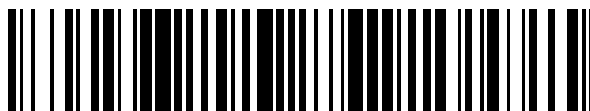


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 108**

51 Int. Cl.:

**C09B 61/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2011 E 11743643 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2571942**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento y purificación de carotenoides**

30 Prioridad:

**17.05.2010 IN CH13792010**

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

**05.09.2014**

73 Titular/es:

**DYNADIS BIOTECH (INDIA) PRIVATE LIMITED  
(100.0%)**

**23, II Floor, Vallalar Salai, Raja Rajeswari Nagar  
Puducherry 605 011, IN**

72 Inventor/es:

**JOSEPH, SURESH y  
ANANDANE, ARNAUD**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 491 108 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento y purificación de carotenoides

5 La presente invención se refiere al aislamiento y purificación de cristales de carotenoides derivados de diversas fuentes vegetales. La invención se refiere particularmente a un nuevo procedimiento de saponificación para el aislamiento y purificación de carotenoides a partir de diferentes oleorresinas con elevado contenido de carotenoides derivadas de vegetales y microorganismos.

### Antecedentes de la invención

10 Los carotenoides pertenecen a los grupos más ampliamente extendidos de pigmentos que se producen de forma natural denominados tetraterpenoides. Estos compuestos son ampliamente responsables del color rojo, amarillo y naranja de frutas y verduras y se encuentran también en muchas verduras verdes oscuras aparte de los vegetales superiores y estos carotenoides están presentes también en ciertos tipos de algas, hongos y bacterias.

Los carotenoides más abundantes disponibles entre las diversas fuentes de alimentos para consumo humano son beta-caroteno, alfa-caroteno, gamma-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, beta-criptoxantina y astaxantina.

15 El beta-caroteno, alfa-caroteno y beta-criptoxantina están presentes significativamente en las frutas y verduras de color naranja de tipo mango, melocotón, albaricoque y zanahorias. Las verduras de hojas verdes como las espinacas y las acelgas contienen también beta-caroteno, luteína y zeaxantina. El licopeno se encuentra en los tomates, sandías, guayabas y pomelo. El salmón, los mariscos y la yema de huevo se ha informado que contienen también carotenoides. Las microalgas como *Dunaliella Sp* y *Haematococcus sp* tienen un elevado contenido de beta-caroteno y astaxantina, respectivamente, análogamente hay una amplia gama de microorganismos capaces de proporcionar una buena fuente comercial de carotenoides naturales.

20

En los últimos días estos carotenoides naturales han logrado una importancia significativa como un ingrediente funcional natural en las industrias nutracéutica, alimentaria, cosmeceútica y de alimentos para animales. Diversos estudios muestran que estos carotenoides tienen propiedades terapéuticas potenciales y un uso potencial como sustancias colorantes naturales.

25 La creciente concienciación de la salud pública y las estrictas normas reguladoras sanitarias exigen ingredientes naturales, seguros y más sanos para diversos mercados y aplicaciones, por lo tanto, hay una necesidad de una tecnología verde más segura para el medio ambiente y de compuestos potencialmente menos peligrosos para la salud en la fabricación de estos productos naturales.

30 La presente innovación atiende a estos requisitos en una forma de proporcionar carotenoides naturales altamente concentrados preparados sin usar disolventes orgánicos tóxicos peligrosos en el procedimiento.

35 La saponificación o hidrólisis es el estado de la técnica conocido y seguido en las industrias de pigmentos naturales o fito-químicos durante varios años. La saponificación se lleva a cabo con el fin de romper y liberar el ácido graso unido a las moléculas activas y en un ejemplo típico los diésteres de ácidos grasos de luteína y zeaxantina están presente en las oleorresinas de las margaritas en la que la hidrólisis se realiza para liberar la forma libre de los carotenoides. Otro ejemplo es el licopeno extraído de la oleorresina de tomate y, todavía, otro ejemplo es la capsanteína derivada de la oleorresina de capsicum annum, análogamente, existen diversos ejemplos que se pueden proporcionar para este procedimiento.

