

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 639**

51 Int. Cl.:

<b>A23L 5/41</b>	(2006.01)
<b>C07C 11/28</b>	(2006.01)
<b>C09B 61/00</b>	(2006.01)
<b>C12P 23/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/31</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/10</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2007 PCT/EP2007/006747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2008 WO08017401**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2007 E 07786445 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2048972**

54 Título: **Composiciones estables y biodisponibles de isómeros de licopeno para la piel y el cabello**

30 Prioridad:

**08.08.2006 EP 06016475**

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

**19.03.2019**

73 Titular/es:

**INDENA S.P.A. (100.0%)  
Viale Ortles, 12  
20139 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**GIORI, ANDREA y  
FRANCESCHI, FEDERICO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 704 639 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

Composiciones estables y biodisponibles de isómeros de licopeno para la piel y el cabello.

- 5 La presente invención se refiere a una composición primaria que incluye al menos un material que contiene licopeno enriquecido en isómeros Z del compuesto de licopeno que tiene una estabilidad y biodisponibilidad aumentadas, y un proceso para formar este. Se refiere, además, a una composición oral que contiene la composición primaria en un producto alimenticio, en un suplemento alimenticio, en una preparación cosmética o en una preparación farmacéutica.
- 10 Antecedentes tecnológicos
- La absorción de carotenoides es un proceso complejo que implica la liberación de la matriz de la microestructura de los alimentos, disolución en micelas mixtas, captación intestinal, incorporación a los quilomicrones, distribución a los tejidos, captación por el hígado y la resecretión en VLDL, que se transforman progresivamente en LDL.
- 15 La absorción de licopeno de las fuentes de alimentos se documenta ampliamente. La biodisponibilidad de licopeno es bastante baja en alimentos tales como los tomates y el jugo de tomate. Hasta ahora, la pasta de tomate es la mejor fuente de alimento conocida para el licopeno biodisponible. El tomate contiene aproximadamente > 90 % de licopeno en su configuración toda E.
- 20 Los extractos de tomate que contienen una alta cantidad de licopeno están disponibles comercialmente en forma de oleoresina pero la biodisponibilidad del licopeno en seres humanos se limita bastante a partir de estas fuentes. En extractos concentrados de tomate, el licopeno está presente principalmente en forma cristalina, lo que se sugiere como uno de los factores principales que reduce su biodisponibilidad.
- 25 Hasta la fecha, la mayoría de las fuentes de licopeno disponibles comercialmente muestran un perfil isomérico bastante similar al de los tomates de partida o muestran solo un ligero aumento en los isómeros Z, ya sean derivados (como salsas) o extractos. Se sabe que varios tratamientos, como por ejemplo el procesamiento térmico, promueven la isomerización. Shi y otros, Journal of Food Process Engineering 2003, 25, 485-498, mostraron que un aumento en los isómeros Z podría obtenerse mediante el calentamiento de salsas de tomate. Sin embargo, ciertos isómeros de licopeno no son estables y son propensos a la retroisomerización. Según la literatura, el 5-Z es el más estable entre los isómeros de licopeno predominantes, seguido del todo-E, el 9-Z y el 13-Z. En consecuencia, la estabilidad de los productos a base de licopeno isomerizado depende de su perfil de isómero de licopeno y por lo tanto puede modularse mediante procesos tecnológicos que afectan a este perfil.
- 30
- 35 Se sabe que la isomerización térmica del licopeno mejora su biodisponibilidad a partir de las matrices alimentarias. Sin embargo, la biodisponibilidad de los isómeros de licopeno individuales todavía no se investiga. En cuanto a la estabilidad, puede suponerse que la biodisponibilidad de los productos a base de licopeno depende de su perfil de isómero de licopeno y por lo tanto puede modularse por medios tecnológicos.
- 40 Ya existen patentes que proponen medios tecnológicos y formulaciones para mejorar la biodisponibilidad de licopeno. Por ejemplo, la patente núm. WO 2005/075575 proporciona una composición primaria enriquecida en isómeros Z, efectiva para aumentar la biodisponibilidad de licopeno.
- 45 La patente núm. EP 1 103 579 describe un proceso para extraer licopeno por reflujo de etanol: el proceso se lleva a cabo durante un corto tiempo (30') para que no se produzca una isomerización significativa. En realidad, el licopeno natural todo-Z se desea como producto final.
- La patente núm. WO 96/13178 describe un proceso para la preparación de concentrados de licopeno estables: sin embargo, no se aprecia el efecto de la isomerización sobre la estabilidad y, por el contrario, el proceso descrito trata de evitar la isomerización mediante el uso de temperaturas inferiores a 50 °C durante unos minutos, por ejemplo, 10 minutos.
- 50
- La patente núm. EP 1 201 762 se refiere a un producto que contiene licopeno en donde el licopeno se encuentra en su forma natural todo trans. No se produce una isomerización significativa ya que cualquier tratamiento térmico (disolución y concentración) se lleva a cabo durante el menor tiempo posible (menos de 1 hora).
- 55
- La patente núm. KR 2005 006592 describe la preparación de un complejo de licopeno-cinc con una actividad antioxidante aumentada. El calentamiento se aplica en ausencia de solventes para romper las paredes celulares del material vegetal. No tiene lugar un calentamiento prolongado ni isomerización.
- 60
- La patente núm. WO 03/079816 describe un proceso para la preparación de extractos de tomate con alto contenido en licopeno en donde la extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente.
- 65 Las patentes núm. US 5,837,311 y WO 97/48287 describen un proceso para la preparación de una oleoresina que tiene un alto contenido de licopeno y una estabilidad satisfactoria. La última característica se obtiene por medio de

fosfolípidos y glicéridos presentes en la propia oleoresina. No se hace mención de la composición isomérica de licopeno y de su influencia en la estabilidad. Se lleva a cabo una extracción en caliente para maximizar el rendimiento en licopeno pero durante un tiempo no superior a 1.2 horas. Se realiza un pretratamiento con calor en los tomates en ausencia de cualquier solvente solo para mejorar la separación pulpa-suero.

