de los ácidos o bases necesarios, para mantener el medio líquido a tratar en un intervalo de pH comprendido entre 3 y 9.

31. Método según la reivindicación 17, que comprende la inmovilización de las PODs y/o PPOs presentes en dicho extracto de alcachofa mediante enlace a un soporte sólido, atrapamiento en geles, encapsulación en vesículas, entrecruzamiento de moléculas de enzimas y confinamiento en biorreactores de membranas.

32. Método según la reivindicación 31, en el que el enlace a un soporte sólido se realiza sobre magnetita o concanavalina-A.

33. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17, 31 ó 32, en el que el biorreactor que comprende la enzima soluble o inmovilizada está acoplado a un sistema de filtración, afinidad, interacción hidrofóbica, intercambio iónico, quelatación o reparto.

34. Método según la reivindicación 17, en el

que el contaminante presente en el medio líquido contaminado se selecciona entre paracetamol, 4-fluorofenol, 3-fluorofenol, 2-fluorofenol, 4-clorofenol, 3-clorofenol, 2-clorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 4-bromofenol, 3-bromofenol, 2-bromofenol, 4-iodofenol, 3-iodofenol, 2-iodofenol, fenol, p-cresol, 4-etilfenol, 4-isopropilfenol, 4-terc-butilfenol, guayacol, p-hidroxianisol, m-hidroxianisol, dimetoxifenol, 2-cloro-4-metoxifenol, 3,5-dimetoxifenol, 3,4-dimetoxifenol, p-hidroxialcohol bencílico, p-hidroxibenzaldehído, ácido p-hidroxibenzoico, anilina, p-toluidina, o-toluidina, m-toluidina, 4-amino-N,N'-dimetilanilina, catecol, 4-metilcatecol, 4-terc -butilcatecol, dopamina, dopa, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, cadmio, mercurio, plomo y sus mezclas.

35. Método según la reivindicación 16, en el que dicho medio contaminado se selecciona entre un medio semisólido y un medio sólido.

36. Método según la reivindicación 35, en el que el material de alcachofa que comprende PODs y PPOs es desecho de alcachofa y el peróxido se añade por pulverización.

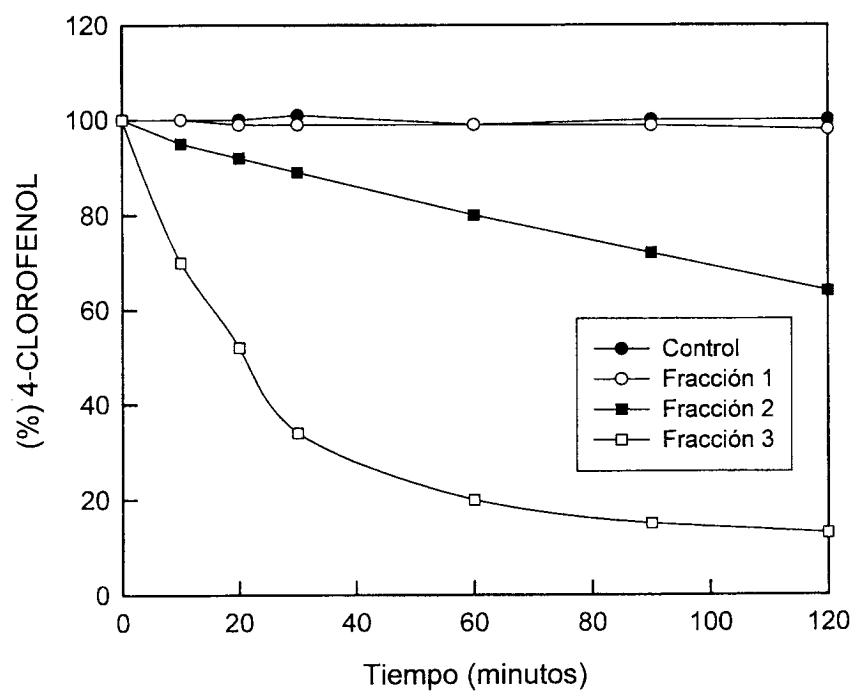
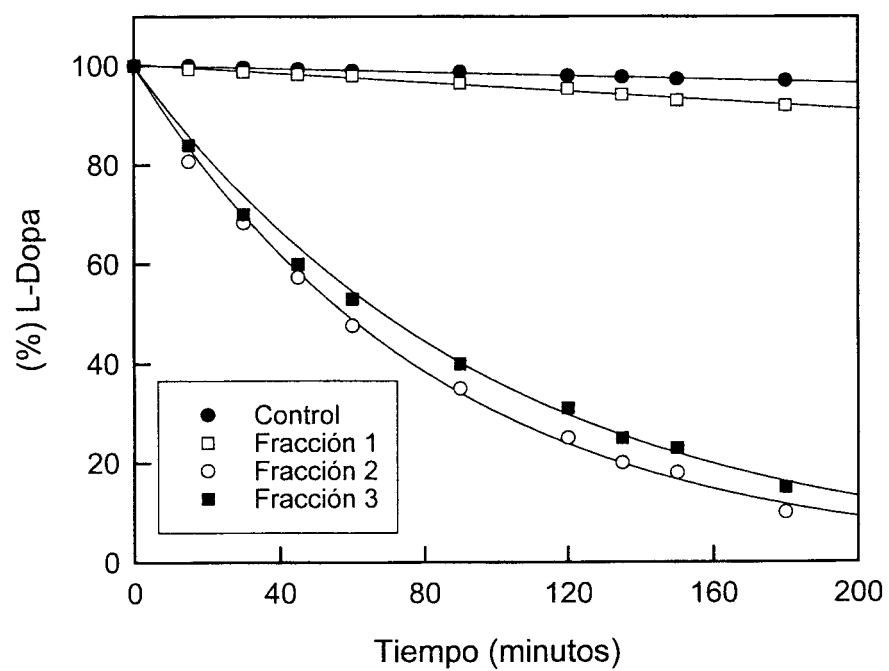


