(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 694 600**

(21) Número de solicitud: 201730822

(51) Int. CI.:

C12N 1/14 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
A61K 36/06 (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

21.06.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

21.12.2018

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (60.0%)
Avda. Medina Azahara, 5
14005 Córdoba ES y
UNIVERSITÉ PARIS 13 (40.0%)

(72) Inventor/es:

RUBIO BRAVO, Soledad;
CRIADO SICILIA, Mª Dolores;
CABALLO LINARES, Carmen;
CABALLERO CASERO, Noelia;
PAVON-DJAVID, Graciela;
GUEGUEN, Virginie y
BASTIAS VENEGAS, Jorge Eduardo

(74) Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

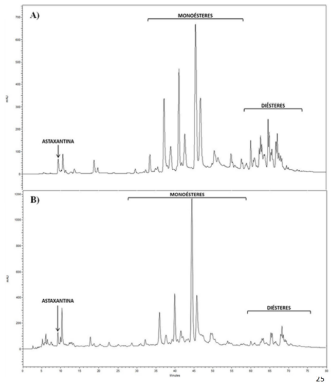
(54) Título: **Procedimiento para la extracción de carotenoides utilizando fases líquidas nanoestructuradas**

(57) Resumen:

Procedimiento para la extracción de carotenoides utilizando fases líquidas nanoestructuradas.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención y enriquecimiento de carotenoides a partir de biomasa, basado en el uso de fases líquidas nanoestructuradas, y al uso de los carotenoides así obtenidos como aditivos alimentarios y en la industria farmacéutica.

FIG.1



ES 2 694 600 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES UTILIZANDO FASES LÍQUIDAS NANOESTRUCTURADAS

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el campo general de la química de productos naturales y en particular se refiere a un procedimiento para la obtención de carotenoides a partir de biomasa, y al uso de dichos productos en la industria farmacéutica y alimentaria donde los carotenoides se utilizan como suplementos nutricionales y aditivos.

Estado de la técnica

Los carotenoides (carotenos y xantofilas) son pigmentos sintetizados por organismos fotosintéticos, algunas bacterias y hongos. Se utilizan como aditivos alimentarios en acuicultura para la coloración de la carne de los salmónidos y como nutracéuticos y aditivos en alimentos para consumo humano. Entre los beneficios demostrados o atribuidos a los carotenoides destacan su actividad antitumoral, propiedades antiinflamatorias y antidiabéticas, y efecto protector del corazón, sistema nervioso, ojos y piel (*Biotecnología de Microalgas, E. Forján Lozano, C. Vílchez Lobato, J.M Vega Piqueres, Cepsa 2014, ISBN974-84-617-2314-0*).

Los carotenos β-caroteno y licopeno y las xantofilas astaxantina, luteína y cantaxantina son los carotenoides de mayor interés comercial. Se estima que el mercado global de carotenoides alcanzará la cifra de 1,4 billones de dólares en 2019 con una tasa de crecimiento anual del 3.5% desde 2014 (*http://www.bcresearch.com*). Los carotenoides se obtienen mediante procedimientos sintéticos o a través de fuentes naturales. Aunque las formas sintéticas son más baratas, las formas naturales presentan mejores propiedades nutricionales y la demanda de este tipo de fuentes ha experimentado un gran incremento en los últimos años. Las principales fuentes naturales de obtención de carotenoides son las microalgas (ej. *Dunaliella salina* para β-caroteno y *Haematococcus pluvialis* para astaxantina), levaduras (ej. *Phaffia rhodozyma* para astaxantina) y flores (ej. pétalos de *Tagetes erecta* para luteína). Las xantofilas se encuentran esterificadas en algunas fuentes (ej. astaxantina en *Haematococcus pluvialis* y luteína en *Tagetes erecta).*