5

La patente núm. WO 2005/075575 aborda el problema de aumentar el contenido de isómeros cis en oleorresinas de tomate: se obtiene la isomerización, *entre otros*, por tratamiento térmico por corto periodo de tiempo. Además, el producto obtenido contiene una alta cantidad del isómero 13-cis inestable.

10

La patente núm. EP 0 937 412 describe un proceso para la preparación de preparaciones de carotenoides pulverizadas finamente divididas que incluyen una etapa de calentamiento en presencia de solventes durante tiempos muy cortos (5 segundos).

15

La patente núm. US 5,858,700 se refiere a un proceso para el aislamiento y purificación de cristales de licopeno que se caracterizan por la hidrólisis de impurezas tales como glicéridos y fosfonatos. La hidrólisis se lleva a cabo a alta temperatura pero durante periodos de tiempo inferiores a 2 horas, opcionalmente precedida por una etapa de extracción con solventes a reflujo, pero siempre durante un período breve para evitar la degradación del licopeno.

20

La patente núm. US 6,235,315 describe formulaciones de licopeno pulverizadas y estables que se caracterizan porque el licopeno tiene un cierto grado de cristalinidad y el menor grado posible de isomerización.

25

La patente núm. WO 03/090554 describe derivados de tomate concentrado que tienen alto contenido de licopeno y viscosidad y contenido de azúcar predeterminados. El proceso es físico y no se usa solvente. El calentamiento durante 1-6 minutos se realiza en tomates redondos para facilitar la separación de la pulpa.

30

Mayer-Miebach y otros, "Thermal processing of carrots: lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential" Food Research International, Elsevier Applied Science, Barking, GB, vol. 38, núm. 8-9, octubre 2005, páginas 1103-1108, estudian la isomerización del licopeno en zanahorias liofilizadas en función de la temperatura. Los autores concluyen que solo el isómero todo trans es estable al calentamiento prolongado, lo que resulta en una disminución de los isómeros cis.

35

De hecho, por lo tanto, la técnica anterior no proporciona procesos de isomerización de licopeno que comprenden un calentamiento prolongado en solventes orgánicos que permite obtener un producto que tiene una alta biodisponibilidad y una composición isomérica estable.

40

Resumen

45

Se encontró que la estabilidad de los isómeros Z de licopeno individuales varía de un isómero a otro; en particular, el licopeno 13-Z era mucho menos estable que el 5-Z, o el 9-Z, o los isómeros todo-E. En consecuencia, una composición primaria de acuerdo con la presente invención debe tener un nivel de isómero 13-Z lo más bajo posible para exhibir una estabilidad óptima. Se demostró, además, que algunos isómeros Z (como 5-Z y 9-Z, por ejemplo) de licopeno aumentan la biodisponibilidad de la composición que contiene licopeno. Por lo tanto, la composición primaria debe contener principalmente el isómero 5-Z, o una combinación de isómeros 9-Z y 5-Z para proporcionar una biodisponibilidad y bioeficacia mejoradas.

50

Por consiguiente, es un primer objeto de la presente invención proporcionar un proceso como en la reivindicación 1.

55

Una ventaja de la presente invención es proporcionar composiciones de isómeros Z de licopeno que exhiben una mayor estabilidad, biodisponibilidad y bioeficacia.

60

Las características y ventajas adicionales se describen en la presente descripción, y serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y la figura.

Breve descripción de la figura

65

FIGURA. Área bajo la curva (AUC) de licopeno/triglicéridos de plasma de TRL después del consumo de una comida estándar que contiene 25 mg de licopeno total ya sea a partir de pasta de tomate (licopeno todo-E) u oleorresina de tomate rica en licopeno 5-Z (oleorresina 5-Z) u oleorresina de tomate rica en licopeno 13-Z (oleorresina 13-Z) u oleorresina de tomate rica en licopeno 9 y 13-Z (oleorresina 9 y 13-Z).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones que proporcionan beneficios para la salud. Más específicamente, la presente invención se refiere a composiciones nutricionales beneficiosas que pueden usarse para mejorar la piel y el cabello y métodos con respecto a estas.

La presente invención ahora pone a disposición del consumidor una composición mejorada obtenida de productos naturales. La composición primaria proporciona licopeno en una forma especialmente altamente biodisponible y/o bioeficaz.

En una modalidad preferida, la invención proporciona extractos de tomate o derivados de estos con una relación de isómeros diferente de la que se produce naturalmente en los productos disponibles hasta la fecha. En particular, la invención se refiere a extractos o derivados con un contenido de isómero E no superior al 60 % sobre el contenido total de licopeno, preferentemente, con un contenido de isómero E no superior al 40 % sobre el contenido total de licopeno (por HPLC).

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición primaria que contiene una combinación específica de isómeros Z. Preferentemente, la relación de isómeros Z/E en las composiciones primarias de la presente invención debe estar por encima de 1.

Además, la combinación es, preferentemente, rica en 5-Z y 9-Z y pobre en 13-Z. En una modalidad preferida, la cantidad de 5-Z y 9-Z es mayor que el 30 % sobre el contenido total de licopeno, preferentemente, mayor que 40 %, con la máxima preferencia mayor que 50 %. Además, la cantidad de 13-Z es menor que el 10 % sobre el licopeno total, preferentemente, menor que 5 %, con la máxima preferencia menor que 3 % sobre el contenido total de licopeno. Al aumentar los isómeros 5-Z y 9-Z específicos y/o mediante la disminución de los isómeros 13-Z, por ejemplo, puede obtenerse una forma estable de la composición primaria que es más biodisponible y más bioeficaz. Además, los extractos o derivados de la invención son estables en las condiciones de almacenamiento habituales y no experimentan retroisomerización. En condiciones normales de protección (ausencia de luz y oxígeno), el contenido total de licopeno y el contenido de isómero E permanecen constantes. Este último no aumenta, incluso cuando se mantienen los extractos a temperatura ambiente.

Tal perfil (es decir, una cantidad baja de isómero 13-Z del licopeno) puede obtenerse, por ejemplo, mediante la isomerización del licopeno mediante el uso de catálisis en una matriz sólida tal como arcillas, o mediante calentamiento prolongado.

