

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 342**

51 Int. Cl.:

C07C 403/24 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 31/047 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

C09B 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2010 PCT/IN2010/000263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10125576**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10735345 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 2424836**

54 Título: **Un procedimiento para el aislamiento de cristales de luteína y zeaxantina a partir de fuentes vegetales**

30 Prioridad:

27.04.2009 IN CH09642009

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

15.11.2019

73 Titular/es:

**KATRA PHYTOCHEM INDIA PRIVATE LIMITED
(100.0%)
No.7, A-1, Attibele Industrial Area, Anekal Taluk
Bangalore District 562 107, IN**

72 Inventor/es:

**SETHURAMAN, SWAMINATHAN y
MADAVALAPPIL KUNHIRAMAN, PRIYA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 731 342 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

Un procedimiento para el aislamiento de cristales de luteína y zeaxantina a partir de fuentes vegetales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides. La presente invención se refiere específicamente a un procedimiento para obtener cristales de carotenoides puros, en el que los cristales de carotenoides así obtenidos comprenden xantofilas tales como luteína, zeaxantina y bajos niveles de β -caroteno y criptoxantina.

10 La presente invención también se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina a partir de diferentes plantas, para obtener cristales de carotenoides de luteína y zeaxantina con relaciones en peso de aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 y de aproximadamente 1:1.

Antecedentes de la invención

15 Los carotenoides son una clase de pigmentos naturales solubles en grasa que se encuentran principalmente en las plantas, las algas, y las bacterias fotosintéticas, donde desempeñan un papel fundamental en el procedimiento fotosintético. También se producen en algunas bacterias, levaduras y mohos no fotosintéticos, donde desempeñan una función protectora frente a los daños causados por la luz y el oxígeno. Aunque los animales parecen no tener la capacidad de sintetizar carotenoides, muchos animales incorporan carotenoides en su dieta. Dentro de los animales, los carotenoides proporcionan una coloración brillante, sirven como antioxidantes, y pueden ser una fuente de actividad de la vitamina A (Ong y Tee 1992; Britton et al. 1995). Los carotenoides se definen por su estructura química. La mayoría de los carotenoides se derivan de una cadena de polieno de 40 carbonos, que podría considerarse la cadena principal de la molécula. Esta cadena puede terminar en grupos terminales cíclicos (anillos) y se puede complementar con grupos funcionales que contienen oxígeno. Los carotenoides hidrocarbonados se conocen como carotenos, mientras que los derivados oxigenados de estos hidrocarburos se conocen como xantofilas. El betacaroteno, el principal carotenoide en las zanahorias, es un caroteno familiar, mientras que la luteína, el principal pigmento amarillo de los pétalos de caléndula, es una xantofila común.

25 Se ha demostrado científicamente que las xantofilas reducen el riesgo de degeneración macular relacionada con la edad (Moeller SM, Jacques PF, Blumberg JB " *The potential role of dietary Xanthophylls in cataract-and age related macular degeneration*", Journal of the American College of Nutrition, 2000; 19: 522S-527S), control sobre el colesterol LDL (Chopra M., Thumham DI, " *Effect of Lutein on oxidation of low density lipoproteins (LDL) in vitro*", Proceedings of the Nutrition Society, 1994; 53: 1993, n.º.18A), prevención de enfermedades coronarias (Howard AN, Williams NR, Palmer CR, Cambou JP, Evans AE, Foote JW, et al., " *Do hydroxy-carotenoids prevent coronary heart diseases*") y la captación de los radicales libres y la mejora de la inmunidad (Chew BP, Wong MW, Wong TS, " *Effects of Lutein from Caléndula extract on immunity and growth of mammary tumors in mice*", Anticancer Research, 1996; 16: 3689-3694).

30 La luteína (β - ϵ -caroteno-3-3'-diol) y la zeaxantina (β - β -caroteno-3-3'-diol) pertenecen al grupo de las xantofilas en la familia de los carotenoides con grupos hidroxilo altamente reactivos que los humanos y los animales no pueden sintetizar.

35 La patente de EE. UU. n.º. 5.382.714 describe un procedimiento para el aislamiento de luteína pura que comprende oleorresina de caléndula saponificada que contiene luteína libre.

40 La patente de EE. UU. n.º. 6.262.284 describe un procedimiento para extraer, saponificar, y aislar luteína y zeaxantina, y una mezcla de varios carotenoides raros de alta pureza a partir de las plantas.

La patente de EE. UU. n.º. 5.648.564 describe un procedimiento para la saponificación de la oleorresina de caléndula con un álcali acuoso diluido con propilenglicol, que da como resultado la formación de cristales de luteína.

45 La patente de EE. UU. n.º. 6.380.442 describe un procedimiento para obtener carotenoides a partir de oleorresina de caléndula mediante hidrólisis utilizando alcohol isopropílico con saponificación. Además, el procedimiento implica enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. La patente de EE. UU. n.º. 6.504.067 describe un procedimiento para obtener concentrados de xantofila al refinar la oleorresina de caléndula con carbonato de sodio seguido de neutralización, en el que la oleorresina refinada se saponificó utilizando álcali acuoso.

50 El documento de patente WO 2006/1 14794 describe un procedimiento para aislar carotenoides, predominantemente luteína a partir de pétalos de flores de caléndula. La patente de EE. UU. n.º. 5.876.782 describe un procedimiento *in situ* para convertir xantofilas de forma no libre en xantofilas libres mediante la transesterificación de las acil xantofilas presentes en el material biológico de la planta.

55 La patente de EE. UU. n.º. 6.743.953 describe un procedimiento para la extracción de xantofilas a partir de pétalos de caléndula secos utilizando hexano como disolvente, que conlleva la saponificación de hasta 3 horas, al someter el producto a calentamiento a 70 °C durante un largo tiempo, lo que puede dar como resultado productos oxidativos degenerados en la masa saponificada.

El documento de patente JP 113222708 A describe un procedimiento para aislar luteína a partir de oleorresina de caléndula mediante saponificación.

5 La patente de EE. UU. n°. 6.784.351 describe una planta de caléndula cuyos pétalos de flores y hojas contienen uno o más de una relación mejorada de zeaxantina, una relación mejorada de neoxantina más violaxantina, una relación mejorada de β -caroteno, una relación mejorada de α -criptoxantina, una relación mejorada de fitoeno o una relación mejorada de fitoflueno con respecto a esa relación en una caléndula no mutante. También se describen métodos para preparar dichas plantas, oleorresinas y materiales comestibles que tienen dichas relaciones de carotenoides.

Ishida y otros (J. Agric. Food Chem; 57, 3, 2009) describen la extracción de carotenoides de la planta utilizando alcohol y mezclas de alcohol con lactato de etilo.

