



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 318 992**

⑫ Número de solicitud: 200602391

⑮ Int. Cl.:
C07C 403/24 (2006.01)
A23L 1/275 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **18.09.2006**

⑫ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

⑫ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2009

⑰ Solicitante/s: **CAROTENOID TECHNOLOGIES, S.A.**
Polígono Industrial Francolí, 30
Ap. Correos 1105
43080 Tarragona, ES

⑰ Inventor/es: **Ferrater Martorell, Joan Carles;**
Fernández Martín, Juan Antonio;
Ribera Ruiz, David y
Viso Acosta, Antonio

⑰ Agente: **No consta**

⑮ Título: **Procedimiento para la preparación de luteína esencialmente pura a partir de extractos de marigold.**

⑮ Resumen:

Procedimiento para la preparación de luteína esencialmente pura a partir de extractos de marigold. Se describe un procedimiento para la preparación de luteína esencialmente pura a partir de extractos de marigold (*Tagetes erecta* L.) caracterizado por las siguientes etapas:

a) tratamiento del extracto con un éster de un ácido orgánico de cadena corta y, por tanto, de bajo punto de ebullición, seleccionado entre el acetato de metilo, de etilo o de propilo, o bien, formiato de metilo, de etilo o de propilo o una mezcla de ellos, b) saponificación del producto así obtenido por acción de reactivos alcalinos, tales como los óxidos y/o hidróxidos de metales alcalinos y alcalino térreos, en medio orgánico o acuoso-orgánico y en presencia de agentes antioxidantes, c) neutralización parcial por adición de ácidos orgánicos, o inorgánicos y posterior tratamiento con disolventes apolares, tipo alcanos, cicloalcanos o similares, d) eliminación de los disolventes y secado, con lo que se obtiene luteína con una pureza entre el 88% y el 97% e incluso superior apta para el consumo humano.

El producto obtenido es útil como aditivo en la alimentación.

ES 2 318 992 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de luteína esencialmente pura a partir de extractos de marigold.

5 Se describe un procedimiento para la preparación de luteína esencialmente pura a partir de extractos de marigold (*Tagetes erecta*) caracterizado por las siguientes etapas:

- 10 a) tratamiento del extracto con un éster de un ácido orgánico de cadena corta y, por tanto, de bajo punto de ebullición, seleccionado entre el acetato de metilo, de etilo o de propilo, o bien, formiato de metilo, de etilo o de propilo o una mezcla de ellos, con el objeto de disminuir la proporción de la zeaxantina, y de eliminar parcial o totalmente los isómeros de la luteína, los epoxicarotenoides y los otros carotenoides junto con los lípidos diversos presentes en los extractos mencionados,
- 15 b) saponificación del producto así obtenido por acción de reactivos alcalinos, tales como los óxidos y/o hidróxidos de metales alcalinos y alcalino térreos, en medio orgánico o acuoso-orgánico y en presencia de agentes antioxidantes,
- 20 c) neutralización parcial por adición de ácidos orgánicos, tales como acético o fórmico, o inorgánicos tales como clorhídrico o sulfúrico, y posterior tratamiento con disolventes apolares, tipo alcanos, cicloalcanos o similares,
- d) eliminación de los disolventes y secado.

25 Con ello se obtiene luteína con una pureza entre el 88% y el 97% e incluso superior, apta para el consumo humano.

30 Sin duda, la presencia de los carotenoides en nuestra vida cotidiana se ilumina con el colorido de gran diversidad de flores y plantas en general, como el brillante amarillo de la luteína del marigold, el naranja que proporciona el β -caroteno a la zanahoria, el rojo que el licopeno da a los tomates, etc. Sabido es que justamente en las plantas y en las algas, es donde principalmente se encuentran los carotenoides además de en algunos microorganismos, cumpliendo fundamentalmente funciones de protección contra la luz y el oxígeno (Britton, *et al*).

35 Kathrein ya había logrado obtener carotenoides a partir de algas y utilizarlos también para el consumo humano desde hace varias décadas (US 2949700), al igual que posteriormente hizo Moore en el caso específico de la luteína (US 3280502) y posteriormente Hills, reivindicando inclusive aplicaciones medicinales (US 4851339). Más recientemente Shimada ha aplicado tecnologías enzimáticas para retirar los ácidos grasos de los extractos que contienen carotenoides, como los del alga *Haematococcus* para la obtención de astaxantina (US 2004/0115758).

40 Los animales no son capaces de sintetizar estas moléculas, tampoco el hombre. Pero pueden depositarlos en su organismo, como los salmónidos con la astaxantina y la cantaxantina y los pollos que depositan la luteína y la zeaxantina en su piel, las gallinas en la yema de los huevos, etc. Tradicionalmente algunas de estas moléculas, como la luteína y la zeaxantina, obtenidas principalmente del marigold, la alfalfa o el maíz amarillo, han sido ya utilizadas en la industria avícola para la pigmentación de tejidos y yemas de los huevos (Poultry Sci., 62:1205-10). Además, en años recientes este trabajo se ha convertido en referencia obligada tratándose de procesos para purificar la luteína del marigold, ya que el producto obtenido es lo suficientemente puro como para ser utilizado como reactivo patrón o bien en fórmulas para el consumo humano. Trabajos esenciales (Food Rev Intr., 20:33), particularmente con los extractos de marigold, para obtener fórmulas útiles para la pigmentación en avicultura (US 3539686, US 3997679) y procedimientos para la obtención de concentrados de luteína, además de para el consumo humano, fueron reportados por Granty-Hawks hace más de treinta años (US 3523138 y US 3535426).