En una modalidad, el material que contiene licopeno puede estar, por ejemplo, en forma de un extracto, un concentrado o una oleorresina. En la presente descripción, el término "oleorresina" debe entenderse como un extracto lipídico de un material que contiene licopeno, que incluye posiblemente otros carotenoides, triglicéridos, fosfolípidos, tocoferoles, tocotrienoles, fitoesteroles y otros compuestos menos importantes. Se encontró sorprendentemente que la retroisomerización de licopeno en la oleorresina de tomate isomerizada puede minimizarse mediante la reducción de su contenido de isómero 13-Z.

En una modalidad, el material que contiene licopeno puede ser un extracto, un concentrado o una oleorresina, que se obtiene, extrae, enriquece o purifica a partir de un material vegetal o vegetal, un microorganismo, una levadura o un producto de origen animal. Además, se somete a un tratamiento para aumentar su contenido de isómero Z de licopeno, como se describe a continuación.

Si la fuente de licopeno es de origen vegetal, puede ser verduras, hojas, flores, frutas y otras partes de la planta. En una modalidad preferida, la fuente de licopeno son los tomates (es decir, tomate entero, extracto de tomate, carne de tomate, puré de tomate, piel de tomate, con o sin las semillas). Pueden obtenerse concentrados de plantas o vegetales adecuados, por ejemplo, mediante el secado o liofilización de las plantas o vegetales recién cortados o de sus respectivas raíces, frutas o semillas, y después mediante la molienda o granulación opcionalmente del material seco. Los métodos adecuados para obtener extractos de las plantas o vegetales mencionados anteriormente se conocen en la técnica. Los extractos de plantas o vegetales pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la extracción de las plantas o vegetales recién cortados o procesados o de sus respectivas raíces, frutas o semillas con agua o con uno o más solventes de calidad alimentaria o con una mezcla de agua y uno o más solventes de calidad alimentaria. Preferentemente, los extractos y concentrados de acuerdo con la presente invención pueden ser lipídicos o acuosos. Debido a que los carotenoides son liposolubles, la extracción con agua eliminará los componentes no deseados que son solubles en agua tales como, por ejemplo, azúcares, aminoácidos, proteínas solubles y/o ácidos orgánicos.

Si el material que contiene licopeno se obtiene de un microorganismo, puede usarse cualquier microorganismo que produzca licopeno, en particular un microorganismo probiótico tal como, por ejemplo, una bacteria del ácido láctico. Además, el producto de origen animal puede ser de, por ejemplo, salmón, camarones, kril o un extracto de hígado o una fracción de leche. En la presente descripción, el término "fracción de leche" debe entenderse como cualquier parte de la leche.

En una modalidad alternativa, el material que contiene licopeno puede ser una oleorresina. Los métodos adecuados para obtener oleorresinas de las plantas o verduras mencionadas anteriormente se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, las oleorresinas pueden obtenerse por extracción lipídica mediante el uso de un solvente compatible con la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica. Las oleorresinas preparadas por métodos convencionales tienen un

contenido en licopeno de aproximadamente 0.05 % a 50 % en peso. Su contenido de isómero todo-E del licopeno suele ser más alto que el de los isómeros Z, *por ejemplo*, la proporción de isómeros Z/E de licopeno en una oleorresina de tomate seleccionada es de aproximadamente 7:93.

5 Las oleorresinas son el material de partida preferido para obtener la composición primaria de acuerdo con la presente invención porque contienen otros carotenoides o antioxidantes, como la vitamina E, que también estabilizan la composición. La bioactividad y la estabilidad del compuesto de licopeno en la oleorresina pueden mejorarse, en particular, durante el proceso de isomerización y puede aumentarse, además, el rendimiento de licopeno Z en la composición primaria.

10 El material que contiene licopeno incluye, preferentemente, carotenos y xantofilas tales como, por ejemplo, zeaxantina, astaxantina, beta criptoxantina, capsantina, cantaxantina, luteína y derivados de estas tales como ésteres, por ejemplo. Los compuestos de licopeno se someten a un tratamiento para aumentar la fracción de isómero Z en la composición primaria.

15 Para obtener tal perfil de isómero, el material que contiene licopeno que está en forma de un extracto, un concentrado o una oleorresina, se somete a una isomerización que se lleva a cabo por calentamiento prolongado en un solvente. Este hallazgo es sorprendente en vista de las enseñanzas contrarias que pueden derivarse de la técnica anterior que se discute en la sección "Antecedentes de la invención".

20 En particular, cuando se usan tomates o derivados de estos como materiales de partida, pueden tratarse con un solvente capaz de extraer licopeno. El extracto resultante se calienta, el solvente se elimina, y se recupera así el extracto isomerizado.

25 Por otro lado, cuando se usa un extracto o derivado como material de partida, este se recoge en un solvente, la mezcla se calienta durante un tiempo adecuado, después se elimina el solvente, y se recupera así el extracto isomerizado. Los solventes que se usan para la etapa de isomerización son hidrocarburos, hidrocarburos clorados, ésteres, cetonas, alcoholes; particularmente hidrocarburos alifáticos C3-C10, solventes clorados C1-C3, ésteres C3-C6, cetonas C3-C8 y alcoholes C1-C8; más particularmente hexano, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, acetona y butanol. La isomerización en solventes se lleva a cabo a temperaturas que oscilan entre 50 y 150 °C, preferentemente, a temperaturas que oscilan entre 60 y 130 °C. El tiempo de isomerización varía de 4 a 240 h, preferentemente, de 10 a 180 h.

35 La relación de isómeros Z/E en la composición primaria puede aumentarse hasta al menos 20:80, preferentemente, entre 20:80 y 95:5, con mayor preferencia, de 30:70 a 90:10. En una modalidad preferida, la relación (5Z+9Z)/E está por encima de 1, y el 13Z se elimina parcialmente.

40 La composición primaria puede comprender adicionalmente uno o más de emulsionantes, estabilizantes y otros aditivos. Los emulsionantes compatibles en el campo de la alimentación son, por ejemplo, fosfolípidos, lecitina, polioxietileno sorbitán mono o triesterato, monolaurato, monopalmitato, mono o trioleato; un mono o diglicérido. Puede adicionarse cualquier tipo de estabilizador que se conozca en el negocio de alimentos, en cosméticos o en productos farmacéuticos. Además, pueden adicionarse sabores, colorantes y cualquier otro aditivo adecuado conocido en la industria alimentaria, en cosméticos o en productos farmacéuticos. Estos emulsionantes, estabilizantes y aditivos pueden adicionarse de acuerdo con los usos finales de las composiciones primarias.

