

Potencial Biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola

Biopharmaceutical Potencial of olive industrial wastes

RAMOS-COMERZANA A. Y MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. 18071 Granada. España

RESUMEN

El tratamiento de los residuos de la industria oleícola plantea serios problemas, especialmente en el área mediterránea. En este trabajo se revisa la posibilidad de utilización y aprovechamiento de los mencionados residuos con fines terapéuticos.

Una alternativa consiste en aprovechar el potencial farmacéutico de los polifenoles, por su utilidad como antioxidantes y como antimicrobianos. Se hace referencia a otro tipo de compuestos como el ácido maslínico.

Otra posibilidad se basa en la obtención de biopolímeros tipo polihidroxicanoatos (PHAs) y exopolisacáridos de origen microbiano (EPS), a partir del alpechin y alpeorujo.

Los polyhidroxy-alcanoatos (PHAs), pueden ser aplicados como envase de productos farmacéuticos, por su interés como mecanismo de liberación controlada de determinados principios activos (microcapsulas); o por su utilidad en ingeniería tisular.

Los EPSs, pueden aplicarse con éxito desde la elaboración de fórmulas farmacéuticas, a su utilidad como moduladores de la respuesta biológica. Se destaca, en este apartado, los resultados obtenidos con un nuevo EPS, descubierto por nuestro grupo de investigación.

PALABRAS CLAVE: Biofarmacéuticas, residuos, alpechin, alpeorujo, polifenoles, tirosol, ácido maslínico, biopolímeros, polihidroxicanoatos.

ABSTRACT

The treatment and disposal of olive and olive oil residues possess a serious problem, especially in the Mediterranean area. This paper deals with the particular difficulties concerning their treatment and focuses on the biopharmaceutical potential of residues in the olive oil industry.

One important alternative, consists in the extraction of the polyphenols, that is, a class of compounds present in this residues. The biopharmaceutical potential of these polyphenols is based on their application as antioxidant and antimicrobial compounds. This review also refers to other chemical compounds such as the maslinic acid.

Another important alternative is based on the biotransformation of the industrial residues, into a basis for the production of biopolymers, namely polyhydroxycanoates (PHA), and extracellular polysaccharides (EPS).

On the one hand PHA can be used in different ways for instance as polymeric devices such implants, microcapsules or nanocapsules that have been studied for their application in biomedicine.

On the one hand, EPS are not only employed in the making of new pharmaceutical formulae, but they are also successfully used as immunomodulators or biological response modifiers. Finally, this paper emphasizes the results obtained from a new EPS discovered by our research team.

KEY WORDS: Biopharmaceuticals, olive wastes, olive oil mill wastes, polyphenols, tyrosol, maslinic acid, biopolymers, polyhydroxycanoates.

INTRODUCCIÓN

La industria procedente del olivar tanto para la obtención del aceite de oliva como para la producción comercial de la aceituna, generan unos residuos de elevada toxicidad. El alpechin, el orujo de dos fases o alpeorujo y las aguas residuales de la obtención comercial de la aceituna, constituyen un material altamente contaminante y de difícil eliminación (Moreno et al. 1990), que representa una contaminación superior a la debida a las aguas residuales urbanas (Boari et al.1984).

Como consecuencia de esa contaminación las investigaciones se han orientado a la eliminación y al tratamiento de estos residuos, cuyos principales componentes tóxicos son de naturaleza muy variada. Se atribuye a los polifenoles existentes la causa de la elevada toxicidad. La mayoría de los polifenoles se consideran extremadamente tóxicos para los vegetales, células animales, microorganismos e insectos, lo que justifica el elevado efecto contaminante de estos residuos. Los polifenoles existentes, tanto en el alpeorujo, como en el alpechin y en las aguas residuales de la obtención de la aceituna son de naturaleza muy diversa (Moreno et al. 1990).