40 Por tanto, la saponificación o hidrólisis implica diversos métodos que incluyen un álcali fuerte acuoso a diferentes temperaturas en presencia de un tensioactivo o emulsionante o en medio de álcali fuerte en disolvente orgánico o en un medio de álcali alcohólico o usando un medio de hidrocarburos. En general, los carotenoides son un componente no soluble en los medios de hidrólisis que resultan cristalizados y separados del medio.

45 La patente de EE.UU. nº 7.875.751 describe un método para la purificación de carotenoides a partir de extractos vegetales mediante saponificación y purificación, la saponificación se hace usando un disolvente polar metanol, etanol y 2-propanol y un disolvente no polar como hexano, pentano y heptanos en presencia de un álcali, adicionalmente los cristales son recuperados después de secar y purificar mediante recristalización en presencia de un disolvente soluble en agua y agua desionizada. El procedimiento es bastante complicado ya que implica disolventes orgánicos y múltiples etapas para la purificación.

50 La patente de EE.UU. nº 7.812.198 describe un procedimiento para la fabricación de una composición que contiene xantofilas saponificando un extracto de margarita y aislando las xantofilas en presencia de una base de amonio cuaternario.

La patente de EE.UU. nº 7.629.007 describe un procedimiento para la purificación de xantofilas libres, según esta descripción una oleorresina derivada de vegetales que xantofilas es saponificada usando un álcali, seguidamente la oleorresina se lava con una solución de sales varias veces antes de tratar con disolventes orgánicos para una purificación adicional y finalmente las xantofilas libres son filtradas y secadas.

- 5 La patente de EE.UU. nº 7.622.599 proporciona un método de aislamiento y purificación para carotenoides a partir de margaritas hidrolizando oleorresina de margarita usando un álcali alcohólico seguido de la precipitación de los cristales de carotenoides usando una mezcla hidro-alcohólica y adicionalmente los cristales se lavan para separar las impurezas y finalmente los cristales se filtran y se secan. Esta patente usa numerosos disolventes que generan corrientes de disolventes mixtos que son costosos a escala comercial de recuperar y separar.
- 10 La patente de EE.UU. nº 7.485.738 describe un método para preparar zeaxantina de contenido elevado y calidad alimenticia a través de una reacción de isomerización química a partir de luteína tratando cristales de xantofilas con glicol o propilenglicol con álcali orgánico para llevar a cabo la isomerización y adicionalmente los cristales de zeaxantina son precipitados en una mezcla de agua desionizada y alcohol para recoger cristales de zeaxantina.
- 15 La patente de EE.UU. nº 7.253.294 describe un procedimiento para el aislamiento de luteína a partir de alfalfa saponificando oleorresina de vegetales verdes para proporcionar una resina saponificada, que es tratada con un primer disolvente orgánico volátil hasta una sustancia aceitosa que es adicionalmente tratada con un segundo disolvente orgánico volátil para hacer derivar la luteína.
- 20 La patente de EE.UU. nº 7.271.298 describe un procedimiento para el aislamiento y purificación de cristales de xantofilas a partir de oleorresina de plantas, en que el procedimiento implica la saponificación de diésteres xantofilas que contienen oleorresinas de plantas con alcohol y álcali y neutralizar la mezcla añadiendo un ácido y lavando adicionalmente la mezcla con agua y alcohol para separar las impurezas y obtener los cristales de xantofilas.
- 25 La patente de EE.UU. nº 7.179.930 describe un método para preparar una pasta de luteína estable a partir de oleorresina mediante diversas etapas como disolver la oleorresina en un disolvente y una purificación mediante resina, seguidamente la saponificación de los ésteres usando un catalizador, tratar en una solución ácida, separar los sólidos, separar los ésteres y destilar la fracción alcohólica. Consecuentemente, el método descrito no es un método comercialmente viable debido al elevado número de etapas implicadas.
- 30 La patente de EE.UU. nº 7.173.145 describe un procedimiento para la extracción y purificación de luteína, zeaxantina y carotenoides raros en el que el método empleado tetrahidrofurano y un alcohol, preferentemente etanol, como disolventes de extracción. En este procedimiento no se usa ningún disolvente orgánico para la saponificación.
- 35 La patente de EE.UU. nº 7.138.152 expone un método para extraer carotenoides a partir de residuos de tratamientos de frutas y verduras, en el que el método implica mezclar el material de fuente de carotenoides con un primer disolvente orgánico y un tensioactivo para formar una suspensión y añadir seguidamente un segundo disolvente orgánico que solubiliza la combinación que seguidamente es separada en una fracción líquida y una fracción sólida y se lleva una separación adicional. El procedimiento no da explicaciones sobre la forma pura de los cristales y no consigue exponer el porcentaje de recuperación para los carotenoides.
- 40 La patente de EE.UU. nº 6.797.303 describe un procedimiento de extracción de carotenoides preparando una materia vegetal hasta más de grado diez y tratando seguidamente el material con un disolvente orgánico para extraer los carotenoides, la principal desventaja del procedimiento es que no se describe un rendimiento de pureza elevada ni una recuperación de cristales y además no se usa ninguno de dichos disolventes orgánicos para la extracción.
- 45 La patente de EE.UU. nº 6.743.953 describe un procedimiento de saponificación y una etapa de purificación final que implica disolventes múltiples como acetato de etilo, hexano, acetona y metanol con las posibilidades de residuos lábiles de los mismos en los productos finales.
- 50 La patente de EE.UU. nº 6.504.067 describe un procedimiento para limpiar oleorresina con álcali y seguidamente ácido y seguidamente la oleorresina es sometida a saponificación con álcali acuoso durante 8 horas en presencia de emulsionantes a una temperatura de 90 °C. La desventaja principal es el tiempo de saponificación más largo por lo que una exposición prolongada a calor puede provocar la degradación de la luteína.
- 55 La patente de EE.UU. nº 6.380.442 describe un procedimiento de saponificación para carotenoides usando alcohol isopropílico, agua y álcali.
- La patente de EE.UU. nº 6.329.557 un procedimiento industrial para obtener cristales de xantofilas a partir de oleorresina de margarita. Se usan cantidades grandes de disolvente orgánico como hexano y cetona en el procedimiento.
- La patente de EE.UU. nº 6.262.284 describe un método que usa THF (Tetrahidrofurano) y hidróxido de potasio o sodio alcohólico para aislar luteína y zeaxantina mediante extracción y saponificación simultáneas a temperatura ambiente.
- La patente de EE.UU. nº 5.858.700 expone un procedimiento para aislar y purificar cristales de licopeno a partir de una fuente biológica de licopeno saponificando el material de la fuente usando una mezcla de propilenglicol y álcali acuoso para formar cristales de licopeno. Los cristales son aislados y purificados.