## EJEMPLOS

50 Ejemplo 1: Estudio de la estabilidad de los isómeros de licopeno

La estabilidad de los isómeros de licopeno se evaluó tanto en un solvente orgánico como en un extracto de tomate.

### *Materiales*

55 La oleoresina de tomate rica en licopeno se obtuvo de Indena s.p.a. (Milán, Italia). Su contenido total de licopeno ascendió al 9.1 %, de los cuales los isómeros todo-E y 5-Z representaron el 93.5 % y 6.5 %, respectivamente. Se prepararon dos oleorresinas isomerizadas mediante el calentamiento de una suspensión de oleorresina de tomate en acetato de etilo (1:10 p/p) ya sea por 1 h o por 48 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, las suspensiones se centrifugaron y el acetato de etilo en los sobrenadantes recuperados se eliminó por destilación a presión reducida.

60 El Di-t-butil-hidroxi-tolueno (BHT) y la N-etildiisopropilamina fueron de Fluka AG. Todos los solventes fueron de grado HPLC y se usaron sin purificación.

### *Aislamiento de isómeros de licopeno puro*

65

Se aislaron licopeno puro 5-Z, 9-Z, 13-Z y todo-E a partir de oleorresina de tomate isomerizada (sometida a 1 hora de calentamiento), mediante la recolección de las fracciones que contenían los picos correspondientes después de la separación por HPLC (ver más abajo las condiciones experimentales). Los picos se recolectaron durante dos series de HPLC consecutivas y las fracciones correspondientes se agruparon.

5

#### Análisis de licopeno

La cantidad de licopeno total se determinó mediante HPLC de fase inversa en una precolumna C<sub>18</sub> (ODS Hypersil, 5 µm, 20 x 4 mm; Hewlett Packard, Ginebra, Suiza) y una columna C<sub>18</sub> (Nova pak, 3.9 µm i.d. x 300 mm de longitud, Millipore, Volketswil, Suiza). La separación se logró a temperatura ambiente en condiciones isocráticas con una fase móvil que consiste en acetonitrilo/tetrahidrofurano/metanol/1 % de acetato de amonio (533.5:193.6:53.7:28, p/p/p/p). La velocidad de flujo de la fase móvil era 1.5 mL/min.

Los perfiles de isómeros de licopeno se determinaron mediante HPLC de fase normal de acuerdo con el método descrito por Schierle y otros (Schierle, J., Bretzel, W., Bühler, I., Faccin, N., Hess, D., Steiner, K., Schuep, W. (1997). Food. Chem. 59: 459). Se disolvieron muestras de oleorresinas isomerizadas en *n*-hexano que contienen 50 ppm de BHT y se giran a la velocidad máxima en una centrifuga Eppendorf Lab. Los sobrenadantes resultantes se analizaron inmediatamente mediante HPLC. El sistema de HPLC usado fue un modelo Hewlett-Packard de la serie 1100 equipado con un detector de matriz de fotodiodos de luz ultravioleta visible. Los datos se adquirieron simultáneamente a 470 nm, 464 nm, 346 nm y 294 nm. Las muestras (10 µL) se separaron mediante el uso de una combinación de tres columnas Nucleosil 300-5 (4 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, Macherey-Nagel). La separación se logró a temperatura ambiente en condiciones isocráticas con una fase móvil que consiste en *n*-hexano con 0.15 % de N-etildiisopropilamina. La velocidad de flujo fue 0.8 mL/min. Los isómeros Z de licopeno se identificaron de acuerdo con los datos de la literatura.

25

Las cantidades de isómeros de licopeno se calcularon en función de las áreas de superficie de los picos de HPLC mediante el uso del mismo coeficiente de extinción que el licopeno todo-E. Por lo tanto, la concentración de licopeno en productos que contienen isómeros Z se subestima ligeramente, ya que se reconoce que los coeficientes de extinción de los isómeros Z son más bajos que los del isómero todo-E.

30

#### Condiciones para las pruebas de estabilidad.

La estabilidad de los isómeros de licopeno se investigó tanto en *n*-hexano como en una oleorresina de tomate isomerizada por 4 horas de calentamiento en acetato de etilo. Para este propósito, los isómeros de licopeno puro se almacenaron durante 33 días en *n*-hexano a temperatura ambiente y en ausencia de luz, y la oleorresina de tomate isomerizada se mantuvo durante 55 días a temperatura ambiente en ausencia de luz. La concentración total de licopeno y los perfiles de isómeros de licopeno se midieron en varios intervalos de tiempo durante el almacenamiento.

35

#### Resultados

40

#### Estabilidad de los isómeros de licopeno en *n*-hexano

Los resultados de la prueba de estabilidad de los isómeros de licopeno puro durante el almacenamiento en *n*-hexano a temperatura ambiente en ausencia de luz se presentan en la Tabla 1. Todos los isómeros, *es decir*, incluido el isómero todo-E, se sometieron a una isomerización geométrica durante el almacenamiento. El 13-Z fue el isómero menos estable: mientras que menos del 50 % del licopeno 5-Z, 9-Z y todo E se transformó después de 33 días de almacenamiento, más del 80 % del licopeno 13-Z se convirtió en otros isómeros durante este periodo de tiempo. Además, la ruta de transformación fue diferente para el licopeno 13-Z en comparación con los otros isómeros Z: mientras que el isómero 13-Z se convirtió principalmente en el isómero todo-E, los isómeros 5-Z y 9-Z se transformaron principalmente en otros isómeros Z durante el almacenamiento en *n*-hexano.