10 Sin embargo, existe la necesidad de un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides en el que la harina de la planta seca se ponga en contacto directamente con el alcohol y en el que los cristales de carotenoides así obtenidos comprendan xantofilas tales como luteína, zeaxantina y bajos niveles de caroteno y criptoxantina.

Estas y otras características, aspectos, y ventajas del presente objeto de estudio se entenderán mejor con referencia a la siguiente descripción y a las reivindicaciones anexas.

15 **Compendio**

La presente invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides como se representa en las reivindicaciones.

20 El procedimiento comprende secar una parte de la planta para obtener una harina; someter la harina a extracción con etanol, isopropanol, o mezclas de los mismos a una temperatura en el intervalo de 50 °C a 75 °C para obtener oleorresina; enriquecer la oleorresina lavando con agua de proceso a 45 °C seguido de homogeneización durante 10 a 20 minutos con etanol, sedimentación, separación y drenaje del etanol a una temperatura en el intervalo de 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida; hidrolizar la oleorresina enriquecida con álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de 70 °C a 80 °C para obtener la mezcla de reacción; añadir agua caliente a una temperatura de 65 °C a 75 °C a la mezcla de reacción para precipitar los cristales de carotenoides; y filtrar, lavar y secar los cristales de carotenoides; seleccionándose la fuente vegetal del grupo que consiste en flores de caléndula (*Tagetes erecta*), pétalos de caléndula, frutos de pimienta roja y bayas de Goji (*Lycium barbarum*).

30 La presente descripción describe cristales de carotenoides que comprenden luteína y zeaxantina en relaciones en peso de aproximadamente 10:1 obtenidos mediante un procedimiento que comprende poner en contacto una parte de una planta rica en luteína con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto, enriquecer el extracto con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en luteína. Una planta rica en zeaxantina se somete a extracción poniendo en contacto una parte de la planta rica en zeaxantina con alcohol y extrayendo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener otro extracto y enriqueciendo el extracto con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en zeaxantina. La oleorresina rica en luteína se mezcla con la oleorresina rica en zeaxantina en relaciones en peso que oscilan entre aproximadamente 80:20 (p/p) y 90:10 (p/p). La oleorresina mezclada se hidroliza luego con un álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción. Los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1 se precipitan de la mezcla de reacción añadiendo agua caliente. Se filtran, se lavan y se secan los cristales de carotenoides.

45 La descripción también expone cristales de carotenoides que comprenden luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1 obtenida mediante un procedimiento que comprende poner en contacto una parte de una planta rica en luteína con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto y enriquecer aún más el extracto con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en luteína. Una planta rica en zeaxantina se somete a extracción poniendo en contacto una parte de la planta rica en zeaxantina con alcohol y extrayendo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener otro extracto y enriqueciendo el extracto con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener oleorresina enriquecida en zeaxantina. La oleorresina rica en luteína se mezcla con la oleorresina rica en zeaxantina en relaciones en peso que varían de aproximadamente 70:30 (p/p) a 30:70 (p/p). La oleorresina mezclada se hidroliza luego con un álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción. Los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1 se precipitan de la mezcla de reacción añadiendo agua caliente. Se filtran, se lavan y se secan los cristales de carotenoides.

55 La descripción también expone cristales de carotenoides que comprenden luteína y zeaxantina en relaciones en peso de aproximadamente 1:1 obtenidos mediante un procedimiento que comprende poner en contacto una parte de una planta rica en luteína con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto y enriquecer aún más el extracto con alcohol a una temperatura en el intervalo de

aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en luteína. Una planta rica en zeaxantina se somete a extracción poniendo en contacto una parte vegetal rica en zeaxantina con alcohol y extrayendo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener otro extracto y enriquecer la oleorresina rica en zeaxantina con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener oleorresina enriquecida en zeaxantina. La oleorresina rica en luteína se mezcla con la oleorresina rica en zeaxantina en relaciones en peso que varían de aproximadamente 10:90 (p/p) a 20:80 (p/p). La oleorresina mezclada se hidroliza luego con un álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción. Los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1 se precipitan de la mezcla de reacción añadiendo agua caliente. Se filtran, se lavan y se secan los cristales de carotenoides. La presente descripción también proporciona cristales de carotenoides que comprenden luteína y zeaxantina, en los que una relación en peso de la luteína a zeaxantina es de aproximadamente 10:1 o 5:1 o 1:1.

Se describen los cristales de carotenoides con estas relaciones en peso producidos mediante el procedimiento descrito anteriormente. Estas relaciones en peso de luteína con respecto a zeaxantina, específicamente de 10:1,5:1 o 1:1, son fundamentales para hacer que los carotenoides sean más bioactivos y biodisponibles. Los cristales de carotenoides que comprenden luteína y zeaxantina, en los que una relación en peso de luteína con respecto a zeaxantina es de aproximadamente 10:1, 5:1 o 1:1 son útiles como antioxidantes. Estos cristales de carotenoides son específicamente buenos para el cuidado de los ojos.

La presente invención tiene ventajas en su combinación de tiempo y temperatura, su naturaleza ecológica y el uso de sólo disolventes seguros de la clase 3. Todos estos factores contribuyen al rendimiento y a la estabilidad del producto y reducen el coste de producción a escala comercial. También aumenta la seguridad del producto para su uso como nutracéutico, cosmecéutico, suplemento alimenticio o dietético.

Este compendio se proporciona para introducir una selección de conceptos en una forma simplificada.

Este compendio no tiene la intención de identificar características clave o características esenciales del objeto de estudio reivindicado.

Descripción detallada

La descripción expone un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides, comprendiendo dicho procedimiento secar una parte de la planta para obtener una harina; someter la harina a extracción con un alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener oleorresina; enriquecer la oleorresina con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener oleorresina enriquecida; hidrolizar la oleorresina enriquecida con álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener la mezcla de reacción; agregar agua caliente a la mezcla de reacción para precipitar los cristales de carotenoides.

En una realización, el procedimiento comprende filtrar, lavar y secar los cristales de carotenoides.

La fuente vegetal rica en luteína y la fuente vegetal rica en zeaxantina se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en flores de caléndula (*Tagetes erecta*), pétalos de caléndula, frutos de pimiento rojo y bayas de Goji (*Lycium barbarum*).

En una realización específica, la fuente vegetal rica en luteína se selecciona del grupo que consiste en flores de caléndula y pétalos de caléndula, y la fuente vegetal rica en zeaxantina se selecciona del grupo que consiste en frutos de pimiento rojo y bayas de Goji.

