

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 457**

51 Int. Cl.:

C07C 29/09 (2006.01)

C07C 29/86 (2006.01)

C07C 27/02 (2006.01)

C07C 403/24 (2006.01)

C07C 35/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2006 E 06850450 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1963245**

54 Título: **Proceso para la purificación de xantofilas**

30 Prioridad:

19.12.2005 US 751672 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.01.2014

73 Titular/es:

**PRODEMEX, S.A. DE C.V. (100.0%)
Canal Lateral 18, KM. 8 Carretera Campo 35, Zona
Industrial Los Mochis APDO. Postal 1095 Sinaloa
México 81364, MX**

72 Inventor/es:

RODRÍGUEZ PEÑA, GUSTAVO

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 439 457 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

Proceso para la purificación de xantofilas

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

- 5 **[0002]** [sic] La presente invención se refiere a un proceso para la purificación de xantofilas procedentes de extractos de plantas, en particular las oleorresinas de cempasúchil o clavelón de la India (*Tagetes erecta*).

Descripción de la técnica relacionada

- 10 **[0003]** Los carotenoides comprenden un grupo de pigmentos naturales que se encuentran en abundancia en las plantas, algunos peces, los crustáceos, las aves, las algas y las bacterias. Dentro de este grupo de pigmentos están los carotenoides de color amarillo, entre los que figuran los carotenos (por ejemplo, el β -caroteno) y las xantofilas (por ejemplo, la luteína y la zeaxantina) y los carotenoides de color rojo, entre los que figuran la capsanteína, la cantaxantina y la astaxantina. Estos carotenoides de color amarillo y rojo a menudo se encuentran presentes en las plantas –especialmente en las plantas con flores– junto con otras clases de pigmentos, incluidos principalmente los pigmentos de clorofila verde.

- 15 **[0004]** Durante décadas se han utilizado los carotenoides, y en particular las xantofilas, procedentes de extractos de cempasúchil en la industria avícola para la pigmentación de pieles de pollo para asar y yemas de huevo. La luteína está presente en concentraciones muy superiores a la zeaxantina en los extractos de cempasúchil. Se conocen formulaciones de pigmentaciones para el uso en la industria avícola que poseen concentraciones relativamente altas de zeaxantina, en las que la luteína ha sido isomerizada para producir zeaxantina (patente estadounidense nº 5.523.494 otorgada a Torres y patente estadounidense nº 5.973.211 otorgada a Rodríguez).

- 20 **[0005]** Además de su importancia comercial en la industria avícola, los científicos han prestado recientemente una atención considerable a los carotenoides debido a su posible función en la promoción de la salud humana. Se ha demostrado que compuestos como el α -caroteno y el β -caroteno, la luteína y la zeaxantina poseen una pronunciada actividad antioxidante, la cual puede retrasar o prevenir enfermedades como el cáncer, la arteriosclerosis, las cataratas, la degeneración macular y otras (Bowen, WO98/45241). La luteína y la zeaxantina son los únicos carotenoides presentes en la región macular de la retina humana y están relacionadas con la función normal de la mácula responsable de la agudeza visual. También se tiene conocimiento de que los carotenoides mejoran la respuesta del sistema inmunitario. Los radicales libres producidos como subproductos de procesos metabólicos y que son el resultado de contaminantes ambientales (como, por ejemplo, el dióxido de nitrógeno y el ozono del aire contaminado, los metales pesados, los hidrocarburos halogenados, la radiación ionizante y el humo de cigarrillos) están implicados como factores causantes de muchas de las enfermedades mencionadas anteriormente. Los carotenoides son inhibidores potentes de los radicales libres de oxígeno, altamente reactivos, que pueden iniciar una cascada de reacciones químicas perjudiciales. Los carotenoides también actúan como antioxidantes separadores de cadenas, especialmente a presiones parciales bajas de oxígeno. Por lo tanto, los carotenoides pueden contribuir a reducir las reacciones provocadas por los radicales libres y también pueden prevenir la generación de radicales libres, limitando así los daños producidos por los radicales libres/oxidantes.

- 30 **[0006]** Khachik ha descrito (patente estadounidense nº 5.382.714) un proceso de obtención de luteína con una pureza generalmente superior al 90%, determinada por espectrofotometría en el ultravioleta visible. Se descubrió que la pureza de la luteína era de aproximadamente 94,79%, y sus isómeros de aproximadamente 3,03%, basándose en un análisis de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, *High performance liquid chromatography*) y otros que constan de zeaxantina, etcétera. El principal inconveniente del procedimiento mencionado anteriormente consiste en el uso de un disolvente halogenado. En la mayoría de los países está prohibido el uso de disolventes halogenados en aplicaciones relacionadas con los alimentos humanos, ya que existen temores sobre sus posibles efectos cancerígenos.

- 45 **[0007]** Ausich y Sanders (patente estadounidense nº 5.648.564) han desarrollado un proceso para la obtención de cristales de xantofila que contienen aproximadamente un 70-85% de carotenoides totales, que se considera que contienen xantofilas sustancialmente puras. El análisis HPLC de las xantofilas mostró un 85-95% de trans-luteína, 0,2-1,5% de sus isómeros geométricos y 2,5-8% de zeaxantina. La escasa solubilidad de los ésteres de xantofila en propilenglicol y el calentamiento posterior a temperaturas de aproximadamente 70° C durante 10 horas son las principales desventajas del proceso mencionado anteriormente, ya que la luteína experimenta una isomerización y descomposición en dichas condiciones. Además, el propilenglicol no es un disolvente cuyo coste sea razonable desde un punto de vista comercial.

