

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 868**

51 Int. Cl.:

C11C 3/04 (2006.01)

C11B 1/04 (2006.01)

A23K 1/14 (2006.01)

C10L 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2009 E 09806111 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2373772**

54 Título: **Procedimiento de trituración reactiva de semillas de ricino**

30 Prioridad:

05.01.2009 FR 0950009

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

21.03.2014

73 Titular/es:

**ARKEMA FRANCE (100.0%)
420, rue d'Estiennes d'Orves
92705 Colombes , FR**

72 Inventor/es:

**DUBOIS, JEAN-LUC;
MAGNE, JULIEN;
BARBIER, JACQUES y
PICCIRILLI, ANTOINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 449 868 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 de trituración reactiva de semillas de ricino.

La presente invención se refiere a un procedimiento de trituración reactiva de semillas de ricino que permite, partiendo de semillas de ricino específicamente acondicionadas y en presencia de alcohol ligero y de catalizador básico, efectuar una sola etapa la trituración y la reacción de transesterificación de los triglicéridos presentes en el aceite de ricino, para obtener de manera simultánea un turtó, glicerol y ésteres de ácidos grasos, particularmente de ácido ricinoleico. Estos últimos se utilizan principalmente en la fabricación del ácido 11-amino undecanoico, monómero constitutivo de Rilsan® 11, que es una poliamida con propiedades físicas excepcionales, desarrollado por la solicitante. Además, el procedimiento según la invención permite obtener un turtó completamente desintoxicado y desalergenizado en el que la toxina y el alérgeno se han inactivado. Los turtós obtenidos por el procedimiento de tratamiento de semillas de ricino según la invención mantienen un interés nutricional y pueden utilizarse directamente en alimentación animal, sin constituir un peligro para la salud de las personas que los manipulan.

Se sabe preparar, a partir de semillas de plantas oleaginosas, ésteres de ácidos grasos, en dos etapas, es decir una etapa de extracción de aceite en presencia de disolvente y una etapa de transesterificación de este aceite en presencia de alcohol y catalizador, para obtener una fase éster y una fase glicerol.

Los documentos US 7 112 229 y US 2005/0011112 de Petrobas describen un procedimiento de obtención de ésteres de ácidos grasos para una aplicación biodiesel. El procedimiento descrito se realiza únicamente en modo discontinuo (reacción en lecho agitado). El procedimiento se realiza a partir de semillas de plantas oleaginosas ricas en aceites (que tienen un contenido de triglicéridos que varía del 15 al 70 % en peso). Este procedimiento comprende una etapa previa de acondicionamiento de las semillas, durante la cual:

- las semillas se descascarillan y después se limpian con un tamiz vibrador,
- las semillas limpias se secan para reducir su contenido de humedad a menos del 0,5 % en peso.

Las semillas secas se introducen en un reactor con alcohol anhidro; esta mezcla heterogénea se transforma en una suspensión homogénea mediante un agitador. Es entonces cuando un catalizador básico se introduce en el reactor. A continuación esta mezcla de reacción se calienta durante 30 a 90 minutos a una temperatura de 30 a 78 °C, lo que conduce a la transesterificación de los triglicéridos en ésteres con un índice de conversión elevado, comprendido entre el 98 y 100 %.

Sin embargo, este procedimiento presenta los siguientes inconvenientes:

- sobrecoste de producción vinculado al uso de un equipo de descascarillado;
- generación de productos secundarios sólidos de escaso valor añadido (cáscaras);
- mala estabilidad mecánica del turtó;
- formación de restos responsables de la obstrucción de los filtros;
- en el caso de semillas de ricino, peligro tóxico y alérgico debido a la tendencia de los restos secos a dispersarse en el aire del ambiente.

En efecto, la semilla de ricino contiene, además de una poderosa toxina (el ricino), alcaloides tóxicos tales como ricinina y ricidinina, así como una proteína muy alergénica (CB-1A) que, activa a concentraciones del orden de ppm (cuando su concentración en peso es del 6,1 al 9 % en la semilla descascarillada desgrasada y del 0,09 al 4,2 % en los turtós comerciales desgrasados, según Anandan et al. Animal Feed Science & Technology, 120 (2005) 159-168) puede provocar reacciones cutáneas severas e irritaciones graves del sistema respiratorio en seres humanos. El calor destruye el ricino y por tanto puede inactivarse calentando el turtó. En lo que respecta a la ricinina y a la ricidinina, estas están presentes en muy pocas cantidades y no plantean problemas de toxicidad en la medida en que en el turtó de ricino solo intervienen en cantidades limitadas en la formulación de alimentos para el ganado.

Como consecuencia, el único punto crítico durante la valoración del turtó de ricino es la proteína alergénica CB-1A, que puede resistir la desnaturalización térmica. Con esta finalidad, se han efectuado numerosos estudios para desarrollar un método de desnaturalización de esta proteína; dando lugar la mayoría de ellos a tratamientos eficaces, aunque las proteínas restantes presentes en el turtó también se degradan y el turtó pierde entonces su interés nutritivo.

A partir del documento US 3.101.266 se sabe cómo realizar la desalergenización y desintoxicación de turtós de ricino mediante un tratamiento a base de una mezcla de agua y Ca(OH)_2 para obtener un pH de 9,5 a 12,5 en el turtó después de calentarlo durante 1 h a 100-120 °C. Para que este tratamiento sea eficaz, la concentración de Ca(OH)_2 debe ser al menos del 8 % en peso con respecto al peso del turtó para una temperatura de calentamiento mínima de 100 °C y al menos del 2 % para una temperatura de 120 °C. A pesar de que este procedimiento requiera una etapa complementaria larga y costosa, la adición de calcio contribuye a estabilizar los fitatos, compuestos

antinutricionales de los turtós según un proceso de formación de complejos en el que interviene el calcio y el ácido fítico y que conduce a la formación de sales estables, insolubles, no digeribles por el animal (ver la publicación de Mikic A. et al., « Anti-nutritional Factors in Some Grain Legumes », *Biotechnol. Anim. Husbandry* 25(5-6), 1181-1188, 2009). Esto lo confirma la publicación de Ekop A.S. et al, *E - J. Chem.* 5(4), 736-741,

5 Por tanto es deseable disponer de un procedimiento de tratamiento de semillas de ricino que permita inactivar, de manera sencilla, rápida y asequible, además del ricino, el potente alérgeno CB-1A, lo que posibilitaría por un lado, la manipulación sin peligro para el hombre, y por otro lado, el uso del turtó de ricino en alimentación animal. Esto es particularmente significativo para la economía de países que son grandes productores de aceite de ricino (India, China, Brasil), ya que aunque el aceite de ricino tiene múltiples usos industriales, los turtós de ricino aún no encuentran uso a escala industrial, particularmente debido a los problemas de alergias citados anteriormente.

15 La presente invención propone ofrecer un procedimiento de tratamiento de las semillas de ricino que limite el número de etapas del tratamiento de las semillas y la manipulación de turtó, con miras a una aplicación industrial en modo continuo para producir ésteres de ácido ricinoleico, y que permita destruir « en origen » la toxina y el alérgeno presentes en la semillas de ricino, conservando si fuese posible un valor nutritivo del turtó. Otra ventaja del procedimiento frente los procedimientos convencionales reside en la poca cantidad de agua que se requiere utilizar. Las operaciones de refinado del aceite bruto, por ejemplo, requieren mucha agua. Esta reducción de agua es una ventaja principal en el ámbito del desarrollo de esta tecnología en los países en vías de desarrollo y en menor medida en los países ricos ya que el agua tiende a ser una comodidad cada vez más costosa.

20 Para ello, la invención tiene por objeto un procedimiento de tratamiento de semillas de ricino, teniendo dichas semillas un índice de acidez inferior a 2 mg de KOH/g, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- i) una etapa de acondicionamiento de semillas;
- ii) una etapa de puesta en contacto de las semillas acondicionadas con un alcohol ligero anhidro y un catalizador alcalino en condiciones de temperatura y tiempo suficientes para permitir la extracción y la transesterificación simultáneas del aceite vegetal y conduciendo a la obtención de una mezcla que comprende ésteres de ácidos grasos y glicerol, y un turtó.

25 El procedimiento según la invención, permite hacer reaccionar « en la planta » el alcohol ligero con el aceite contenido en el núcleo de la semilla. En este procedimiento, el alcohol desempeña, de manera simultánea, la función de disolvente y de reactivo.

30 De manera característica, las semillas se acondicionan mediante una serie de operaciones que comprenden una etapa de aplanamiento y una etapa de secado de las mismas.

35 Según las condiciones empleadas, el procedimiento según la invención puede conducir directamente a la obtención de un turtó desintoxicado. En una variante de realización, el turtó se somete a una etapa de secado complementaria, en condiciones de temperatura y tiempo suficientes para inactivar el ricino y el alérgeno CB-1A. En otras variantes de realización, el turtó se mezcla, en estado húmedo, con turtós de sal (*Shorea robusta*), donde está embebido con soluciones de taninos y/o de polifenoles, durante un tiempo suficiente para inactivar el ricino y el alérgeno CB-1A.

Ventajosamente, el turtó tratado de esta manera pierde su carácter nocivo y puede manipularse sin peligro para el hombre para su uso en la alimentación animal.