Se han descrito muchos procedimientos para la obtención de carotenoides a partir de microalgas (*EP1808483B1, 05.10.2011, Cognis IP Management GmbH/Universidad de Sevilla; Mar. Drugs, 2011, 9, 625-644*). En general, la biomasa se separa del medio de

cultivo mediante centrifugación, sedimentación o filtración y el concentrado (5-10% peso seco) se deshidrata mediante aspersión o liofilización. La rotura de las células de las microalgas con homogeneizadores, ultrasonidos, molino de perlas de vidrio, congelación, shock osmótico, etc., es fundamental para liberar los carotenoides intracelulares, y así aumentar su digestibilidad para humanos y animales. Esta operación se realiza en presencia de antioxidantes para evitar la degradación de los carotenoides (*WO0277105, 10.03.2002, Fuji Chemical Industry Co.,*). La biomasa seca, empaquetada al vacío y almacenada a temperaturas de -20ºC, se comercializa para su uso en acuicultura y como aditivo en alimentos para consumo humano. Parte de esta biomasa se somete a procesos de enriquecimiento de los carotenoides presentes en la misma mediante extracción con disolventes orgánicos o fluidos supercríticos, para su posterior uso como nutracéutico en forma de cápsulas, tabletas, etc. (*Current Anal. Chem., 2014, 10, 29-66; Anal. Methods, 2013, 5, 2916-2924, Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture, 2010, 2, 75-82*).

El enriquecimiento con disolventes orgánicos se realiza usando disolventes polares (ej. acetona, metanol, etanol, acetato de etilo, etc., *US14420136, 19.04.2016, Roquette Freres; US20030087335 A1, 08.05.2003, Jacobson Holman PLLC; US8097761B2, 17.01.2012, JX Nippon Oil & Energy Corporation*), no polares (ej. hexano, pentano, benceno, etc., *US20070196383 A1, 23.08.2007, Yamaha Hatsukoki Kabushiki Kaisha*), o mezclas de ellos para ajustar la polaridad y aumentar la eficacia de extracción (ej. isopropanol:hexano, etanol:hexano, agua:etanol:hexano, alcano:metanol, etc. *WO2009063100A1, 22.05.2009, Universidad de Almería; US20070196894 A1, 23.08.2007, Sungkyunkwan University, Chin. J. Chem. Eng. 2013, 21, 776-780*). La principal desventaja del uso de disolventes orgánicos es que se requieren múltiples etapas de extracción para obtener rendimientos aceptables, elevadas relaciones de biomasa a disolvente (generalmente 1:10), altas temperaturas y tiempos de extracción comprendidos entre 24 y 48 h. Además, es necesario evaporar elevados volúmenes de disolvente en el extracto, proceso en el que los carotenoides pueden degradarse. Por otro lado, la legislación relativa a nutracéuticos y aditivos alimentarios es muy restrictiva con respecto a los residuos de disolventes, por lo que se recomienda el uso de disolventes incluidos en la categoría 3 por la US Food and Drug Administration, FDA (ej. etanol, acetona, acetato de etilo, etc) y que el producto final contenga una cantidad de disolvente inferior al 0.5% (*Guidance for Industry Q3C, FDA, 2012*). Estas restricciones, junto con la presión de la normativa legal acerca del control, prevención y remediación de la contaminación ambiental, han potenciado el uso de disolventes menos tóxicos como los aceites vegetales, aunque la extracción con los

mismos requiere 48 h para alcanzar un rendimiento de extracción del 88% y no se han desarrollado aplicaciones industriales (*Biotechnol. Letter 2008, 30, 441-444*).