50 La creciente utilización de diversos carotenoides en la alimentación y la salud humana ha detonado el interés en estos compuestos durante los últimos años. En este sentido es conveniente acentuar que ya desde antes de 1956 Bauernfied desarrollaba formulaciones de carotenoides naturales para incluirse en aplicaciones para el consumo humano y preveía la sustitución de los análogos sintéticos (US 2861891) en esa época existentes, posteriormente este tipo de esfuerzos fueron continuados por Klaui (US 3206316), Emodi (US 3886294) y después por Antoshkiw (US 3998753).

55 En su forma purificada también se han empleado con fines analíticos, como reactivo patrón (Poultry Sci., 70:651-4, Phytoplankton pigments in oceanography, UNESCO). En esta última referencia Repeta hace una brillante revisión y aportación de tecnología para la preparación de diversos carotenoides altamente purificados.

65 En lo que se refiere a los extractos de marigold parcialmente purificados como el que describe Philip (US 4048203) tratando de enriquecer los ésteres de luteína contenidos en los extractos de marigold se puede decir que representa una aportación relevante en los inicios de la búsqueda de la obtención de luteína útil para los humanos en su forma esterificada. En este mismo campo se han reportado variantes a este proceso como el de Levy (US 6191293) que utiliza alcoholes para precipitar los ésteres desde el extracto o Kumar (US 6737535) que hace lo propio con disolventes cetónicos y más recientemente Rao (US 2004/0267033) que los obtiene bajo condiciones supercríticas.

Sin embargo, se debe reconocer que Burdick logró preparar cristales de luteína al 100% de pureza desde hace muchos años teniendo en mente un producto enfocado en el consumo humano (US 3248301). También Prebluda describe la manera de obtener cristales de luteína para el consumo humano o bien para la pigmentación en la avicultura (US 3333962).

Aunque la preparación de cristales de carotenoides diversos, como la luteína, y su aplicación en el consumo humano es un asunto reivindicado recurrentemente en patentes de hace varias décadas, no fue sino hasta hace unos cuantos años que carotenoides naturales altamente purificados como la luteína, la zeaxantina, el licopeno y la astaxantina, entre otros, han tenido una real demanda comercial. Es así que han proliferado las metodologías que intentan obtener la mejor versión de un carotenoide de alta pureza.

Por ejemplo, Khachik (US 5382714) reporta un proceso de purificación en el que dice obtener y además reivindica, la (3R, 3'R, 6'R) β,ϵ -carotene-3,3'-diol (*trans*-luteína) esencialmente pura, libre de impurezas químicas (sin mencionar exactamente que componentes) y otros carotenoides. Sin embargo el proceso descrito no permite separar los isómeros geométricos de la luteína de una manera simple y económica sino que tiene que recurrirse a una serie de procesos de recrystalización caros, tediosos y toxicológicamente cuestionables, inclusive hasta el día de hoy este tema sigue siendo complicado utilizando aún procesos cromatográficos, poco atractivos, también, económicamente.

Conviene apuntar que en gran cantidad de vegetales verdes y algunas flores y frutas la luteína y la zeaxantina frecuentemente van juntas en determinada proporción y que para la luteína se han detectado (Anal. Chem., 73:667-74, J Agric Food Chem., 1322-27) por lo menos 5 estereoisómeros principales (all-*E*, 13-*Z*, 13'*Z*, 9-*Z* y 9'*Z*) y 3 para la zeaxantina (all-*E*, 13-*Z* y 9-*Z*). Khachik también ignora totalmente el hecho de que la luteína pura ya había sido reportada décadas atrás, probablemente con los mismos u otros defectos analíticos, y su uso en el consumo humano también y de manera reiterada. Además, el uso de disolventes organoclorados para su proceso de recrystalización es bastante cuestionable.

Más tarde Ausich (US 5648564) desarrolló un proceso para purificar carotenoides saponificando los extractos grasos de diversos vegetales en glicoles y separando los cristales del producto de interés por centrifugación. Posteriormente Khachik hace una disertación acertada (US 6262284) en cuanto a los inconvenientes del proceso de Ausich, principalmente en cuanto a la presencia de hexano en los extractos utilizados y al prolongado procesamiento que conduce a la inevitable presencia de otros productos de degradación en un producto final de pureza limitada. También hace lo mismo con su propio trabajo anterior (US 5382714), lo cual apoya de manera definitiva nuestros comentarios previos en cuanto a los inconvenientes de tales procedimientos.