- 50 **[0008]** Khachik en su patente estadounidense nº 6.262.284 ha desarrollado un proceso para la obtención de cristales de luteína y zeaxantina (con una pureza de un 97%) a partir de harina de cempasúchil en vez de extracto de cempasúchil. Este proceso supuso la extracción y saponificación simultáneas de los ésteres de xantofila. Las principales limitaciones en este proceso son la saponificación del extracto sin concentración, lo que provoca el consumo de un gran volumen de disolventes que son difíciles de manipular en la producción comercial. La formación

adicional de peróxidos a partir de disolventes, como por ejemplo THF (tetrahidrofurano) puede causar la degradación de las xantofilas. Asimismo, el uso de cromatografía en columna de gel de sílice resulta un proceso incómodo y menos económico para la producción a escala comercial de cristales puros de luteína.

- 5 **[0009]** Madhavi y Kagan (patente estadounidense nº 6.380.442) han divulgado un proceso para el aislamiento de carotenoides mixtos procedentes de plantas y éste es ilustrado con ejemplos de oleorresina de cempasúchil. La temperatura de hidrólisis es elevada y el tiempo de reacción es prolongado, lo que provoca la oxidación y degradación de la luteína. El método no resulta atractivo para aplicaciones comerciales, ya que se requiere una cantidad de agua de más de 30 veces por kilogramo de material de entrada y la luteína se libera en forma de cristales diminutos dispersos en una solución jabonosa viscosa, lo que dificulta la labor de recuperación.
- 10 **[0010]** Rodríguez *et ál.* (patente estadounidense nº 6.329.557) han divulgado un proceso a escala industrial para la obtención de cristales de xantofila a partir de extracto de cempasúchil. El método es útil para las oleorresinas de cempasúchil y proporciona un proceso a escala industrial para la obtención de concentrados de luteína y zeaxantina de alta pureza utilizando extractos de cempasúchil saponificados.
- 15 **[0011]** Montoya *et ál.* (patente estadounidense nº 6.504.067) describen un proceso para la limpieza de oleorresinas con álcali y ácido. La oleorresina limpia es sometida a hidrólisis acuosa de álcali a una temperatura de 90° C durante 8 horas en presencia de agentes emulsionantes. Este método tiene la desventaja de que la temperatura elevada y la duración prolongada del ciclo tiene como resultado la degradación de la luteína libre.
- 20 **[0012]** Kumar *et ál.* (patente estadounidense nº 6.743.953) divulgan un método que incluye la saponificación en un alcohol para evitar la adición de agua, la eliminación del alcohol a presión reducida y la extracción de xantofilas en acetato de etilo para obtener xantofilas con un buen rendimiento. El método de Kumar *et ál.* evita el uso de agua durante la saponificación, evitando así los pasos para eliminar el agua mediante disolventes orgánicos, especialmente disolventes orgánicos halogenados. La saponificación en alcohol era conocida y ha sido descrita por Grant (patente estadounidense nº 3.523.138).
- 25 **[0013]** Sadano *et ál.* (U.S. 2004/0055954) divulgan la extracción de oleorresina de cempasúchil con la extracción de fluido supercrítico, como por ejemplo dióxido de carbono a alta presión. La extracción selectiva se consigue cambiando la presión del fluido supercrítico. La oleorresina extraída se purifica adicionalmente mediante la disolución en un disolvente de cetona y la eliminación del precipitado. El requisito de un equipo especial para la extracción de fluido supercrítico hace que este método resulte poco atractivo en aplicaciones comerciales.
- 30 **[0014]** Khachik (solicitud estadounidense nº 2005/0038271) describe un método para la extracción de zeaxantina a partir de bayas *Lycium Chinese Mill* y luteína a partir de cempasúchil sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos nocivos. Este método se sirve de tetrahidrofurano y un alcohol Clase 3 de la FDA (*Food and Drug Administration*, Organismo para el Control de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos), preferentemente etanol, como disolventes de extracción. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la formación de peróxidos a partir de disolventes como el THF puede causar la degradación de las xantofilas.
- 35 **[0015]** Quesnel (solicitud estadounidense nº 2005/0139145) describe un método relativamente sencillo para la purificación de carotenoides que incluye luteína y se sirve de disolventes orgánicos. Los cristales obtenidos por este procedimiento fueron altos en todas las trans-luteínas.
- 40 **[0016]** Rosales *et ál.* (solicitud estadounidense nº 2005/0153002) describen un proceso para la obtención de xantofilas con buen rendimiento y alta pureza que están libres de derivados epoxizados. Este método incluye el secado de flores de cempasúchil en condiciones moderadas para evitar la formación de epóxidos, seguida por la saponificación y el uso de halogenuros metálicos (por ejemplo, cloruro de calcio) [para eliminar] ácidos grasos. El precipitado resultante es extraído y lavado con disolvente polar (por ejemplo, alcohol o acetona).
- 45 **[0017]** Bhaskaran *et ál.* (solicitud estadounidense nº 2005/0182280) describen un método para la preparación de una pasta de luteína estable a partir de oleorresinas utilizando temperaturas relativamente bajas y tiempos de reacción cortos. Sin embargo, este método incluye pasos múltiples, como por ejemplo la disolución en alcohol, la limpieza en una resina de intercambio iónico, la hidrólisis de los ésteres utilizando un catalizador de transferencia de fase, la inhibición con una solución ácida, la disolución y el filtrado de los sólidos, el secado de los ésteres, la trituración del residuo y la destilación de la fracción alcohólica. En consecuencia, el método descrito no es un método viable desde un punto de vista comercial si se tiene en cuenta el gran número de pasos necesarios.
- 50 **[0018]** Es evidente que sigue existiendo la necesidad de un método sencillo y adaptable para el aislamiento de xantofilas libres que limite el uso de disolventes orgánicos y reduzca al mínimo los niveles de degradación y epóxidos en el producto de xantofila. Las realizaciones preferidas de la presente invención tienen como objetivo lograr un proceso mejorado para el aislamiento de xantofilas que estén libres de derivados de epóxidos, a partir de extractos de plantas y que sea adaptable, económico y fácil de llevar a cabo.