40 En el ámbito de la presente invención por « semillas de ricino » se entiende que se refiere a semillas de plantas de ricino, solas o mezcladas con semillas que provienen de al menos otra planta oleaginosa, oleoproteaginosa o proteaginosa, comprendidas las semillas de sal, las semillas o la mezcla de semillas que producen un aceite que contiene al menos el 10 % en peso de ácido ricinoleico. No se saldrá del ámbito de la invención cuando las semillas aplicadas en el procedimiento según la invención provengan total o parcialmente de plantas modificadas genéticamente que producen el ácido ricinoleico, solas o mezcladas con plantas oleaginosas eventualmente modificadas genéticamente.

45 Las plantas oleaginosas se cultivan específicamente por sus semillas o sus frutos oleaginosos ricos en materias grasas de los que se extrae el aceite para su uso alimentario, energético o industrial. Las plantas proteaginosas pertenecen al grupo botánico de las leguminosas cuyas semillas son ricas en proteínas. Las plantas oleoproteaginosas son leguminosas cuyas semillas también contienen aceite.

Por « turtó de ricino desintoxicado » según la invención se entiende un turtó de ricino que presenta al mismo tiempo:

- 50 - un índice de desintoxicación de ricino de al menos 90 % y preferentemente de al menos 95 %, en actividad, cuando ese índice se mide mediante un ensayo cuantitativo, tal como mediante un ensayo ELISA, o del 100 % cuando ese índice se mide mediante un ensayo cualitativo.

- y un índice de inactivación del alérgeno CB-1A de al menos 50 % y preferentemente de al menos 75 %, en actividad, cuando ese índice se mide mediante un ensayo cuantitativo, o del 100 % cuando ese índice se mide mediante un ensayo cualitativo.

Por « índice de desintoxicación » de ricino se entiende el porcentaje de toxina inactivada en el turtó.

- 5 Por « índice de inactivación » de alérgeno CB-1A se entiende el porcentaje de alérgeno inactivado en el turtó.

Ventajosamente, el turtó de ricino según la invención se obtiene directamente al aplicar el procedimiento según la invención, su desintoxicación y su desalergenización no requieren etapas y/o reactivos complementarios. El turtó según la invención posee un nivel de iones Ca^{2+} que es inferior al 1,6 % en peso, preferentemente al 1 % en peso, con respecto al peso del turtó. Este índice difiere del descrito en el documento US 3.101.266 en que es superior al 1,6 % en peso con respecto al peso del turtó. En efecto, el nivel de iones Ca^{2+} medido en un turtó de ricino no tratado es del 0,6 % en peso, mientras que la adición de iones Ca^{2+} mediante una mezcla de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /agua por el procedimiento descrito en el documento citado anteriormente es de al menos el 1 % en peso.

Otras características y ventajas surgirán a partir de la descripción detallada del procedimiento de tratamiento de semillas de ricino según la invención indicado a continuación.

- 15 La invención tiene por objeto un procedimiento de tratamiento de semillas de ricino, solas o mezcladas con semillas que provienen de al menos otra planta oleaginosa, oleoproteaginosa o proteaginosa, teniendo dichas semillas un índice de acidez inferior a 2 mg de KOH/g, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- i) una etapa de acondicionamiento de las semillas sin descascarillado previo;
- ii) una etapa de puesta en contacto de las semillas acondicionadas con un alcohol ligero anhidro y un catalizador alcalino en condiciones de temperatura y tiempo suficientes para permitir la extracción y la transesterificación simultáneas del aceite vegetal y conduciendo a la obtención de una mezcla que comprende ésteres de ácidos grasos y glicerol, y un turtó;

caracterizado porque las semillas se acondicionan mediante una serie de operaciones que comprenden una etapa de aplanamiento y una etapa de secado de las mismas.

- 25 El aceite de ricino comprende, como componente principal, tricinoleato de glicerol. El ácido ricinoleico es un ácido graso hidroxilado. Ningún otro aceite natural conocido contiene una proporción tan elevada de ácidos grasos hidroxilados. Es esta composición característica de glicéridos lo que diferencia al aceite de ricino de cualquier otra grasa y aceites vegetales y la que le otorga sus propiedades físicas y químicas notables. El aceite de ricino, no secante, posee de este modo el índice de viscosidad y la densidad más elevados entre todos los aceites naturales.
- 30 Estas propiedades se deben principalmente a los enlaces de hidrógeno formados entre los grupos hidroxilos. Por otro lado, el metanol es mucho más soluble en el aceite de ricino, pero desgraciadamente el glicerol también. Son estas propiedades las que imponen al aceite de ricino un comportamiento muy particular durante las reacciones químicas y que hacen que los procedimientos de transesterificación de los aceites vegetales « ordinarios » conocidos no puedan trasladarse sin más al aceite de ricino (Nota: por « aceite ordinario » se entiende los aceites no hidroxilados extraídos de plantas oleaginosas tales como girasol, colza, soja, cacahuete, olivo, sésamo, cártamo, coco, palma).

- 35 Otra particularidad de las semillas de ricino está relacionada con su fuerte toxicidad, debido principalmente a la presencia del ricino y del alérgeno CB-1A (como se ha indicado anteriormente). Después de la extracción del aceite, estos compuestos tóxicos se concentran en los turtós, haciendo que su manipulación sea problemática, o peligrosa, para el hombre.

El procedimiento según la invención permite resolver los numerosos problemas relacionados con la transesterificación del aceite de ricino. Este procedimiento permite producir ventajosamente, de manera simultánea, ésteres de ácidos grasos y glicerol y sin extracción previa del aceite, así como un turtó desintoxicado (no alergenizante y no conteniendo ricino activo).

- 45 El procedimiento según la invención permite pasar directamente de la semilla a los ésteres de ácidos grasos, en particular de ácido ricinoleico, evitando las etapas de trituración, refinado, purificación y la producción de productos secundarios. Los ésteres de ácido ricinoleico obtenidos por el procedimiento según la invención convienen particularmente para la preparación del ácido 11-amino undecanoico, como se ha mencionado anteriormente. Estos ésteres también convienen para la fabricación de biocarburantes. Por otro lado, el procedimiento conduce a la obtención de turtós desintoxicados, que pueden manipularse sin peligro para el hombre y que pueden utilizarse en la alimentación animal sin peligro de envenenamiento para los animales.

Etapa de acondicionamiento de las semillas

5 La primera etapa del procedimiento según la invención consiste en acondicionar las semillas de ricino, utilizadas solas o mezcladas con otras semillas de plantas oleaginosas, oleoproteaginosas o proteaginosas. Este acondicionamiento se efectúa en las semillas enteras y comprende una primera operación de aplanamiento de las semillas, seguido de una operación de secado de las semillas aplanadas.

10 El objetivo del acondicionamiento de la semilla es hacer que el aceite sea lo más accesible posible al alcohol, sin alterar demasiado su resistencia mecánica. Esto impide la formación de una pasta y de restos, respectivamente perjudiciales al realizar un procedimiento continuo y la purificación final de los ésteres producidos. Por otro lado, la semilla acondicionada debe permitir un paso fácil del fluido de reacción (mezcla alcohol-catalizador básico) de acuerdo con un simple fenómeno de percolación.

Según una variante de realización, las semillas frescas se aplanan en un aplanador mecánico de rodillos lisos o acanalados. Preferentemente, los rodillos utilizados son acanalados.

15 Las semillas así aplanadas se secan, por ejemplo en un horno con ventilación termostregulada o en un secador de banda continua o rotativo con aire caliente. El tiempo de secado y la temperatura se seleccionan para obtener una disminución de la humedad de las semillas a valores inferiores o iguales al 2 % en peso. Preferentemente, el secado se realiza rápidamente después del aplanamiento, en menos de una hora, preferentemente después de 5 a 10 minutos, a una temperatura suficiente para reducir el contenido de humedad de las semillas al 2 % en peso o menor.

20 La humedad residual de la semilla se determina por termogravimetría. La semilla se muele previamente, después la molienda obtenida se seca a 105 °C en una termobalanza hasta la estabilización del peso. El contenido acuoso se expresa en porcentaje de materia bruta.

25 En una variante de realización preferida, la etapa i) de acondicionamiento de las semillas comprende adicionalmente una operación de precalentamiento de las semillas, efectuada antes de la operación de aplanamiento. Esta operación de precalentamiento confiere a la semilla una plasticidad aún mayor y por tanto una compresión más eficaz durante el aplanamiento (aumento a nivel de la superficie de contacto, de la velocidad de percolación del alcohol y por tanto de su capacidad extractiva). Se realiza preferentemente a una temperatura inferior o igual a 100 °C.

Etapa de extracción y de transesterificación

30 Las semillas acondicionadas como se ha descrito anteriormente se ponen en contacto con un alcohol ligero anhidro y un catalizador alcalino en condiciones de temperatura y tiempo suficientes para permitir la extracción y la transesterificación del aceite vegetal y produciendo una mezcla que comprende ésteres de ácidos grasos y glicerol, y un turtó.

El alcohol ligero utilizado en la etapa ii) es un alcohol alifático inferior tal como metanol, etanol, isopropanol y *n*-propanol, y preferentemente es metanol.

35 El catalizador básico aplicado en el procedimiento se selecciona del grupo: sosa, sosa alcohólica, sosa sólida, potasio, potasio alcohólico, potasio sólido, metilato de sodio o de potasio, etilato de sodio o de potasio, propilato de sodio y de potasio, isopropilato de sodio y de potasio.

