



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 225 873**

⑤ Int. Cl.7: **C07D 503/18**  
// C12P 17/18

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **96905945 .0**

⑧6 Fecha de presentación: **11.03.1996**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0813536**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.1997**

⑤4 Título: **Procedimiento para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables de ácido clavulánico.**

③0 Prioridad: **10.03.1995 SI 9500074**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2005**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2005**

⑦3 Titular/es:  
**Lek Pharmaceutical and Chemical Co. D.D.**  
**Verovskova 57, P.O. Box 81**  
**61107 Ljubljana, SI**

⑦2 Inventor/es: **Capuder, Egidij**

⑦4 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 225 873 T3**

**Aviso:** En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables de ácido clavulánico.

Esta invención se refiere a un procedimiento para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables de ácido clavulánico, particularmente pero no exclusivamente sales alcalinas, especialmente clavulanato potásico.

El ácido clavulánico es el nombre común para el ácido (2R,5R,Z)-30(2-hidroxiethyliden)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-carboxílico. El ácido clavulánico y sus sales y ésteres de metales alcalinos son activos como inhibidores de beta-lactamasa producida por algunos microorganismos Gram positivos así como Gram negativos. Además de la inhibición de beta-lactamasas, el ácido clavulánico y las sales de metales alcalinos del mismo también tienen una acción sinérgica con los antibióticos penicilina y cefalosporina. El ácido clavulánico y sus sales se usan en preparaciones farmacéuticas para evitar la desactivación de antibióticos de beta-lactama. Las preparaciones comerciales contienen clavulanato potásico en combinación con trihidrato de amoxicilina. El clavulanato potásico es más estable que el ácido libre u otras sales.

El ácido clavulánico se prepara mediante la fermentación de un microorganismo tal como cepas de *Streptomyces* tales como *S. clavuligerus* NRRL 3585, *S. jimonjiniensis* NRRL 5741 y *S. katsurahamanus* IFO 13716 y la especie de *Streptomyces* P6621 FERM P2804. El cultivo acuoso obtenido después de la fermentación se purifica y se concentra de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo filtración y purificación cromatográfica según se describe en GB 1508977, antes de la extracción de la solución acuosa con un disolvente orgánico para obtener una solución de ácido clavulánico impuro en el disolvente.

GB 1508977 describe la preparación de sales de clavulanato mediante filtración del caldo de fermentación mediante el paso a través de una resina de intercambio aniónico. Este procedimiento puede alcanzar rendimientos aceptables pero se prefieren métodos de purificación cromatográfica sofisticados y el uso de columnas de resina implica una inversión substancial para la fabricación a escala comercial.

GB 1543563 describe un procedimiento de fermentación en el que el valor del pH del medio se mantiene en el intervalo de 6,3 a 6,7. Se preparan sales farmacéuticamente aceptables tales como clavulanato potásico resalando a partir de clavulanato de litio.

EP-A-0026044 describe el uso de la sal de butilamina terciaria de ácido clavulánico como un producto intermedio para la purificación de ácido clavulánico. Esta sal se conocía de BE-86211 o DE 2733230 que describían que la sal era incluso más estable que las sales de clavulanato sódico o potásico. La butilamina terciaria es un compuesto tóxico y también es difícil de retirar de agua residual dando lugar a problemas de contaminación graves.

EP-A-0562583 describe el uso de sales de ácido clavulánico con etilendiaminas simétricas N,N'-monosustituidas, tales como diclavulanato de N,N'-diisopropiletildiamonio, como productos intermedios útiles para el aislamiento y la preparación de ácido clavulánico puro o sales de clavulanato de metal alcalino a partir de extracto de acetato de etilo.

WO93/25557 describe el uso de sales de clavulanato con numerosas aminas como productos intermedios para la preparación de ácido clavulánico o sales o ésteres farmacéuticamente aceptables.