En una realización preferida, las partes de la planta usadas en el procedimiento se ensilan bajo condiciones anaeróbicas controladas antes del secado.

En otra realización, la relación de la oleorresina con respecto al alcohol para enriquecer la oleorresina está en el intervalo de 1,0,5 a 1:4 (p/v), preferiblemente 1:1 (p/v).

En otra realización, el álcali alcohólico es, o bien hidróxido de sodio etanólico, o bien hidróxido de potasio etanólico.

En otra realización, la relación de la mezcla de reacción con respecto al agua caliente está en el intervalo de 1:1 a 1:1,5.

Los métodos convencionales para preparar los cristales de carotenoides que tienen tanto luteína como zeaxantina, tal como la combinación de cristales después de purificar los cristales de luteína y los cristales de zeaxantina individualmente, da como resultado relaciones variadas de luteína y zeaxantina. Además, con dichos métodos, la recuperación de cristales purificados de zeaxantina obtenidos según lo anterior es muy baja, lo que no es rentable a escala comercial. Por lo tanto, también es necesario un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina procedentes de diferentes plantas al combinar la oleorresina, para obtener cristales de carotenoides de luteína y zeaxantina en relaciones en peso de aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 y de aproximadamente 1:1.

La descripción proporciona un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, comprendiendo dicho procedimiento:

5 poner en contacto una fuente vegetal rica en luteína con un alcohol y someterla a extracción a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto; enriquecer el extracto con un alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener la oleorresina rica en luteína; poner en contacto una fuente vegetal rica en zeaxantina con un alcohol y someterla a extracción a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto; enriquecer el extracto con un alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener la oleorresina rica en zeaxantina; mezclar la oleorresina rica en luteína y la oleorresina rica en zeaxantina en una relación que oscila de aproximadamente 80:20 (p/p) a 90:10 (p/p) y homogeneizar para obtener una oleorresina mezclada; hidrolizar la oleorresina mezclada con un álcali alcohólico a una temperatura de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción; precipitar los cristales de carotenoides añadiendo agua caliente a la mezcla de reacción para formar un precipitado; y obtener los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1.

15 La presente descripción también expone un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1, comprendiendo dicho procedimiento:

poner en contacto una fuente vegetal rica en luteína con un alcohol y someterla a extracción a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto; enriquecer el extracto con un alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener la oleorresina rica en luteína; poner en contacto una fuente vegetal rica en zeaxantina con un alcohol y someterla a extracción a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto; enriquecer el extracto con un alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener la oleorresina rica en zeaxantina; mezclar la oleorresina rica en luteína y la oleorresina rica en zeaxantina en una relación en peso que varía de aproximadamente 70:30 (p/p) a 30:70 (p/p) y homogeneizar para obtener una oleorresina mezclada; hidrolizar la oleorresina mezclada con un álcali alcohólico a una temperatura de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción; precipitar los cristales de carotenoides añadiendo agua caliente a la mezcla de reacción para formar un precipitado; y obtener los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1.

30 También se describe un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1, comprendiendo dicho procedimiento:

poner en contacto una fuente vegetal rica en luteína con un alcohol y someterla a extracción a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto; enriquecer el extracto con un alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener la oleorresina rica en luteína; poner en contacto una fuente vegetal rica en zeaxantina con un alcohol y someterla a extracción a una temperatura de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener un extracto; enriquecer el extracto con un alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener la oleorresina rica en zeaxantina; mezclar la oleorresina rica en luteína y la oleorresina rica en zeaxantina en una relación en peso que varía de aproximadamente 10:90 (p/p) a 20:80 (p/p) y homogeneizar para obtener una oleorresina mezclada; hidrolizar la oleorresina mezclada con un álcali alcohólico a una temperatura de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción; precipitar los cristales de carotenoides añadiendo agua caliente a la mezcla de reacción para formar un precipitado; y obtener los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1.

45 La descripción también expone un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1, y de 1:1, y además comprende lavado con agua caliente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 55 °C a 80 °C, preferiblemente de aproximadamente 75 °C y secado de los cristales de carotenoides.

La presente memoria descriptiva expone un procedimiento en el que la relación de oleorresina a alcohol utilizada para enriquecer las oleorresinas en el procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, aproximadamente 5:1 y 1:1, está en el intervalo de aproximadamente 1:0,5 a 1:4 (p/v).

La descripción también describe un procedimiento en el que el alcohol usado en el procedimiento para el aislamiento de los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina se selecciona del grupo que consiste en etanol, alcohol isopropílico o mezclas de los mismos.

55 La fuente vegetal rica en luteína y la fuente vegetal rica en zeaxantina se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en flores de caléndula (*Tagetes erecta*), pétalos de caléndula, frutos de pimiento rojo y bayas de Goji (*Lycium barbarum*).

La fuente vegetal rica en luteína se selecciona del grupo que consiste en flores de caléndula y pétalos de caléndula, y la fuente vegetal rica en zeaxantina se selecciona del grupo que consiste en frutos de pimiento rojo y bayas de Goji.

En otra realización más, el álcali alcohólico usado en el procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides se selecciona de un grupo que consiste en hidróxido de sodio etanólico e hidróxido de potasio etanólico. En otra realización más, la relación de la mezcla de reacción con respecto al agua caliente para precipitar los cristales de carotenoides añadiendo agua caliente a la mezcla de reacción para formar un precipitado, está en el intervalo de 1:1 a 1:1,4.

La descripción también expone un procedimiento para producir una oleorresina enriquecida, comprendiendo dicho procedimiento: secar una parte de la planta para obtener una harina; someter a extracción dicha harina utilizando alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener oleorresina; y enriquecer dicha oleorresina con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener una oleorresina enriquecida. El alcohol de extracción en la harina seca en el procedimiento anterior se selecciona del grupo que consiste en etanol, alcohol isopropílico o mezclas de los mismos, preferiblemente etanol.

En otra realización más, la planta utilizada para ser secada y obtener la harina se selecciona del grupo que consiste en plantas naturales de caléndula, de pimentón rojo y de bayas de Goji (*Lycium barbarum*).

En otra realización más, las partes de la planta se ensilan en condiciones anaeróbicas controladas antes de secar en el procedimiento para producir la oleorresina enriquecida.

En otra realización más, la oleorresina está enriquecida con alcohol en una relación de oleorresina a alcohol en el intervalo de 1:0,5 a 1:4 (p/v), preferiblemente de 1:1 (p/v) a 1:2 (p/v) v), en el procedimiento para producir la oleorresina enriquecida.