Mención aparte merece el reconocimiento de Khachik en el sentido de que ya antes que él lo hiciera, se había reportado un procedimiento útil para preparar luteína de alta pureza para el consumo humano (Poult. Sci., 70:651), que en su patente inmediata anterior había omitido discutir (US 5382714) y que antes como ahora se trata de un proceso del dominio público.

Montoya trata de reivindicar procedimientos de refinación genéricos para los extractos vegetales como la neutralización de ácidos grasos libres y el desgomado de los extractos vegetales grasos con posterior centrifugación, desde hace décadas del dominio público (US 6504067). Además el proceso que describe corresponde a una adaptación, lamentablemente, bastante cercana al procedimiento descrito por Prebluda (US 3333962) que igualmente no conduce a la obtención de carotenoides de alta pureza sin utilizar disolventes de toxicidad cuestionable.

Más recientemente Madhavi (US 6380442) reportó un procedimiento que parece ser una adaptación del trabajo reportado por Ausich en el cual se sustituye el propilenglicol por un alcohol de cadena corta en la etapa de saponificación aduciendo un proceso más corto y por lo tanto generando menos subproductos. Rodríguez (US 6329557) hace uso de disolventes polares y no polares para eliminar eficientemente clorofilas de sus muy particulares extractos de marigold ricos en material verde, aunque finalmente logra concentrados de luteína aptos para el consumo humano. Kumar (US 6743953) saponifica extractos de marigold en medio alcohólico, después de eliminar el alcohol, diluye el jabón residual con agua y haciendo uso de una mezcla de disolventes, polar y no polar, extrae las xantofilas de interés en su forma libre. Aunque el uso del acetato de etilo parece adecuado en el proceso de saponificación, la utilización además de alcoholes y cetonas vuelven al proceso global un tanto lento y con mayor presencia de disolventes residuales. Socia (US 2005/0153002) precipita los ácidos grasos de los extractos de marigold saponificados utilizando sales de metales pesados y posteriormente extrae el material colorante utilizando disolventes polares. El concentrado de luteína obtenido parece ser apto para el consumo humano.

Como se puede observar los procedimientos para obtener carotenoides de alta pureza se han venido multiplicando en años recientes, particularmente en el caso de la luteína y zeaxantina obtenidas a partir de los extractos de marigold, principalmente.

Sin embargo, particularmente en el caso de los extractos de marigold, ninguno de los procedimientos mencionados logra eliminar rápida, eficiente y económicamente la zeaxantina presente y los isómeros geométricos de la luteína. Esta es la razón por la que la pureza de luteína en los productos comerciales alcanza valores máximos entre el 90 y el 93%.

Por otra parte, en los últimos años se ha venido obteniendo evidencia experimental suficiente (Annu. Rev. Nutr. 23:171) que demuestra el papel activo que los carotenoides en la protección contra diversas enfermedades que aquejan al ser humano, como son diversos tipo de cáncer, SIDA, enfermedades cardiovasculares, degeneración macular asociada a la edad, entre otras. (Pure & Appl Chem., 71:2213). Mucha de la investigación que se ha llevado a cabo está relacionada con el papel de los carotenoides como agentes antioxidantes, que por tanto, protegen eficientemente contra la oxidación y demás procesos destructivos que involucran radicales libres (Carotenoids Vol. 1A) y que desencadenan procesos degenerativos con el perjuicio directo a la salud.

Por lo tanto, un objetivo primordial de esta invención es el de obtener luteína de alta pureza, con contenidos que van desde el 88% hasta el 97% del ingrediente activo, e incluso superiores, para su utilización en el consumo humano, mediante un procedimiento sencillo que permite la disminución de la proporción de la zeaxantina y la eliminación parcial o total de los isómeros de la luteína, de los epoxicarotenoides y del resto de carotenoides, tales como la β -criptoxantina y el β -caroteno entre otros, que están presentes en el extracto de marigold.

15 Ventajas frente a lo descrito

En esta invención se describe un nuevo procedimiento para preparación de luteína esencialmente pura a partir de extractos de marigold.

La luteína y la zeaxantina están presentes simultáneamente en los extractos de marigold. La proporción más frecuente de luteína (L) frente a zeaxantina (Z) observada en los extractos u oleorresinas de marigold es de 77-80% (L):4-6%(Z), mientras que en los extractos saponificados la proporción varía ligeramente hasta alcanzar valores del orden de 80-85%(L): 4-6%(Z). Prácticamente en todos los procedimientos citados anteriormente en la descripción del estado de la técnica, para la purificación de luteína se obtiene una proporción de 90-93%(L): 4-6%(Z). Aunque hay algunos autores que describen la obtención de luteína de pureza superior, el hecho es que los productos comerciales presentan como valores máximos de riqueza los ya mencionados del 90 al 93%.