EP-A-0594099 describe el uso de octilamina terciaria con ácido clavulánico como un producto intermedio en la preparación de ácido clavulánico o sales farmacéuticamente aceptables.

WO94/21647 describe el uso de diaminas N,N'-sustituidas, tales como diclavulanato de N,N'-diisopropiletildiamonio, como un producto intermedio útil para la preparación de ácido clavulánico y sales alcalinas.

WO94/22873 describe el uso de nuevas sales de diamonio terciarias de ácido clavulánico, tales como clavulanato de N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminoetano, como un producto intermedio útil para la preparación de ácido clavulánico y sales del mismo.

EP-A-0 312 813 describe un procedimiento para la preparación de ácido clavulánico y sus sales y ésteres, que comprende añadir 2-etilhexanoato de litio a un caldo de fermentación de ácido clavulánico en bruto, añadir un disolvente inmiscible con agua tal como acetato de etilo, aislar clavulanato de litio como una sal intermedia de ácido clavulánico y convertir la sal intermedia de ácido clavulánico en una sal de clavulanato purificada como un producto final mediante intercambio iónico. Se añade un agente de agregación al caldo de fermentación para permitir una mejor filtración del mismo. Adicionalmente, el ácido clavulánico purificado final se prepara a través de una sal de ácido clavulánico intermedia que debe convertirse en el producto final mediante etapas adicionales tales como procedimientos de intercambio iónico.

El objetivo de esta invención es preparar ácido clavulánico y sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como clavulanato potásico, de una manera nueva y simple, en donde la sustancia deseada se obtiene con un alto rendimiento y de alta pureza, evitando el uso de aminas tóxicas.

De acuerdo con la presente invención, un procedimiento para la preparación de una sal farmacéuticamente aceptable de ácido clavulánico comprende las etapas de:

retirar sólidos de un caldo de fermentación que contiene ácido clavulánico mediante microfiltración; acidificar el filtrado hasta un pH entre 1 y 3;

extraer el filtrado acidificado con un disolvente inmiscible con agua y separar el extracto que contiene ácido clavulánico;

mezclar el extracto con un donante de metal y al menos un disolvente adicional;

y separar la sal de clavulanato metálico de la solución.

El caldo que contiene ácido clavulánico puede obtenerse mediante fermentación de un microorganismo de *Streptomyces* tal como la especie de *Streptomyces* P6621 FERM P2804, según se describe en JP Kokai 80-162993. Pueden emplearse cepas de *Streptomyces* alternativas.

La microfiltración del caldo puede llevarse a cabo según se describe en WO 95/23870. En un procedimiento preferido de acuerdo con esta descripción, el caldo acuoso de fermentación que contiene ácido clavulánico en bruto, micelio, proteínas y otra materia sólida suspendida se purifica mediante microfiltración a un valor del pH entre 5,8 y 6,2 y a una temperatura de aproximadamente 20 a 40°C. El filtrado purifica-

do puede concentrarse mediante ósmosis inversa y a continuación extraerse directamente en una serie de extractores centrífugos de contracorriente con un disolvente inmiscible con agua, preferiblemente acetato de etilo. La extracción se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura entre 15 y 25°C y un pH entre 1 y 3. El extracto se seca a continuación hasta un contenido de agua por debajo de 0,1% en moles, se concentra adicionalmente mediante evaporación y se decolora con carbón vegetal activo para obtener una fase orgánica completamente seca.

En el procedimiento de la técnica anterior convencional, la fase orgánica se ha hecho reaccionar con una amina para formar un producto intermedio que se aísla y se convierte subsiguientemente en la sal de clavulanato deseada. El presente solicitante ha descubierto sorprendentemente que pueden obtenerse sales de clavulanato alcalino tales como la sal potásica con alta pureza mediante la reacción directa del extracto secado con un donante de metales en presencia de al menos un disolvente adicional. Se evita la etapa adicional de conversión en la sal de clavulanato alquilamónico. Se cree que el procedimiento de la presente invención se hace disponible por la alta pureza del filtrado después de la microfiltración y preferiblemente la ultrafiltración.