La presente descripción también proporciona cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, obtenida mediante un procedimiento que comprende: poner en contacto una fuente vegetal rica en luteína con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener oleorresina rica en luteína; enriquecer la oleorresina rica en luteína con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en luteína; poner en contacto una fuente vegetal rica en zeaxantina con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener una oleorresina rica en zeaxantina; enriquecer la oleorresina rica en zeaxantina con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en zeaxantina; mezclar una oleorresina rica en luteína y una oleorresina rica en zeaxantina en una relación que varía de aproximadamente 80:20 (p/p) a 90:10 (p/p) y homogeneizar para obtener una oleorresina mezclada; hidrolizar la oleorresina mezclada con un álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción; añadir agua caliente a la mezcla de reacción para precipitar los cristales de carotenoides; y obtener los cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, en los que la relación de la mezcla de reacción con respecto al agua caliente es de 1:1 a 1:1,5.

Además, la descripción también describe cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1, obtenidos por un procedimiento que comprende: poner en contacto una fuente vegetal rica en luteína con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener una oleorresina rica en luteína; enriquecer la oleorresina rica en luteína con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en luteína; poner en contacto una fuente vegetal rica en zeaxantina con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener una oleorresina rica en zeaxantina; enriquecer la oleorresina rica en zeaxantina con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en zeaxantina; mezclar una oleorresina rica en luteína y una oleorresina rica en zeaxantina en una relación que varía de aproximadamente 70:30 (p/p) a 30:70 (p/p) y homogeneizar para obtener una oleorresina mezclada; hidrolizar la oleorresina mezclada con un álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción; añadir agua caliente a la mezcla de reacción para precipitar los cristales de carotenoides; y obtener cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1, en los que la relación de la mezcla de reacción con respecto al agua caliente es de 1:1 a 1:1,5. Otra realización más de la presente descripción proporciona cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1 obtenidos por un procedimiento que comprende: poner en contacto una fuente vegetal rica en luteína con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener una oleorresina rica en luteína; enriquecer la oleorresina rica en luteína con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en luteína; poner en contacto una fuente vegetal rica en zeaxantina con alcohol y someterla a extracción a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a 75 °C para obtener una oleorresina rica en zeaxantina; enriquecer la oleorresina rica en zeaxantina con alcohol a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida en zeaxantina; mezclar una oleorresina rica en luteína y una oleorresina rica en zeaxantina en una relación en peso que varía de aproximadamente 10:90 (p/p) a 20:80 (p/p) y homogeneizar para obtener una oleorresina mezclada; hidrolizar la oleorresina mezclada con un álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 70 °C a 80 °C para obtener una mezcla de reacción; añadir agua caliente a la mezcla de reacción para precipitar los cristales de carotenoides; y obtener

crisales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1, en los que la relación de la mezcla de reacción con respecto al agua caliente es de 1:1 a 1:1,5.

5 La descripción también se refiere al procedimiento para el aislamiento de crisales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1, en el que la filtración de dichos crisales de carotenoides precipitados se lleva a cabo utilizando prensa de filtración, centrifugadora o filtro de tipo Nutsche.

La descripción también se refiere a un procedimiento para el aislamiento de crisales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1 o de aproximadamente 5:1 o de aproximadamente 1:1, en el que los crisales de carotenoides se secan utilizando un secador de lecho fluidizado.

10 El procedimiento descrito en la presente memoria consiste en el ensilado de partes de plantas bajo condiciones anaeróbicas controladas para evitar la formación de productos oxidativos degenerados como los epóxidos, reparar y enriquecer los carotenoides presentes, deshidratación que consiste en etapas como prensado de tornillo, trituración y secado en lecho fluidizado utilizando gas productor ecológico como medio de calentamiento para el secador sin ninguna emisión de gases nocivos para obtener harina seca. La harina seca se extrae mediante disolvente por medio de alcohol isopropílico o etanol y se separa del disolvente en la menor medida posible sin mucha degradación para obtener oleorresina. La oleorresina así obtenida se enriquece lavando la oleorresina dos veces con agua de procesodurante 10 - 15 minutos a aproximadamente 45 °C y tres veces con etanol durante 10 - 15 minutos a temperatura ambiente para obtener una oleorresina orgánica enriquecida que contenga al menos el doble de concentración de xantofilas que la oleorresina inicial. Se homogeneiza la oleorresina enriquecida. La hidrólisis de la oleorresina homogeneizada se lleva a cabo con álcali alcohólico y los ésteres se saponifican a una temperatura de aproximadamente 70 °C a 80 °C durante menos de 30 minutos. Los carotenoides hidrolizados se precipitan añadiendo agua de manera que la relación de alcohol y agua en la mezcla se mantenga en el intervalo de 1:1 a 1:3 y el precipitado así obtenido se lava con agua caliente para eliminar las impurezas. Los crisales lavados se filtran utilizando una prensa de filtración y se secan con un secador de lecho fluidizado para eliminar la humedad y las impurezas orgánicas volátiles. La presente invención tiene ventajas en su naturaleza ecológica, combinación de tiempo y temperatura, y uso de sólo disolventes seguros de clase 3. Todos estos factores contribuyen al rendimiento y la estabilidad del producto y reducen el coste de producción a escala comercial. También aumenta la seguridad del producto para su uso como nutracéutico, cosmeceútico, suplemento alimenticio y dietético. La presente invención proporciona un procedimiento eficaz para aislar y purificar crisales de carotenoides de partes de plantas, en particular, pétalos de flores de caléndula, ricos predominantemente en luteína, zeaxantina, o en luteína y zeaxantina en diversas combinaciones. El cultivo de *Tagetes erecta* se realiza mediante un conjunto de prácticas orgánicas especializadas que incluyen la producción de semillas, la cosecha y el traslado a la unidad de deshidratación a las pocas horas de la cosecha. El conjunto de prácticas incluye el desarrollo de semillas no modificadas genéticamente y el cultivo orgánico que se adapte a las condiciones agroclimáticas específicas. Las flores cultivadas orgánicamente se trasladan inmediatamente para ensilar en silos después de la limpieza física y se rocían con un antioxidante orgánico ecológico y un aditivo de ensilaje a una concentración apropiada en condiciones de cierre anaeróbicas. El ensilaje se controla a través del pH y la temperatura del ensilaje y se asegura la fermentación completa durante un período de dos a tres semanas. Las flores ensiladas se recogen de los silos y se someten a un procedimiento de deshidratación en una serie de etapas. Las flores ensiladas se someten a una prensa de tornillo industrial en dos etapas y se comprimen para eliminar el agua, llevando el contenido de humedad desde el 88 % al 75 %. Las flores exprimidas se someten luego a trituración antes de secar en un secador de lecho fluidizado. Las flores trituradas se secan en un secador de lecho fluidizado utilizando aire caliente, generado por el calentamiento del aire con una llama de gas productor producida mediante el uso de un gasificador ecológico con una emisión absolutamente exenta de gases nocivos. El secador industrial de lecho fluidizado de tipo túnel (FBD) comprende cámaras de secado con diferentes temperaturas a través del túnel desde la entrada, siendo la temperatura máxima (de 85 °C a 90 °C), hasta la salida a la temperatura (de 45 °C a 50 °C).