Frente a los procedimientos descritos en la bibliografía, el que aquí se describe permite preparar concentrados de luteína con purezas muy elevadas, que pueden alcanzar el 97%, e incluso superiores, mediante un proceso sencillo que consta de las siguientes etapas:

- a) tratamiento del extracto de la flor de marigold con un éster de bajo punto de ebullición que permite obtener un concentrado de xantofilas esterificadas que es útil por sí mismo, para el consumo humano,
- b) saponificación por acción de un reactivo alcalino del extracto parcialmente purificado,
- c) neutralización por adición de ácidos orgánicos o inorgánicos y extracción con disolventes apolares,
- d) eliminación de disolventes y secado.

Es importante recalcar que en el caso específico de los pigmentos contenidos en la flor de marigold se logra una separación más eficaz entre la luteína y la zeaxantina en su forma esterificada. Este aspecto supone una gran diferencia respecto de todas las tecnologías anteriormente discutidas. De hecho, al ser tan similares en sus propiedades físico-químicas es ampliamente conocido el problema de que ambas moléculas en su forma libre poseen solubilidades en cualquier disolvente sumamente parecidas (J Agric. Food Chem., 40:431-4, US 2004/0018279). Por esta razón, cuando la técnica se fundamenta en los habituales procesos extractivos sobre las referidas formas libres, siempre se mantiene una proporción en los purificados aproximadamente de 90:5 entre la luteína y la zeaxantina.

En cuanto a las formas esterificadas de estas xantofilas las solubilidades resultan un poco más diferenciadas, sobre todo en el caso particular de los disolventes utilizados en el procedimiento que aquí se describe, lo que permite alcanzar valores superiores al 97% para la luteína en el producto final cristalizado.

Un aspecto de gran interés sobre todo a nivel industrial y que supone una ventaja importante frente a lo descrito, es la sencillez técnica de todas las etapas que constituyen el presente procedimiento. Esto simplifica considerablemente el equipamiento necesario para llevar a cabo la producción industrial con el consecuente aumento de productividad y la disminución de costes de producción.

Dado que el producto final de este procedimiento es el resultado de diferentes procesos de reacción y purificación, una ventaja adicional es la completa eliminación de posibles pesticidas residuales, lo cual resulta altamente conveniente para su aplicación final en la industria alimentaria y farmacológica.

Se incluye en la presente memoria un procedimiento para incrementar la estabilidad de la luteína una vez purificada, que consiste en someterlo a un proceso de microencapsulación utilizando los excipientes habituales. Se consigue, de esta manera, disminuir la superficie de contacto de la luteína con el oxígeno atmosférico, reduciendo considerablemente los mecanismo de oxidación y, por tanto, incrementado la estabilidad del producto.

Descripción detallada

El extracto u oleoresina de flor de marigold que constituye el producto de partida para la preparación de luteína esencialmente pura, es un producto de origen natural que presenta, tal como se ha citado anteriormente, una elevada proporción de xantofilas cuyos grupos hidroxilo están esterificados con ácidos grasos.

La primera etapa del procedimiento que aquí se describe consiste en el tratamiento del referido extracto con un disolvente constituido por un éster de un ácido orgánico de cadena corta y, por tanto, de bajo punto de ebullición.

Entre los ésteres utilizados se incluyen los del ácido acético y los del ácido fórmico principalmente, los acetatos de metilo, etilo, n-propilo e isopropilo, y los formiatos de metilo, etilo, n-propilo e isopropilo, por separado o en forma de mezcla de dos o más de ellos. Los mejores resultados se han obtenido con el acetato de etilo, siendo, por tanto este disolvente la mejor opción para llevar a cabo la primera etapa.

El objetivo de la primera etapa es el de disminuir en la mayor medida posible la proporción de la zeaxantina, los isómeros de la luteína, los epoxicarotenoides y los demás carotenoides. Dada la similitud estructural de estos compuestos con la luteína, la eliminación total de todos ellos es muy difícil. Por ello, para conseguir elevados niveles de pureza se requiere con frecuencia la repetición de esta primera etapa un número variable de veces. El tratamiento con el disolvente permite, por otra parte, la eliminación de los diversos lípidos presentes en el extracto de partida.

La utilización de disolventes de bajo punto de ebullición presenta una ventaja adicional de gran interés a nivel industrial, su fácil recuperación y reciclaje por los métodos habituales de evaporación y destilación, ampliamente conocidos.

La cantidad de disolvente utilizada depende en cierta medida de la naturaleza del extracto de marigold utilizado y del disolvente considerado. Los mejores resultados se han obtenido manteniendo una proporción entre el disolvente y el extracto de entre 0.1 y 3.0 partes, preferentemente entre 0.5 y 1.0, de disolvente por cada parte del extracto.

Los parámetros de temperatura, tiempo y agitación para llevar a cabo la primera etapa del procedimiento han resultado influir considerablemente en el resultado. Si bien se han obtenido buenos resultados con temperaturas entre 10°C y 60°C, los mejores resultados se han obtenido manteniendo la temperatura en el orden de los 25°C a 30°C.