40 La reacción tiene lugar en un reactor de lecho fijo. Según un modo de realización, el reactor de lecho fijo es una columna de percolación termostregulada dotada de una rejilla. Una bomba permite suministrar a la columna una mezcla de alcohol-catalizador básica. El alcohol y el catalizador se añaden por tanto simultáneamente en el reactor, que se mantiene a una temperatura que varía de 30 a 75 °C, preferentemente a aproximadamente 50 °C. La proporción en masa del catalizador/alcohol/semillas está preferentemente comprendida en el intervalo de 0,001 a 0,01/0,1 a 5/1.

45 La alimentación se realiza en el cabezal del lecho; el líquido de reacción percola entonces a través del lecho y después se recupera en un tanque situado aguas abajo, debajo del lecho. Mediante bombeo, el líquido se reenvía al cabezal del lecho para difundirse de nuevo en el lecho. La duración del ciclo de recirculación de la mezcla alcohol/catalizador es de 15 a 60 minutos, preferentemente de 20 a 40 minutos. Al final del ciclo, la alimentación en líquido se detiene. Una parte del líquido aún presente en las semillas embebidas se recupera entonces por simple escurrimiento.

50 A continuación se realiza la extracción y el lavado de las semillas. Para ello, se suministra alcohol anhidro a la columna, que se difunde de nuevo por percolación sin recirculación ulterior del alcohol. La cantidad de disolvente se inyecta durante un periodo de tiempo determinado (del orden de 4 a 10 minutos), escurriéndose el líquido después durante un tiempo de 10 a 20 minutos. El líquido recuperado puede someterse a una etapa de neutralización por

adición de ácido, y después a una etapa de evaporación del alcohol, para conducir a una mezcla de fases que consisten en una fase más ligera rica en ésteres y una fase más densa rica en glicerol. Ninguna de estas fases contiene ricino o alérgeno.

5 La mezcla de fases se somete a una etapa de decantación (que consiste, por ejemplo, en una decantación estática en uno o más decantadores en paralelo o en serie, decantación centrífuga, combinación de decantación estática o centrífuga), que permite obtener una fase superior compuesta principalmente de ésteres grasos de ácido ricinoleico (fase éster) y una fase inferior compuesta principalmente de glicerina y agua (fase glicerina).

10 La fase éster se somete después a una secuencia que tiene como fin la recuperación de ésteres grasos de ácido ricinoleico, que comprende de manera conocida una etapa de lavado con agua seguido de una etapa de secado al vacío.

De acuerdo con otro modo de realización, la mezcla de fases líquidas recogidas se somete a una etapa complementaria de esterificación neutralizante, que consiste en:

- volver a añadir al conjunto de fases líquidas una cantidad de ácido fuerte, tal como ácido sulfúrico;
- calentar la fase líquida acidificada así obtenida, y
- 15 - purificar la fase éster como se describe anteriormente.

El éster del ácido ricinoleico obtenido de este modo se destina particularmente en la preparación de ácido 11-amino undecanoico, siguiendo el encadenamiento de reacciones indicado a continuación:

- pirolisis o craqueo del éster, particularmente metílico, del ácido ricinoleico, para obtener heptanal y undecilenato de metilo;
- 20 - hidrolizar el undecilenato de metilo para obtener ácido undecilénico;
- hidrobromuración del ácido undecilénico para obtener ácido 11-bromoundecanoico, y
- amidación del ácido 11-bromoundecanoico para obtener ácido 11-amino undecanoico.

25 En una variante de la realización, el éster del ácido ricinoleico obtenido del procedimiento según la invención puede utilizarse directamente de manera ventajosa en la síntesis del ácido 11-amino undecanoico. Cuando el éster del ácido ricinoleico no es suficientemente puro, puede ser necesaria una etapa de purificación complementaria, antes de someterlo a la reacción de pirolisis.

El ácido 11-amino undecanoico así obtenido está destinado principalmente a la síntesis por condensación de la poliamida 11 o Rilsan[®] 11.

Otro producto obtenido directamente del procedimiento según la invención es el turtó de ricino.

30 De acuerdo con una variante de realización, el turtó magro embebido de alcohol se seca en un horno con ventilación durante 4 horas a una temperatura inferior o igual a 200 °C, preferentemente inferior o igual a 150 °C e incluso más preferentemente inferior o igual a 120 °C. Esta etapa de secado tiene por objeto destruir el ricino y el alérgeno CB-1A que quedan en el turtó. En paralelo, esta etapa de secado permite eliminar del turtó el disolvente (alcohol) utilizado durante la extracción.

35 De acuerdo con otra variante de realización, el procedimiento según la invención no comprende etapa de secado del turtó a alta temperatura (temperatura superior a 120 °C); según las condiciones de realización, el ricino y el alérgeno CB-1A pueden estar inactivados gracias a los tratamientos físicos y/o químicos aplicados a las semillas de ricino durante las etapas de acondicionamiento y de extracción/transesterificación descritas anteriormente, de tal manera que la operación de secado del turtó a temperaturas elevadas no es útil. En este caso, el procedimiento solo
40 comprende una etapa de secado del turtó a temperaturas inferiores a 120 °C, para eliminar el disolvente (alcohol) utilizado durante la extracción, para permitir el uso de dicho turtó en la alimentación animal.

45 Por tanto, determinadas semillas ricas en taninos (derivados del ácido gálico y de otros ácidos polifenólicos) permiten, gracias a una interacción química de estas moléculas con las proteínas de ricino, desintoxicar y desalergénizar el turtó de ricino. La publicación de Gandhi et al (JAOCS, vol. 71, n° 8, 1994, páginas 827-831) describe un procedimiento para desintoxicar los turtós de ricino mezclándolos en estado húmedo con turtós de sal (*Shorea robusta*). Estos últimos contienen taninos adecuados para formar complejos con las proteínas solubles en agua, conduciendo así a la inactivación del ricino y del alérgeno CB-1A. En una variante de realización, el procedimiento según la invención también puede comprender una etapa complementaria de mezclado de turtós de ricino en estado húmedo con turtós de sal (*Shorea robusta*) en una proporción en peso que varía de 2 :1 a 1 :5.

50 Como alternativa también puede añadirse directamente taninos o polifenoles en forma de soluciones destinadas a embeber los turtós obtenidos por el procedimiento según la invención durante un tiempo suficiente para inactivar el

ricino y el alérgeno CB-1A.

Los turtós obtenidos de esta manera se someten a dosificaciones del ricino y del alérgeno CB-1A.

5 Se ha constatado que, en estas condiciones, el turtó de ricino está desintoxicado, es decir, presenta simultáneamente una tasa de desintoxicación en ricino de al menos 90 % y preferentemente de al menos 95 % en actividad, cuando esta tasa se mide mediante un ensayo cuantitativo, o del 100 % cuando esta tasa se mide mediante un ensayo cualitativo y sin poder sensibilizante debido al alérgeno CB-1A como se evalúa mediante un ensayo cualitativo tal como el ensayo LLNA.

10 El ensayo cualitativo de detección de ricino se utiliza para determinar el carácter activo o intacto del ricino en los turtós así como en las fases líquidas recuperadas después de la etapa extracción/transesterificación. Un ensayo de este tipo puede realizarse de acuerdo con la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), como por ejemplo el desarrollado por la sociedad EUROFINS con el código de análisis T/JJW7F. El límite de detección de este método es de 10 ng de ricino/ml.

15 Pueden utilizarse métodos conocidos de dosificación cuantitativa del ricino. A modo de ejemplo se cita el método descrito en la publicación: Becher F. et al. : « Detection of Functional Ricin by Immunoaffinity and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry » Anal. Chem. 2007, 79, 659-665, que presenta un límite de detección inferior a 0,1 ng/ml. También se citará el método de tipo ELISA desarrollado por el Comisariado de Energía Atómica (CEA), que permite cuantificar el ricino utilizando un kit de dosificación específico desarrollado para dosificar este tóxico.

20 Por otro lado, el alérgeno CB-1A puede dosificarse mediante un ensayo con precipitina, descrito, por ejemplo, en la publicación: J.R. Spies et al. : « The Chemistry of Allergens. Inactivation of the Castor Bean Allergens and Ricin by Heating with Aqueous Calcium Hydroxyde », Agric. Food Chem. 10 (2), 1962, 140-145. El poder sensibilizante cutáneo del turtó puede medirse ventajosamente mediante el método cualitativo del ensayo del ganglio linfático local (Local Lymph Node Assay, LLNA), método validado y recomendado por la Directiva CE n° 440/2008 (reglamento REACH) en el campo de la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas.

25 El procedimiento según la invención puede realizarse sin dificultad en modo continuo a escala industrial, por ejemplo mediante: un reactor-extractor de banda móvil que funciona en modo continuo (tipo de extractor De Smet); un filtro rotativo o una centrifugadora. Preferentemente la trituración reactiva se realiza con el metanol a contracorriente del turtó, en varias fases consecutivas.

30 El procedimiento de trituración reactiva según la invención está particularmente bien adaptado a mezclas de semillas, tales como las semillas de soja, jatrofa, cártamo, colza, sal, ya que las propiedades disolventes del éster metílico del ácido ricinoleico confieren al medio propiedades sinérgicas. Ventajosamente, el turtó de ricino que no puede utilizarse puro sino mezclado con otras proteaginosas, se mezcla entonces directamente con otras fuentes de proteínas.