50

Tabla 1: Estabilidad de los isómeros de licopeno puro en *n*-hexano durante el almacenamiento a temperatura ambiente

	tiempo (días)	concentración (% del total de isómeros)				
		todo E	13-Z	9-Z	5-Z	x-Z
licopeno todo-E	0	97.6	1.4	0.5	0.5	0.1
	1	86.0	10.1	1.2	1.2	1.5
	2	78.4	15.0	1.1	2.6	3.0
	5	69.3	19.6	2.2	3.8	5.1

60

65

		12	67.8	18.2	2.0	6.4	5.6
		33	58.7	15.7	3.8	13.4	8.4
5	<b>licopeno 5-Z</b>	0	1.1	n.d.	n.d.	95.5	3.4
		1	2.2	n.d.	n.d.	84.3	13.5
		2	2.4	n.d.	n.d.	76.9	20.6
10		5	3.9	n.d.	n.d.	68.4	27.7
		12	5.6	1.7	0.7	65.3	26.7
		33	10.7	2.8	2.3	53.5	30.7
15		<b>licopeno 9-Z</b>	0	4.4	0.6	93.3	1.8
	1		5.8	2.3	87.1	2.1	2.8
20		2	6.0	3.1	83.5	11.6	5.9
		5	5.6	5.2	79.2	1.5	8.6
		12	7.0	8.2	66.5	2.3	15.9
25		33	9.8	10.5	56.0	4.1	19.7
	<b>licopeno 13-Z</b>	0	2.4	96.6	0	0	1.0
		1	42.6	57.0	0.4	0	0
30		2	59.8	38.7	0	0	1.5
		5	68.9	23.4	1.5	1.9	4.3
		12	65.5	20.8	2.6	5.3	5.8
35		33	57.0	16.9	4.2	11.7	10.2

*Estabilidad de los isómeros de licopeno en oleoresina de tomate*

Los resultados del ensayo de estabilidad de isómeros de licopeno en una oleoresina de tomate calentada durante 48 horas en acetato de etilo se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Estabilidad de los isómeros de licopeno en la oleoresina de tomate isomerizada durante el almacenamiento a temperatura ambiente (n = 2).

	Tiempo de almacenamiento (días)	Licopeno total (mg/g)	13-Z %	9-Z %	todo-E %	5-Z %
	0	0 55.6 ± 3.0	17.4 ± 0.4	32.7 ± 0.7	18.7 ± 0.6	12.0 ± 0.4
	3	56.6 ± 0.8	12.4 ± 0.1	31.4 ± 0.3	25.6 ± 0.5	13.0 ± 0.1
50	5	58.7 ± 0.4	9.5 ± 0.0	30.6 ± 0.5	30.6 ± 0.6	14.0 ± 0.4
	7	59.2 ± 0.1	7.3 ± 0.2	30.9 ± 0.7	32.9 ± 0.3	14.4 ± 0.2
	11	59.3 ± 0.8	5.2 ± 0.1	29.4 ± 0.0	36.5 ± 0.1	15.0 ± 0.1
55	17	60.1 ± 0.9	3.3 ± 0.4	29.0 ± 0.4	38.9 ± 0.4	15.4 ± 0.4
	20	58.8 ± 0.9	2.9 ± 0.3	29.2 ± 0.4	39.9 ± 1.3	15.2 ± 0.6
	34	51.3 ± 7.7	2.2 ± 0.1	30.0 ± 0.1	40.1 ± 0.7	14.1 ± 1.0
60	47	53.9 ± 1.2	1.9 ± 0.6	30.0 ± 0.3	41.4 ± 0.7	14.6 ± 1.3

El contenido total de licopeno fue estable durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Sin embargo, el perfil del isómero de licopeno cambió notablemente con una disminución del contenido de licopeno 13-Z y un aumento del licopeno todo-E. El contenido de licopeno 9-Z y 5-Z se mantuvo estable durante el período de almacenamiento.

## Conclusión

5 Ambas pruebas de estabilidad demostraron que el licopeno 13-Z era mucho menos estable que el 5-Z, o el 9-Z, o los isómeros todo-E. Consecuentemente, una oleorresina de tomate isomerizada con un bajo nivel de licopeno 13-Z debe mostrar una buena estabilidad de su perfil de isómero de licopeno.

## Ejemplo 2: Oleorresina de tomate isomerizada con mayor biodisponibilidad

### 10 Objetivo:

15 El objetivo del presente trabajo fue investigar la biodisponibilidad de varios isómeros de licopeno Z en humanos. Para dilucidar la biodisponibilidad del isómero Z de licopeno específico en humanos, las oleorresinas de tomate se enriquecieron en diferentes isómeros Z de licopeno que alcanzan aproximadamente el 60 % del contenido de licopeno total, es decir, una rica en licopeno 5-Z, otra rica en licopeno 13-Z y la última rica en una mezcla de licopeno 9-Z y licopeno 13-Z.

## Materiales y métodos

### 20 Sujeto

25 Se incluyeron treinta hombres sanos en el estudio. Los criterios de inclusión fueron que los sujetos debían ser no vegetarianos y no fumadores y que no tuvieran trastornos metabólicos como diabetes; hipertensión; enfermedad renal, hepática o pancreática; o úlceras. Los sujetos eran normolipidémicos, es decir, tenían una proporción de colesterol en plasma a colesterol HDL < 5.0 y concentraciones plasmáticas de triacilglicerol (TAG) < 1.5 mmol/L. Debido a la gran cantidad de sangre que se extrajo durante el estudio, los sujetos debían tener una concentración de hemoglobina en la sangre > 13 g/dL. Los sujetos se excluyeron del estudio si usaron medicamentos que alteran el colesterol o un tratamiento hipolipidémico o suplementos de vitaminas y minerales desde 3 meses antes del inicio del estudio hasta la finalización del estudio o si se sometieron a una cirugía gastrointestinal mayor; se ejercitaron intensivamente, como correr maratones; y si consumieron diariamente > 2 copas de vino (3 dL), > 2 cervezas (3 dL) o > 1 copa (vaso) de licor fuerte. Veintisiete de los 30 voluntarios completaron las 4 pruebas posprandiales. Tres voluntarios abandonaron el ensayo antes del final por las siguientes razones: indisponibilidad, tratamiento médico relacionado con una lesión ocular, náuseas relacionadas con el consumo de alimentos grasos. Los sujetos tenían  $24 \pm 1$  años de edad con un peso corporal de  $70 \pm 1$  kg y un índice de masa corporal (IMC) de  $22.5 \pm 0.3$  kg/cm<sup>2</sup>.