Durante el tratamiento se debe mantener una agitación muy vigorosa que garantice un buen contacto entre la fase grasa del extracto de marigold y el disolvente orgánico. Por otra parte, el tiempo de tratamiento está íntimamente ligado a la temperatura y a la naturaleza del disolvente considerado. En general, tiempos entre 15 minutos y 2 horas permiten la obtención de buenos resultados, siendo suficientes valores en el entorno de los 30 minutos.

Una vez terminado el tratamiento con el disolvente, la masa se mantiene en reposo durante el tiempo necesario para obtener una buena decantación, normalmente entre 15 y 30 minutos, y se procede a la eliminación de la mayor parte de la fase líquida mediante filtración, centrifugación o un método similar. Con ello se separa el disolvente con gran parte de la zeaxantina, los isómeros de la luteína, los lípidos y otros componentes menores.

Esta operación se puede repetir entre 2 y 5 veces hasta obtener un concentrado de xantofilas esterificadas en el cual más del 97% corresponde a los ésteres de luteína, frecuentemente estearatos, miristatos y palmitatos (J Agric. Food Chem., 50:66-70).

La eliminación del resto de disolvente del producto obtenido en esta etapa y su posterior secado a vacío permite la obtención de un polvo de color naranja que puede tener utilidad en el consumo humano, tanto como aditivo alimentario como en tratamientos de salud.

La segunda etapa del procedimiento que aquí se describe consiste en la obtención de las xantofilas libres a partir de las formas esterificadas purificadas en la etapa anterior mediante un proceso de saponificación.

La saponificación se puede llevar a cabo por acción de reactivos básicos tipo óxidos e hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos. Los mejores resultados se han obtenido con los hidróxidos de sodio ó de potasio, o bien una mezcla de ellos, en una proporción de entre 0.2 a 0.5 partes de reactivo alcalino por cada parte de concentrado de ésteres de xantofilas.

El medio de reacción puede ser acuoso, orgánico o acuoso-orgánico, preferentemente, alcohólico o hidroalcohólico, y se lleva a cabo en presencia de agentes antioxidantes que ayuden a evitar la degradación de estos compuestos durante el proceso global. El ácido ascórbico y sus ésteres, el galato de propilo, los tocoferoles, el butilhidroxitolueno (BHT) y el butilhidroxianisol (BHA) o mezclas de ellos, son los antioxidantes que han dado los mejores resultados. La proporción de antioxidante utilizada está entre el 0,05% y el 2%, obteniéndose buenos resultados utilizando entre el 0.1% y el 1%, en peso respecto del contenido en xantofilas esterificadas.

La saponificación se puede llevar a cabo bajo condiciones de proceso convencionales, manteniendo la temperatura entre 70°C y 100°C y el tiempo de reacción entre 30 minutos y 5 horas. Aunque la reacción se puede llevar a cabo

ES 2 318 992 A1

en condiciones atmosféricas es más conveniente utilizar una atmósfera inerte, con lo que se garantiza una mejor conservación de las xantofilas.

Una vez concluida la saponificación se lleva a cabo la tercera etapa, el proceso de neutralización. Para ello se trata la masa de reacción con un ácido orgánico, principalmente fórmico, acético, cítrico o una mezcla de ellos, o bien, un ácido inorgánico, principalmente clorhídrico, sulfúrico, fosfórico o una mezcla de ellos.

Si bien todos los ácidos ensayados permiten una buena decantación, el que mejores resultados ha dado es el ácido clorhídrico, preferentemente diluido en agua, con valores de concentración entre el 5% y el 10%.

La neutralización se lleva a cabo adicionando entre 1 y 20 partes en peso, preferentemente entre 3 y 10, del ácido clorhídrico diluido de concentración entre 5 y 10%, por cada parte de producto obtenido en la etapa b).

La adición del ácido se lleva a cabo lentamente y manteniendo fuerte agitación y una temperatura entre 70°C y 90°C, con lo que se consigue separar la fracción grasa y descartar las sales disueltas en el agua y otras impurezas solubles. En estas condiciones y manteniendo la temperatura en el citado intervalo, se procede a la filtración o centrifugación obteniendo el extracto residual esencialmente seco.

La tercera etapa se completa con el tratamiento del producto con disolventes apolares, preferentemente hidrocarburos, tipo alcanos, cicloalcanos o similares, tales como éter de petróleo, ciclohexano, hexano, heptano o mezcla de ellos. Entre todos los mejores resultados se han obtenido con el ciclohexano.

Para ello se utilizan entre 2 y 100 partes de ciclohexano por cada parte de extracto, preferentemente entre 5 y 50 partes. La mezcla se calienta suavemente hasta alcanzar una temperatura entre 30°C y 40°C y se agita entonces vigorosamente hasta alcanzar una masa homogénea. Se deja reposar hasta completar la precipitación.

La cuarta etapa del procedimiento consiste en la eliminación de los disolventes utilizados y secado del producto sólido resultante. Así, del concentrado de xantofila se elimina el disolvente por filtración o centrifugación. El secado de sólido residual a vacío y temperatura entre 25°C y 30°C permite aislar la luteína en forma de polvo violáceo.