El donante de metal puede ser una sal orgánica, un carbonato, un bicarbonato o un hidróxido de potasio, sodio, litio o magnesio. Se prefiere el uso de una sal orgánica, preferiblemente un ácido carboxílico. El uso de la sal potásica se prefiere en vista de la estabilidad comparativa del clavulanato potásico.

El ácido carboxílico puede seleccionarse de acetato, propionato, hexanoato, benzoato y benzoato substituido con uno o más grupos alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; halógeno; nitro; heteroalquilo substituido con O, S o NR; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono substituido con un grupo: R, OR, SR o NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> en donde R, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente alquilo de 1 a 10 átomos de carbono.

Donantes de metales preferidos incluyen 2-etilhexanoato potásico, acetato potásico, 2-etilhexanoato de litio y acetato de litio.

El disolvente adicional puede comprender un alcohol de 1 a 10 átomos de carbono o mezclas de los mismos. Se prefiere el uso de alcoholes de 1 a 4 átomos de carbono. Disolventes adicionales especialmente preferidos incluyen metanol, etanol, isopropanol e isobutanol y mezclas de los mismos. El uso de isopropanol se prefiere especialmente. Estos disolventes son preferiblemente secos, conteniendo por ejemplo entre 0% y 4% de agua.

El donante de metales puede disolverse en el disolvente adicional antes de la adición al extracto clavulánico. Alternativamente, el donante de metales puede disolverse en el mismo disolvente que el extracto de ácido clavulánico, por ejemplo acetato de etilo, y el disolvente adicional añadirse separadamente.

Se obtienen resultados particularmente ventajosos cuando se disuelve 2-etilhexanoato potásico en isopropanol, se disuelve acetato potásico en metanol o se disuelve benzoato potásico en metanol. La concentración del 2-etilhexanoato potásico en isopropanol puede ser preferiblemente de 0,1 mol/l a 5 mol/l, más ventajosamente de 1 mol/l a 2,5 mol/l y preferiblemente de 1,5 mol/l a 2 mol/l en un exceso molar

de 0,8 a 5 basado en la cantidad de ácido clavulánico, preferiblemente en un exceso molar de 5 a 25%.

El disolvente inmiscible con agua usado para extraer el filtrado del caldo de fermentación se selecciona preferiblemente de acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de propilo, acetato de n-butilo, cetonas tales como metil-etil-cetona, alcoholes tales como n-butanol, alcohol n-amílico o disolventes halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo o éteres tales como éter dietílico o hexano o mezclas de los mismos. Se prefiere el uso de acetato de etilo. El extracto puede purificarse con carbón vegetal activado y, si es necesario, una columna de gel de sílice.

La concentración de ácido clavulánico en bruto en el extracto concentrado secado del disolvente inmiscible con agua tal como acetato de etilo puede estar entre 8 g/l y 40 g/l, preferiblemente entre 20 g/l y 40 g/l.

El extracto de clavulanato, preferiblemente en acetato de etilo, puede decolorarse mediante la adición de carbón vegetal activado. Se ha encontrado que una cantidad de 0,2 a 0,5 g de carbón vegetal activado por gramo de ácido clavulánico es conveniente, aunque pueden emplearse cantidades alternativas, según se desee.

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención, el caldo de fermentación se purifica mediante microfiltración y ultrafiltración sucesivas. El uso de ultrafiltración proporciona un producto inesperadamente puro que no requiere una etapa de purificación subsiguiente que implica el aislamiento de un producto intermedio.

La ultrafiltración se lleva a cabo preferiblemente usando una membrana polimérica que tiene una resolución de 10.000 a 30.000 daltons, preferiblemente 20.000 daltons. La membrana puede tener un tamaño de poro de 1 a 10 nm. La ultrafiltración continua se prefiere de modo que los tiempos de parada sean tan cortos como sea posible. Se prefieren dispositivos de ultrafiltración interconectados en serie.