55

RESUMEN DE LA INVENCION

- 5 [0019] Las realizaciones de la invención tienen como objetivo métodos para la obtención de xantofilas libres que incluyen uno o varios de los siguientes pasos. Se proporciona una oleorresina derivada de plantas. La oleorresina derivada de plantas se saponifica para obtener una resina saponificada. La resina saponificada se lava con una solución de sal más de una vez hasta que el pH de la resina esté comprendido entre 6,5 y 9. A continuación se lava la resina con un disolvente no polar para eliminar los componentes lípidos. La resina se lava al menos una vez con un disolvente de polaridad incrementada. Después se lava la resina con agua para eliminar el disolvente. La resina se filtra y/o seca para obtener las xantofilas libres.
- 10 [0020] En realizaciones preferidas, la oleorresina derivada de plantas se deriva del cempasúchil o clavelón de la India (*Tagetes erecta*) o bayas *Lycium chinensis*.
- 15 [0021] Preferentemente, la solución de sal comprende una sal de sodio o de potasio en una concentración de 5 a 15%. Se prefiere aún más que la sal sea una sal de sodio y que la sal de sodio sea cloruro de sodio. Preferentemente, al menos uno de los lavados en solución de sal es acidificado. Se prefiere aún más que el último lavado en solución de sal sea acidificado. En las realizaciones más preferidas, al menos un lavado en solución de sal es acidificado con ácido fosfórico al 2-3%.
- 20 [0022] En realizaciones preferidas, el disolvente de polaridad incrementada es una solución de agua-alcohol o una solución de agua-acetona. Más preferentemente, la resina se lava con el disolvente de polaridad incrementada 2-4 veces y la polaridad del primer lavado es menor que la polaridad del último lavado. Se prefiere aún más que el disolvente de polaridad incrementada se acidifique durante al menos un lavado. En una realización preferida, se lava la resina al menos una vez con un disolvente de polaridad incrementada que se acidifica con ácido fosfórico al 1-3%. En la realización más preferida, el disolvente de polaridad incrementada incluye una solución de agua-metanol (10:90) acidificada para al menos uno de los lavados. En algunas realizaciones, el lavado de la resina con el disolvente de polaridad incrementada también incluye un paso de filtrado.
- 25 [0023] En algunas realizaciones preferidas, la planta es cempasúchil y las xantofilas libres son predominantemente luteína libre, preferentemente al menos un 60% de luteína libre. En algunas realizaciones preferidas, la planta consiste en bayas *Lycium chinensis* y las xantofilas libres son predominantemente zeaxantina.
- [0024] Preferentemente, el disolvente no polar es hexano.
- 30 [0025] En realizaciones preferidas, el paso final de secado también incluye la adición de una mezcla de alcohol-agua para facilitar la eliminación de agua. Preferentemente, la mezcla de alcohol-agua es una mezcla de etanol-agua (50:50).
- [0026] En algunas realizaciones se proporciona la oleorresina mediante uno o varios de los siguientes pasos:
- el tratamiento de un homogeneizado de plantas con un disolvente de polaridad incrementada para una purificación inicial;
 - el filtrado del homogeneizado para obtener un material precipitado; y
 - 35 la extracción del material precipitado con un disolvente no polar.
- [0027] Preferentemente, la planta es *Lycium chinensis*. Preferentemente, el disolvente de polaridad incrementada es una solución de alcohol-agua. Preferentemente, el disolvente no polar es hexano.
- [0028] En algunas realizaciones preferidas, el método también incluye los pasos de concentración del extracto en los extractos de disolventes no polares, y/o el lavado del concentrado con agua
- 40 [0029] Otros aspectos, características y ventajas adicionales de esta invención se harán evidentes gracias a la descripción detallada de las realizaciones preferidas que se muestran a continuación.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

- 45 [0030] A continuación se describirán estas características y otras características adicionales de la invención haciendo referencia al dibujo adjunto de las realizaciones preferidas, el cual tiene como objetivo ilustrar, pero no limitar, la invención.
- [0031] La figura muestra un diagrama de flujo para la purificación de luteína a partir de extracto de cempasúchil saponificado.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA REALIZACION PREFERIDA

- 50 [0032] Aunque la realización descrita representa la realización preferida de la presente invención, se sobrentenderá que los expertos en este campo podrán concebir modificaciones sin abandonar el espíritu de la

invención. Por consiguiente, el ámbito de la invención estará determinado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

5 **[0033]** Las realizaciones de la invención se refieren a un nuevo método para la purificación de xantofilas libres procedentes de fuentes de origen vegetal y no vegetal. Las fuentes de origen vegetal incluyen el cempasúchil (*Tagetes erecta*), las bayas *Lycium Chinese Mill* (LCM), las bayas *Lycium chinensis* y verduras verdes como las coles rizadas (*Brassica oleracea* var. *acephala*), las espinacas (*Spinacia oleracea*) y las berzas comunes (*Brassica oleracea*, var. *Champion*). Otras fuentes de materias primas incluyen las algas, el excremento de gusanos de seda y las hojas de alfalfa. Las fuentes preferidas son el cempasúchil (*Tagetes erecta*) y las bayas *Lycium chinensis*.