El enriquecimiento con fluidos supercríticos (EFS) se lleva a cabo principalmente con dióxido de carbono, sólo o en la presencia de modificadores polares, ya que es inocuo, no inflamable y relativamente inerte (*Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 6725-6740*). La principal ventaja del uso de EFS es que disminuye el consumo de disolventes orgánicos y los fluidos supercríticos utilizados pueden reciclarse. Sin embargo, los costes de operación son muy elevados y se necesita una inversión inicial alta, además de existir baja disponibilidad de equipos y reducido desarrollo de diseños. Por otro lado, las xantofilas, compuestos relativamente polares y de alto peso molecular, tienen baja solubilidad en dióxido de carbono, por lo que se requiere trabajar a presiones muy elevadas (superiores a 50 MPa) para obtener rendimientos y tiempos de extracción aceptables, lo que aumenta de forma considerable los costes. La adición de etanol como modificador (10-70%) permite obtener rendimientos de aproximadamente el 85% debido a que mejora la humidificación de los poros de la biomasa y establece puentes de hidrógeno con las xantofilas (*J. Supercritical Fluids, 2014, 92, 75-83, Eur. Food Res. Technol. 2006, 223, 787-790*), sin embargo, es necesario eliminarlo del extracto. El rendimiento de extracción puede aumentarse utilizando fluidos supercríticos que establezcan puentes de hidrógeno con las xantofilas, como por ejemplo dimetil éter (*US 7696396B2, 19.06.2008, Phasex Corporation, Lawrence, MA, US).* El producto obtenido es generalmente una oleorresina que contiene los carotenoides y ácidos grasos presentes en la biomasa mientras que los componentes polares como las proteínas y los carbohidratos permanecen en el residuo.

Dadas las limitaciones de los procesos anteriores, existe la necesidad de desarrollar métodos de extracción y enriquecimiento de carotenoides a partir de fuentes naturales utilizando procesos rápidos, eficaces, económicos y seguros, que no requieran instalaciones especiales u operaciones complicadas y proporcionen productos que no contengan residuos tóxicos y, por lo tanto, puedan utilizarse en aplicaciones farmacéuticas y alimentarias.

Breve descripción de la invención

La presente invención soluciona los problemas descritos en el estado de la técnica ya que proporciona un método para la extracción y enriquecimiento de carotenoides a partir de biomasa, basado en el uso de fases líquidas nanoestructuradas obtenidas mediante procesos espontáneos de autoensamblaje y coacervación de moléculas anfifílicas.

El tipo de nanoestructuras y componentes de estas fases líquidas maximiza las energías de interacción con los carotenoides, evita la extracción de las macromoléculas presentes en la biomasa vegetal mediante mecanismos químicos y físicos de exclusión y proporciona extractos enriquecidos en carotenoides que pueden utilizarse directamente, o previa dilución con un aceite vegetal, para la formulación de nutracéuticos y aditivos alimentarios. El método es rápido, simple y de bajo coste, se desarrolla a presión atmosférica y temperatura ambiente, utilizando disolventes no tóxicos y proporcionando una extracción cuantitativa de carotenoides en una única etapa de equilibrio entre la biomasa vegetal y el disolvente. La composición de los extractos enriquecidos en carotenoides es similar a las oleorresinas obtenidas mediante extracción con fluidos supercríticos sin el requerimiento de instalaciones especiales y costosas.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento (de aquí en adelante, procedimiento de la presente invención) para la obtención de carotenoides a partir de biomasa, que comprende las siguientes etapas:

a) disolver un tensioactivo anfifílico en un disolvente orgánico y adicionar agua, en una relación comprendida entre 1:4:2.6 y 1:7:13(g:mL:mL).

b) centrifugar la mezcla obtenida en a), a al menos 3000 rpm durante 10 min, obteniendo una fase hidro-orgánica y una fase líquida nanoestructurada,

c) separar las dos fases obtenidas en la etapa b)

d) mezclar la biomasa con la fase hidro-orgánica y la fase líquida obtenidas en la etapa b) en una relación comprendida entre 1:0:2 y 1:10:1 (g:mL:mL)

e) centrifugar la mezcla obtenida en d) durante al menos 10 minutos a al menos 2500 rpm, obteniendo 3 fases diferenciadas: fase líquida, fase sólida y una fase intermedia,

f) purificar la fase líquida obtenida en e) para obtener el extracto de carotenos.

En un aspecto particular de la presente invención, el tensioactivo anfifílico comprende una cadena hidrocarbonada de entre 6 y 18 átomos de carbono y al menos un grupo polar seleccionado de entre grupos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, fosfatos.

En otro aspecto particular de la presente invención, el tensioactivo anfifílico se selecciona de entre glicolípidos, ácidos grasos, fosfolípidos, lipopéptidos, lípidos neutros, o cualquier tensioactivo de origen natural.