35 Una mezcla de partida constituida por semillas de ricino (ricas en aceite) con semillas oleaginosas (ricas en proteínas) en una proporción que varía de 1:1 a 1:10, conduce, mediante el procedimiento según la invención, a una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos que contienen del 15 al 75 %, preferentemente del 30 al 75 % de éster metílico del ácido ricinoleico, particularmente apropiado para un uso como biocarburante. Por ejemplo, una mezcla de semillas de ricino con semillas de soja en una proporción de 1:9 produce una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos que comprenden el 38 % en peso de ésteres metílicos de ácido ricinoleico (ver ejemplo 7).

40 El procedimiento de trituración reactiva de semillas según la invención presenta múltiples ventajas.

45 Gracias a la etapa de acondicionamiento específico de las semillas, es posible aumentar la superficie de contacto para mejorar la percolación de la mezcla alcohol-catalizador y por tanto mejorar la extracción de lípidos y su transformación constitutiva en ésteres. No se requiere ninguna impregnación previa de las semillas acondicionadas. La fracción éster obtenida a partir de la mezcla que comprende ésteres de ácidos grasos y glicerol sirve particularmente para la fabricación de ácido 11-amino undecanoico, monómero utilizado en la síntesis de poliamida 11.

El hecho de partir de semillas enteras permite:

- por un lado, limitar enormemente la formación de restos, simplificando las etapas posteriores de filtración y limitando el riesgo alérgico y tóxico ya que los restos secos tienden a disiparse/dispersarse en el aire ambiente;
- 50 - por otro lado, obtener una buena estabilidad mecánica del lecho de semillas aplanadas (que formará el turtó), propiedad muy interesante si se desea realizar la reacción en un modo continuo.

Los turtós se obtienen directamente a partir de semillas, según el procedimiento de la invención. Estos turtós no son tóxicos para el hombre y por lo tanto pueden manipularse sin correr riesgos. Por otra parte, estos turtós conservan su integridad física (cohesión, resistencia mecánica) y presentan un valor nutritivo interesante, lo que les permite su uso en la alimentación animal.

- 5 La invención y sus ventajas se comprenderán mejor a partir de la lectura de los siguientes ejemplos proporcionados a modo puramente ilustrativo.

Ejemplo 1. Trituración reactiva de semillas de ricino con una extracción de metanol efectuada en 3 fases (procedimiento realizado en un reactor de lecho fijo)

10 Se acondicionaron 500 g de semillas frescas de ricino no descascarilladas en un triturador de tipo Henry con cilindros lisos que presentaban una separación fija de 0,05 mm.

Las semillas aplanadas presentaban forma de pétalos de 0,2 mm de espesor y un diámetro de 0,2 mm aproximadamente. Las semillas aplanadas se secaron a 60 °C durante 16 h. Su contenido final acuoso era del 1,3 % en peso.

15 En una columna de percolación termorregulada y de lecho fijo, estas semillas aplanadas y secas se pusieron en contacto con una mezcla de sosa y metanol, que contenía 0,5 % en peso de sosa con respecto a la semilla y que presentaba una proporción en peso de alcohol/semilla de 1,15. Las reacciones de extracción y de transesterificación se realizaron a una temperatura de 50 °C durante 30 minutos. El escurrimiento del lecho se efectuó durante 15 minutos. A continuación se realizó una extracción y un lavado de las semillas con metanol en tres fases y a contracorriente.

20 La fase líquida obtenida se sometió a una decantación para recuperar por un lado una fase más ligera rica en ésteres y por otro una fase más densa rica en glicerol. El rendimiento en ésteres fue del 77,2 %.

El turtó obtenido se sometió a un secado en un horno con ventilación a 120 °C durante 4 h. Se constató que el turtó magro estaba relativamente bien desgrasado, con un índice de materia grasa residual del 5,4 % (determinado según la norma NF ISO 659).

25 Ensayos efectuados para dosificar el ricino y el alérgeno CB-1A en el turtó muestran que el turtó está desintoxicado.

Ejemplo 2. Caracterización de la semilla de ricino.

Se evaluaron tres lotes de semillas de ricino en relación con sus índices de peso de materias volátiles, materia grasa, sus índices de acidez de materia grasa (expresados en mg de KOH/g) y su contenido en ricino (expresado en mg de ricino/kg semillas). Los resultados obtenidos figuran en la Tabla 1.

30 Tabla 1

Características	Método	Lote 1	Lote 1B (2)	Lote 3
Materias volátiles, %	NF ISO 665	5,2	5,6	5,2
Materia grasa, % MS	NF ISO 659	52,2	54,0	52,2
Acidez de la materia grasa, mg KOH/g	EN 14104	0,6	2,6	0,6
Contenido en ricino, mg/kg	Elisa (1)	no investigado	18 000 (3)	no investigado
(1) Método ELISA CEA (véase más adelante el ejemplo 5).				
(2) El lote 1 B corresponde al lote 1 después de 12 meses de almacenamiento.				
(3) Medida efectuada en un pétalo de semilla deslipidada obtenido según el modo operativo descrito más adelante en el ejemplo 4				

Estos resultados muestran que los lotes 1 y 3 son poco ácidos (IA < 1 mg KOH/g) mientras que el lote 1B, que corresponde al lote 1 después de 12 meses de almacenamiento, se vuelve fuertemente ácido (IA > 2 mg KOH/g).

Ejemplo 3. Acondicionamiento del copo de la semilla de ricino

35 La semilla de ricino procedente de erizos de ricino - semilla constituida por una cáscara fibrosa que contiene una almendra cubierta por una piel fina (cutícula) - se aplanada tal cual (semilla entera) utilizando un aplanador de cilindros acanalados, de acuerdo con un procedimiento de doble aplanamiento descrito en la tabla 2. Esta operación se realiza pasando el aplanador dos veces para obtener un pétalo de semilla de ricino. Después del aplanamiento, el pétalo se seca en un horno con ventilación con una corriente de aire caliente a 100 °C durante 16 horas para conseguir una humedad residual inferior al 2 %.

40

Tabla 2

Equipo	1 ^{er} aplanamiento		2 ^o aplanamiento	
	Velocidad de rotación (vueltas/min)	Espacio intercilindros (mm)	Velocidad de rotación (vueltas/min)	Espacio intercilindros (mm)
Aplanador de cilindros Ø 240 mm, sin acanaladura 1 estría/cm	430	0,1	430	0,1
Grosor medio del pétalo (mm)	0,4 a 0,6 mm		0,3 a 0,5 mm	
Longitud (mm)	3 a 4 mm		2 a 3 mm	

Ejemplo 4. Obtención del copo deslipidado

5 La deslipidación del pétalo de semilla de ricino se realiza en presencia de hexano en un equipo de tipo Soxhlet según el método NF ISO 659 convencional. Después, el disolvente del pétalo deslipidado se elimina con una corriente de aire caliente en un horno con ventilación, a 60 °C durante 10 horas.

Ejemplo 5. Dosificación del ricino según un ensayo Elisa

10 Se pesan exactamente 250 mg de pétalo de semilla de ricino o de turtó, previamente triturados (granulometría media: Ø = 1 mm). A estos 250 mg se añaden 5 ml de un tampón de extracción compuesto por 100 mM de fosfato de potasio (pH 7,4), 0,15 M de cloruro de sodio, 0,1 % de BSA (albúmina de suero bovino) y 0,01 % de azida sódica. La solución obtenida se incuba después durante 1 hora agitando durante 10 minutos. El sobrenadante se recupera después por sedimentación y se centrifuga durante 15 minutos a 15000 vueltas/minuto. Finalmente se recupera el sobrenadante para una dosificación de lectinas, usando un kit de dosificación tal como el desarrollado por el Comisariado de la Energía Atómica (Centro de Estudios de Saclay Francia), dosificación realizada de la siguiente manera:

- 15 - diluciones en serie de 10 en 10 de sobrenadantes en un tampón de dilución de composición idéntica al tampón de extracción;
- primera dilución 1/100, 6 diluciones por muestra;
- una vez determinada esta concentración, se realiza una nueva dosificación con diluciones de 3 en 3, y 8 diluciones por muestra.
- 20 Se evaluó un lote de pétalos deslipidados de semillas de ricino (lote 1B) tales como los preparados en el ejemplo 4 y el turtó obtenido del procedimiento de trituración reactiva del ensayo 09-E08 previamente calentado en el horno a 120 °C durante 4 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Producto ensayado	Ricina (%/materia bruta)	Tasa de reducción con respecto al pétalo deslipidado (%)
Pétalo de semilla de ricino deslipidado	1,8	-
Turtó del ensayo 09-E08 (ver ejemplo 6.1)	$8,6 \times 10^{-4}$	99,95

25 Se constata que el ricino inicialmente presente en el pétalo deslipidado tiene un contenido elevado (1,8 %), apenas presente en el turtó obtenido a partir del procedimiento de trituración reactiva (contenido muy bajo $<10^{-3}$ %), o más de 2000 veces más bajo que inicialmente.