10 **[0034]** La xantofila predominante que se extrae dependerá del material básico utilizado. Por ejemplo, muchas especies de cempasúchil son ricas en luteína. Las realizaciones de la invención que utilizan una especie de cempasúchil rica en luteína producirán predominantemente luteína. Si se utilizan las bayas *Lycium Chinese Mill* (LCM) o las bayas *Lycium chinensis*, el producto será predominantemente zeaxantina. Por el término "predominantemente" se entiende su significado normal y habitual y, en el contexto de la presente solicitud, se entiende que la especie de xantofila específica se encuentra presente en más del 50% de los carotenoides totales, más preferentemente en más del 60%, aún más preferentemente en más del 70%, aún más preferentemente en más del 80% e idóneamente en más del 90% de los carotenoides totales. Si se utilizan pimientos rojos, el producto final será rico en capsantina. Otras fuentes pueden producir mezclas de xantofilas. Se conocen los niveles de xantofila presentes de forma natural para muchas especies y variedades. Un experto en este campo podría elegir el material de partida apropiado, dependiendo del producto de xantofila que se desee.

20 **[0035]** Las realizaciones de la invención se refieren a un método de preparación de xantofilas. Algunos pasos incluyen lavados repetidos de extractos de la planta con una solución acuosa de sal que facilita la eliminación de las impurezas solubles en agua, disminuyendo a la vez el pH. A medida que el pH disminuye durante los lavados de sal, no es necesario añadir grandes cantidades de ácido para neutralizar el álcali usado durante la saponificación. A diferencia de los disolventes orgánicos utilizados en los procedimientos del estado anterior de la técnica, los lavados con agua salada son respetuosos con el medio ambiente y no plantean problemas de salud para los usuarios finales.

25 **[0036]** Otra ventaja de las realizaciones de este método es que el proceso de purificación elimina los epóxidos y otras impurezas que son liberados durante el ensilado y los pasos de procesamiento (como por ejemplo el secado) de los extractos de plantas utilizados como material de partida. Como resultado, el producto final está prácticamente libre de derivados de epóxido no deseados.

30 **[0037]** Las realizaciones de este método pueden ser adaptadas comercialmente debido a que los disolventes y otros materiales utilizados en la extracción son económicos y pueden ser adquiridos fácilmente

35 **[0038]** En una realización preferida de la presente invención, se utilizan como materiales de partida los extractos de cempasúchil que contienen entre 40 y 150 gramos de carotenoides por kilogramo y entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 gramos de clorofila por kilogramo. Se pueden cosechar a mano o mecánicamente las flores de cempasúchil utilizadas para la fabricación de estos extractos. También se pueden utilizar harinas de cempasúchil o extractos de cempasúchil.

40 **[0039]** Las harinas de cempasúchil se preparan mediante la deshidratación de las flores. Existen diferentes métodos para la deshidratación, por ejemplo mediante secadores de cinta, de bandejas, de estantes, de tambor o el secado al sol. El material seco se muele y después de este proceso se realiza una extracción con disolvente usando un disolvente no polar, como por ejemplo el hexano. A continuación se elimina el disolvente por evaporación y se obtiene una oleorresina de cempasúchil. La oleorresina se saponifica después para completar la hidrólisis de las xantofilas y las clorofilas presentes. La saponificación puede llevarse a cabo por tratamiento de la oleorresina con hidróxido de sodio o de potasio o algún otro álcali. Las condiciones de saponificación son bien conocidas. Preferentemente, el extracto se saponifica sin el uso de ningún aditivo que no sea el álcali (por ejemplo, el hidróxido de sodio o de potasio).

45 **[0040]** Durante la reacción de saponificación se obtienen la luteína libre, la zeaxantina libre y otras xantofilas libres, así como sales de sodio y de potasio de ácidos grasos como los ácidos mirístico, palmítico y esteárico. Asimismo, los grupos fitilo y metilo en las moléculas de pigmento pueden ser sustituidos por sodio o potasio, en función de la base (por ejemplo, NaOH o KOH, respectivamente) usada como agente de saponificación. También se pueden producir clorofilinas solubles en agua durante la saponificación.

50 **[0041]** El material saponificado se precipita por sales para separar el pigmento de lípidos que contiene la materia del exceso de sales alcalinas y otros subproductos de la hidrólisis con afinidad o solubilidad en agua. El tratamiento de precipitación por sales se puede hacer con una sal común y económica como el cloruro de sodio u otras sales que creen soluciones de agua altamente polares. Dichas sales son bien conocidas y, en particular, incluyen cualquier sal de sodio o de potasio. La concentración de sal está comprendida entre un 1% y un 30%, y preferentemente entre un 5% y un 15%. Los lavados repetidos con solución de sal neutralizan el extracto saponificado, lo que evita la necesidad de utilizar ácidos más costosos y difíciles de usar y/o elimina el uso de disolventes orgánicos para crear fases acuosas y orgánicas con el fin de iniciar el proceso de purificación. Puesto

que los disolventes orgánicos tienen una mayor toxicidad que las soluciones acuosas de sal, la evitación de un disolvente orgánico en este paso supone una ventaja desde el punto de vista de la salud humana y proporciona una ventaja por lo que respecta a los costes. Normalmente se utiliza una solución de sal con una concentración de entre 5% y 15% a una temperatura de 85° a 90° C. El pH de la solución de sal es alcalino (pH 11-12). Se descartan los lavados de sal acuosos que contienen los pigmentos solubles en agua, dejando la oleorresina.

[0042] La oleorresina se lava con una solución salina ligeramente más ácida. Con lavados continuados para obtener una mezcla alcalina de pH de 6,5 a 9, y más preferentemente de 7,5 a 8,0, se forma un sistema de dos fases donde se elimina prácticamente toda el agua en la fase acuosa-salina y se proporciona una fase lipídica orgánica para su posterior procesamiento. En algunas realizaciones, estos lavados también pueden incorporar uno o más pasos de filtrado.