La invención se describe además por medio de ejemplos, pero no en un sentido limitativo.

#### Ejemplo 1

Un caldo de fermentación de *Streptomyces* que contiene ácido clavulánico se filtró, se ultrafiltró, se preconcentró hasta pH de 1,2 a 2,0 y se extrajo con acetato de etilo según se describe en el Ejemplo 1 de WO95/23870. Los extractos de acetato de etilo se concentraron sobre un aparato de destilación que eliminaba la mayoría del agua mediante destilación azeotrópica. La solución en acetato de etilo resultante de solución de ácido clavulánico (0,3 l, contenido de ácido clavulánico 25,4 g/l, contenido de agua 0,6 g/l) se trató con carbón vegetal (1,75 g) y, después de la retirada del carbón vegetal mediante filtración, se añadió gota a gota 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 23,0 cm<sup>3</sup>, 20% de exceso) durante un período de 10 minutos. La mezcla se enfrió hasta de 0 a 5°C con agitación y el producto precipitado se filtró después de 1 hora. El producto se secó bajo presión reducida a 35°C para dar clavulanato potásico (6,13 g, rendimiento 55%, ensayo 68,1%).

#### Ejemplo 2

Un extracto en acetato de etilo de ácido clavulánico (1 l, contenido de ácido clavulánico 23,6 g/l) se agitó con carbón vegetal (5,7 g) durante 20 minutos. La mezcla se filtró y el carbón vegetal se lavó con isopropanol (0,33 l). La solución de acetato de etilo

lo/isopropanol recogida se trató mediante adición gota a gota de 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 71,5 cm<sup>3</sup>, 20% de exceso). Se siguió el procedimiento del Ejemplo 1 y se aisló clavulanato potásico cristalino (20,14 g, rendimiento 68%, ensayo 79,6%, calidad USP).

#### Ejemplo 3

La solución de acetato de etilo del Ejemplo 1 se trató de acuerdo con el mismo procedimiento, excepto que el isopropanol se reemplazó por metanol (0,33 l). El rendimiento de clavulanato potásico era 17,7 g (55%, ensayo 73,8%).

#### Ejemplo 4

El procedimiento del Ejemplo 2 se repitió usando etanol absoluto (0,33 l) en lugar de isopropanol para dar clavulanato potásico (9,3 g, rendimiento 29%, ensayo 74,0%).

#### Ejemplo 5

El procedimiento del Ejemplo 2 se repitió usando isobutanol (0,33 l) en lugar de isopropanol para dar clavulanato potásico (19,8 g, rendimiento 62%, ensayo 74,0%).

#### Ejemplo 6

Una solución en acetato de etilo y ácido clavulánico (26,7 g/l, 0,6 l) se trató con carbón vegetal (3,6 g) y el filtrado se diluyó con isopropanol (0,1 l) y acetona (0,1 l). Se añadió gota a gota 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 48,5 cm<sup>3</sup>, 20% de exceso) y la mezcla se trató adicionalmente según se describe en el Ejemplo 1 para dar clavulanato potásico (12,4 g, rendimiento 60%, ensayo 77,0%).

#### Ejemplo 7

Se añadió 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 8 cm<sup>3</sup>) durante la agitación vigorosa de solución de ácido clavulánico en acetato de etilo (1 l, ensayo 20,2 g/l) y después de 5 minutos se introdujo carbón vegetal (4,6 g) en la mezcla. Después de agitar durante 20 minutos, las partículas sólidas se retiraron mediante filtración. Se añadió 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M, 43 cm<sup>3</sup> en isopropanol) en porciones de 5 cm<sup>3</sup> cada minuto. La mezcla se agitó a continuación por debajo de 0°C durante 30 minutos y el producto precipitado se recogió mediante succión, se lavó con acetona y se secó como se describe en el Ejemplo 1 para dar clavulanato potásico (rendimiento 58,7%, ensayo 80,1%, calidad USP).