El disolvente separado en esta última etapa se puede someter a destilación para recuperar el ciclohexano. El residuo de esta destilación, rico en pigmentos residuales, una vez libre de disolvente, puede ser formulado para su utilización en la industria avícola, principalmente para la pigmentación de la piel de pollo y la yema del huevo.

Por otra parte, los cristales de luteína pueden ser sometidos a un lavado con alcohol para eliminar impurezas residuales solubles y posteriormente con agua. Se obtiene de esta manera un producto final con purezas entre el 88% y 97% en luteína e incluso superiores. Los niveles más elevados de pureza de luteína se obtienen cuando la primera etapa del procedimiento (etapa a)) se repite entre 2 y 5 veces, tal como se ha descrito anteriormente.

Es aconsejable estabilizar este producto adicionando nuevamente agentes antioxidantes preferentemente liposolubles tales como el BHT, BHA, tocoferol, ácido ascórbico y sus ésteres, galato de propilo, ya que dichos pigmentos son muy sensibles a procesos degradativos en presencia de la luz, el calor o el oxígeno.

El producto, debido a sus características de pureza puede emplearse como reactivo patrón con fines analíticos, también en fórmulas farmacológicas y nutracéuticas para el tratamiento de diversos problemas de salud como algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración macular asociada a la edad (J. Nutr., 133:992), padecimientos dermatológicos, fortalecimiento del sistema inmunológico, entre otras ampliamente documentadas (Nutr Rev., 57:201). La luteína se utiliza también como colorante de diversos alimentos como cereales, dulces, derivados lácteos, bebidas refrescantes y energizantes, aderezos y postres, pan y pasteles, pastas, salsas, etc. También se formula con bastante éxito en alimentos para mascotas.

Además su uso se ha hecho intensivo en diversos cosméticos que van desde las cremas antienvejecimiento hasta los bloqueadores solares para la piel, jabón y champú, maquillajes, entre otras muchas.

Ejemplos

A continuación se exponen unos ejemplos del procedimiento descrito, sin que se deba atribuir a los mismos un carácter limitativo.

Ejemplo 1

Alrededor de 23 Kg de oleoresina de marigold son tratados con 5 Kg de acetato de etilo a temperatura ambiente. La mezcla se agita durante 30 min y se centrifuga para obtener un producto enriquecido en ésteres de xantofilas. El proceso se repite dos veces más manteniendo igual proporción de disolvente y sustrato.

El producto obtenido se introduce en un reactor previamente calentado y se añaden 0.2 Kg de BHT. Se agregan lentamente 12 Kg de una disolución alcalina compuesta por un 23.5% NaOH, un 23.5% agua y un 53% etanol.

ES 2 318 992 A1

La mezcla se mantiene en agitación constante a 70°C durante 2 h. A continuación se añaden 20 litros de una solución acuosa que contiene 8 litros de ácido clorhídrico concentrado, se deja separar las dos fases y se decanta la fase acuosa. A la fase orgánica se añaden 460 litros de éter de petróleo en agitación a 55°C durante 45 min. Se enfría entonces a 15°C formándose un precipitado rico en xantofilas que se filtra, seca y tamiza, dando lugar a un polvo marrón de brillo metálico que contiene más de 880 mg de luteína/gramo de polvo.

La fase orgánica se destila para recuperación de los disolventes. El residuo de destilación contiene una pequeña proporción de luteína y puede usarse también como fuente pigmentante.

El producto enriquecido se estabiliza mediante la adición de un antioxidante como por ejemplo galato de propilo y se microencapsula siguiendo los métodos habituales.

Ejemplo 2

En un reactor se introducen 50 Kg de un extracto de marigold a la temperatura ambiente. Se adicionan 25 Kg de acetato de etilo y se agita durante 30 minutos hasta completa homogenización. La mezcla se centrifuga con lo que se obtiene un sólido enriquecido en ésteres de xantofilas y una fracción líquida enriquecida en lípidos, epoxicarotenoides y cis-carotenoides, entre otros. Se repite el tratamiento un total de tres veces más, manteniendo la proporción sólido:disolvente.

Con ello se obtienen 18 Kg de un sólido naranja que contiene alrededor de 400 g de carotenoides por kilogramo de producto, de los cuales el 97% corresponde a los ésteres de luteína. Dadas sus características de pureza, después de eliminar totalmente el disolvente residual, este producto podría ser utilizado para el consumo humano.

Sin embargo, se somete al resto de etapas del proceso de purificación. Así, siguiendo un procedimiento tal como se describe en el Ejemplo 1 se obtienen alrededor de 6 Kg de un polvo violáceo con un contenido superior al 90% de carotenoides totales, de los cuales el 96% es luteína. El producto se utiliza como tal o se formula de acuerdo con la aplicación a la que se vaya a dirigir, tal como, la microencapsulación utilizando palmitato de ascorbilo como antioxidante.