FIGURA 1

**FIGURA 2**

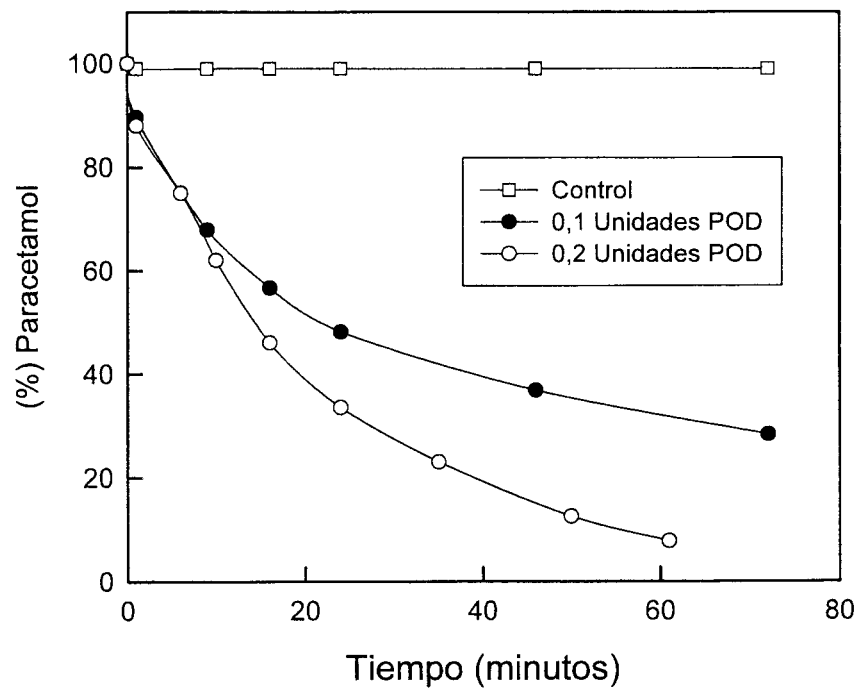


FIGURA 3

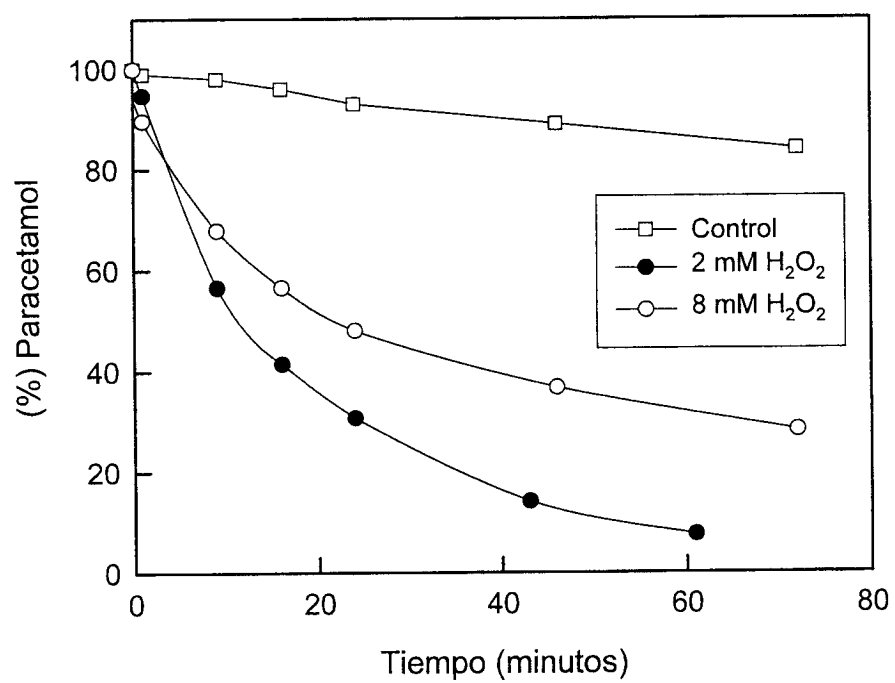


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 167 277
⑫ N.º solicitud: 200002544
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 23.10.2000
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 9/08, 9/02, C02F 3/32

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	KANEL, M.Y.; GHAZY, A.M. Peroxidases of Cynara scolymus (global artichoke) leaves. Purification and properties. 1973. Acta Biol. Med. Ger., 31 (1), 39-49.	1-2,15-16
Y	ESPIN, JUAN CARLOS et al. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke heads (Cynara scolymus L.). 1997. Food Sci. Technol. (London), 30 (8), 819-825.	1-2,15-16
Y	EP 462082 A2 (ENTE POUR LA NUOVE TECNOLOGIE E L'ENERGIE E L'AMBIENTE. ENEA) 18.12.1991, página 6, líneas 15-18,37-40,53-54; reivindicación 8.	15-16
A	EP 547318 A1 (AUSIMONT S.P.A.) 23.06.1993	15-16
A	EP 126394 A1 (PHILLIPS PETROLEUM COMPANY) 28.11.1994	15-16

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 n.º:

Fecha de realización del informe

04.01.2002

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1