La patente de EE.UU. nº 5.847.238 describe un procedimiento para recuperar xantofilas a partir de gluten de maíz por medio de saponificación y purificando las xantofilas en bruto mediante métodos de separación cromatográfica. El método es difícil para una aplicación industrial y es bastante costoso.

5 La patente de EE.UU. nº 5.648.564 expone un método para la saponificación de oleorresina de margarita que se hace en una solución acuosa en presencia de alcohol y propilenglicol a temperaturas hasta 70 °C y durante 10 horas para completar la saponificación y adicionalmente se hace la cristalización usando un disolvente orgánico para recuperar los cristales. El procedimiento es bastante largo y existe la posibilidad de oxidación de los carotenoides debido a la exposición prolongada a calor.

10 La solicitud de EE.UU. nº 2005/0139145 describe un método relativamente sencillo para purificar carotenoides que incluye luteína usando disolventes orgánicos.

La solicitud de EE.UU. nº 2010/0280286 describe un procedimiento para la conversión de luteína o ésteres de luteína en beta- y alfa-criptoxantina usando hidrogenación catalítica.

15 La solicitud de EE.UU. nº 2010/0305366 describe un procedimiento de extracción de luteína extrayendo en primer lugar ésteres de luteína mediante un disolvente orgánico y un método de ultrasonidos y saponificando seguidamente el éster de luteína que contiene filtrado usando solución alcalina y adicionalmente la solución se lava y se separa para recoger los cristales en bruto y finalmente es recristalizada usando tetrafurano y agua desionizada.

20 La solicitud de EE.UU. nº 2011/0065965 describe un procedimiento de saponificación de oleorresina de margarita usando una solución de alcohol de hidrocarburo de alcano e hidróxido de potasio y seguidamente los cristales se recogen y adicionalmente los cristales recogidos son lavados con solución de metanol-hexano y finalmente los cristales se separan.