Ejemplo 3

Se lleva a cabo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 utilizando ciclohexano en lugar del éter de petróleo. Las xantofilas precipitan y el disolvente se elimina mediante succión. El producto así obtenido se lava una vez más con ciclohexano repitiendo la operación, aunque en esta ocasión las xantofilas precipitadas se recogen filtrando la disolución del ciclohexano.

Sobre el concentrado de xantofilas se efectúa un lavado con etanol hasta que por el fondo del filtro se observa la salida de una disolución transparente. Finalmente se eliminan las sales residuales por lavado con agua desmineralizada y el producto final se seca al vacío.

Se obtiene un polvo con una concentración superior al 95% en carotenoides totales de los cuales el 97% es luteína. El pigmento se estabiliza utilizando una mezcla de galato de propilo y tocoferoles para su utilización en el consumo humano.

Ejemplo 4

El extracto de marigold descrito en el Ejemplo 2 se trata con 25 Kg de una mezcla de acetato de etilo:acetato de isopropilo:formiato de etilo en la proporción 50:30:20 correspondiente a porcentajes en peso de los disolventes mencionados, a 20°C, durante 45 minutos con agitación moderada.

Se centrifuga la mezcla para obtener un concentrado de marigold que contiene alrededor de 200 gramos de xantofilas por cada kilogramo de extracto. La operación se repite una vez más pero utilizando solo 15 Kg de la mezcla de disolventes y manteniendo iguales el resto de condiciones de proceso. De esta manera se obtiene un concentrado de xantofilas que contiene alrededor de 300 gramos de carotenoides por cada kilogramo de extracto de los cuales el 91% son ésteres de luteína.

Se elimina el disolvente y se saponifica y purifica de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 1, con lo que se obtiene un polvo violeta que contiene más de 950 gramos de xantofilas por cada kilogramo de polvo y de los cuales el 91% es luteína libre y menos del 2% corresponde a la zeaxantina.

Ejemplo 5

500 g de oleorresina de marigold que contienen 56 g de esteres de luteína se mezclan con 250 g de formiato de etilo a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez que la mezcla es completamente homogénea se procede a centrifugarla para separar la fase orgánica que contiene el disolvente y el concentrado que se ha enriquecido en ésteres de xantofilas. Esta operación se repite una vez más para obtener un concentrado de xantofilas que contiene más de 400 gramos de carotenoides por cada kilogramo de concentrado de los cuales más del 95% corresponden a los ésteres de luteína.

ES 2 318 992 A1

Se elimina el disolvente mediante procedimientos convencionales y, posteriormente, se seca a vacío. El producto así obtenido está libre de disolventes y puede ser utilizado para el consumo humano.

5 Por otra parte, el disolvente ha sido apropiadamente recuperado para su reciclaje y los pigmentos residuales obtenidos se destinan a la pigmentación de piel de pollo y yema de huevo.

10 El concentrado de ésteres de xantofilas, así preparado, puede someterse a un proceso de saponificación en atmósfera inerte utilizando 0.4 partes de NaOH por cada parte de extracto parcialmente purificado además de 0.6 partes de etanol. La masa de reacción se calienta y se mantiene la temperatura alrededor de los 70°C.

15 Una vez concluida la reacción se agregan 10 partes de agua, 2 partes de ácido fosfórico concentrado y 0.5 partes de ácido cítrico en relación al peso total. Este proceso se lleva a cabo también a 70°C y hasta completa separación de una capa grasa. Este material lipídico se separa y se trata con 20 partes de ciclohexano a 35°C y agitación vigorosa hasta completa precipitación de los cristales de luteína.

20 Se separa el disolvente y los cristales se secan a vacío para obtener un producto con un contenido en luteína del 95%.

Ejemplo 6

25 10 g del concentrado de ésteres de luteína obtenidos en el Ejemplo 5 se saponifican mezclando el pigmento con una disolución acuosa que contiene 5 gramos de KOH, agitando durante 3 horas a 80°C en atmósfera inerte y utilizando una mezcla de BHA y BHT como antioxidantes.

30 Una vez concluida la saponificación se agrega una mezcla de 10 ml de HCl y 40 ml de agua. Se continúa agitando hasta completa separación de una fase acuosa turbia y una capa aceitosa homogénea. La fase acuosa se descarta y el aceite residual se mezcla con 200 ml de hexano, 50 ml de etanol y 0.5 ml de HCl. Después de agitar vigorosamente manteniendo la temperatura de la mezcla a 40°C, se deja en reposo mientras se completa la precipitación de las xantofilas. El sólido se separa y la fase líquida que contiene los disolventes se almacena para su recuperación.