En otro aspecto particular de la presente invención, el disolvente orgánico es seleccionado de entre tetrahidrofurano, etilenglicol, dioxano, acetona, propanol, etanol, acetonitrilo y metanol.

En otro aspecto particular de la presente invención, la etapa f) de purificación, se realiza mediante la eliminación del disolvente orgánico. Más en particular, la eliminación del disolvente orgánico se realiza mediante evaporación del disolvente mediante corriente de nitrógeno.

En otro aspecto particular, el procedimiento de la presente invención comprende una etapa adicional de dilución del extracto obtenido en la etapa f) con un aceite vegetal.

En un aspecto particular de la presente invención, la biomasa es biomasa vegetal, fúngica o de levadura.

En otro aspecto particular de la presente invención, la biomasa comprende un pretratamiento de secado y triturado.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso del extracto obtenido mediante el procedimiento de la presente invención como aditivo alimentario.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del extracto obtenido mediante el procedimiento de la presente invención en formulaciones farmacéuticas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra los cromatogramas obtenidos mediante análisis del extracto de muestras de *Haematococcus pluvialis* producido mediante (A) extracción con fluidos supercríticos y (B) extracción con fases líquidas nanoestructuradas de acuerdo al procedimiento descrito en la invención. El contenido total y distribución de carotenoides presentes en la biomasa vegetal depende de las condiciones de cultivo y cepas usadas. Así, el contenido total de astaxantina generalmente varía entre el 3 y el 5% del peso de la biomasa mientras la distribución de astaxantina libre, monoésteres y diésteres en *Haematococcus pluvialis* puede variar en los intervalos 1-5%, 46-79% y 10-39%, respectivamente. La distribución de astaxantina libre, monoesteres y diesteres en los extractos analizados fueron: (A) 1.7%, 76.1% y 22.2% y (B) 1.7%, 78.8% y 19.5%. La columna utilizada para el análisis cromatográfico de los extractos fue una Ultrabase C18 (5 µm, 250 mmx 4.6 mm de diámetro interno) suministrada por Análisis Vínicos (Tomelloso, España) y termostatada a 20 ºC. Para la elución se utilizó una fase móvil constituida por acetona y agua con un gradiente de elución desde 83:17 a 98:2 en 80 min a una velocidad

de flujo de 0.8 mL/min. El intervalo de longitudes de onda medido en el detector de diodos en filas fue de 200 a 800 nm.

Descripción detallada de la invención

Las fases líquidas nanoestructuradas se sintetizaron a partir de moléculas anfifílicas mediante procesos espontáneos de autoensamblaje y coacervación bajo condiciones experimentales en las que es energéticamente más favorable la agregación entre los anfifilos que la interacción de los mismos con el disolvente (*The coloidal domain, where physics, chemistry, biology and technology meet, F. Evans, H. Wennnerström, Wiley, BCH, 1999, 2nd edition*). La característica diferencial más importante de estas fases líquidas con respecto a otros disolventes (ej. disolventes orgánicos, líquidos iónicos y fluidos supercríticos) es que los componentes que lo integran forman nanoestructuras sensibles a estímulos ambientales y éstas pueden diseñarse para que cumplan funciones específicas. Existen multitud de sustancias anfifílicas de origen natural y sintético para el desarrollo de fases líquidas nanoestructuradas, aunque hasta el momento no se han utilizado en procesos de extracción industriales.

Mediante el procedimiento de la presente invención, se obtienen fases líquidas nanoestructuradas con características adecuadas para la extracción de carotenoides y el desarrollo de un proceso para la obtención de extractos enriquecidos a partir de biomasa que puedan utilizarse directamente, o previa dilución con un aceite vegetal, para la formulación de nutracéuticos y aditivos alimentarios.

Diseño y síntesis de fases líquidas nanoestructuradas

Las sustancias anfifílicas usadas en la presente invención para la síntesis de fases líquidas, fueron preferentemente anfifilos que permitieron la formación de puentes de hidrógeno, y el establecimiento de interacciones polares, además de interacciones de dispersión, con las xantofilas. Ejemplos de sustancias anfifílicas para la síntesis de las fases líquidas nanoestructuradas son aquellas que contengan grupos polares constituidos por grupos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, fosfatos, etc.