El documento EP 2174559 aborda entre otras cosas el efecto estabilizante del jabón creado a partir de la saponificación de oleorresinas. El carácter tensioactivo de las sales alcalinas de ácidos grasos y su contribución a la estabilidad de los cristales de cantaxantina formados es contemplado en este documento.

25 Aunque hay un cierto número de métodos, es necesario actualmente un método simplificado que use menos o nada de disolvente químicos orgánicos, económico e industrialmente factible para aislar carotenoides.

### **Objeto y sumario de la invención**

Un objeto de la invención es proporcionar un nuevo procedimiento de saponificación que ayude a estabilidad y proteger carotenoides de la degradación durante el procedimiento de saponificación.

30 Otro objeto de la invención es proporcionar una mezcla económica y segura de ingredientes para el procedimiento de saponificación que comprende un alcohol graso, un álcali y un ácido graso sin usar otros productos tóxicos ni disolventes peligrosos.

Otro objeto de la invención es recuperar cristales de carotenoides altamente puros en los que la pureza es de al menos 90%.

35 Todavía, otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento de rendimiento elevado en el que el rendimiento final de carotenoides es de al menos de 90% a partir del material de partida inicial.

40 La presente invención describe un nuevo procedimiento de saponificación para el aislamiento y purificación de carotenoides altamente puros a partir de diferentes oleorresinas con elevado contenido de carotenoides derivadas de vegetales y microorganismos sin usar productos químicos tóxicos ni disolventes peligrosos. La hidrólisis se lleva a cabo tratando la oleorresina con elevado contenido de carotenoides con una nueva mezcla de un alcohol graso, álcali y un ácido graso sin usar ningún otro disolvente. Además, la invención explica un procedimiento para estabilizar los carotenoides respecto a la degradación debida a la temperatura elevada y tiempo de exposición durante el procedimiento de saponificación. Además, la invención describe un procedimiento económicamente viable para aislar carotenoides de pureza elevada con un rendimiento superior.

45 La presente invención describe una producción de cristales de carotenoides con una pureza de al menos 90% mediante un nuevo procedimiento de una mezcla de reacción de saponificación. La estabilidad y eficacia de la recuperación de cristales se aumentó mediante la adición de un ácido graso de cadena corta mixto y estable en calor, preferentemente ácido caprílico/cáprico en la mezcla de reacción.

### **Descripción detallada de la invención**

50 El ácido caprílico/cáprico estable en calor estabiliza los carotenoides, para explicar adicionalmente un grado estable en calor de ácido caprílico/cáprico usado como estabilizador en el procedimiento de saponificación, que protege a los carotenoides de la degradación o pérdida cuando son expuestos a una temperatura y tiempo de reacción superiores durante el procedimiento de saponificación y esto ayuda también a aumentar el rendimiento global de

carotenoides. Por tanto, la presente invención supera la necesidad de usar productos químicos orgánicos en el procedimiento de saponificación y la dificultad de estabilizar carotenoides durante el procedimiento de saponificación que requiere una temperatura elevada y tiempo de reacción prolongado.

5 El estabilizador de carotenoides es menos de un 12,0% (p/p) de la mezcla de reacción de saponificación, preferentemente menos de 11,0% (p/p), más preferentemente menos de 10,0% (p/p), lo más preferentemente menos de 9,0% (p/p).

El procedimiento de la invención comprende las siguientes etapas:

10 (a) La oleoresina usada en el procedimiento es de diferentes fuentes de vegetales y microorganismos. Más preferentemente, la oleoresina con elevado contenido de carotenoides es derivada de fuentes vegetales como margarita, tomate, palma, goji, pilli, fruta de Gac, flores de Adonis y derivados de fuentes microbianas como levadura, hongos, algas y bacterias.

(b) La oleoresina es introducida en un reactor y vigorosamente homogeneizada durante 5 a 10 minutos a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 60 °C, más preferentemente 35 °C a 55 °C y, lo más preferentemente, 40 °C a 52 °C.