Se pretende en el presente trabajo hacer una exposición de los principales logros obtenidos en relación al biopotencial farmacéutico de los residuos de la industria oleícola, de acuerdo con la bibliografía existente hasta el momento. Nuestro grupo de investigación, es pionero no solo en el planteamiento de este tipo de investigaciones sino también en la obtención de resultados favorables; aunque, en nuestro caso, se hayan centrado las investigaciones en el estudio de los mecanismos de detoxificación de los residuos producidos y en la biotransformación del alpechin. Parece importante que conjuntamente con la eliminación del residuo tóxico se pueda recuperar el residuo bajo una perspectiva netamente farmacéutica. En su día resaltamos la posibilidad del empleo del alpechin como fuente de productos de interés fitosanitario o farmacéutico (Ramos-Cormenzana et al.1996) y demostramos la capacidad de formación de biopolímeros por microorganismos utilizando como sustrato nutritivo el alpechin (Lopez y Ramos-Cormenzana 1996). Existen antecedentes (Monteoliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana 1998), respecto a la posibilidad de que los biopolímeros, puedan ser satisfactoriamente aplicados bajo este punto de vista farmacéutico.

PRODUCTOS NATURALES APROVECHABLES

I. Fenoles

Los **polifenoles** existentes en el alpeorujo, aguas residuales de la obtención de la aceituna y del alpechin, como ya comentamos son de naturaleza muy tóxica y a su vez diversa (Moreno et al. 1990). La mayoría de estos polifenoles se consideran extremadamente tóxicos tanto para los vegetales, como para las células animales, insectos y microorganismos, lo que justifica el enorme efecto contaminante de estos residuos.

Estos **polifenoles** tóxicos pueden ser inactivados ya sea mediante los microorganismos, o por sistemas enzimáticos, como las lacasas, lo mismo podría ocurrir respecto a otros polifenoles carboxilados, por lo menos tal puede deducirse de los resultados obtenidos de la biodegradación de los polifenoles del alpechin utilizando diferentes microorganismos. Se ha descrito la degradación del 50%, e incluso se ha llegado a degradar el

69% del total de fenoles existentes en el alpechin, por distintas especies microbianas como por el *Bacillus pumilus* 123 y por el *Aspergillus terreus* (Borja et al. 1995; Martínez-Nieto et al. 1993).

Los compuestos fenólicos deben ser considerados bajo dos puntos de vista según sea su composición, mientras determinados contaminantes plantean serios problemas al poseer una elevada toxicidad, como sucede con el catecol, metil-catecol y polifenoles carboxílicos, existen otros que deben ser considerados como útiles (Capasso 1997). Estos últimos podrían ser reutilizados bajo una perspectiva farmacéutica, posibilidad real debido a las propiedades antioxidantes de alguno de estos polifenoles como ocurre con el tirosol e hidroxitirosol. Otras aplicaciones se basarían en su acción antienzimática, antimicrobiana, o en la modificación de la respuesta biológica inmune.

En relación al tratamiento de los componentes tóxicos existen dos claras posibilidades:

(i) la simple degradación de los compuestos tóxicos, lo que no implica ningún aprovechamiento de residuos

(ii) la investigación de procedimientos o sistemas que permitan recuperar alguno de las sustancias naturales existentes en estos residuos, como los compuestos fenólicos, mediante los correspondientes procesos de extracción y purificación, lo que parece mucho más interesante. Quizás sea esta la causa de la relativa proliferación de patentes respecto a estos procedimientos de recuperación u obtención de diferentes compuestos químicos.

La actividad antimicrobiana de los componentes del alpechin ha sido ampliamente estudiada y revisada observándose la generación de nuevos compuestos fenólicos en la biodegradación de los fenoles existentes en el alpechin (Ramos-Cormenzana et al. 1996). Diferentes polifenoles de origen vegetal se han considerado como compuestos de elevada actividad antiviral (Buciumeanu et al. 1994). No se puede considerar desencaminado el pensar que los polifenoles hallados en el alpechin puedan poseer una actividad similar.