La sustancia anfifílica usada en la presente invención, debe ser compatible y aceptada legalmente para uso en formulaciones farmacéuticas y aditivos alimentarios. Además, debe tener baja solubilidad en agua y alta solubilidad en disolventes orgánicos miscibles en agua. Ejemplos de disolventes orgánicos que pueden utilizarse para la síntesis de las fases líquidas nanoestructuradas son tetrahidrofurano, etilenglicol, dioxano, acetona, propanol,

etanol, acetonitrilo, metanol, etc. Se prefieren disolventes incluidos en la categoría 3 por la US Food and Drug Administration, FDA (ej. etanol, acetona, etc.).

La sustancia anfifílica debe producir en el medio hidro-orgánico seleccionado, a temperatura ambiente y mediante procesos espontáneos de autoensamblaje y coacervación, la fase líquida nanoestructurada.

El porcentaje de disolvente orgánico en el medio orgánico estabacomprendido entre el 5 y 40% (v/v).

La disposición espacial de las sustancias anfifílicas en las nanoestructuras maximiza las interacciones por puentes de hidrógeno, polares y de dispersión con los carotenoides.

Las nanoestructuras fueron reversibles y se adaptaron al ambiente, es decir al medio hidro-orgánico en el que se autoensamblan y coacervan, de tal forma que permiten la fácil modificación de las mismas de acuerdo a los requerimientos de extracción.

Las nanoestructuras formadas solubilizan eficazmente los carotenoides excluyendo la extracción de macromoléculas polares (proteínas, carbohidratos, etc.) a través de mecanismos químicos y físicos.

Proceso de extracción de carotenoides en biomasa vegetal

El proceso desarrollado en la presente invención es aplicable a la extracción de carotenos y xantofilas a partir de biomasa vegetal, incluyendo microalgas (ej. *Dunaliella salina, Haematococcus pluvialis, Chlorella, Scenedemus almeriensis, etc)* y plantas (*ej. Tagetes erecta y Tagetes patula).* También puede extenderse a otras fuentes de carotenoides tales como levaduras (ej. *Phaffia rhodozyma)*, previa optimización de las condiciones experimentales de extracción.

La biomasa vegetal preferentemente está seca y triturada.

La fase líquida nanoestructurada se sintetizó y se separó de la disolución hidro-orgánica en equilibrio con la misma, mediante centrifugación.

Se adicionó un volumen de fase líquida nanoestructurada y de disolución de equilibrio a la biomasa vegetal seca y triturada. La función de la disolución de equilibrio es rehidratar la biomasa vegetal disminuyendo así la necesidad de usar la fase líquida nanoestructurada para este fin. La relación biomasa:disolución de equilibrio:fase líquida nanoestructurada (p/v/v; g/mL/mL) varía en el intervalo 1:0:2 y 1:10:1 y preferentemente en el intervalo 1:2:1 y 1:3:1.

La mezcla se agitó en el intervalo 2-15 min y preferentemente durante 5 min.

La mezcla se centrifugó hasta la obtención de tres fases; una fase sólida que contiene el residuo de la biomasa vegetal constituida fundamentalmente por proteínas, carbohidratos y sustancias minerales; una fase líquida intermedia que es la disolución de equilibrio hidro-orgánica y la fase líquida nanoestructurada que contiene los carotenoides y los ácidos grasos de la biomasa, además de los constituyentes de la fase líquida nanoestructurada.

El proceso permitió la extracción de carotenoides libres y esterificados a partir de la biomasa vegetal con un porcentaje de recuperación superior al 90% utilizando una única etapa de equilibrio entre la biomasa y la fase líquida nanoestructurada. El equilibrio se alcanzó en un corto intervalo de tiempo utilizando una relación de biomasa a fase líquida nanoestructurada de 1:1 (m:v).

La disolución de equilibrio hidro-orgánica puede reciclarse para la síntesis de nuevas fases nanoestructuradas mientras el residuo de la biomasa vegetal puede encontrar otras aplicaciones relacionadas con el aprovechamiento de proteínas y carbohidratos. Así la presente invención podría formar parte del diagrama de flujo de proceso de una biorefinería.