[0043] Esta fase lipídica es tratada con un disolvente no polar, como por ejemplo el hexano, para formar un sistema de tres fases en el que las fases alta y media son decantadas y eliminadas, separando de este modo los lípidos de los carotenoides de mayor densidad. El uso de hexano para extracciones de lípidos es bien conocido en la industria de las grasas y aceites, aunque se pueden usar otros hidrocarburos de cadena lineal como por ejemplo el pentano, el heptano o el éter de petróleo (temperatura de ebullición de 30-60° C).

[0044] El material lavado con hexano es tratado con un disolvente de polaridad incrementada, como por ejemplo alcohol mezclado con agua, en donde ambos componentes son completamente miscibles y pueden contener un componente ácido como parte de la solución. La introducción del disolvente de polaridad incrementada reduce la pérdida de luteína en este paso de la purificación. Entre los ejemplos de disolventes de polaridad incrementada que se pueden utilizar en este paso de la invención figuran mezclas de alcohol/agua, acetonitrilo/agua, acetona/agua o ácido acético/agua. Los alcoholes preferidos incluyen el etanol, el metanol, el propanol, el isopropanol, el terc-butanol y el butanol, combinados con agua para el disolvente de polaridad incrementada. Preferentemente, el disolvente de polaridad incrementada es etanol/agua o metanol/agua. Más preferentemente, el disolvente de polaridad incrementada es metanol/agua. Preferentemente, el contenido de agua es de un 30% o inferior, más preferentemente de un 15% o inferior. En la realización más preferida, el contenido de agua es de aproximadamente un 10%. Preferentemente, el disolvente de polaridad incrementada incluye una pequeña cantidad de un ácido para eliminar la alcalinidad residual, en particular en el último lavado con el disolvente de polaridad incrementada. Se puede utilizar cualquier ácido para acidificar el disolvente de polaridad incrementada, incluidos (pero no limitados a) HCl, HNO₃, H₂SO₄, H₃O₄P, con una concentración baja de 1-5%, y preferentemente de 1-3%. Preferentemente, se utiliza ácido fosfórico con una concentración de 1-5%, y preferentemente de 2-3%. En algunas realizaciones, la polaridad del disolvente de polaridad incrementada aumenta a medida que se realizan lavados sucesivos.

[0045] Después del lavado con el disolvente de polaridad incrementada, el residuo se lava adicionalmente con agua que elimina el exceso de disolvente de polaridad incrementada del sistema y elimina también cualquier sal o compuestos solubles en agua.

[0046] El agua se elimina en gran medida del residuo purificado mediante la mezcla con una mezcla de agua-alcohol seguida de una filtración en vacío. Preferentemente, el alcohol es etanol, metanol, propanol, isopropanol, terc-butanol o butanol. Preferentemente, el alcohol está presente a un nivel de al menos 40% y más preferentemente de un 50%. En realizaciones preferidas, la mezcla de agua-alcohol es una solución de agua-etanol (50:50). Este paso facilita el secado final. Cualquier humedad y disolvente residuales son eliminados mediante un secado al vacío o una liofilización.

[0047] Se describe una realización preferida de la invención haciendo referencia a la Figura que se adjunta.

[0048] Se mezcla el extracto de cempasúchil (oleorresina) libre de etoxiquina o cualquier otro aditivo con suficiente solución acuosa del 50% de hidróxido de potasio para saponificarlo a 103° C. Una vez saponificado, se añade una solución salina de cloruro sódico con una concentración de entre 5 y 15% en una proporción de 4 a 8 veces el peso de la oleorresina de partida y a una temperatura de entre 85° y 90° C y se agita durante aproximadamente 15 minutos. Se deja la mezcla en reposo entre 15 minutos y dos horas a la misma temperatura hasta que se forma una separación de dos fases. La fase salina inferior es drenada y eliminada del proceso. A continuación se mezcla la oleorresina restante durante un periodo de entre 5 y 20 minutos con otra solución de cloruro de sodio (5 a 15%) a una temperatura comprendida entre 85° y 90° C, se deja reposar y drena. Se puede llevar a cabo un tercer lavado con solución salina a una temperatura comprendida entre 85° y 90° C, añadiendo esta vez preferentemente un 2-3% de ácido fosfórico en la solución para lograr una clara separación de dos fases y un mejor drenaje de la fase de solución salina. Después se enfría la oleorresina residual a una temperatura comprendida entre 30° y 40° C y se lava preferentemente dos veces con una proporción de 15 partes de hexano a 1 parte de residuo, agitándola durante aproximadamente 10 minutos, dejándola reposar durante un periodo comprendido entre 1 y 5 horas para la separación de fases y decantando la capa superior. El residuo lavado con hexano se mezcla a continuación durante un periodo comprendido entre 5 y 15 minutos a una temperatura comprendida entre 40° y 50° C con un disolvente de polaridad incrementada que consiste en una solución de agua-metanol (10:90) que contiene entre 0,5 y 1 kg de ácido fosfórico por 100 litros de solución. Después se filtra o centrifuga al vacío esta mezcla. La torta residual se lava a continuación de una a tres veces con una solución todavía más polar de agua-metanol (50:50) durante 10 minutos a una temperatura comprendida entre 40° y 50° C y se filtra o se centrifuga al vacío después de cada lavado. A

continuación, la torta se lava con toda el agua necesaria a 65° C para eliminar el metanol residual a menos de 10 ppm. Se pueden eliminar los lavados con agua por filtración, centrifugación o decantación. El residuo lavado con agua a continuación se lava con una solución de agua-etanol (50:50) entre 40° y 50° C y se filtra al vacío para eliminar el líquido. En esta fase se pueden añadir antioxidantes aptos para el consumo humano al residuo purificado si así se desea. Después se seca el producto para eliminar el etanol y el agua. Se puede llevar a cabo la eliminación del disolvente mediante secado al vacío o liofilización. El producto final contendrá entre un 60% y un 90% de luteína y zeaxantina libres, donde aproximadamente el 95% de estos carotenoides será luteína y el 5% será zeaxantina.