50 El tiempo de tránsito dentro del FBD desde la entrada hasta la salida es de sólo 30 minutos como máximo, en el que el nivel de humedad en el producto se reduce hasta aproximadamente el 10 % desde aproximadamente el 75 %. La ventaja de este procedimiento de secado es que el producto no se somete a calor fuerte de larga duración, lo que minimiza la formación de productos oxidativos degenerativos que se podrían formar debido al calor y al aire durante períodos prolongados. La harina de caléndula seca se pulveriza con un molino de martillos industrial y se reduce el tamaño de las partículas a menos de 400 micrómetros.

55 La harina de flores de caléndula así obtenida se somete a extracción con disolvente utilizando alcohol isopropílico o etanol como disolvente, en una batería de extractores bajo extracción a contracorriente y a una temperatura no superior a 75 °C para lograr la máxima extracción de los principios activos, es decir, xantofilas y carotenoides, junto con los otros resinoides y lípidos. La micela delgada se concentra luego en evaporadores de película descendente y evaporadores de película agitada para reducir la concentración de los disolventes hasta aproximadamente el 5 % desde aproximadamente el 90 % al 95 %. La micela concentrada se somete luego a destilación al vacío para reducir el nivel de disolvente del 5 % al 1 %. Esta oleorresina de caléndula en bruto con un nivel de disolvente del 1 % en ella, se concentra aún más eliminando el disolvente bajo una corriente de nitrógeno y vapor de agua para reducir los niveles de disolvente a menos de 1.000 ppm en la oleorresina de caléndula final. La oleorresina de caléndula así obtenida se homogeneiza con agitación en un reactor con volúmenes de 1:3 a 1:5 de agua de procesodurante 10 a 15 minutos a 45 °C. La mezcla se deja separar y se filtra la capa separada. La oleorresina en el filtro se transfiere de nuevo al reactor

- y el lavado se repite una vez más de manera similar. La oleorresina así obtenida se homogeneiza con agitación en el mismo reactor con un volumen de 1:1 de etanol que contiene aproximadamente el 6,0 % de humedad durante 10 - 20 minutos para obtener una mezcla uniforme a temperatura ambiente. La masa homogeneizada se deja sedimentar y se separa después de detener la agitación. La capa inferior del disolvente se drena luego para retener la oleorresina lavada en el propio reactor. Se añade otro volumen de 1:1 de etanol a la oleorresina retenida en el reactor y se repite la homogeneización, sedimentación, separación y drenaje del disolvente dos veces más para obtener la oleorresina enriquecida. La oleorresina de caléndula enriquecida así obtenida contiene casi dos veces más xantofilas que la de la oleorresina inicial antes del enriquecimiento.
- La oleorresina de caléndula enriquecida homogeneizada se hidroliza luego en el mismo reactor con la adición de 1,5 a 2 volúmenes de disolución alcohólica de hidróxido de sodio al 25 %, de la cantidad de oleorresina de caléndula, a una temperatura que oscila entre 70 °C y 80 °C durante un período de tiempo no superior a 30 minutos, en donde el alcohol utilizado es etanol con un contenido de humedad inferior al 6 %. El grado de saponificación se garantiza mediante cromatografía de capa fina o cromatografía líquida de alta presión y la cocción final se realiza durante 10 minutos a la misma temperatura después de asegurar la finalización de la saponificación en más del 99 %.
- El agua caliente generada en un recipiente separado a una temperatura de 65 °C a 75 °C se añade a la masa saponificada en una relación de aproximadamente 1:4 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina y se homogeneiza bien durante 10 minutos para ayudar a la cristalización de los cristales de carotenoides. La relación del alcohol absoluto, ya presente en la mezcla de reacción, y el agua se mantiene en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 1:3, en donde la relación del etanol con respecto al agua de 1:2, potencia una mejor cristalización de los cristales de carotenoides y también se disuelven bien las impurezas no deseadas tales como jabones, lípidos, grasas y otras materias orgánicas.
- La masa diluida luego se filtra a través de una prensa de filtración bombeando la masa en la prensa de filtración ayudada por presión positiva utilizando nitrógeno o aire. La masa recolectada dentro de la placa de la prensa de filtración se lava con agua caliente a una temperatura de 65 °C a 75 °C con una cantidad suficiente de agua caliente hasta que el pH se reduce hasta llegar a ser neutro a aproximadamente 7,0.
- La masa húmeda recolectada de la prensa de filtración se seca en un secador de lecho fluidizado a una temperatura entre 50 °C y 55 °C durante un período de 1 hora o hasta que el nivel de humedad en el producto sea inferior al 1 % y hasta que cualquier impureza orgánica volátil esté por debajo del límite detectable determinado por cromatografía de gases.
- Los cristales de carotenoides resultantes contienen un mínimo del 80 % de carotenoides totales, en la mayoría de los casos más del 90 %, determinados por espectrofotómetro UV visible. Los cristales de carotenoides comprenden del 45 al 89 % (p/p) de toda la trans-luteína, del 3 al 45 % (p/p) de trans-zeaxantina, menos del 1 % (p/p) de cada uno de los otros carotenoides tales como, betacaroteno, criptoxantina, violaxantina, etc., y sin casi ningún rastro de cis-luteínas y epóxidos, determinados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase normal. El contenido de cera en los cristales es de aproximadamente el 10 % p/p, cuando se mide por cromatografía de gases, lo cual está dentro del límite aceptado por el Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
- La recuperación química de los principios activos, es decir, carotenoides y xantofilas en el producto final, se encuentra entre el 65 % p/p y el 95 % p/p de la oleorresina de entrada, dependiendo de la pureza deseada del producto final y las condiciones variables del mismo utilizadas en función de los parámetros de procedimiento anteriores con ligeras modificaciones del procedimiento de la presente memoria.
- El producto terminado de cristales de carotenoides obtenido se formula y se estabiliza en masa, en forma de polvo, perlas, gránulos, dispersiones de aceite y dispersiones de agua con concentraciones que varían del 1 % al 40 % al agregar excipientes y emulsionantes adecuados de calidad farmacéutica, dependiendo del uso final en línea con las aplicaciones de productos nutracéuticos, cosmeceúticos, y de suplementos alimenticios y dietéticos.
- Para el procedimiento de aislamiento de cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina de dos plantas diferentes, una rica en luteína y la otra rica en zeaxantina para obtener cristales de carotenoides con relaciones en peso variables de luteína y zeaxantina en los intervalos de aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 y de aproximadamente 1:1, la oleorresina rica en zeaxantina se obtiene de la extracción con disolvente de una variedad mutante de planta de caléndula que proviene de Ball Horticulture Inc. abarcada por el documento de patente n°. US 6.784.351. Otras fuentes de oleorresinas ricas en zeaxantina son la Paprika y *Lycium barbarum*. Las partes de plantas de dos plantas diferentes se secan por separado para obtener dos harinas, una rica en luteína y la otra rica en zeaxantina. Las plantas específicamente adecuadas para el procedimiento anterior incluyen, entre otras, plantas naturales de caléndula (*Tagetes erecta*), pimiento rojo y bayas de Goji (*Lycium barbarum*). Las harinas secas se someten a extracción con disolventes utilizando alcohol por separado y se retiran del disolvente en la menor medida posible sin mucha degradación para obtener una oleorresina rica en luteína procedente de una harina rica en luteína a una temperatura en el intervalo de 50 °C a 75 °C y una oleorresina rica en zeaxantina procedente de harina rica en zeaxantina a una temperatura de 50 °C a 75 °C.