Obtención de oleorresinas enriquecidas en carotenoides

El extracto obtenido en el proceso descrito anteriormente puede transformarse en una oleorresina, semejante a la obtenida con EFS, previa eliminación del disolvente orgánico que contiene el mismo con una corriente de nitrógeno o procedimiento similar que mantenga la integridad de los carotenoides.

Mediante la eliminación del disolvente orgánico, que puede reciclarse, se reduce el peso del extracto aproximadamente 2.5 veces, obteniéndose un factor de enriquecimiento de carotenoides en la oleorresina equivalente a esta reducción de peso. Este factor de enriquecimiento es similar al obtenido con EFS.

La distribución de carotenoides en el extracto obtenido en la presente invención es similar a la de la biomasa vegetal y al obtenido con EFS (Figura 1).

Como ocurre con la oleorresina obtenida con EFS, el extracto tiene mayor concentración de lípidos que la biomasa vegetal, pero esto es irrelevante puesto que la oleorresina se diluye con aceites vegetales para su comercialización como nutracéutico o para su uso como aditivo alimentario.

El extracto obtenido, por tanto, es semejante a los productos ya existentes en el mercado obtenidos por EFS, pero su obtención se realiza con un procedimiento simple que no

requiere grandes instalaciones ni elevadas inversiones. El consumo de energía y materiales es muy bajo comparado con los procesos actuales y, por tanto, el proceso propuesto en esta invención es más económico.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

Ejemplo 1: Síntesis de fases líquidas nanoestructuradas

La sustancia anfifílica se disolvió en etanol (12%, p/v) y la disolución se diluyó con agua por un factor de 1.5. La mezcla se homogenizó mediante agitación magnética durante 5 min. La fase líquida nanoestructurada, producida espontáneamente, se separó de la disolución hidro-orgánica en equilibrio con la misma mediante centrifugación a 3500 rpm durante 10 min y se transfirió a otro recipiente. Ambas fases se mantuvieron en recipientes herméticamente cerrados hasta su uso.

Ejemplo 2. Extracción de astaxantina a partir de Haematococcus pluvialis

La cantidad apropiada de biomasa de *Haematococcus pluvialis*, seca y triturada, se mezcló con la disolución de equilibrio hidro-orgánica y la fase líquida nanoestructurada, sintetizada de acuerdo al procedimiento descrito en el ejemplo anterior, en una proporción 1:2.5:1 (p/v/v). La mezcla se agitó magnéticamente durante 5 min a 900 rpm y a continuación se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm para la separación física de tres fases. En la fase líquida nanoestructurada, que contiene los carotenoides, se evaporó el disolvente orgánico mediante una corriente de nitrógeno para obtener un extracto que puede utilizarse directamente, o previa dilución con aceite vegetal, para formulaciones farmacéuticas o como aditivo alimentario. Como ejemplo, la dosis diaria recomendada de ingesta de astaxantina para humanos es de alrededor de 4 mg, cantidad equivalente al consumo de una ración de 100 g de salmón rojo. La recuperación de carotenoides a partir de la *Haematococcus pluvialis* es superior al 90% y el factor de enriquecimiento en los mismos es al menos de 2.5. La fase hidro-orgánica se recicla para la preparación de nuevas fases líquidas nanoestructuradas, mientras el residuo de *Haematococcus pluvialis*, que contiene proteínas, carbohidratos y minerales puede utilizarse para otras aplicaciones.

Ejemplo 3. Extracción de luteína a partir de Scenedesmus almeriensis

El procedimiento de extracción de luteína a partir de *Scenedesmus almeriensis,* seca y triturada, así como los productos obtenidos, son similares a los descritos en el ejemplo 2 para *Haematococcus pluvialis.* La relación biomasa: disolución de equilibrio hidro-orgánica:fase líquida nanoestructurada recomendada es 1:2:1 (p/v/v). La luteína presente en

Scenedesmus almeriensis (aproximadamente 0.5%, p/p, en forma libre), se extrajo con porcentajes de recuperación superiores al 90% y el extracto, enriquecido por un factor de 2.5 veces, contiene los carotenoides en una matriz de ácidos grasos y fase líquida nanoestructurada. El residuo de la biomasa está fundamentalmente constituido por proteínas y carbohidratos.