Entre los procedimientos descritos para la recuperación y el aprovechamiento del hidroxitirosol a partir del alpechin, debe mencionarse el sistema de extracción en contracorriente (Martínez-Nieto y García-Granados 1992). Llegando a obtenerse de los anteriores residuos, en forma cristalina, para una vez purificado aplicarlo comercialmente. Tenemos conocimiento sobre la existencia de proyectos de investigación, en realización, respecto a la posible utilización de estos compuestos como antioxidantes naturales.

II. Otros compuestos

Reciente interés farmacéutico, ha surgido de los ácidos oleoico y maslínico, obtenidos a partir del alpechín; de los que se ha realizado una patente internacional respecto a su recuperación industrial (García-Granados 1997).

Creo que son suficientemente conocidas las propiedades del ácido oleoico, para regular el nivel de colesterol y en el mantenimiento equilibrado y regulado de peso corporal. Por otra parte a lo largo de los últimos años se vienen realizando estudios sobre el ácido maslínico, extraído de productos naturales procedentes de la aceituna y su uso en química fina, farmacología y aditivo de piensos naturales. Se ha investigado su acción como activador de neuronas y antiinflamatorio. De forma más reciente se ha investigado su actividad como inhibidor de proteasas, que sugiere su aplicación en el tratamiento de la inmunodeficiencia humana, como inhibidor del virus del sida (VIH). Este virus una vez incubado dentro de la célula, utiliza un enzima - la serin proteasa- para romper la célula, salir al medio y pasar a invadir nuevas células. Precisamente el ácido maslínico inhibe la acción de la serin proteasa entorpeciendo la expansión del VIH, tal y como se ha demostrado experimentalmente (García-Granados A.1997c, García-Granados 1999).

De los estudios derivados de la actividad sobre estos sistemas enzimáticos se sugiere su utilización como medicamento, en el tratamiento de parasitosis ocasionadas por *Cryptosporidium* sp., también en este caso debido a la inhibición de la serin proteasas (García-Granados 1997).

BIOPOLÍMEROS

En un anterior estudio sobre las posibles soluciones para la biorremediación del alpechin (Ramos-Cormenzana et al. 1995) exponíamos la formación de biopolímeros como importante alternativa para el aprovechamiento de estos residuos, ya fueran del tipo de los exopolisacáridos (EPSs), o de los poli-hidroxicanoatos (PHAs). Trataremos de aportar los datos que puedan poner en evidencia el interés farmacéutico de los mencionados productos.

2.1 Interés Farmacéutico y Biomédico de los PHAs.

El primer componente descrito fué el poli-

hidroxibutirato (PHB), que en forma de depósitos granulares se situaba en el citoplasma de una amplia gama de bacterias. Posteriormente se ha descrito, un PHB de menor peso molecular (14.000) como constituyente de las membranas bacterianas (Reusch et al. 1986). Este PHB se ha descrito, más recientemente, como componente normal del plasma humano, encontrándose en pequeñas cantidades, aunque excepcionalmente se encuentre en mayor proporción, en los casos de enfermos de diabetes mellitus.

Tanto el PHB como el colesterol tienen como precursor común el acetil-CoA, que está catali-

zado en ambos casos por la β -tiolasa que facilita la condensación del acetyl-CoA en acetoacetylCoA. Puesto que los lípidos se transportan en el plasma normalmente a través de una lipoproteína, al estudiarse el transportador en plasma, los resultados experimentales parecen indicar que la principal proteína transportadora del PHB plásmico es la albumina, puesto que entre el 70 y 80 % del PHB se encuentra combinado con la albumina, correspondiendo a las lipoproteínas el transporte del 20-30 % restante (Reusch et al.1992). La tasa de combinación es lenta, con la existencia de un periodo de reajuste de una hora. Se sugiere la reagrupación o desnaturalización previa a la unión, proceso que en vivo puede facilitarse y acelerarse mediante las proteínas de transferencia (Reusch et al.1992).

Se han desarrollado vías para preparar una amplia gama de PHA, utilizando a los microorganismos por medio tanto de la ingeniería genética como de las nuevas técnicas de fermentación. En consecuencia a lo anteriormente expuesto, se puede afirmar, que los PHAs constituyen uno de los grupos más amplios y fascinantes de los polímeros termoplásticos que se conocen, por su aplicabilidad in vivo.