15 (c) La oleoresina homogeneizada es hidrolizada en un reactor con la adición de 0,5 a 1 volúmenes de 40-55% de solución acuosa de hidróxido de potasio, de la cantidad de la oleoresina. A esta mezcla se añade una mezcla de reacción de 1 a 1,5 veces de alcohol graso y se homogeneiza adicionalmente, más preferentemente se usó un alcohol graso como alcohol laurílico-miristílico o la forma pura de alcohol laurílico o alcohol miristílico. A la mezcla de  
20 reacción anterior se añade de 3% a 10%, más preferentemente 4% a 9% y, lo más preferentemente, 4,1% a 9% de ácido cáprico, a una temperatura que varía en el intervalo entre 60 °C y 100 °C durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 90 minutos. El grado de saponificación se evalúa mediante técnicas cromatográficas para asegurar la compleción del procedimiento.

25 (d) La mezcla de reacción saponificada se enfría adicionalmente a una temperatura de aproximadamente de 30 °C a 60 °C, más preferentemente 35 °C a 55 °C y, lo más preferentemente, 40 °C a 52 °C. A la mezcla de reacción enfriada se añade agua desmineralizada de 1 a 6 veces, más preferente de 1,5 a 4 veces y, lo más preferentemente, de 2 a 3 veces y se agita durante 5 a 20 minutos, más preferentemente 6 a 15 minutos y, lo más preferentemente, 8 a 12 minutos.

30 (e) A la mezcla de reacción de saponificación enfriada se añade opcionalmente un alcohol como alcohol etílico con un bajo contenido de humedad aproximadamente 2 a 10 veces del contenido de oleoresina para la cristalización de carotenoides y para separar las impurezas no deseadas como lípidos y grasas.

(f) La mezcla tratada con alcohol se filtra a través de una prensa de filtración haciendo bombear la masa en la prensa de filtración. La masa en el filtro se lavó con agua caliente de 50 °C a 60 °C hasta que el pH de la masa sea todavía neutro.

35 (g) La masa húmeda de la prensa de filtración se seca en un mezclador cónico con encamisado de agua caliente bajo vacío a una temperatura de 40 °C a 50 °C hasta que la humedad y las impurezas de disolvente estén por debajo del límite permisible según la farmacopea.

40 (h) Los cristales resultantes contienen al menos un 90% de carotenoides mediante espectrofotómetro UV-VIS y la recuperación química del componente activo en el producto final es entre 70% y 95% y las condiciones variables del mismo son utilizadas basadas en los parámetros del procedimiento anterior mediante cierta modificación del procedimiento y las mezclas de reacción del mismo.

(i) Los carotenoides activos acabados obtenidos son usados para formular formulaciones como aceite, formulación dispersable en agua fría, bolitas, gránulos y polvos con diferentes concentraciones dependiendo de las aplicaciones.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos, pero no limitativos de los métodos de la presente invención.

45 Ejemplo 1

Se toman 11,7 g de oleoresina de éster de luteína con 135,1 g/kg de contenido de éster de luteína en un matraz de fondo redondo de 500 ml y la oleoresina se homogeneiza durante 5 a 10 minutos bajo agitación a una temperatura de aproximadamente 45 °C usando un baño de agua caliente. Se añade KOH acuoso (2,3 g de KOH al 95% en 3,5 g de agua) a la oleoresina homogeneizada lentamente. A esto se añadieron 1 g de ácido caprílico-cáprico y 5 g de  
50 alcohol laurílico y se homogeneizó apropiadamente bajo agitación. La reacción de saponificación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 80 °C durante 60 minutos. La reacción de saponificación se controla mediante la realización de cromatografía de capa fina. Una vez que se completa la reacción de saponificación, se añaden 25 g de agua desmineralizada caliente a la mezcla de reacción y se agita durante 10 minutos. Esta mezcla diluida se filtra

bajo vacío, durante la filtración se añadió continuamente agua desmineralizada caliente de nueva aportación de aproximadamente 100 g a los cristales para neutralizar el pH de los cristales y separar las impurezas no deseadas en los cristales. Seguidamente los cristales húmedos se recogen y se secan bajo vacío a una temperatura de aproximadamente 50 °C durante 1 hora.

- 5 Los cristales de carotenoides recuperados tienen una pureza en carotenoides totales de aproximadamente 92,43% mediante análisis con espectrofotómetro UV-VIS y la recuperación química del producto final es 78,2%.