#### Ejemplo 8

Una solución acuosa de ácido clavulánico obtenida a partir de la fermentación de *Streptomyces* se filtró, se trató mediante ultrafiltración, se preconcentró, se acidificó con ácido sulfúrico concentrado hasta pH 1,5 a 2,0 y se extrajo con acetato de etilo en un procedimiento de extracción continuo. Los extractos de acetato de etilo se concentraron en un aparato de destilación para retirar la mayoría del agua mediante destilación azeotrópica. La solución resultante (1 l, 18,3 g/l de ácido clavulánico, contenido de agua 0,5 g/l) se hizo pasar a través de una columna corta (altura 20 cm, diámetro 9 cm) que contenía gel de sílice (E Merck, Kiesel gel 60, 70 a 230 de malla, 440 g) y se eluyó con un flujo de acetato de etilo reciente. La solución resultante se recogió en porciones de 250 cm<sup>3</sup>. Las porciones ricas en ácido clavulánico (porciones 7<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup>, 1,25 l) se recogieron, se trataron con carbón vegetal y se diluyeron con isopropanol (300 cm<sup>3</sup>). Después de la adición gota a gota de 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 78,8 cm<sup>3</sup>, 10% de exceso) la mezcla se agitó a de 0°C a

10°C durante 30 minutos y el precipitado se filtró, se lavó y se secó para dar clavulanato potásico (21,4 g, rendimiento 61%, ensayo 81,2%, calidad USP).

#### Ejemplo 9

Un extracto en acetato de etilo de ácido clavulánico obtenido de acuerdo con el Ejemplo 1 se concentró y se secó sobre sulfato magnésico anhidro para dar una solución con ácido clavulánico (ensayo 16,6 g/l) y un contenido de agua de 5 g/l. Se hicieron pasar 0,3 l de esta solución a través de la columna de gel de sílice (diámetro 5 cm, altura 10 cm, 120 g). El ácido clavulánico se eluyó usando acetato de etilo y a continuación, después de 600 cm<sup>3</sup> de flujo de salida, este disolvente se reemplazó por mezcla de acetato de etilo/isopropanol 3:1 v/v. Las fracciones que contenían más de 0,5 g de ácido clavulánico por litro se recogieron y se trataron con carbón vegetal (0,5 g). Se añadió una solución de 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 13,8 cm<sup>3</sup>, 10% de exceso) en una sola porción y la mezcla se agitó durante 60 minutos. Los cristales resultantes se recogieron mediante filtración, se lavaron y se secaron para dar clavulanato potásico (3,97 g, rendimiento 63,0%, ensayo 79,0%, calidad USP).

#### Ejemplo 10

Una solución acuosa de ácido clavulánico obtenida a partir de un caldo de fermentación de acuerdo con el Ejemplo 1 se acidificó y a continuación se extrajo rápidamente con isobutil-metil-cetona. El extracto se secó con un sulfato magnésico, se concentró mediante evaporación y se trató con carbón vegetal. Después de la filtración del absorbente, se añadió 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 29,3 cm<sup>3</sup>, 15% de exceso) al filtrado (1 l, contenido de ácido clavulánico 10,1 g/l) y la mezcla se agitó a de 0 a 5°C durante 60 minutos. Los cristales amarillos de clavulanato potásico se filtraron, se lavaron y se secaron para dar 5,0 g (rendimiento 29%, ensayo 59%).

#### Ejemplo 11

Una solución de ácido clavulánico en acetato de etilo (0,3 l, contenido de ácido clavulánico 22,6 g/l) se trató con carbón vegetal y, después de la retirada del carbón vegetal mediante filtración, se añadió acetato potásico (solución 1 M en metanol, 51 cm<sup>3</sup>, 50% de exceso) gota a gota durante un período de 15 minutos. La mezcla se agitó durante 30 minutos a de 0 a 10°C. El precipitado se filtró, se lavó y se secó para dar clavulanato potásico (2,33 g, rendimiento 25%, ensayo 72,3%).