No obstante, el hecho que los **costes** de estos bioplásticos sea superior a los procedentes de la industria del petróleo, hecho analizado por diferentes autores (Witholt y Kessler, 1999), constituye la primera objeción para su rentabilidad industrial puesto que el precio de 15 a 30 \$ por Kg es bastante elevado todavía. Una reducción a 5\$ lo convertiría en un producto válido, debido al extraordinario interés de estos PHA, como plásticos biodegradables y a su excepcional potencial interés biofarmacéutico.

Un aspecto a considerar por nosotros para reducir costes, es la viabilidad respecto a la formación de PHA a partir del alpechín, de forma análoga como otros autores observaban la formación de PHA a partir de otras aguas residuales (Yu et al.1999); los resultados que empezamos a conseguir podemos considerarlos como esperanzadores. Nos queda por resumir la aplicación de los mencionados biopolímeros dentro de la industria farmacéutica.

Puede que una de las aplicaciones iniciales de los **PHAs**, haya sido su utilidad como envases de diferentes productos, sobre todo productos cosméticos. Más recientemente y basándose en sus propiedades de servir como termoplástico,

de ser completamente degradable, y bioreciclable, conjuntamente con su elevada estabilidad, es prácticamente nula su biodegradación en atmósfera de aire húmedo, han llevado al PHB y a otros copolímeros como PHB-polihidroxivalerato (PHV) a ser utilizados para el transporte de líquidos, gases y vapores (Miguel et al. 1997). Nosotros sugerimos su aplicación como envase en productos farmacéuticos, aunque en cierto aspecto puede parecer chocante esa sugerencia, no debería descartarse pues sus propiedades ofrecen garantías suficientes, para que se mantengan perfectamente estables las propiedades del medicamento a envasar, por otro lado como quiera que el PHB es un material completamente biodegradable y reciclable, nosotros los profesionales de la Farmacia debemos dar ejemplo utilizando estos plásticos de origen microbiano, para así evitar el biodeterioro de la naturaleza por el empleo de otros biopolímeros.

Un segundo aspecto de aplicación farmacéutica de los polihidroxialcanoatos es su uso en la preparación de **microcápsulas o nanocápsulas**, que permitan la liberación lenta del principio activo y así prolongar su acción. La formación de microcápsulas por los ácidos poli- α -hidroxi, ha sido recientemente revisada (Ogawa 1997), constatándose que las propiedades de los PHAs lo hacen muy adecuado la elaboración de este tipo de formas farmacéuticas.

Existen diferentes formas para la formación de microcápsulas, aunque bajo un punto de vista morfológico pueden reducirse tan solo a dos los prototipos descritos: aquella microcápsulas que servirían como almacén o reserva, y las microcápsulas de encapsulación monolítica. En las microcápsulas de almacén, el sustrato o principio activo iría situado en una porción central rodeado de una membrana polimérica, mientras que en las microcápsulas monolíticas el principio activo se encuentra disperso y homogéneamente mezclado con la matriz polimérica. De esta forma el fármaco puede liberarse de forma controlada a partir de una microcápsula formada con un polímero biodegradable, en este caso la matriz debe de estar constituida por una microcápsula monolítica, independientemente del proceso de liberación; a diferencia de lo que sucedería en las microcápsulas almacén pues en este caso el principio activo se va a liberar rápidamente después de la degradación de la microcápsula, aunque esta degradación sea solo parcial (Ogawa 1997).

Se han analizado diferentes poli-ácidos que puedan emplearse, parece que los polímeros polilácticos (PLA) y la forma alfa del polihidroxibúterico, dan buenos resultados, sobre todo los copolímeros láctico-glicólico, debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y a sus propiedades físicas.