#### Ejemplo 2

10 Se toman 10 kg de oleorresina de éster de luteína con 135,1 g/kg de contenido de éster de luteína en un reactor de 50 litros de capacidad con un agitador. La oleorresina se homogeneiza durante 5 a 10 minutos bajo agitación a una temperatura de aproximadamente 45 °C usando agua caliente en el encamisado del reactor como medio de calentamiento. Se añade KOH acuoso (1,95 kg de KOH al 95% en 3,0 kg de agua) a la oleorresina homogeneizada lentamente. A esto se añadieron 860 g de ácido caprílico-cáprico y 4,3 kg alcohol laurílico y se homogeneizó apropiadamente bajo agitación. La reacción de saponificación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 80 °C durante 60 minutos. La reacción de saponificación se controla mediante la realización de cromatografía de capa fina. Una vez que se completa la reacción de saponificación, se añaden 25,0 kg de agua desmineralizada caliente a la mezcla y se agita durante 10 minutos. La mezcla diluida se centrifuga con una centrifugadora a velocidad elevada para recuperar los cristales y, durante la centrifugación, se añadieron continuamente agua desmineralizada caliente de nueva aportación en aproximadamente 100 kg a los cristales para neutralizar el pH de los cristales y separar las impurezas no deseadas en los cristales. Los cristales húmedos se recogen seguidamente y se secan bajo vacío a una temperatura de aproximadamente 50 °C durante 1 hora.

15 Los cristales de carotenoides recuperados tienen una pureza respecto a los carotenoides totales de aproximadamente 91,75% mediante análisis de espectrofotómetro UV-VIS y la recuperación química del producto final es de 80,17%.

#### Ejemplo 3

25 Se recogen 5 kg de oleorresina de éster de luteína con 135,1 g/kg de contenido de éster de luteína en un reactor de 50 litros de capacidad con un agitador. La oleorresina se homogeneiza durante 5 a 10 minutos bajo agitación a una temperatura de aproximadamente 45 °C usando agua caliente en el encamisado del reactor como medio de calentamiento. Se añade KOH acuoso (0,975 kg de KOH al 95% en 1,5 kg de agua) a la oleorresina homogeneizada lentamente. A esto se añadieron 430 g de ácido caprílico-cáprico y 2,15 kg de alcohol laurílico y se homogeneizó apropiadamente bajo agitación. La reacción de saponificación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 80 °C durante 60 minutos. La reacción de saponificación se controla mediante la realización de cromatografía de capa fina. Una vez que se completa la reacción de saponificación, se añaden 12,5 kg de alcohol etílico y se agita durante 10 minutos. Esta mezcla diluida se centrifuga en una centrifugadora a velocidad elevada para recuperar los cristales y, durante la centrifugación, se añadió continuamente alcohol etílico de nueva aportación en aproximadamente 50 kg a los cristales para neutralizar el pH de los cristales y separar las impurezas no deseadas en los cristales. Seguidamente los cristales húmedos se recogen y se secan bajo vacío a una temperatura de aproximadamente 50 °C durante 1 hora.

35 Los cristales de carotenoides recuperados tienen una pureza respecto a los carotenoides totales de aproximadamente 93,59% mediante análisis de espectrofotómetro UV-VIS y la recuperación química del producto final es de 82,03%.