La extracción con disolvente a la que se somete la harina seca utilizando etanol se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 70 °C a 75 °C y cuando se realiza la extracción con alcohol isopropílico, la temperatura está en el intervalo de 55 °C a 58 °C.

5 Las oleorresinas obtenidas por extracción alcohólica se enriquecen adicionalmente lavando la oleorresina con agua y etanol a una temperatura en el intervalo de 25 °C a 50 °C durante aproximadamente 10 a 20 minutos para obtener oleorresinas enriquecidas por separado, una rica en luteína y la otra rica en zeaxantina. Las oleorresinas, una rica en luteína y la otra rica en zeaxantina, se mezclan en tres intervalos de relación en peso específicos diferentes (i) de 80:20 a 90:10, (ii) de 70:30 a 30:70 y (iii) de 10: 90 a 20:80. Estas relaciones se basan en la composición de carotenoides de las oleorresinas. El contenido de carotenoides de las oleorresinas a su vez depende del tipo de disolvente de extracción empleado; por ejemplo, cuando se usa alcohol para la extracción, la oleorresina obtenida se enriquece aún más y, por lo tanto, el contenido de carotenoides aumenta aún más. Además, el contenido de carotenoides en la oleorresina también depende de la harina de oleorresina. Estas relaciones específicas de oleorresinas mientras se mezclan facilitan la obtención de cristales de carotenoides con relaciones en peso de luteína y de zeaxantina (i) de aproximadamente 10:1, (ii) de aproximadamente 5:1 y (iii) de aproximadamente 1:1. La mezcla de oleorresinas, una rica en luteína y la otra rica en zeaxantina, en la relación en peso (i) de 80:20 a 90:10, proporciona cristales de carotenoides con luteína y zeaxantina en la relación en peso de aproximadamente 10:1. Del mismo modo, la mezcla de oleorresinas (ii) de 70:30 a 30:70 proporciona cristales de carotenoides en la relación en peso de aproximadamente 5:1; y cuando las oleorresinas se mezclan en la relación de peso (iii) de 10:90 a 20:80, la relación en peso final de cristales de carotenoides de luteína y zeaxantina obtenidos es de aproximadamente 1:1. Estas relaciones en peso de la luteína con respecto a la zeaxantina, específicamente de 10:1, 5:1 y 1:1, son fundamentales para hacer que la luteína sea más bioactiva y biodisponible.

La mezcla de oleorresinas se homogeneiza mediante agitación continua a 40 °C en un baño de agua caliente. La saponificación de oleorresinas homogeneizadas se lleva a cabo con álcali alcohólico a una temperatura de 70 °C a 80 °C durante menos de 30 minutos.

25 Los carotenoides saponificados se tratan con agua caliente para obtener cristales de carotenoides en los que la relación de la mezcla de reacción con respecto al agua caliente está en el intervalo de aproximadamente 1:1 a 1:1,5 (v/v) que corresponde a una relación de 4:1 (v/p) de agua caliente con respecto a oleorresina. Los cristales de carotenoides así obtenidos se filtran utilizando una prensa de filtración y se secan utilizando un secador de lecho fluidizado para eliminar la humedad y las impurezas orgánicas volátiles. Los cristales de carotenoides filtrados se lavan con agua caliente mantenida a 75 °C, en donde la relación de agua caliente con respecto a oleorresina utilizada es de 8:1 (v/p). Los cristales de carotenoides lavados se secan utilizando un secador de lecho fluidizado.

30 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 10:1, en el que dichos cristales de carotenoides comprenden aproximadamente del 75 % al 85 % (p/p) de trans-luteína, aproximadamente del 6 % al 10 % (p/p) de trans-zeaxantina y no más del 5 % (p/p) de cada uno de los otros carotenoides medidos por HPLC.

35 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1, en el que dichos cristales de carotenoides comprenden aproximadamente del 70 % al 80 % (p/p) de trans-luteína, aproximadamente del 10 % al 20 % (p/p) de trans-zeaxantina y no más del 5 % (p/p) de cada uno de los otros carotenoides medidos por HPLC.

40 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 1:1, en el que dichos cristales de carotenoides comprenden aproximadamente del 40 % al 50 % (p/p) de trans-luteína, aproximadamente del 40 % al 50 % (p/p) de trans-zeaxantina y no más del 5 % (p/p) de cada uno de los otros carotenoides medidos por HPLC.

45 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina contienen aproximadamente el 10 % (p/p) del total de ceras cuando se mide utilizando cromatografía de gases. Otra realización más de la presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 5:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina contienen aproximadamente el 10 % (p/p) del total de ceras cuando se mide utilizando cromatografía de gases.

50 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 1:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina contienen aproximadamente el 10 % (p/p) del total de ceras cuando se mide utilizando cromatografía de gases.

55 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina se formulan en forma de polvo, perlas, gránulos, dispersión de aceite o dispersión de agua.

Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 5:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina se formulan en forma de polvo, perlas, gránulos, dispersión de aceite o dispersión de agua.

5 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 1:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina se formulan en forma de polvo, perlas, gránulos, dispersión de aceite o dispersión de agua. La descripción también se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1 o de
10 aproximadamente 5:1 o de aproximadamente 1:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina se usan en aplicaciones nutracéuticas o cosmeceúticas y de suplementos alimenticios y dietéticos. Otra realización más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina contienen del 65 % al 95 % (p/p) del total de carotenoides
15 presentes en dicha oleorresina. La presente descripción también se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina contienen del 65 % al 95 % (p/p) del total de carotenoides presentes en dicha oleorresina.