Una aplicación, muy interesante de los PHAs, es su empleo en ingeniería tisular mediante la fabricación de diferentes componentes, en consonancia con sus propiedades biológicas (Williams et al. 1999). La **ingeniería tisular** ha emergido como una ciencia multidisciplinar que abarca la biología, materiales y la reconstrucción quirúrgica para suministrar productos tisulares que restauren, mantengan o mejoren la actividad tisular (Langer y Vacanti 1993, Williams et al. 1999). Son tres los procedimientos conocidos de contribuir a este concepto: la infusión de células aisladas o sustitutivos celulares; el empleo de materiales sustitutivos de tejidos; y la implantación de células "sembradas en andamios", antes o inmediatamente después del implante. El objetivo de esta ingeniería está diseñada para suministrar una estructura de soporte para proteger a las células implantadas frente al propio sistema inmune; o de forma abierta para que las células se incorporen directamente a nuestro organismo. Utilizando este tipo de estructuras los ingenieros tisulares han conseguido ingeniar tejidos de mamíferos, incluyendo cartílagos, huesos, hígado, tejido uroepitelial, músculos de fibra lisa, epitelios traqueales, tendones y válvulas cardíacas. Estas estructuras de andamio deben poseer por lo menos las siguientes propiedades básicas:

- 1.- Biocompatibilidad,
- 2.- Permitir el desarrollo celular
- 3.- Guiar y organizar las células en la forma prevista y deseada
- 4.- Poseer la capacidad de permitir y facilitar el desarrollo de las células mediante los correspondientes sistemas que permitan tanto la nutrición celular como la eliminación de los materiales de desecho, para mantener las células viables
- 5- Finalmente el propósito de este tipo de estructuras es la reparación, por lo que es deseable que las "estructuras andamio" sean biodegradables, y que los productos de la degradación no sean tóxicos. Se considera que estas son las cinco propiedades imprescindibles en bioingeniería tisular, otras propiedades pueden ser deseables, aunque no sean esenciales (Williams et

al. 1999). En consecuencia los PHAs deberán reunir las cinco propiedades anteriormente mencionadas ser biocompatibles, mantener el crecimiento celular, servir de guía, permitir el desarrollo tisular, y degradarse a productos no tóxicos. La utilidad potencial de los PHAs se puede esquematizar en los siguientes apartados: Biopsia para recoger las células autólogas que se mezclarán con el correspondiente banco celular; preparación de las células en el andamio de PHA, proliferación celular e implante del andamio celular en el individuo enfermo (Williams et al. 1999).

Este tipo de aplicaciones conllevan un especial interés farmacéutico. Parece lógico que deba existir una regulación sanitaria para los PHAs, cuando se pretendan utilizar con fines sanitarios ya sea como productos biológicos o fármacos, en el tratamiento de diversas enfermedades. Debido a su procedencia de origen microbiológico, estos materiales suelen contener proteína residual, agentes surfactantes residuales o elevados niveles de endotoxina. Las proteínas extrañas, presentes en el PHA, pueden actuar ocasionando una respuesta inmune no deseable. Los surfactantes no están permitidos para su uso *in vivo*. La presencia de endotoxina, constituye uno de los principales problemas planteados a los fabricantes, pues no podemos olvidarnos que el origen del PHA, que procede principalmente de bacterias Gram negativas. Por tal motivo conjuntamente con la degradación del polímero y liberación de los principios activos, se originará la liberación conjunta de la endotoxina bacteriana, que no solo posee actividad como sustancia pirógena -esta endotoxina causaría fiebre caso de pasar al torrente circulatorio-, sino que también es responsable de la activación del complemento que regula la respuesta inmune e interviene en la respuesta inflamatoria aguda. En consecuencia, como precaución y seguridad adicional en la utilización de cualquier fármaco, antes de cualquier aplicación biomédica, debe limitarse la posibilidad de esta presencia, mediante el correspondiente control de los niveles de endotoxina presentes.