35 El protocolo se aprobó por el comité de ética de Marsella (Marsella, Francia). Los sujetos recibieron información sobre los antecedentes y el diseño del estudio y dieron su consentimiento informado por escrito antes de participar. Tenían la libertad de retirarse del estudio en cualquier momento.

### 40 *Diseño del estudio*

45 Este fue un ensayo clínico doble ciego, aleatorizado, de 4 períodos, 4 tratamientos cruzados con un período de lavado de 3 semanas como mínimo. Después de un ayuno nocturno, los sujetos llegaron al Centro de Ensayos de Farmacología Clínica y Terapéutica de la Universidad de Marsella y consumieron una comida estándar que consistía en 25 mg de licopeno incorporado en 40 g de aceite de cacahuete que se mezcló con 70 g de sémola de trigo (cocinado con 200 mL de agua del grifo). Además, consumieron 40 g de pan, 60 g de claras de huevo cocidas, un yogur de 125 g que contenía 5 g de azúcar blanco y bebieron 330 mL de agua (Aquarel, Nestlé). Esta comida estándar proporcionó 842 kcal (3520 kJ) con la siguiente composición de nutrientes: proteína (11.7 %), carbohidratos (39.3 %) y lípidos (49.0 %). Esta comida se consumió en 15 min. No se permitió ningún otro alimento durante las siguientes 6 h, pero los sujetos pudieron beber hasta una botella de agua (330 ml) durante las últimas 3 h posteriores a la absorción (Aquarel, Nestlé).

### *Suplementos de licopeno*

55 Se probaron cuatro productos diferentes de tomate, cada uno proporcionó 25 mg de licopeno total. Consistían en:

- Pasta de tomate (Thorny, Suiza) que contiene licopeno, principalmente en configuración todo-E
- Oleorresina de tomate enriquecida en licopeno 5-Z
- Oleorresina de tomate enriquecida con licopeno 13-Z

60 Oleorresina de tomate enriquecida con una mezcla de licopeno 9-Z y 13-Z

La Tabla 3 presenta el contenido de licopeno, así como el perfil del isómero de licopeno de estos cuatro productos de tomate.

65 Tabla 3: Licopeno total así como todo-E y suma de isómeros Z de licopeno en los cuatro productos de tomate

	<b>Todo-E</b> (% de licopeno total)	<b>5-Z</b> (% de licopeno total)	<b>9-Z</b> (% de licopeno total)	<b>13-Z</b> (% de licopeno total)	<b>X*-Z</b> (% de licopeno total)
5 <b>Pasta de tomate</b>	94.9	4.1	nd	0.1	nd
<b>5-Z</b>	33.4	65.3	1.3	nd	nd
<b>13-Z</b>	29.3	7.6	9.6	41.5	12.0
10 <b>9- &amp; 13-Z</b>	27.7	7.7	30.8	23.5	10.2
* los isómeros de licopeno no identificados son un conjunto de isómeros de licopeno desconocidos calculados a partir de las áreas de los picos correspondientes en el cromatograma de HPLC.					

15

#### *Recolección de muestras de sangre*

Se extrajo sangre en ayunas de una vena anticubital mediante punción venosa en un tubo evacuado que contiene EDTA de potasio/K<sub>3</sub> que se colocó inmediatamente en un baño de agua con hielo y se cubrió con una lámina de aluminio para evitar la exposición a la luz. Las muestras de sangre en ayunas se recolectaron antes, es decir, 20 minutos y 5 minutos antes del consumo de la comida estándar, así como 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h después de la absorción. El tubo que contenía la sangre se protegió de la luz, se almacenó a 4 °C y después se centrifugó durante 2 h (10 min, 4 °C, 2.800 rpm) para separar el plasma. Se adicionó un cóctel de inhibidores (10 µL/mL) (Cardin y otros, Degradation of apolipoprotein B-100 of human plasma low density lipoproteins by tissue and plasma kallikreins, Biol Chem 1984; 259:8522-8.).

25 *Aislamiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos plasmáticos (TRL)*

Después del consumo de una comida grasa, las moléculas lipófilas de la dieta se incorporan a los quilomicrones, que se secretan en la sangre. Las lipoproteínas se separan por una metodología de ultracentrifugación basada en su densidad. Debido a la densidad bastante similar de los quilomicrones (0.95 g/ml) y las VLDL (1.006 g/ml), no es posible separar uno de las otras y se recolectan por completo en una fracción llamada lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL). Sin embargo, en el estado posprandial, esta fracción plasmática de TRL contiene principalmente quilomicrones secretados por el intestino, lo que es una buena evaluación de la biodisponibilidad intestinal.

35 Las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) que contienen principalmente quilomicrones con poca cantidad de VLDL se aislaron inmediatamente mediante ultracentrifugación de la siguiente manera: Se cubrieron 6 mL de plasma con una solución de NaCl al 0.9 % y se centrifugaron durante 28 minutos a 32.000 rpm, a 10 °C en un rotor SW41TI (Beckman), en una ultracentrífuga L7 (Beckman). Inmediatamente después de la centrifugación, las TRL se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C antes de las determinaciones analíticas. Los análisis de licopeno se realizaron en un período de 10 días, y los análisis de triacilglicerol en un período de 30 días.

40

#### *Determinación analítica*

Los triglicéridos se analizaron mediante un método enzimático y colorimétrico mediante el uso de un estuche comercial (Estuche Bio-Merieux).

45

Los perfiles totales de isómeros de licopeno y de licopeno se determinaron mediante el método de HPLC de fase inversa y fase normal, respectivamente (M. Richelle, K. Bortlik, S. Liardet, C. Hager, P. Lambellet, L.A. Applegate, E.A. Offord, J. Nutr. (2002) 132, 404-408.). El contenido total de licopeno se calculó como la suma de los isómeros de licopeno 5-Z, 9-Z, 13-Z, x-Z y todo-E. El isómero de licopeno se cuantificó mediante el uso del coeficiente de extinción del licopeno todo-E, ya que el valor exacto para todo el licopeno Z individual aún se desconoce. El perfil de los isómeros de licopeno se determina por la relación del isómero de licopeno individual al licopeno total expresado en porcentaje.