[0049] La recuperación típica de carotenoides del material de partida está comprendida entre el 60% y el 85%.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0050] En un recipiente de reacción de dos litros se saponificaron 250 g de extracto de cempasúchil con una solución acuosa de 50% de hidróxido de potasio a una temperatura de 103° C. El material de partida contenía 110,3 g/kg de carotenoides totales. El material saponificado se mezcló con 1.420 ml de una solución de cloruro de sodio de 9,8% en agua y se agitó durante 20 minutos a 85° C. A continuación se dejó en reposo durante 30 minutos a 85° C y después de la aparición de una separación de dos fases se eliminó la fase de solución salina inferior con una succión al vacío. Se trató la oleorresina restante dos veces más con 1.000 ml de una solución de cloruro de sodio al 7%, como se ha descrito anteriormente. Después la oleorresina lavada con solución salina se transfirió a un recipiente de 4 litros y se mezcló vigorosamente con 3.000 ml de hexano a 35° C durante 10 minutos. A continuación se dejó reposar durante dos horas y media y se decantó la fase superior junto con una interfaz que contenía gomas hidratadas. Un segundo tratamiento de hexano se realizó de la misma manera pero con 1.500 ml de disolvente. La pasta residual se mezcló después con 2.000 ml de una solución de metanol-agua (90:10) y 20 g de ácido fosfórico al 85% y se agitó durante 10 minutos a 45° C. Esta dispersión se filtró al vacío utilizando papel de filtro Whatman nº 2. Se llevó a cabo un segundo lavado con metanol-agua, pero esta vez solo con 1.000 ml de una solución con una proporción de 50:50. Después se realizaron tres lavados posteriores de 10 minutos con 800 ml de agua a 65° C, seguidos por filtración, para eliminar el metanol. A continuación se llevó a cabo un lavado de 10 minutos con 800 ml de una solución de etanol-agua (50:50) a temperatura ambiente para eliminar parcialmente el agua antes del secado final. El secado se terminó al vacío. La pureza del producto final fue de 84,5% de carotenoides totales, con menos de un 1% de volátiles, lo que representa un rendimiento del 68,7%.

Ejemplo 2

[0051] Se llevó a cabo la saponificación de 100 g de extracto de cempasúchil utilizando 36 g de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 50% a una temperatura de 103° C. El extracto contenía 105 g/kg de carotenoides totales antes de reaccionar. El producto saponificado se agitó durante 10 minutos en 500 ml de una solución de cloruro de potasio al 12% a 90° C y se dejó reposar a la misma temperatura durante una hora. Se separó una fase inferior más pesada de una fase superior pigmentada y este lavado se repitió utilizando las mismas condiciones. A continuación se mezcló la oleorresina lavada con 2 litros de hexano a 30° C durante 15 minutos. Después se detuvo la mezcla y se decantó una capa superior de hexano que se formó después de permitir el reposado durante 5 horas. Se eliminó una fina capa de sólidos suspendidos junto con la fase de hexano. Se repitió un segundo tratamiento de hexano con el mismo volumen y en las mismas condiciones y se decantó la capa de hexano. El exceso de hexano se evaporó mediante una agitación a 55° C y al vacío (600 mmHg). La pasta lavada con hexano se mezcló después con 400 ml de una solución de acetona-agua (4 partes de acetona por 1 parte de agua) y 75 ml de una solución acuosa de ácido fosfórico al 25%. La mezcla se agitó durante 10 minutos a 25° C y se filtró usando un papel de filtro Whatman nº 2 y presión reducida. La torta de filtración se lavó de nuevo, pero esta vez con 100 ml de una solución de acetona-agua (3 partes de acetona por 2 partes de agua), agitándola durante 10 minutos a 25° C y después filtrándola como se hizo anteriormente. La torta de filtración se lavó y filtró sucesivamente tres veces con porciones de 200 ml de agua. La pasta lavada con agua se mezcló con 350 ml de una solución de etanol-agua (1 parte de etanol por 1 parte de agua), agitándola durante 10 minutos a 25° C y después filtrándola para obtener una pasta purificada. El material purificado se secó al vacío. Se obtuvo un polvo seco que pesaba 10,1 gramos y que contenía 820 g/kg de carotenoides totales determinados espectrofotométricamente. El análisis HPLC mostró que el 94,7% de los carotenoides eran luteína y el 5,3% zeaxantina. Este producto tuvo un rendimiento de 78,9% de carotenoides totales con respecto al material de partida.

Ejemplo 3

[0052] Un lote de 300 g de bayas *Lycium chinensis* con 0,89 g/kg de carotenoides totales se pusieron en remojo en 1.200 ml de una solución de metanol-agua (1:1) durante 12 horas. A continuación se homogeneizaron las bayas en una batidora eléctrica y se pasó la masa total a través de un filtro de fibra de poliéster. El material retenido en el filtro se extrajo con hexano a 40° C y se filtró usando papel de filtro Whatman nº 2. Las extracciones se repitieron hasta que el extracto era prácticamente incoloro. Este proceso utilizó 5.400 ml de hexano. Los extractos de hexano se combinaron y se redujo el volumen a 2.000 ml por evaporación al vacío. Los extractos de hexano concentrados parcialmente se lavaron a continuación con 2.000 ml de agua para eliminar las gomas y otros sólidos solubles en agua usando embudos de decantación. Se hizo pasar el extracto de hexano lavado con