35 Los cristales de luteína finalmente se lavan con agua y posteriormente se secan a vacío para obtener 7 gramos de un polvo violáceo que contiene más de un 90% de carotenoides, de los cuales más del 97% es luteína.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de luteína esencialmente pura a partir de extractos de marigold (*Tagetes erecta*) **caracterizado** por las siguientes etapas:

- a) tratamiento del extracto con un éster de un ácido orgánico de cadena corta y, por tanto, de bajo punto de ebullición, seleccionado entre el acetato de metilo, de etilo o de propilo, o bien, formiato de metilo, de etilo o de propilo o una mezcla de ellos, con el objeto de disminuir la proporción de la zeaxantina, y de eliminar parcial o totalmente los isómeros de la luteína, los epoxicarotenoides y los otros carotenoides junto con los lípidos diversos presentes en los extractos mencionados,
- b) saponificación del producto así obtenido por acción de reactivos alcalinos, tales como los óxidos y/o hidróxidos de metales alcalinos y alcalino térreos, en medio orgánico o acuoso-orgánico y en presencia de agentes antioxidantes,
- c) neutralización parcial por adición de ácidos orgánicos, tales como acético o fórmico, o inorgánicos tales como clorhídrico o sulfúrico, y posterior tratamiento con disolventes apolares, tipo alcanos, cicloalcanos o similares,
- d) eliminación de los disolventes y secado,

con lo que se obtiene luteína con una pureza entre el 88% y el 97% e incluso superior, apta para el consumo humano.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque la etapa a) se lleva a cabo utilizando acetato de etilo como disolvente en una proporción entre 0.1 y 3.0 partes de acetato de etilo, preferentemente entre 0.5 y 1.0, por cada parte del extracto, pudiéndose repetir opcionalmente este tratamiento.

3. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque la etapa a) se lleva a cabo manteniendo la temperatura entre 10°C y 60°C, preferentemente entre 25°C y 30°C.

4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3 **caracterizado** porque en la etapa a) se utiliza como disolvente otros ésteres de bajo punto de ebullición, tales como el formiato de metilo, el formiato de etilo, el acetato de metilo, o una mezcla de algunos o de todos ellos.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque en la etapa b) la saponificación se lleva a cabo en un medio hidroalcohólico, en atmósfera inerte y por acción de hidróxido sódico o potásico o una mezcla de ellos, en una proporción de entre 0.2 y 0.5 partes de reactivo alcalino por cada parte de concentrado de ésteres de xantofilas.

6. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 5 **caracterizado** porque la etapa b) se lleva a cabo utilizando como antioxidante el tocoferol, el ácido ascórbico o sus ésteres, el BHA, el BHT, el galato de propilo o una mezcla de dos o más de ellos, en una proporción del 0,05% al 2% de antioxidante, preferentemente del 0,1% al 1%, respecto del contenido en xantofilas esterificadas.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque en la etapa c) la neutralización se lleva a cabo adicionando entre 1 y 20 partes en peso, preferentemente entre 3 y 10, de ácido clorhídrico diluido de concentración entre 5% y 10%, por cada parte de producto obtenido en la etapa b).

8. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 7 **caracterizado** porque el disolvente apolar que se utiliza en la etapa c) es el ciclohexano, el éter de petróleo, el hexano, el heptano o una mezcla de dos o más de ellos.

9. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 8 **caracterizado** porque en la etapa c) la proporción del disolvente no polar utilizado está entre 2 y 100 partes de disolvente, preferentemente entre 5 y 50, por cada parte de producto neutralizado.

10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizado** porque en la etapa d) la eliminación de los disolventes se lleva a cabo por centrifugación y el secado se realiza a vacío y a una temperatura entre 25°C y 30°C, lo que permite obtener luteína con más de un 88% de pureza.

11. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 10 **caracterizado** porque la etapa a) se repite entre 2 y 5 veces, preferentemente 3 veces, antes de pasar a la etapa b), con lo que es posible obtener luteína con pureza superior al 97% y adecuada para el consumo humano.

12. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 y 11 en el cual del producto resultante en la etapa a) se elimina el disolvente por centrifugación y el sólido separado se seca a vacío para obtener concentrados de marigold con un contenido en ésteres de luteína superiores al 88%.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 318 992

⑫ Nº de solicitud: 200602391

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 18.09.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C07C 403/24 (2006.01)
A23L 1/275 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2004018417 A1 (KANCOR FLAVOURS AND EXTRACTS LTD) 04.03.2004, páginas 4,5,11,12,15,16; reivindicaciones 1,10.	1-5,8-10
A	WO 03081200 A2 (PRODEMEX, S.A. DE C.V.) 02.10.2003, páginas 3,5; reivindicaciones 1,4.	1,4,5,7
A	WO 9723436 A1 (KEMIN FOODS, L. C.) 03.07.1997, página 4, línea 28 - página 6; página 7, línea 18 - página 8; reivindicaciones 1,2,5.	1,5
A	ES 2147261 T3 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF AMERICA) 01.09.2000, columnas 1,2; reivindicación 1.	1,5,8
A	US 2005182280 A1 (BHASKARAN et al.) 18.08.2005, página 4; reivindicaciones 1,5,9,15,21.	1,5
A	US 2005153002 A1 (SOCLA ROSALES et al.) 14.07.2005, página 1, columna 2; reivindicación 27.	1,5

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

31.03.2009

Examinador

Asha Sukhwani

Página

1/1