50

#### *Análisis estadístico*

55 La biodisponibilidad del licopeno se evaluó mediante la medición del área bajo la concentración de licopeno en la curva de tiempo TRL (AUC). Esta área se calculó durante el período de 0-6 horas mediante el uso del método trapezoidal (AUC (0-6 h)). Los datos se presentan como la media ± SEM. La línea base de concentración fue el promedio de las concentraciones medidas en las dos muestras de plasma recolectadas antes del consumo de la comida estándar que contenía 25 mg de licopeno de la matriz de tomate. Para cada sujeto y cada tratamiento con licopeno, el cálculo del AUC (0-6h) se realizó mediante la resta de la línea base de la concentración del valor de concentración medido en cada punto de tiempo posterior a la absorción. Si este valor era negativo, se consideraba cero.

60

Para cada tratamiento, si la distribución del AUC<sub>(0-6h)</sub> fue normal (pruebas de asimetría y kurtosis) con o sin transformación logarítmica, la comparación se realizó mediante el uso de un modelo mixto lineal con tratamiento como efecto fijo y sujeto como efecto aleatorio.

65

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SAS (versión 8.2; SAS Institute, Cary, NC). El nivel de rechazo en las pruebas estadísticas fue igual al 5 %.

## 5 Resultados

### Biodisponibilidad de licopeno

10 Debido a que los cuatro tratamientos con tomate indujeron una variación de la extensión de la secreción de triglicéridos, la biodisponibilidad del licopeno se normalizó mediante el uso de la absorción de triglicéridos. ( $AUC_{(0-6h)}$ ).

La biodisponibilidad del licopeno normalizado fue marcadamente diferente entre los cuatro tratamientos de tomate (Figura).

15 Sorprendentemente, el licopeno estaba más biodisponible, por aproximadamente dos veces, en la oleorresina de tomate rica en licopeno 5-Z que en los otros tres tratamientos, es decir, la pasta de tomate, oleorresina de tomate rica en licopeno 13-Z y oleorresina de tomate rica en una mezcla de licopeno 13-Z y 9-Z ( $p < 0.0001$ ) (Figura).

20 Mientras el licopeno estaba similarmente biodisponible en la pasta de tomate como en la mezcla de oleorresina de tomate 13-Z y 9-Z.

El licopeno presente en la oleorresina de tomate 13-Z exhibió una leve pero significativamente menor biodisponibilidad ( $p < 0.03$ ) en comparación con la pasta de tomate.

## 25 Conclusión

Estos resultados indican que la configuración de la molécula de licopeno afecta notablemente el tráfico de licopeno dentro del tracto gastrointestinal y en consecuencia la cantidad de licopeno que se absorbe. La biodisponibilidad de licopeno a partir del extracto de tomate rico en licopeno 5-Z es aproximadamente el doble que la de la pasta de tomate.

30 Por el contrario, el licopeno presente en el extracto de tomate rico en una mezcla de licopeno 9-Z y 13-Z es similarmente biodisponible al presente en la pasta de tomate, mientras que la oleorresina de tomate rica en licopeno 13-Z presenta un licopeno ligeramente menos biodisponible. Varios autores ya señalaron que la presencia de licopeno Z en un producto de tomate se asocia con un aumento de la biodisponibilidad de licopeno. Este es el primer estudio que demuestra que la mejora de la biodisponibilidad de licopeno se relaciona específicamente con la configuración del licopeno, es decir, licopeno 5-Z > licopeno 9-Z > licopeno 13-Z.

### Ejemplo 3: Extracción e isomerización en acetato de etilo

40 52 kg de tomates frescos que contienen 100 ppm de licopeno se trocean y homogeneizan. Parte del agua se elimina por destilación a presión reducida para obtener 18 kg de concentrado de tomate. Este se extrae con 36 L de acetato de etilo saturado con agua; durante la extracción, la mezcla se mantiene a temperatura ambiente protegida de la luz y bajo agitación durante 2 horas. Después se separa el extracto del concentrado de tomate. El procedimiento descrito anteriormente se repite dos veces en dicho concentrado de tomate, mediante el uso de 108 L totales de solvente. Los extractos combinados se lavan en un embudo de decantación con 27 L de agua. La fase acuosa se desecha después, mientras que la fase orgánica se concentra a presión reducida para obtener una suspensión con un 10 % p/v de residuo seco; el residuo seco tiene un contenido total de licopeno de 9.1 % p/p y un contenido de isómero Z de 0.46 % p/p. Esta mezcla se calienta a reflujo (76 °C) bajo agitación durante 7 días antes de concentrarse a sequedad a presión reducida.

50 Se obtienen 46.8 g de extracto final con un contenido total de licopeno del 9 % p/p y un contenido de isómero Z de 5.59 % p/p; en particular, el contenido del isómero E es de 3.41 % p/p y el contenido de isómero 13-Z es 0.16 % p/p. El perfil de HPLC del extracto se presenta en la Figura.

### Ejemplo 4: Extracción e isomerización en hexano

55 10 kg de tomates frescos que contienen 140 ppm de licopeno se trocean y se homogeneizan. Parte del agua se separa por destilación a presión reducida para obtener 2.5 kg de concentrado de tomate, que se extrae con 12.5 L de hexano. Durante la extracción, la mezcla se mantiene a temperatura ambiente protegida de la luz y bajo agitación durante 2 horas. Después se separa el extracto del concentrado de tomate. El procedimiento descrito anteriormente se repite una vez en dicho concentrado de tomate, mediante el uso de 25 L totales de solvente. Los extractos se combinan y se concentran a presión reducida para obtener una solución al 10 % p/v de residuo seco; el residuo seco tiene un contenido total de licopeno de 9.1 % p/p y un contenido de isómero Z de 0.46 % p/p. Esta mezcla se calienta a reflujo (69 °C) bajo agitación durante 6 días antes de concentrarse a sequedad a presión reducida. Se obtienen 16.5 g de extracto final con un contenido total de licopeno de 9.1 % p/p y contenido de isómero Z de 5.62 % p/p; en particular, el contenido del isómero E es de 3.38 % p/p y el contenido de isómero 13-Z es 0.18 % p/p.