5 agua a través de un lecho de sulfato sódico anhidro para eliminar la humedad, y a continuación se llevó a cabo una evaporación del disolvente al vacío para obtener un extracto de pigmento concentrado que pesaba 3 g. Después se saponificó el concentrado con 2 ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 25% durante una hora a 103° C. El material saponificado se lavó tres veces durante 20 minutos con 23,2 ml de una solución de cloruro de sodio al 7% a 65° C, separando la fase acuosa inferior después de cada lavado. A continuación, el material lavado con solución salina se mezcló con 36 ml de hexano durante 10 minutos a 35° C. Después se dejó reposar durante 3 horas y se separó la fase superior de hexano por aspiración mecánica. Se lavó la pasta de color restante con 20 ml de una solución de metanol-agua (85:15) a 45° C durante 10 minutos y se pasó a través de un papel de filtro Whatman nº 2. Se lavó el pigmento en el filtro con 12 ml de una solución de metanol-agua (50:50) a 45° C, seguido de tres lavados sucesivos con 9 ml de agua a 65° C, para finalizar con un lavado en una solución de 9 ml de etanol-agua (50:50) a temperatura ambiente. El material se secó bajo una corriente de nitrógeno. El material purificado pesó 0,10 gramos y tras un análisis mostró 55% de carotenoides totales, de los cuales se detectó que un 97% eran zeaxantina y un 1,1% eran luteína. Ello representa un rendimiento del 20,6% de carotenoides totales y el material se purificó desde 0,89 g/kg hasta 550 g/kg casi 618 veces.

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de xantofilas libres que comprende:
el suministro de una oleorresina derivada de plantas;
la saponificación de la oleorresina derivada de plantas para obtener una resina saponificada;
5 el lavado de la resina saponificada con una solución de sal;
la repetición del lavado con la solución de sal hasta que el pH de la resina esté comprendido entre 6,5 y 9;
el lavado de la resina con un disolvente no polar para eliminar los componentes lípidos;
el lavado de la resina al menos una vez con un disolvente de polaridad incrementada;
el lavado de la resina con agua para eliminar el disolvente; y
10 el filtrado y/o secado de la resina para obtener xantofilas libres.
2. El método de la reivindicación 1, en el que se proporciona la oleorresina mediante los pasos que comprenden:
el tratamiento de un homogeneizado de plantas con un disolvente de polaridad incrementada para una purificación inicial;
15 el filtrado del homogeneizado para obtener un material precipitado; y
la extracción del material precipitado con un disolvente no polar.
3. El método de la reivindicación 2, que además comprende: la concentración del extracto en los extractos de disolventes no polares y el lavado del concentrado con agua.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 3, en el que:
20 la oleorresina derivada de plantas se deriva del cempasúchil o clavelón de la India (*Tagetes erecta*) o de bayas *Lycium chinensis*, y/o
la planta es *Lycium chinensis* y las xantofilas son predominantemente zeaxantina.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 4, en el que la solución de sal:
comprende una sal de sodio o potasio con una concentración del 5% al 15%; y/o
25 es una sal de sodio y en el que la sal de sodio es cloruro de sodio.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 5, en el que:
al menos uno de los lavados con solución de sal es acidificado; y/o
el último lavado con solución de sal es acidificado.
7. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que al menos uno de los lavados con solución de sal es acidificado con 2-3% de ácido fosfórico.
30
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 7, en el que el disolvente de polaridad incrementada es una solución de agua/alcohol o una solución de agua/acetona.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 8, en el que se lava la resina con el disolvente de polaridad incrementada 2-4 veces y en el que la polaridad del primer lavado es inferior a la polaridad del último lavado.
35
10. El método de la reivindicación 9, en el que el disolvente de polaridad incrementada es acidificado.
11. El método de la reivindicación 10, en el que la resina se lava al menos una vez con un disolvente de polaridad incrementada que está acidificado con un 1-3% de ácido fosfórico.
12. El método de la reivindicación 11, en el que el disolvente de polaridad incrementada comprende una solución acidificada de agua/metanol (10:90).
40

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 12, en el que la planta es cempasúchil y las xantofilas libres comprenden al menos un 60% de luteína libre.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 13, en el que el disolvente no polar es hexano.

5 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones comprendidas entre la 1 y la 14, en el que:

el paso final de secado también incluye la adición de una mezcla de alcohol-agua para facilitar la eliminación de agua; y/o

el lavado de la resina con el disolvente de polaridad incrementada comprende adicionalmente un paso de filtrado.