Ejemplo 6. Ensayos de trituración reactiva

30 El copo previamente seco se introduce en una columna de percolación termorregulada dotada de una rejilla de soporte (lecho con soporte). La temperatura de la columna se regula a 50 °C. Una bomba permite suministrar a la columna una mezcla de reacción metanol-sosa o de metanol anhidro. El suministro se realiza en el cabezal del

lecho. El líquido de reacción percola entonces a través del lecho y después se recupera en un tanque situado aguas abajo, debajo del lecho de copo. Por bombeo, el líquido se reenvía al cabezal del lecho para su difusión de nuevo en el lecho de copo. La duración del ciclo de recirculación de la mezcla es de 30 minutos y se considera que es igual a la duración de la reacción.

- 5 Al final del ciclo, el suministro del líquido se detiene. Una parte del líquido aún presente en el copo embebido se recupera entonces por simple escurrimiento (duración 15 minutos).

10 En una segunda etapa, se realiza la extracción y el lavado del copo. Para esto, se suministra a la columna metanol anhidro que se difunde de nuevo por percolación sin recirculación posterior de metanol. La cantidad necesaria de disolvente se inyecta durante un tiempo de 5 minutos, a continuación el líquido gotea durante 15 minutos. De este modo se realizan 5 ciclos de lavado. El turtó magro embebido de alcohol se seca después en un horno con ventilación a 120 °C durante 4 horas.

15 Las fases líquidas obtenidas bien después de la reacción o bien después de los lavados del turtó por el metanol anhidro, se juntan para purificarse. Primero se elimina el metanol por destilación al vacío usando un evaporador rotativo (90 °C a un vacío final de 4.000 Pa (40 mbar)). A continuación, la fase grasa recuperada se centrifuga (4500 vueltas/min) durante 5 minutos para separar el éster de la glicerina en bruto. El éster se lava finalmente con agua desmineralizada a una temperatura de 90 °C, hasta neutralidad de las aguas de lavado. El éster se seca finalmente a una temperatura de 90 °C a un vacío de 4.000 Pa (40 mbar).

Ejemplo 6.1. Influencia de la cantidad de catalizador básico de trituración reactiva

20 Se realizaron ensayos de cantidad variable de catalizador empleado en la reacción de trituración reactiva (sosa); los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Se observa que, para una cantidad de 0,3 % de catalizador, se obtiene un rendimiento máximo de ésteres metílicos (87,1 %), mientras que con 0,1 % de catalizador, el rendimiento obtenido es más bajo (57,5 %). Los rendimientos de glicerina son muy superiores al 100 %, indicando que la glicerina recuperada está muy cargada de impurezas: agua, sales, jabones, materia grasa polar, hidratos de carbono.

Tabla 4

Criterio	ENSAYO 09-E08	ENSAYO 09-E11	ENSAYO 09-E12
Masa de pétalos de semilla de ricino de lote 1B, g	350	350	350
Masa de metanol, g	700	700	700
Masa de sosa empleada, g	1,1	0,7	0,35
Proporción en peso metanol/pétalo	2	2	2
% de catalizador con respecto al pétalo	0,30	0,20	0,10
Rendimiento de ésteres metálicos, %	87,1	86,3	57,5
% de materia grasa en el turtó magro, % de equivalentes de ésteres metílicos	2,6	3,5	3,7
Pérdida de ésteres (valor calculado)**, %	10,3	10,2	38,8
Rendimiento de glicerina, %	161	153	203
** pérdida de ésteres = [masa teórica de ésteres] - [masa de ésteres producidos] - [masa potencial de ésteres en el turtó magro]			

Los ésteres purificados obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron (tabla 5).

Tabla 5

Criterio	ENSAYO 09-E08	ENSAYO 09-E011	ENSAYO 09-E12
% de catalizador con respecto a pétalo	0,3	0,2	0,1
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,46	0,52	0,60
Contenido de MeC16 (%)	0,85	0,75	0,50
Contenido de MeC18 :2 (%)	2,90	3,02	1,92
Contenido de MeC18 :1 (%)	3,46	2,09	1,08
Contenido de Me C18 :0 (%)	0,96	0,71	0,73
Contenido de Ricinoleato de metilo (%)	90,65	73,16	49,80
Contenido de Monoglicérido (%)	1,19	16,14	12,22
Contenido de Diglicérido (%)	nd	0,80	4,28
Contenido de Triglicérido (%)	nd	0,38	28,77
nd : no detectado			

5 Para cantidades de 0,1 y 0,2 % de catalizador, los ésteres producidos presentan cantidades modestas de ricinoleato de metilo (<75 %) e inversamente elevadas de productos secundarios indeseables, en este caso mono, di y triglicéridos. A la inversa, en presencia de 0,3 % de catalizador, la cantidad de ricinoleato de metilo es elevada (>90 %) y los glicéridos se han transformado muy correctamente: 1,2 % de monoglicéridos y una ausencia total de di y triglicéridos. En presencia de 0,3 % de catalizador, los ésteres obtenidos presentan la acidez residual más baja. Por último se constata la robustez del procedimiento que permite transesterificar directamente, con un rendimiento apreciable, aceites de semillas que presentan acidez elevada (>2 mg KOH/) incompatibles con los procedimientos clásicos.

10

Ejemplo 6.2. Influencia de la cantidad de alcohol

Se realizaron ensayos con cantidades variables de alcohol (tabla 6).

De estos resultados se obtiene que la cantidad de alcohol empleada no tiene ningún efecto relevante sobre el rendimiento global de ésteres metílicos.

Tabla 6

Criterio	ENSAYO 09-E25	ENSAYO 09-E08
Masa de pétalos de semilla de ricino del lote 1B, g	280	350
Masa de metanol empleada en la etapa de trituración reactiva, g	700	700
Masa de sosa empleada, g	0,84	1,1
Proporción en peso metanol/pétalo	2,5	2,0
% de catalizador con respecto a pétalo	0,30	0,30
Masa de metanol empleada durante las etapas de lavado del pétalo (en 5 pases), g	1400	1750
Rendimiento de ésteres metílicos, %	88,7	87,1
% de materia grasa en el turtó magro, % de equivalentes de ésteres metílicos	4,3	2,6
Pérdida de ésteres (valor calculado)** , %	7,0	10,3
Rendimiento de glicerina, %	141,3	161
**pérdida de ésteres = [masa teórica de ésteres] - [masa de ésteres producida] - [masa potencial de ésteres en el turtó magro]		

Los resultados que figuran en la siguiente tabla 7 muestran que la acidez final de los ésteres mejora cuando se emplea más alcohol.

Tabla 7

Criterio	ENSAYO 09-E25	ENSAYO 09-E08
<i>Proporción en peso metanol/pétalo</i>	2,5	2,0
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,23	0,46
Contenido de MeC16 (%)	1,01	0,85
Contenido de MeC18:2 (%)	3,98	2,90
Contenido de MeC18:1 (%)	3,14	3,46
Contenido de Me C18 :0 (%)	0,85	0,96
Contenido de Ricinoleato de metilo (%)	89,19	90,65
Contenido de Monoglicérido (%)	1,82	1,19
Contenido de Diglicérido (%)	0,00	nd
Contenido de Triglicérido (%)	0,00	nd
nd : no detectado		

Ejemplo 6.3. Influencia de la duración del ciclo de reacción

- Se realizó un ensayo duplicando el tiempo de pase (o tiempo de contacto) de la solución alcohólica y catalítica sobre el lecho de pétalos de semilla, es decir duplicando la duración de la reacción. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 8.

Tabla 8

Criterio	Ensayo 09-E26	Ensayo 09-E08
Masa de pétalos de semilla de ricino del lote 1B, g	350	350
Masa de metanol	700	700
Masa de sosa empleada, g	1,1	1,1
Duración del ciclo de reacción (tiempo de contacto), min	60	30
Proporción en peso metanol/pétalo	2,0	2,0
% de catalizador con respecto a pétalo	0,3	0,3
Rendimiento de ésteres metílicos, %	90,4	87,1
% de materia grasa en el turtó magro, % de equivalentes de ésteres metílicos	4,5	2,6
Pérdida de ésteres (valor calculado)** , %	5,1	10,3
Rendimiento de glicerina, %	137	161
**pérdida de ésteres = [masa teórica de ésteres] - [masa de ésteres producida] - [masa potencial de ésteres en el turtó magro]		

Estos resultados muestran que el aumento de tiempo del ciclo de reacción permite aumentar el rendimiento global de ésteres metílicos. Del mismo modo, el rendimiento de glicerina disminuye inversamente al tiempo de contacto, lo que parece indicar una presencia menos significativa de impurezas en la glicerina.

Tabla 9

Criterio	ESSAI 09-E25	ESSAI 09-E08
<i>Duración del ciclo de reacción (tiempo de contacto, min)</i>	60	30
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,29	0,46
Contenido de MeC16 (%)	0,71	0,85
Contenido de MeC18 :2 (%)	3,31	2,90
Contenido de MeC18 :1 (%)	2,90	3,46
Contenido de Me C18 :0 (%)	0,86	0,96
Contenido de Ricinoleato de metilo (%)	90,34	90,65
Contenido de Monoglicérido (%)	1,82	1,19
Contenido de Diglicérido (%)	0,05	nd
Contenido de Triglicérido (%)	0,00	nd
nd : no detectado		

- 5 Desde el punto de vista cualitativo, los resultados de la tabla 9 muestran que el aumento del tiempo del ciclo de reacción mejora la acidez residual de los ésteres finales pero no contribuye a mejorar la cantidad de monoglicéridos.