Se requieren precauciones especiales para la eliminación de la endotoxina, siempre que se pretenda la producción del PHA con fines biomédicos. Una de las recomendaciones se basa en el empleo de agentes oxidantes, sin embargo este método en el PHA tan solo es aplicable cuando el PHA se encuentra en el estado de polímero

sólido cristalino, pues la endotoxina quedaria atrapada en el biopolímero y durante el proceso de la biodegradación del PHA también se cedería o liberaría lentamente esta endotoxina (Williams et al. 1999). En un trabajo reciente, se concluye que el PHB para fines biomédicos puede obtenerse por extracción con cloroformo (valores de endotoxina inferiores a una unidad), consiguiéndose niveles mucho más bajos de endotoxina si se produce a partir de una cepa recombinante de *Escherichia coli*, mediante un sencilla digestión con NaOH 0,2 N (Lee et al. 1999a).

El interés farmacéutico de los PHAs, todavía se puede incrementar basándonos en recientes consideraciones, pues se ha propuesto que su potencial sea utilizado en la fabricación u obtención industrial de principios activos tales como antibióticos, vitaminas, y otros compuestos químicos, a través de los que podría ser considerada como *la ruta verde* para la obtención por síntesis de compuestos químicos de interés en Farmacia “de azúcares a plásticos y de estos a compuestos químicos definidos” (Lee et al. 1999b). En nuestro caso sería de residuos de la industria oleícola a biopolímeros y de estos a principios activos definidos.

2.2 Exopolisacáridos de origen microbiano.

Se conocen un gran número de EPSs de origen microbiano, que han sido objeto de un especial interés en diferentes reuniones y revisiones (Yalpani 1987; Phillips et al. 1990; Sutherland, 1990; Byron 1991). El papel específico de estas biomoléculas depende del ambiente, sugiriéndose que la habilidad de los microorganismos para producir polisacáridos es una respuesta a las presiones selectivas del medio ambiente. Los polisacáridos microbianos varían considerablemente en sus propiedades tanto físicas como químicas, pudiendo verse afectadas en gran medida las propiedades reológicas, como consecuencia de pequeños cambios en la estructura del polisacárido. Las propiedades de las que derivan las aplicaciones industriales de los exopolisacáridos microbianos, puestas de manifiesto por diferentes autores (Yalpani 1987, Phillips et al. 1989), se basan en la elevada solubilidad en agua, elevada viscosidad a baja concentración, pseudoplasticidad, alta estabilidad de las soluciones, ya sea a elevadas concentraciones de sales, a dife-

rentes pH y temperatura; la capacidad tensioactiva, dispersante y floculante, biodegradabilidad específica; y a sus propiedades adhesiva, captadora y selectiva para iones, proteína y lípidos.

En su momento destacamos el interés e importancia de los polisacáridos en Farmacia (Monteoliva-Sánchez y Ramos-Cormenzana 1998), entre las que cabe resaltar sus propiedades como anticoagulantes, actividad inmunogénica, antitumorales, hipolipemiantes; así como su interés tanto en la formulación de productos farmacéuticos, como en la elaboración de formas farmacéuticas de liberación controlada.

Quedaba por investigar la posibilidad de obtener EPSs a partir de residuos de la industria oleícola. De forma relativamente reciente hemos descrito la producción de xantano a partir del alpechín (Lopez 1996, Lopez y Ramos-Cormenzana 1996), posteriormente hemos conseguido la formación de nuevos polisacáridos microbianos a partir del alpechín (Ramos-Cormenzana et al. 1997)

Cuando expusimos el interés de la investigación de los EPSs, que podían originarse del alpechín bajo un punto de vista farmacéutico, no imaginábamos los buenos resultados que podrían lograrse. Recientemente hemos propuesto una nueva especie bacteriana, el *Paenibacillus jami-lae*, cepa descubierta por nuestro grupo, capaz de desarrollarse al 100 % de alpechín (Aguilera et al. pendiente de publicación). Concretamente la cepa *P. jami-lae* B7, es productora de un nuevo EPS.