10

Proceso mejorado para la purificación de luteína

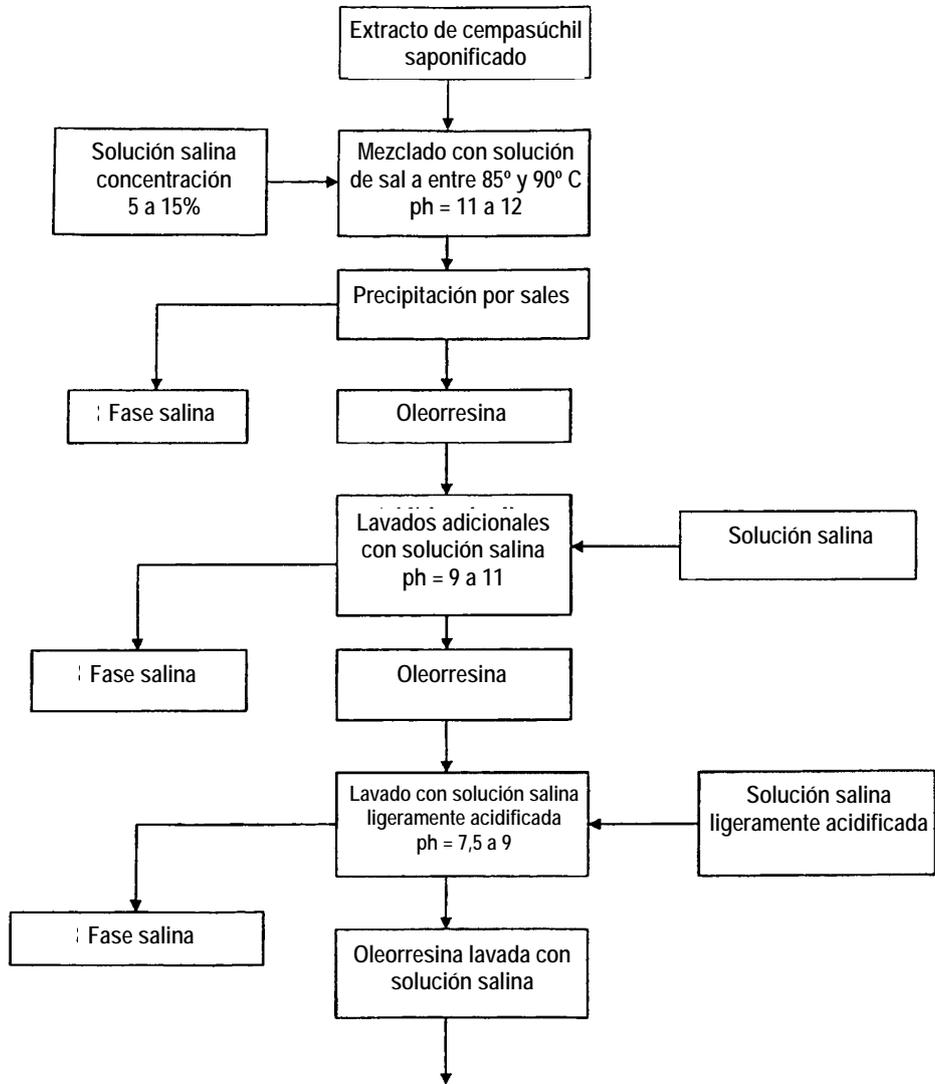


FIGURA 1

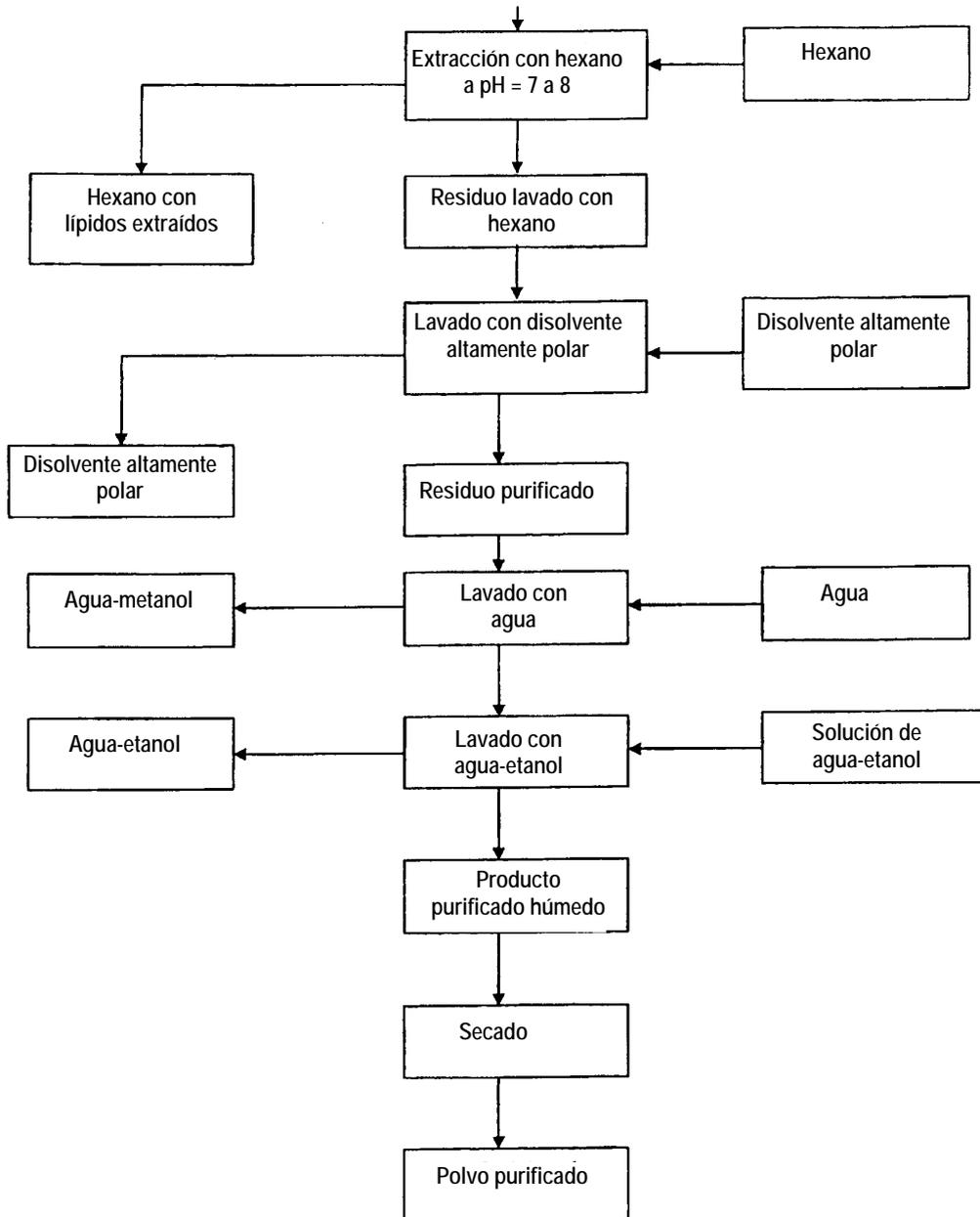


FIGURA 2