Ejemplo 4. Extracción de β-caroteno a partir de Dunaliella salina

La microalga *Dunaliella salina* es uno de los organismos con mayor producción de β-caroteno, pudiendo alcanzar hasta 10% en peso seco. Contiene además luteína y zeaxantina en menor proporción. La extracción de los carotenoides presentes en la misma se realiza a partir de la biomasa seca y triturada, utilizando la relación biomasa: disolución de equilibrio hidro-orgánica:fase líquida nanoestructurada 1:2.5:1 (p/v/v). El porcentaje de recuperación del β-caroteno es superior al 98%. El procedimiento de extracción, así como los productos obtenidos, son similares a los descritos en el ejemplo 2 para *Haematococcus pluvialis.*

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de carotenoides a partir de biomasa que comprende las siguientes etapas:

a) disolver un tensioactivo anfifílico en un disolvente orgánico y adicionar agua, en una proporción de cada componente en la mezcla comprendida entre 1:4:2.6 y 1:7:13(g:mL:mL).

b) centrifugar la mezcla obtenida en a), a al menos 3000 rpm durante 10 min, obteniendo una fase hidro-orgánica y una fase líquida nanoestructurada,

c) separar las dos fases obtenidas en la etapa b)

d) mezclar la biomasa con la fase hidro-orgánica y la fase líquida obtenidas en la etapa b) en una relación comprendida entre 1:0:2 y 1:10:1 (g:mL:mL),

e) centrifugar la mezcla obtenida en d) durante al menos 10 minutos a al menos 2500 rpm, obteniendo 3 fases diferenciadas: fase líquida, fase sólida y una fase intermedia,

f) purificar la fase líquida obtenida en e) para obtener el extracto de carotenos.

2. Procedimiento para la obtención de carotenoides según la reivindicación 1, donde el tensioactivo anfifílico comprende una cadena hidrocarbonada de entre 6 y 18 átomos de carbono y al menos un grupo polar seleccionado de entre grupos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, fosfatos...

3. Procedimiento para la obtención de carotenoides según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el tensioactivo anfifílico se selecciona de entre glicolípidos, ácidos grasos, fosfolípidos, lipopéptidos, lípidos neutros, o cualquier tensioactivo de origen natural

4. Procedimiento para la obtención de carotenoides según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el disolvente orgánico es seleccionado de entre tetrahidrofurano, etilenglicol, dioxano, acetona, propanol, etanol, acetonitrilo y metanol.

5. Procedimiento para la obtención de carotenoides según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la etapa f) de purificación se realiza mediante la eliminación del disolvente orgánico.

6. Procedimiento para la obtención de carotenoides según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una etapa adicional de dilución del extracto obtenido en la etapa f) con un aceite vegetal.