Ejemplo 6.4. Procedimiento de trituración reactiva de semillas de ricino que incluye una etapa de neutralización de ácidos grasos libres por esterificación

- 10 Se ensayó una variante del procedimiento añadiendo una etapa de esterificación neutralizante de las fases líquidas recogidas. Esta etapa comprende siguientes las operaciones unitarias:

- las fases líquidas del procedimiento se recogen y después se juntan;
- se realiza una medición de « extracto seco » de estas fases evaporando el metanol presente en una alícuota de fases líquidas. La masa del producto residual permite calcular la cantidad de « extracto seco » según la fórmula siguiente: «*Contenido de « extracto seco »*» = $100 \times [masa\ residual\ después\ de\ la\ evaporación\ del\ metanol] / masa\ de\ las\ fases\ líquidas\ antes\ de\ la\ evaporación$
- 15 - al conjunto de fases líquidas se añaden cantidades variables de ácido sulfúrico 2,5 N;
- después, la fase líquida acidificada se lleva a una temperatura de 50 °C durante 15 minutos;
- a continuación se efectúan las etapas unitarias clásicas de purificación de ésteres (evaporación de metanol, separación de glicerol, lavado de ésteres y secado) tal y como se describe en el ejemplo 5.

- 20 En el campo de estos ensayos, se ha empleado una semilla poco ácida (lote 3). A la vista de los resultados de la tabla 10, parece que en presencia de una semilla poco ácida, y sin la etapa de esterificación neutralizante, el rendimiento de ésteres es superior al 90 %. En las mismas condiciones, el rendimiento de glicerina disminuye a un valor de 124 % lo que indica que, como resultado de la saponificación parcial del catalizador, se forman menos jabones. Los valores en cursiva presentan una incertidumbre significativa (± 20 %) relacionados con la realización de
- 25 ensayos sobre alícuotas de fase líquida.

Desde el punto de vista cualitativo, los efectos de la etapa de esterificación neutralizante presentados a continuación en la tabla 11 muestran que:

- la acidez residual de ésteres finales tiende a aumentar ligeramente con la cantidad de ácido sulfúrico utilizada durante la etapa de esterificación neutralizante;
- 30 - por otro lado, la pureza en ricinoleato (producto diana) tiende a aumentar con la cantidad de ácido sulfúrico utilizada durante la etapa de esterificación neutralizante. Este resultado es concomitante con la disminución de monoglicéridos indeseables;

- un óptimo correspondiente al mejor compromiso entre, por un lado, el rendimiento y la pureza de ricinoleato de metilo, y por otro lado, la acidez residual de ésteres, se sitúa en el intervalo que varía del 0,1 % al 0,3 % de ácido sulfúrico empleado durante la etapa de esterificación neutralizante.

Tabla 10

Criterio	ENSAYO 09-E30-1	ENSAYO 09-E30-2	ENSAYO 09-E30-4	ENSAYO 09-E30-3
Masa de pétalos de semilla de ricino del lote 3, g		350		
Masa de metanol, g		700		
Masa de sosa empleada, g		1,1		
Duración del ciclo de reacción (tiempo de contacto), min		30		
Temperatura de reacción (°C)		50		
Proporción en peso metanol/pétalo		2		
% de catalizador con respecto a pétalo		0,30		
Esterificación neutralizante % H ₂ SO ₄ frente a contenido de extracto seco H ₂ SO ₄ 2,5N, ml	0,0 0,0	0,1 1,6	0,3 4,8	0,4 6,4
Rendimiento de ésteres metílicos, %	96,0	93±20	70±20	70±20
% de materia grasa en el turtó magro, % de equivalentes de ésteres metílicos	4,0	4,0	4,0	4,0
Pérdida de ésteres (valor calculado)** %	0	nd	nd	nd
Rendimiento de glicerina, %	124	90±20	90±20	90±20
**pérdida de ésteres = [masa teórica de ésteres] - [masa de ésteres producida] - [masa potencial de ésteres en el turtó magro]				
Nd - No determinado				

Tabla 11

Criterio	ENSAYO 09-E30-1	ENSAYO 09-E30-2	ENSAYO 09-E30-4	ENSAYO 09-E30-3
% de H ₂ SO ₄ frente a contenido de extracto seco	0,0	0,1	0,3	0,4
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,14	0,17	0,49	0,63
Contenido de MeC16 (%)	0,97	0,79	0,84	0,86
Contenido de MeC18 :2 (%)	3,76	3,37	3,52	3,55
Contenido de MeC 18:1 (%)	3,76	3,37	3,52	3,55
Contenido de Me C18 :0 (%)	1,31	1,30	1,20	1,36
Contenido de Ricinoleato de metilo (%)	87,65	89,52	90,55	90,32
Contenido de Monoglicérido (%)	2,11	1,59	0,33	0,32
Contenido de Diglicérido (%)	0,44	0,04	0,03	0,03
Contenido de Triglicérido (%)	0,00	0,00	0,00	0,00

Ejemplo 6.5. Evaluación de la toxicidad aguda y del poder sensibilizante de los pétalos y turtós de semillas de ricino producidos durante el procedimiento

Evaluación del poder sensibilizante

- 5 El poder sensibilizante de los turtós y de los pétalos deslipados de las semillas de ricino se evaluó de acuerdo con el ensayo denominado LLNA (*Local Lymph Node Assay*, ensayo del ganglio linfático local) conforme con las directrices de la OECD N° 429, del 24 de abril de 2002 y del Consejo de Regulación (EC) N° 440/2008, B.42, del 3 de mayo de 2008. Se encontró una buena correlación de poder alergenizante entre los umbrales determinados experimentalmente en ratón por el método del LLNA y los determinados en el ser humano por el método de ensayo de estimulación repetida con parche (*Human Repeated Insult Patch Test* (HRIPT, J.-P. Lepoittevin. Allergènes de contacts forts. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 48 (2008), 120-122). El método del LLNA se basa en la aplicación de la sustancia a ensayar en la oreja de un grupo de ratones los días 0, 1 y 2 y en la inyección de timidina tritiada el día 5. La medición de la incorporación de la radioactividad en los ganglios linfáticos permite medir la proliferación celular después de la exposición a la sustancia de ensayo. Por comparación con los métodos más antiguos de desalergenización de turtós de ricino, el método del LLNA es hoy en día totalmente reconocido e incluso recomendado por las autoridades europeas en el marco del Reglamento Comunitario REACH (Directiva CE).

20 Los ratones hembra seleccionados para el ensayo del LLNA son de la especie CBA/j convencional. Su edad el primer día de tratamiento está comprendida entre 8 y 12 semanas y su peso entre 18 y 25 g \pm 20 %. Para cada dosis, la cohorte está constituida por 3 ratones que viven en la misma jaula.

El reactivo utilizado para provocar la proliferación es la [³H] metil-timidina (³H-TdR; GE Healthcare, Les Ulis, Francia). Al menos 3 días antes de las inyecciones, la cantidad necesaria de ³H-TdR se diluye en NaCl al 0,9 % (20 μ Ci de ³H-TdR en 250 μ l y NaCl 0,9 % por animal). La solución obtenida se conserva a +4 °C protegida de la luz.

25 Se realiza un ensayo preliminar en cada animal para medir al micrómetro el grosor de la oreja después de cada aplicación y 72 horas antes de la última.

El vehículo más adecuado para la evaluación del poder sensibilizante de los turtós y pétalos deslipados de las semillas de ricino es una supresión homogénea de estos materiales de 10 y 25 % en propilenglicol.

30 Se evaluó un lote de pétalos deslipados de semillas de ricino tales como los preparados según el ejemplo 4 y el turtó obtenido del procedimiento de trituración reactiva del ensayo 09-E08 del ejemplo 6.1 previamente calentado en el horno a 120 °C durante 4 horas. De los resultados mostrados en la tabla 12 resulta que el turtó obtenido a partir del procedimiento de trituración reactiva según la invención ya no presenta poder sensibilizante contrariamente al pétalo deslipado que es fuertemente sensibilizante.

Tabla 12

Producto ensayado	Ensayo principal	
	Dosis máxima del ensayo (%)	Observaciones principales
Pétalo de semilla de ricino deslipidado	10(1)	Hiperproliferación linfocitaria atribuida a la hipersensibilidad de contacto conclusión: producto sensibilizante
Turtó de ensayo 09-E08	10	No se observa ninguna hiperproliferación linfocitaria conclusión: producto no sensibilizante

(1) dosis definida durante el ensayo preliminar tras la muerte de 2 animales de 3 después de la aplicación del producto formulado al 10 y 25 %. Por el contrario, el 3^{er} animal superviviente no ha desarrollado irritación en las orejas a la dosis del 10 % (dosis mantenida para el ensayo principal)

Evaluación de toxicidad aguda

La toxicidad aguda de los turtós y de los pétalos deslipidados de semillas de ricino se evaluó de acuerdo con las directrices de la OECD N° 423, del 17 de diciembre de 2001 y del Consejo de Regulación (EC) N° 440/2008, B.1 tris del 3 de mayo de 2008. Las ratas hembra seleccionadas para el ensayo de toxicidad aguda eran de la especie Sprague-Dawley convencional. El vehículo utilizado en la evaluación de los turtós y pétalos deslipidados de semillas de ricino era un polvo de metilcelulosa (0,5 %). La administración del producto se realizó desde el D0 al D8. Las dosis diarias administradas en los turtós y pétalos deslipidados de semillas de ricino fueron de 50, 300 y 2000 mg/kg de peso corporal. Para cada dosis, se constituyó un grupo de 3 ratas hembra.