Aunque existan trabajos pendientes de una próxima publicación nos atrevemos a anticipar un resumen de resultados obtenidos respecto a un nuevo polisacárido obtenido del alpechín (Ramos-Cormenzana et al. 1997). El EPS B7 posee escasa toxicidad para el ratón, pues a dosis de 100 mg/Kg se manifiesta una pérdida de peso corporal que se recupera con rapidez, de lo que se infiere su posible aplicabilidad en medicina humana. *In vitro* a dosis de 100 mg/ml es mitógeno para esplenocitos, las evidencias sugieren su comportamiento como mitógeno para las células B. Uno de los aspectos más interesantes de nuestros ensayos es su incremento de las defensas inmunológicas de los animales tratados, frente al microorganismo patógeno *Listeria monocitogenes*, sobreviviendo el 75% a un inóculo de listerias, que matan al 100% de los animales testigo entre 2 y 6 días desde el inicio de la infección, concretamente los

linfocitos de los animales tratados muestran una producción basal del interferón γ significativamente mayor que los linfocitos procedentes de los animales testigo.

CONCLUSIÓN

Como principal conclusión debemos considerar que ya no es utópico pensar que se pueden aprovechar los residuos procedentes de la industria oleícola con fines farmacéuticos, pues consideramos previsible se obtengan grandes logros a partir de estos residuos.

AGRADECIMIENTO

Parte de los resultados expuestos se han obtenido gracias a la financiación de los proyectos PB96-1403 y OLI 96-2189.

BIBLIOGRAFIA

- Boari, A., Brunetti A., Passino R. y Rozzi A. (1984) "Anaerobic digestion of olive oil mill wastewaters." *Agricultural Wastes* **10**, 161-175.
- Borja, R., Alba, J., Garrido, S.E., Martinez, L., Garcia, M.P., Monteoliva, M. y Ramos-Cormenzana, A. (1995) Effect of aerobic pretreatment with *Aspergillus terreus* on the anaerobic digestion of olive-mill wastewater" *Biotechnol. Appl. Biochem.* **22**, 233-246.
- Buciumeanu, E., Grecu, C., y Bejan, C. (1994) "La teneur en polyphénols chez les vignestteintes des maladies virales" *Polyphénols Actualités* **11**, 69.
- Byron, D. (1991) "Biomaterials; Novel Materials from Biological Sources" New York, USA Stockton Press.
- Capasso, R. (1997) "The chemistry, biotechnology and ecotoxicology of the polyphenols naturally occuring in vegetable wastes" *Current Topics in Phytochemistry* **1**, 145-156.
- García-Granados, A. y Martínez-Nieto, L. (1993) "Procedimiento de obtención de manitol y productos derivados a partir de alpeorujos procedente del procesado de aceituna según el procedimiento en dos fases" Patente 93.00945.
- García-Granados, A. (1997a) "Process for the industrial recovery of oleoic and maslinic acids contained in the olive milling byproducts" Patente 128: 179706.
- García-Granados, A. (1997b) "Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serin proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos del género *Cryptosporidium*" Patente 9701029.
- García-Granados, A. (1997c) "Utilización de ácido maslínico como inhibidor de proteasas para el tratamiento de la enfermedad causada por el virus de la inmunodeficiencia adquirida." Patente 9702628.
- García-Granados, A. (1999) "Investigadores de la Universidad trabajan con un derivado del orujo como inhibidor del SIDA" Artículo en "Ideal 2 de Diciembre"
- Langer, R., y Vacanti, J.P. (1993) *Science* **260**, 920, citado en Williams et al. 1999
- Lee, S.Y., Choi, J., Han, K., y Song, J.Y. (1999a) "Removal of endotoxin during Purification of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Gram-Negative Bacteria" *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2762-2764.
- Lee, S.Y., Lee, Y., y Wang, F. (1999b) "Chiral Compounds from Bacterial Polyesters : Sugars to Plastics to Fine Chemicals" *Biotechnology and Bioengineering* **65**, 363-368.
- López, M.J. (1996) "Producción de biopolímeros a partir del alpechín: obtención de xantano". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- López, M.J., y Ramos-Cormenzana, A. (1996) "Xanthan Production from Olive-Mill Wastewaters" *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 263-270.
- Martos, M. y Martínez, L. (1999) "Aprovechamiento y tratamiento de los residuos de la industria oleícola" Memoria del I Curso de Especialista en tratamiento de Residuos. Universidad Internacional de Andalucía. Sede Antonio Machado. Baeza.
- Miguel, O., Fernández-Berridi, M.J., y Irui, J.J. (1997) "Survey on Transport Properties of Liquids, Vapors, and Gases in Biodegradable Poly (3-hydroxybutyrate)(PHB)." *Journal of applied Polymer Science* **64**, 1849-1859.
- Martínez-Nieto, L., y García-Granadaos, A. (1992) "Procedimiento de aprovechamiento del alpechín para obtención de ácidos, fenoles, alcoholes y derivados mediante extracción en contracorriente" Patente 92.98236.
- Martínez-Nieto L., Garrido Hoyos S.E., Camacho Rubio F., García Pareja M.P., y Ramos-Cormenzana A. (1993) The Biological Purification of Waste Products from Olive Oil Extraction " *Bioresource Technology* **43**, 215-219.
- Moreno E., Quevedo-Sarmiento J., y Ramos-Cormenzana A. (1990) "Antibacterial Activity of wastewaters from olive oil mills" In *Encyclopedia of Environmental Control Technology* 731-757. Ed. P.N. Cheremisinoff. Gulf Publishing Co., Houston.