20 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1, en el que dichos cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina contienen del 65 % al 95 % (p/p) del total de carotenoides presentes en dicha oleorresina.

25 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para aislar cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1, en el que los cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina obtenidos después del secado contienen un nivel de humedad menor del 1 % y están casi exentos de trazas de disolventes residuales.

30 Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para aislar cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 5:1, en el que los cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina obtenidos después del secado contienen un nivel de humedad menor del 1 % y casi exentos de trazas de disolventes residuales.

Otro aspecto más de la presente descripción se refiere a un procedimiento para aislar cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina que tienen luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 1:1, en donde los cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina obtenidos después del secado contienen un nivel de humedad menor del 1 % y están casi exentos de trazas de disolventes residuales.

35 Otro aspecto de la presente descripción proporciona el uso de cristales de carotenoides que comprenden una relación en peso de luteína con respecto a zeaxantina de aproximadamente 10:1 o de aproximadamente 5:1 o de aproximadamente 1:1 como antioxidantes.

La invención se ilustrará ahora con ejemplos de trabajo, que pretenden ilustrar el funcionamiento de la invención.

Ejemplo comparativo 1

40 Extracción de oleorresina utilizando alcohol isopropílico como disolvente

Se llevó harina de caléndula (6,0 kg) con 8,99 g/kg (0,89 %) de xantofilas (con un perfil de carotenoides del 74,58 % de trans-luteína, el 4,28 % de trans-zeaxantina y el 18,08 % de isómeros cis y epóxidos) a un extractor de 50 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujo alcohol isopropílico (36 litros) con un contenido de humedad inferior al 1,0 % en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 55 °C y se mantuvo durante 1 hora
45 en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y se recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió dos veces con el mismo volumen de alcohol isopropílico (36 l) en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. La cuarta y quinta extracciones se llevaron a cabo utilizando 30 litros de alcohol isopropílico en cada extracción en circulación y a una temperatura de 58 °C. Se llevaron 152 l de micela recogida de las cinco extracciones a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de aproximadamente un 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 136 L con una pureza
50 medida por cromatografía de gases superior al 99 % y con un nivel de humedad del 0,28 %. Se obtuvieron 960 g de oleorresina que contenía 49,68 g/kg de xantofilas (4,97 % de xantofilas) con una recuperación del 88,42 %. La oleorresina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 70,98 % de trans-luteína, el 5,30 % de trans-zeaxantina y el 20,12 % de isómeros cis/epóxidos.

Ejemplo comparativo 2

Hidrólisis de la oleorresina con álcali alcohólico

Se homogeneizaron 100,26 g de la oleorresina de caléndula obtenida del Ejemplo 1 que contenía 49,68 g/kg de xantofilas (4,97 % de xantofilas) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 1.000 ml bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El NaOH etanólico se preparó tomando 49,60 g de NaOH con una pureza del 95 % y disolviéndolo en 200 ml de etanol. El NaOH etanólico preparado se añadió lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada (1:2 volúmenes de oleorresina). La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación era más del 99 % por HPLC, se añadieron 400 ml de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 70 °C a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La oleorresina de caléndula saponificada diluida que comprendía cristales de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 1.600 ml de agua caliente para eliminar las impurezas y reducir el pH del efluente a un valor neutro de alrededor de 7,0. Los cristales húmedos después se recogieron del filtro y se secaron en un secador de vacío a una temperatura de alrededor de 50 °C durante 3 horas a presión reducida.

Se obtuvieron cristales de xantofila purificados (5,80 g) en forma de polvo pegajoso y la recuperación física del producto final fue del 5,78 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían el 58,50 % de carotenoides (determinados por espectrofotómetro UV visible) de los cuales el 84,10 % fue todo trans-luteína, el 3,60 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,12 % betacaroteno, el 0,31 % criptoxantina y el 6,80 % de cis-luteínas y epóxidos (determinados por HPLC). Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 16,20 % p/p de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química del producto final fue del 68,07 % frente a la oleorresina de entrada. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,98 % y contenía 1.400 ppm de alcohol isopropílico determinados por análisis de cromatografía de gases.

Ejemplo 3

Extracción de oleorresina utilizando alcohol isopropílico como disolvente y lavado con etanol para enriquecer la oleorresina

Se llevó harina de caléndula (6,1 kg) con 8,99 g/kg (0,89 %) de xantofilas (con un perfil de carotenoides del 74,58 % de trans-luteína, el 4,28 % de trans-zeaxantina y el 18,08 % de isómeros cis y epóxidos) a un extractor de 50 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujo alcohol isopropílico (36 l) con un contenido de humedad inferior al 1,0 % en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 55 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y se recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió dos veces con el mismo volumen de alcohol isopropílico (36 l) en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. La cuarta y quinta extracciones se llevaron a cabo utilizando 30 litros de alcohol isopropílico en cada extracción bajo circulación y a una temperatura de 58 °C. Se llevaron 150 litros de micela recogida de las cinco extracciones a un evaporador, preferiblemente un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía un 70 % de sólidos y un 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 135 litros con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % y con un nivel de humedad del 3 %. Se obtuvieron 982 g de oleorresina que contenía 50,72 g/kg de xantofilas (5,07 % de xantofilas) con una recuperación del 90,82 %. La oleorresina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 70,22 % de trans-luteína, el 5,43 % de trans-zeaxantina y el 20,82 % de isómeros cis/epóxidos.

Se homogeneizó la oleorresina (165,68 g) que contenía 50,72 g/kg de xantofilas, obtenida por extracción con alcohol isopropílico, a temperatura ambiente con 165 ml de etanol que contenía un 6 % de humedad en un matraz cónico durante 10 minutos, para obtener una mezcla homogénea uniforme. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La capa inferior del disolvente se drenó y la oleorresina así obtenida se retuvo en el matraz cónico. El procedimiento se repitió dos veces añadiendo 165 ml de etanol cada vez para enriquecer la oleorresina. Se obtuvieron 64,25 g de oleorresina enriquecida que contenía 119,86 g/kg de xantofilas (11,98 % de xantofilas) con una recuperación química del 91,64 %. La oleorresina enriquecida así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 71,41 % de trans-luteína, el 4,62 % de trans-zeaxantina y el 20,16 % de isómeros cis/epóxidos.