Tabla 13

Producto	Dosis diaria (mg/kg)	Observaciones principales	DL50
Pétalo deslipidado de semilla de ricino	50	ninguna mortalidad el D8 ningún síntoma clínico ninguna anomalía histológica ningún aumento de peso	DL50>50
	300	ninguna mortalidad el D8 ningún síntoma clínico ninguna anomalía histológica ligero aumento de peso	DL50>300
	2000	Mortalidad del 100 % el D2 (pilo-erECCIÓN preliminar a la muerte)	300<DL50<2000
Turtó del ensayo 09-E08	50	ningún síntoma clínico del D2 al D8	DL50>50
	300	ningún síntoma clínico del D2 al D8	DL50>300
	2000	ningún síntoma clínico del D2 al D8 ligero aumento de peso	DL50>2000

Estos resultados muestran que la administración de pétalos deslipidados de semilla de ricino a ratas ocasiona una mortalidad del 100 % a la dosis de 2000 mg/kg el segundo día. Por otro lado, la administración del turtó obtenido a partir del procedimiento de trituración reactiva no ocasiona ninguna mortalidad de las ratas y ningún síntoma clínico a la dosis de 2000 mg/kg durante 8 días. Por consiguiente, el turtó está bien desintoxicado al final del procedimiento. Se observa incluso un aumento de peso con la dosificación más fuerte.

Ejemplo 7. Trituración reactiva en presencia de una mezcla de semillas oleaginosas

Se realizó un ensayo a partir de mezclas de semillas de ricino (lote 1) y soja.

Primero se analizó el lote de habas de soja para caracterizar el haba de soja. Los resultados presentados en la tabla 14 muestran que la semilla de soja aplicada es débilmente ácida (IA<2 mg KOH/g) y conforme con la bibliografía en relación con su contenido lipídico.

Tabla 14

Características	Método	haba de soja
Materias volátiles, %	NF ISO 665	11,3
Materia grasa, % MS	NF ISO 659	20,6
Acidez de la materia grasa, mg KOH/g	EN 14104	1,6

A continuación se realizaron ensayos de trituración reactiva en el haba de soja aislado y mezclado (tabla 15). Los resultados presentados muestran que:

- 5 - el haba de soja aislado simplemente aplanado de acuerdo con un proceso de doble aplanamiento conduce a un rendimiento mediocre de ésteres metílicos (39,2 %). El turtó obtenido en este ensayo es además rico en aceite.
- en presencia de pétalos de semillas de ricino (mezcla 50/50), se constata que el rendimiento de ésteres metílicos (52,3 %) es superior a la adición de los rendimientos respectivos obtenidos en presencia de semillas aisladas (44 % teórico);
- 10 - en presencia de mezcla de pétalos de ricino-soja 10/90, el rendimiento de ésteres metílicos (74 %) es ligeramente superior al de las semillas aisladas (70 % teórico).

El conjunto de estos resultados muestra que, a partir de una mezcla de pétalos de semillas, técnicamente es posible obtener un rendimiento apreciable de ésteres.

Tabla 15

Criterio / Ensayo	ENSAYO 09-E14	ENSAYO 09-E19	ENSAYO 09-E21
Masa de pétalos de semilla de ricino del lote 1B, g	0,0	175	35
Masa de pétalos de haba de soja, g	350	175	315
Proporción en peso pétalo de ricino/pétalo de soja	0/100	50/50	10/90
Masa de metanol, g	700	700	700
Masa de sosa empleada, g	1,1	1,1	1,1
Duración del ciclo de reacción (tiempo de contacto), min	30	30	30
Temperatura de reacción (°C)	50	50	50
Proporción en peso metanol/pétalo soja + ricino	1,15	2	2
% de catalizador con respecto a pétalos de soja + ricino	0,3	0,3	0,3
Rendimiento de ésteres metílicos, %	39,2	52,3	74,0
materia grasa en el turtó magro, % de equivalentes de ésteres metílicos	16,6	18,7	6,7
Pérdida de ésteres (valor calculado)** , %	44,2	29	19,3
Rendimiento de glicerina, %	303	262	202
** pérdida de ésteres = [masa teórica de ésteres] - [masa de ésteres producidos] - [masa potencial de ésteres en el turtó magro]			

Los ésteres obtenidos se analizaron y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje teórico de ácidos grasos.

Tabla 16

Criterio / Ensayo	ENSAYO 09-E14	ENSAYO 09-E19	ENSAYO 09-E21
<i>Proporción en peso pétalo de ricino/pétalo de soja</i>	0,0	50/50	10/90
Índice de acidez IA (mg KOH/g)	<0,1	0,41	0,11
Contenido de MeC16 (%)	10,22	2,20 (3,3)	6,39 (7,8)
Contenido de MeC18:2 (%)	30,01	4,88 (6,6)	34,64 (14,5)
Contenido de MeC18: (%)	47,11	14,11 (22,0)	16,66 (53,8)
Contenido de Me C18:0 (%)	9,19	1,35 (1,7)	2,57 (3,3)
Contenido de Ricinoleato de metilo (%)	nd	75,64 (66,3)	38,88 (20,7)
Contenido de Monoglicérido (%)	3,16	1,50	0,31
Contenido de Diglicérido (%)	0,21	0,11	0,10
Contenido de Triglicérido (%)	nd	nd	nd

5 **Ejemplo comparativo 8.** Procedimiento PETROBRAS de obtención de ésteres de ácidos grasos según el documento US 2005/0011112.

Las características de los reactivos y de la semilla aplicada en el ensayo se presentan en las tablas 17 y 18.

Tabla 17

Reactivos de semilla de ricino	Proveedor	Pureza (%)
Etanol anhidro	CIRON	99,9
Etilato de sodio	X	96
Semilla de ricino	Arkema	-

Tabla 18

Características	Método	Lote 3
Materias volátiles, %	NF ISO 665	5,2
Materia grasa, % MS	NF ISO 659	52,2
Acidez de la materia grasa, mg KOH/g	EN 14104	0,6

10 El ensayo se reprodujo tal y como se describe en el documento US 2005/0011112. Como catalizador se utilizó etilato de sodio al 96 %. Asimismo, como no se indica la dosificación de etilato, se ha considerado que el esquema del procedimiento ilustrado en la figura 1 de este documento expresaría un valor en equivalente de etilato, es decir 40 g. Igualmente, el ensayo se ha reproducido en presencia de una semilla seca al 0,5 % de humedad.

Las figuras 1 y 2 adjuntas y la tabla 19 presentan los balances de los materiales obtenidos. La figura 1 presenta el balance según el documento US 2005/0011112. La figura 2 presenta el balance según el ejemplo comparativo 8.

15 Las figuras 1 y 2 y la tabla 19 ponen de manifiesto una diferencia muy significativa sobre las masas de los productos y coproductos circulantes. Como ejemplo: + 250 % de etanol recuperado en el turtó, - 100 % de éster etílico y de glicerina puesto que ninguno de estos 2 productos diana se recupera, -40 % de extracto seco en la micela. El extracto seco de la micela es monofásico y licoroso (más viscoso que un éster etílico). No se obtiene ninguna decantación de glicerina.

20

Tabla 19

Rendimiento	Ejemplo según el documento US 2005/0011112	Ensayo comparativo	Diferencia entre los 2 ensayos (%)
Turtó seco, g	520	646	+ 24 %
Etanol recuperado del turtó, g	80	281	+ 250%
Extracto seco, g	560	337	- 40%
Éster etílico, g	505	0,0	- 100%
Glicerina, g	55	0,0	- 100%

Se realizó un análisis más profundo del extracto seco de micela determinando su contenido de éster etílico y de glicéridos (por CPG) así como el contenido de cenizas (la tasa de cenizas permite cuantificar la cantidad de sodio presente en forma de sales, jabones y catalizador no consumido). Se han obtenido los siguientes resultados:

- 5 - Ésteres etílicos: no detectados
 - Triglicéridos: 100 %
 - Diglicéridos: no detectados
 - Monoglicéridos: no detectados
 - Cenizas: 0,4 %.
- 10 Desde el punto de vista lipídico, el extracto seco de micela solo está constituido por triglicéridos no transformados en ésteres. La cantidad de cenizas indica que el sodio está débilmente presente en la micela y no en forma de jabones como podía suponerse. Probablemente el sodio debe estar atrapado en el turtó. Finalmente, el análisis cromatográfico no detectó la presencia de ésteres.
- 15 En conclusión, parece ser por tanto que el procedimiento descrito en el documento US 2005/0011112 no produce éster etílico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el tratamiento de semillas de ricino, teniendo dichas semillas un índice de acidez inferior a 2 mg de KOH/g y conteniendo ricino y alérgeno CB-1A, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
- 5 i) una etapa de acondicionamiento de semillas;
ii) una etapa de puesta en contacto de las semillas acondicionadas con un alcohol ligero anhidro y un catalizador alcalino en condiciones de temperatura y tiempo suficientes para permitir la extracción y la transesterificación del aceite vegetal y produciendo una mezcla que comprende ésteres de ácidos grasos y glicerol, y un turtó.
- caracterizado porque** la etapa i) comprende operaciones de aplanamiento y de secado de los granos.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa i) también comprende precalentar las semillas a una temperatura inferior o igual a 100 °C, efectuándose la operación de precalentamiento antes del aplanamiento.
3. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la operación de secado de las semillas aplanadas de la etapa i) se realiza rápidamente después del aplanamiento, en menos de una hora, preferentemente después de 5 a 10 minutos, a una temperatura suficiente para reducir el contenido de humedad de las semillas al 2% en peso o menor.
- 15 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa ii) comprende una primera reacción efectuada a una temperatura que varía de 30 a 75 °C, preferentemente a aproximadamente 50 °C, durante 15 a 60 minutos, preferentemente de 20 a 40 minutos, seguido de una extracción con alcohol efectuada en 3 a 9 fases y a contracorriente.
- 20 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la operación de aplanamiento se efectúa mediante un aplanador mecánico de rodillo.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las etapas i) y ii) se realizan en modo continuo.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el alcohol ligero es metanol y el catalizador alcalino es sosa.
- 25 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proporción en peso catalizador/alcohol/semillas comprende el intervalo de 0,001 a 0,01/0,1 a 5/1.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la mezcla que comprende ésteres de ácidos grasos y de glicerol se somete a una etapa de decantación que permite obtener una fase superior compuesta predominantemente de ésteres grasos de ácido ricinoleico y una fase inferior compuesta predominantemente de glicina y de agua.
- 30 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicha fase superior se somete a una sucesión de reacciones químicas que producen ácido 11-aminoundecanoico.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 10, en el que, cuando las semillas de ricino se mezclan con semillas oleaginosas en una proporción que varía de 1:1 a 1:10, se obtiene una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos que comprende del 15 al 75 %, preferentemente del 30 al 75 % en peso de ésteres metílicos de ácido ricinoleico.
- 35 12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicha mezcla de ésteres metílicos se utiliza como biocombustible.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el turtó obtenido se somete a una etapa de secado en condiciones de temperatura y tiempo suficientes para inactivar el ricino y el alérgeno CB-1A.
- 40 14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que el secado del turtó se efectúa en un horno con ventilación durante 4 h a una temperatura inferior o igual a 200 °C, preferentemente inferior o igual a 150 °C e incluso más preferentemente inferior o igual a 120 °C.
- 45 15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende mezclar el turtó de ricino en estado húmedo con turtós de sal (*Shorea robusta*).

16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende una etapa de adición de taninos y/o polifenoles, en forma de soluciones destinadas para sumergir los turtós obtenidos, durante un tiempo suficiente para inactivar el ricino y el alérgeno CB-1A.

5 17. Un turtó que puede obtenerse mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11 y 13 a 16, que presenta:

- un grado de desintoxicación de ricino de al menos 90 % y preferentemente de al menos 95 %, de actividad, como se mide por medio de un ensayo ELISA,
- ningún poder sensibilizante debido al alérgeno CB-1A, evaluado mediante el ensayo LLNA,
- y un nivel de iones Ca^{2+} que es inferior al 1% en peso con respecto al peso del turtó.

10 18. La utilización del turtó según la reivindicación 17 en la alimentación animal.

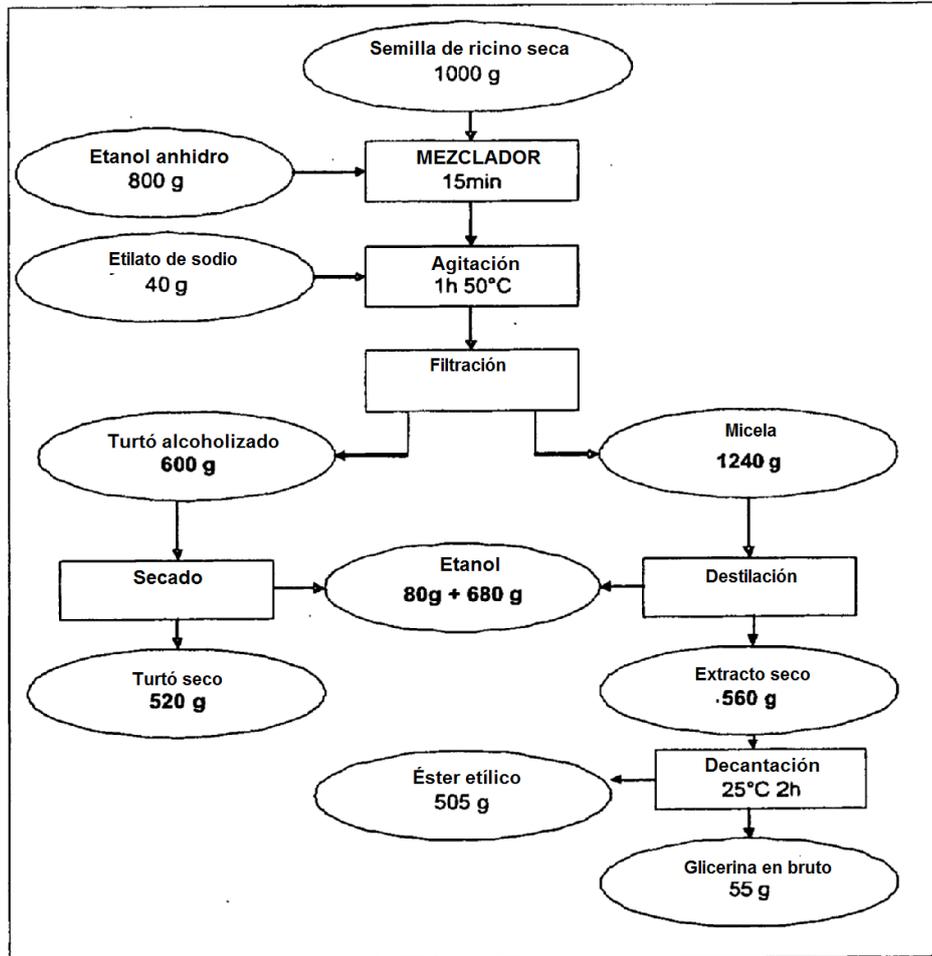


Figura 1

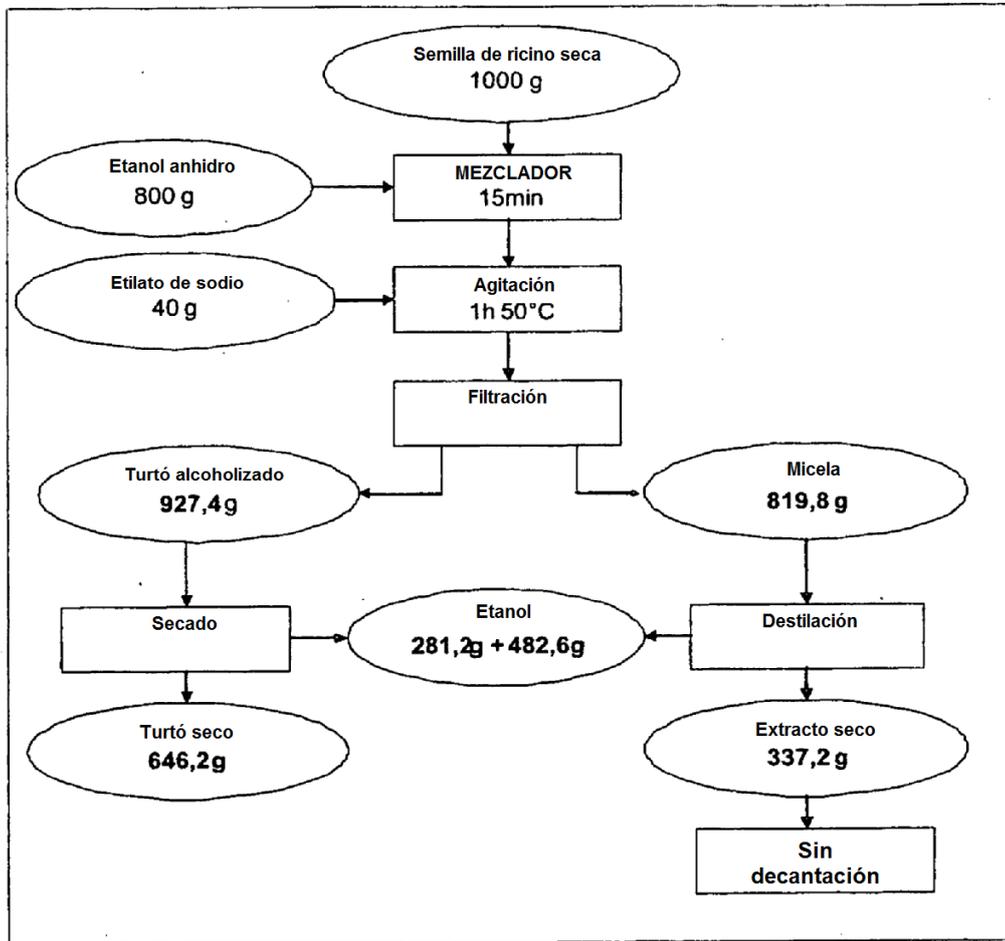


Figura 2