- Monteoliva-Sánchez M., y Ramos-Cormenzana A. (1998) "Polisacáridos Microbianos. Aplicaciones farmacéuticas" 1st Virtual Congress Pharmacy Internet 1998.
- Ogawa Y. (1997) "Injectable microcapsules prepared with biodegradable poly(a-hydroxy) acids for prolonged release of drugs. J. Biomater.Sci. Polymer Edn. **8**, 391-409.
- Phillips G.O., Wedlock D.J., y Williams P.A. (eds)(1989) "Gums and Stabilisers for the Food Industry 5" IRL Press. Oxford Univ. Press.
- Ramos-Cormenzana A., M.Monteoliva-Sánchez & M.J.Lopez (1995) "Bioremediation of Alpechin " International Biodeterioration and Biodegradation **37**, 249-268.
- Ramos-Cormenzana A., Guerra del Aguila V. y Monteoliva-Sánchez M. (1997) "Production of Microbial Polysaccharides in wastewater from olive oil mills " En H.Verachtert and W.Verstraete "Environmental Biotechnology" part II, 259-262.
- Ramos-Cormenzana A., Juarez-Jiménez B. y Garcia-Pareja M.P. (1996) Antimicrobial Activity of Olive Mill Waste-Waters (Alpechin) and Biotransformed Olive Oil Mill Wastewater" International Biodeterioration and Biodegradation **38**, 283-290.
- Reusch R.N. , Hiske T.W., y Sadoff (1986) "Poly-b-Hydroxybutyrate Membrane Structure and Its Relationship to genetic Transformability in *Escherichia coli* "Journal Bacteriology **168**, 553-562
- Reusch R.N., Sparrow A.W., y Gardiner J. (1992) "Transport of poly-b-hydroxybutyrate in human plasma" Biochimica Biophysica Acta **1123**, 33-40.
- Sutherland I.W. (1990) Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides. London, U.K. Cambridge University Press.
- Witholt B. y Kessler B. (1999) "Perspectives of medium chain length poly-(hydroxyalkanoates) a versatile set of bacterial bioplastics" Current Opinion in Biotechnology **10**,279-285.
- Williams S.F.,Martin D.P.,Horowitz D.M.,y Peoples O.P. (1999) "PHA applications : addressing the price performance issue I.Tissue engineering" Biological Macromolecules **25**, 11-121.
- Yalpani M. (ed) (1987) " Industrial Polysaccharides. genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications". Progress in Biotechnology **3**.Elsevier Amsterdam.
- Yu P.H., Chua H., Ling A.y Ho K. (1999) "Conversion of Industrial Food wastes by *Alcaligenes latus* into Polyhydroxyalkanoates" Applied Biochemistry and Biotechnology **77-79**,445-454.