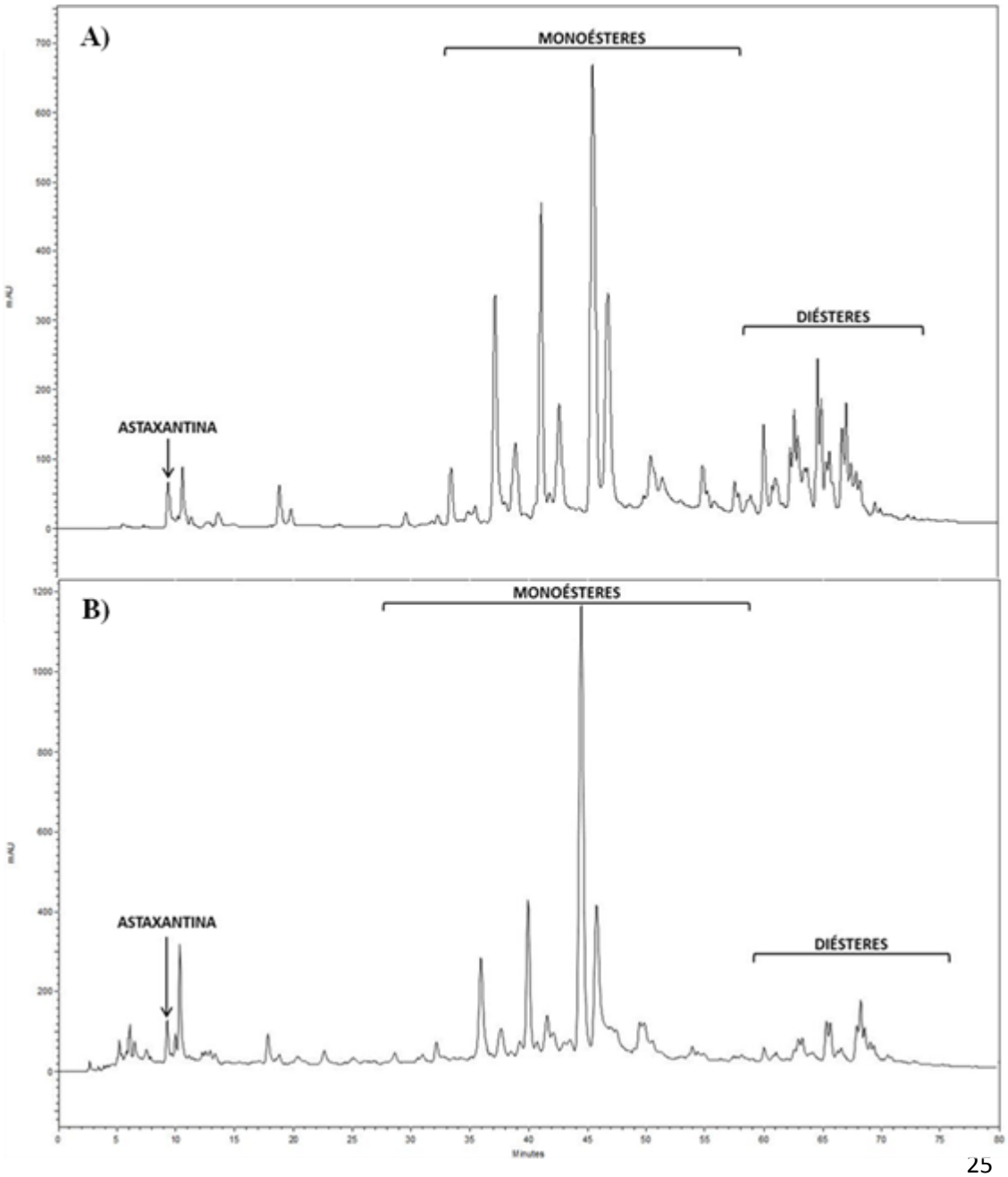
7. Procedimiento para la obtención de carotenoides según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la biomasa es biomasa vegetal, fúngica o de levadura.

8. Procedimiento para la obtención de carotenoides según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la biomasa comprende un pretratamiento de secado y triturado.

9. Uso del extracto obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 como aditivo alimentario.

10. Uso del extracto obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en formulaciones farmacéuticas.

FIG.1


A)
MONOÉSTERES
DIÉSTERES
ASTAXANTINA
mAU
B)
MONOÉSTERES
DIÉSTERES
ASTAXANTINA
mAU
Minutes

25

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201730822

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	CABALLO CARMEN et al. Determination of supplemental feeding needs for astaxanthin and canthaxanthin in salmonids by supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography-UV/VIS spectroscopy. Food Chemistry 2012, Vol. 134, Nº 2, Páginas 1244-1249, resumen	1-10
A	GONG MENGYUE et al. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances* 34, páginas 1396-1412, página 1406	1-10
A	WO 2009063100 A1 (UNIV ALMERIA et al.) 22/05/2009, resumen	1-10

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
16.04.2018	I. Rueda Molíns	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/14 (2006.01)
C12N1/16 (2006.01)
A61K36/06 (2006.01)
A61K36/02 (2006.01)
A23L33/10 (2016.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, BIOSIS, INTERNET