#### Ejemplo 12

Un extracto en acetato de etilo de ácido clavulánico (0,3 l, contenido de ácido clavulánico 22,9 g/l) se trató con carbón vegetal como se describe en el Ejemplo 1. Una solución de 2-etilhexanoato de litio (solución 1 M en metanol, 38,5 cm<sup>3</sup>, 10% de exceso) se añadió gota a gota durante un período de 10 minutos. La mezcla se agitó a de 0 a 10°C durante 30 minutos. El precipitado se filtró, se lavó y se secó para dar clavulanato de litio (4,85 g, 91,1%, ensayo 64%).

#### Ejemplo 13

Un extracto concentrado seco de ácido clavulánico en bruto en acetato de etilo preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, que tenía un contenido de ácido clavulánico de 32 g/l y un contenido de agua por debajo de 2 g/l, se decoloró mediante tratamiento con carbón vegetal activado y se añadió metanol seco (80 cm<sup>3</sup>). Se añadió 2-etilhexanoato potásico (solución 2 M en isopropanol, 47 cm<sup>3</sup>) con agitación vigorosa durante

15 minutos a 20°C. La suspensión resultante se enfrió hasta 10°C y el precipitado se separó mediante filtración. El precipitado se lavó con porciones de 2 x 50

cm<sup>3</sup> de acetato de etilo y se secó durante 1 hora bajo vacío a 40°C. Se obtuvo clavulanato potásico (10,4 g, ensayo 82,2%, calidad USP).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una sal farmacéuticamente aceptable de ácido clavulánico, que comprende las etapas de:

retirar sólidos de un caldo de fermentación que contiene ácido clavulánico mediante microfiltración; acidificar el filtrado hasta un pH entre 1 y 3; extraer el filtrado acidificado con un disolvente inmiscible con agua y separar el extracto que contiene ácido clavulánico;

mezclar el extracto con un donante de metal y al menos un disolvente seco adicional;

y separar la sal de clavulanato metálico de la solución.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el donante de metal es una sal orgánica, un carbonato, un bicarbonato o un hidróxido de: potasio, sodio, litio, calcio o magnesio.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el metal es potasio.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3 ó 4, en el que el donante de metal es una sal de ácido carboxílico.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el ácido carboxílico se selecciona de: acetato, propionato, hexanoatos, benzoatos y benzoatos sustituidos con uno o más grupos alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono; halógeno; nitro; heteroalquilo sustituido con O, S o NR; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono sustituido con un grupo: R, OR, SR, NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, en donde R, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son independientemente alquilo de 1 a 10 átomos de carbono.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el donante de metal se selecciona de: 2-etilhexanoato potásico, acetato potásico, 2-etil-

hexanoato de litio y acetato de litio.

7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el disolvente seco adicional se selecciona de: alcoholes de 1 a 10 átomos de carbono y mezclas de los mismos.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el disolvente adicional se selecciona de alcoholes de 1 a 4 átomos de carbono y mezclas de los mismos.

9. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el disolvente adicional se selecciona de: isopropanol, metanol, etanol, isobutanol y mezclas de los mismos.

10. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el disolvente inmiscible con agua es acetato de etilo o metil-isobutilcetona.

11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el disolvente inmiscible con agua es acetato de etilo y la relación de acetato de etilo al disolvente no acuoso adicional es de 3:1 a 10:1.

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la relación es de 5:1 a 7:1.

13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 ó 12, en el que el disolvente adicional es metanol.

14. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el extracto se seca hasta un contenido de agua menor que 6 g/l antes de la adición del donante de metal.

15. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el caldo se ultrafiltra usando una membrana con tamaños de poros en el intervalo de 1 a 100 nm.

16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, después de la microfiltración, el filtrado se concentra mediante ósmosis inversa.