**Referencias**

1. Agarwal S, Rao AV. Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metabolism Drug Interact* 2000; 17(1-4): 189-210 2000. PMID: 15130.
- 5 2. International Agency for Research on Cancer. IARC Handbooks of Cancer Prevention: Carotenoids. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1998.
3. Delgado-Vargas F, Jimenez AR, Paredes-Lopez O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains-- characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2000 May; 40(3): 173-289 2000. PMID: 15150.
- 10 4. Handelman GJ. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition* 2001 Oct; 17(10): 818-22 2001. PMID: 15100.
5. Krinsky NI. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* 2001 Oct; 17(10): 815-7 2001. PMID: 15110.
6. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 2001 Jan I; 385(I): 20-7 2001. PMID: 15120.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método mejorado de saponificación para estabilizar y proteger carotenoides degradables en calor durante el procedimiento de saponificación de oleorresinas con elevado contenido de carotenoides, comprendiendo dicho método las etapas de añadir una cantidad eficaz de ácidos grasos de cadena corta mixtos estables en calor a la mezcla de reacción.
2. El método mejorado de saponificación según la reivindicación 1, en el que la oleorresina con elevado contenido de carotenoides es de fuentes vegetales o microorganismos.
3. El método mejorado de saponificación según la reivindicación 2, en el que las fuentes vegetales incluyen margarita, tomate, palma, goji, pilli, flores de Adonis y fruta de gac.
- 10 4. El método mejorado de saponificación según la reivindicación 2, en el que las fuentes microbianas incluyen levadura, hongos, algas y bacterias.
5. El método mejorado de saponificación según la reivindicación 1, en el que los ácidos grasos de cadena corta mixtos son ácidos cáprico y caprílico.
- 15 6. El método mejorado de saponificación según la reivindicación 1 a la reivindicación 5, en el que la cantidad eficaz de ácidos grasos de cadena corta mixtos son de menos de 11,0% (p/p), más preferentemente menos de 10,0% (p/p), lo más preferentemente menos de 9,0% (p/p).
7. Un método de saponificación mejorado para proteger oleorresinas con elevado contenido de carotenoides de la degradación durante el procedimiento de saponificación, que comprende las etapas de:
- 20 a) introducir la oleorresina en un reactor y homogeneizar vigorosamente durante 5 a 10 minutos a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 60 °C, más preferentemente 35 °C a 55 °C y, lo más preferentemente, 40 °C a 52 °C;
- b) hidrolizar la oleorresina homogeneizada en un reactor con la adición de 0,5 a 1 volumen de solución de hidróxido de potasio acuoso al 40-55% de la cantidad de oleorresina;
- c) añadir 1-1,5 veces de alcohol graso a la mezcla anterior, homogeneizándola adicionalmente;
- 25 d) añadir la mezcla de ácido caprílico-cáprico a la mezcla de reacción de la etapa (b) en una cantidad de 3% a 10%, más preferentemente 4% a 9% y lo más preferentemente 4,1% a 9%, a una temperatura que varía en el intervalo entre 60 °C y 100 °C durante un periodo de tiempo de 30 minutos a 90 minutos.
- e) evaluar el grado de saponificación para asegurar la compleción del procedimiento, preferentemente mediante técnicas cromatográficas;
- 30 f) enfriar la mezcla de saponificación a una temperatura de aproximadamente 30 °C a 60 °C, más preferentemente 35 °C a 55 °C y lo más preferentemente 40 °C a 52 °C;
- g) añadir a la mezcla de reacción enfriada 1 a 6 veces, más preferentemente 1,5 a 4 veces y lo más preferentemente 2 a 3 veces de agua desmineralizada, agitando durante 5 a 20 minutos, más preferentemente 6 a 15 minutos y lo más preferentemente 8 a 12 minutos;
- 35 h) opcionalmente, añadir a la mezcla de saponificación enfriada un alcohol como alcohol etílico con bajo contenido de humedad, aproximadamente 2 a 10 veces del contenido de oleorresina para la cristalización de carotenoides y para separar impurezas no deseadas como lípidos y grasas;
- i) filtrar la mezcla tratada con agua o alcohol haciendo bombear la masa en la prensa de filtración;
- j) lavar la masa en el filtro con agua caliente de 50 °C a 60 °C hasta que el pH de la masa sea todavía neutro;
- 40 k) secar la masa húmeda de la prensa de filtración en un mezclador cónico con encamisado de agua caliente bajo vacío a una temperatura de 40 °C a 50 °C hasta que la humedad y las impurezas de disolvente estén por debajo del límite permisible por la farmacopea.
8. El método de saponificación mejorado según la reivindicación 7, en el que las oleorresinas con elevado contenido de carotenoides son derivadas de fuentes vegetales como margarita, tomate, palma, goji, pilli, fruta de gac, flores de Adonis y derivadas de fuentes microbianas como levadura, hongos, algas y bacterias.
- 45 9. El método de saponificación mejorado según la reivindicación 7, en el que el alcohol graso usado es alcohol laurílico-miristílico o la forma pura de alcohol laurílico o alcohol miristílico.
10. Un método mejorado de saponificación para el aislamiento de carotenoides de la oleorresina con elevado contenido en carotenoides que comprende la etapa de incorporar alcohol graso a la mezcla homogeneizante.



11. El método mejorado según la reivindicación 10, en el que el alcohol graso incorporado se selecciona entre: alcohol laurílico-miristílico o la forma pura de alcohol laurílico o alcohol miristílico.