65

## Ejemplo 5: Isomerización en butanol

10 kg de tomates frescos que contienen 90 ppm de licopeno se trocean y homogeneizan. Parte del agua se separa por destilación a presión reducida para obtener 3.4 kg de concentrado de tomate, que se extrae con 7 L de acetato de etilo saturado con agua. Durante la extracción, la mezcla se mantiene a temperatura ambiente protegida de la luz y bajo agitación durante 2 horas. Después se separa el extracto del concentrado de tomate. El procedimiento descrito anteriormente se repite dos veces en dicho concentrado de tomate, mediante el uso de 21 L totales de solvente. Los extractos combinados se lavan en un embudo de decantación con 5.3 L de agua. La fase acuosa se desecha después, mientras que la fase orgánica se concentra a sequedad a presión reducida. El residuo seco (9.8 g), que tiene un contenido total de licopeno de 7.8 % p/p y un contenido de isómero Z de 0.40 % p/p, se suspende en 98 ml de n-butanol. La mezcla se mantiene a 130 °C bajo agitación durante 4 horas antes de concentrarse a sequedad a presión reducida. Se obtienen 9.8 g de extracto final con un contenido total de licopeno de 6.35 % p/p y un contenido de isómero Z de 4.50 % p/p; en particular, el contenido de isómero E es de 1.85 % p/p y el contenido de isómero 13-Z es 0.47 % p/p.

## Ejemplo 6: Isomerización en catalizadores sólidos

*Materiales*

La oleoresina de tomate rica en licopeno se obtuvo de Indena s.p.a. (Milán, Italia). Su contenido total de licopeno ascendió al 9.1 %, de los cuales los isómeros todo-E y 5-Z representaron el 93.5 % y 6.5 %, respectivamente.

*Métodos*

Se filtró una suspensión de oleoresina de tomate en acetato de acetilo (1: 100 p/p) y se incubó con un 5 % de catalizador sólido con agitación constante a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se centrifugó a velocidad máxima en una centrífuga Eppendorf Lab y se evaporó una alícuota de sobrenadante bajo N<sub>2</sub> y se volvió a suspender n-hexano/BHT.

*Análisis de licopeno*

La cantidad de licopeno total y los perfiles de isómeros de licopeno se determinaron mediante HPLC de fase inversa y fase normal, respectivamente, en las condiciones analíticas descritas en el ejemplo 1.

## Resultados

Los perfiles de isómeros de licopeno medidos en la oleoresina de tomate isomerizada durante 2 horas a temperatura ambiente mediante el uso de catalizadores sólidos se presentan en la Tabla 4.

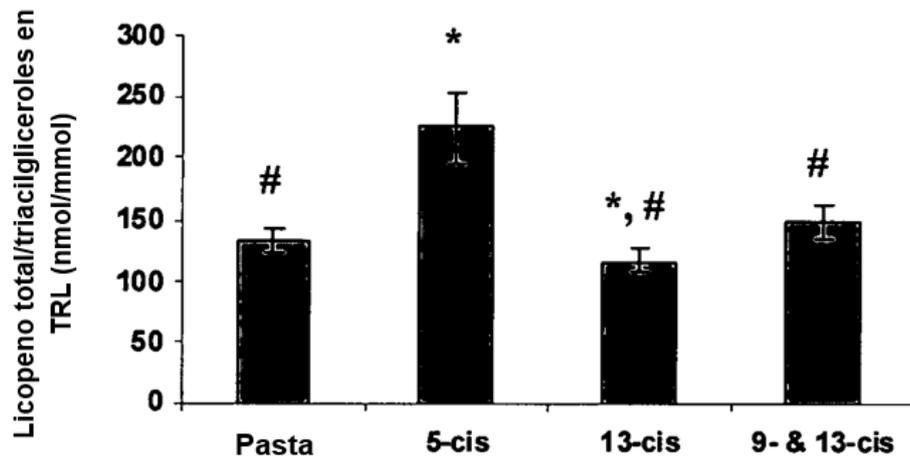
Tabla 4. Perfiles de isómeros de licopeno en oleoresinas de tomate isomerizadas mediante el uso de catalizadores sólidos

Catalizador	Concentración de isómeros (% del total de isómeros)				
	Todo-E	13-Z	9-Z	5-Z	x-Z*
control	83.3	3.0	0.9	8.6	4.1
Tonsil Optimum	31.3	7.0	13.4	23.8	24.5
Amberlyst 15	34.5	4.8	11.2	19.4	30.1
* isómeros de licopeno desconocidos					

El licopeno se isomerizó eficientemente durante 2 h de reacción en acetato de etilo a temperatura ambiente en presencia de Tonsil Optimum o Amberlyst 15. Con ambos catalizadores una gran parte del isómero del licopeno todo-E se convirtió en isómeros Z. Entre los isómeros de licopeno identificados, el 5-Z se formó mayoritariamente, seguido por el 9-Z y el 13-Z, respectivamente; así, la concentración del isómero 13-Z fue, por lo tanto, inferior al 10 % en las oleoresinas de tomate isomerizadas.

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para fabricar una composición estable enriquecida en cis-licopeno (isómeros Z) por calentamiento continuo prolongado en un solvente de un material que contiene licopeno, en donde la temperatura de calentamiento varía de 50 a 150 °C y el tiempo de calentamiento varía de 4 a 240 h y en donde la cantidad de isómero 13-Z es inferior al 10 % respecto al licopeno total en la composición estable.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el material que contiene licopeno consiste en tomates, partes de tomates, derivados de estos o extractos de tomate en solventes.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el solvente es un hidrocarburo alifático C3-C10, un solvente clorado C1-C3, un éster C3-C6, una cetona C3-C8 o un alcohol C1-C8.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en donde el solvente se selecciona de hexano, tetracloruro de carbono, acetato de etilo, acetona, butanol.



\* Diferente significativamente de la pasta de tomate,  $p < 0.05$

# Diferente significativamente de la oleorresina de tomate 5-Z,  $p < 0.05$