Ejemplo 4

Hidrólisis de la oleorresina enriquecida con álcali alcohólico

Se homogeneizaron 44,826 g de la oleorresina de caléndula enriquecida obtenida en el Ejemplo 3 que contenía 119,86 g/kg de xantofilas (11,98 % de xantofilas) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 500 ml bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El NaOH etanólico se preparó tomando 22,40 g de NaOH con una pureza del 95 % y disolviéndolo en 90 ml de etanol. El NaOH etanólico preparado se añadió lentamente

- en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada (1:2 volúmenes de oleorresina). La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % por HPLC, se añadieron 180 ml de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 70 °C a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La oleorresina de caléndula saponificada diluida que comprendía cristales de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 720 ml de agua caliente para eliminar las impurezas y reducir el pH del efluente a un valor neutro de aproximadamente 7,0. Los cristales húmedos se recogieron del filtro y se secaron en un secador de vacío a una temperatura de alrededor de 50 °C durante 3 horas a presión reducida.
- Se obtuvieron cristales de xantofila purificados (4,0 g) y la recuperación física del producto final fue del 8,92 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían el 90,78 % de carotenoides (determinados por espectrofotómetro UV visible), de los cuales el 93,99 % fue todo trans-luteína, el 4,90 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,23 % betacaroteno y el 0,5 % criptoxantina y sin ninguna traza de cis-luteínas ni epóxidos (determinados por HPLC). Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 8,56 % p/p de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química del producto final fue del 67,58 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,47 % y no se pudo detectar ninguna traza de disolventes residuales por análisis de cromatografía de gases.

Ejemplo 5

Extracción de oleorresina utilizando alcohol isopropílico como disolvente y lavado con etanol para enriquecer la oleorresina

- Se llevó la harina de caléndula (100 kg) con 9,44 g/kg (0,94 %) de xantofilas (con un perfil de carotenoides del 73,98 % de trans-luteína, el 4,52 % de trans-zeaxantina y el 18,28 % de isómeros cis y epóxidos) a un extractor de 1.000 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujo alcohol isopropílico (600 litros) con un contenido de humedad inferior al 0,1 % en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 55 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y se recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió dos veces con el mismo volumen de alcohol isopropílico (600 litros) en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. La cuarta y quinta extracciones se llevaron a cabo utilizando 500 litros de alcohol isopropílico en cada extracción bajo circulación y a una temperatura de 58 °C. La micela recogida de las cinco extracciones (2.500 litros) se llevó a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La mezcla concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló posteriormente a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 2.275 litros con una pureza medida por cromatografía de gases superior al 99 % y con un nivel de humedad del 3 %. Se obtuvo oleorresina (16,5 kg) que contenía 52,32 g/kg de xantofilas (5,23 % de xantofilas) con una recuperación química del 91,44 %. La oleorresina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 71,62 % de T-Luteína, el 5,39 % de T-Zeaxantina y el 19,51 % de isómeros cis/epóxidos.

- Se homogeneizó la oleorresina (16,5 kg) que contenía 52,32 g/kg de xantofilas, obtenida por extracción con alcohol isopropílico, a temperatura ambiente en un reactor de 100 litros con 16,5 litros de etanol que contenía un 6 % de humedad durante 10 minutos para obtener una mezcla homogénea uniforme. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La capa inferior del disolvente se drenó y la oleorresina así obtenida se retuvo en el reactor. El procedimiento se repitió dos veces añadiendo 16,5 litros de etanol cada vez para enriquecer la oleorresina. Se obtuvieron 6,52 kg de oleorresina enriquecida que contenía 120,22 g/kg de xantofilas (12,02 % de xantofilas) con una recuperación química del 90,80 %. La oleorresina enriquecida así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 71,98 % de trans-luteína, el 4,39 % de trans-zeaxantina y el 19,78 % de isómeros cis/epóxidos.

Ejemplo 6

Hidrólisis de la oleorresina enriquecida con álcali alcohólico

- Se homogeneizaron 6,52 kg de oleorresina de caléndula enriquecida obtenida en el Ejemplo 5 que contenía 120,22 g/kg de xantofilas (12,02 % de xantofilas) durante 10 minutos en un reactor de 100 litros con agitación continua a una temperatura de 40 °C ya sea con vapor de agua o con agua caliente en el encamisado del reactor como medio de calentamiento. El NaOH etanólico se preparó tomando 3,26 kg de NaOH con una pureza del 95 % y disolviéndolo en 13,0 litros de etanol. El NaOH etanólico preparado se introdujo lentamente en el reactor que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada (volúmenes 1:2 de oleorresina). La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera de más del 99 % medido por HPLC, se añadieron 26 litros de agua desmineralizada mantenida a una temperatura de 70 °C a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La oleorresina de caléndula saponificada diluida que comprendía cristales de carotenoides se filtró en una prensa de filtración para recuperar los cristales. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 104 litros de agua caliente adicional bombeada a través de la prensa de filtración para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de alrededor

de 7,0. Los cristales húmedos se recogieron luego de la prensa de filtración y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de aproximadamente 55 °C durante 1 hora. Se obtuvieron cristales purificados de xantofila (706 g) y la recuperación física del producto final fue del 10,82 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían el 91,12 % de carotenoides (determinados por espectrofotómetro UV visible) de los cuales el 93,67 % fue todo trans-luteína, el 5,14 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,26 % betacaroteno y el 0,52 % criptoxantina y sin ningún rastro de cis-luteínas y epóxidos (determinados por HPLC). Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 8,12 % p/p de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química del producto final fue del 82,07 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,42 % y no se pudo detectar ninguna traza de disolventes residuales por análisis de cromatografía de gases.

10 Ejemplo 7

Extracción de oleorresina utilizando etanol como disolvente y lavado con etanol para enriquecer la oleorresina

Se llevó harina de caléndula (100 kg) con 9,44 g/kg (0,94 %) de xantofilas (con un perfil de carotenoides del 73,98 % de trans-luteína, el 4,52 % de trans-zeaxantina y el 18,28 % de isómeros cis y epóxidos) a un extractor de 1.000 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujo etanol (600 litros) con un contenido de humedad inferior al 3,0 % en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 75 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y se recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió dos veces con el mismo volumen de etanol (600 litros) en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. La cuarta y quinta extracciones se llevaron a cabo utilizando 500 litros de etanol en cada extracción bajo circulación a la misma temperatura. La micela recogida de las cinco extracciones (2.540 litros) se llevó a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La mezcla concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló posteriormente a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 2.286 litros con una pureza medida por cromatografía de gases superior al 99 % y con un nivel de humedad del 4,2 %.

Se obtuvo una oleorresina (18,20 kg) que contenía 46,12 g/kg de xantofilas (el 4,61 % de xantofilas) con una recuperación química del 88,96 %. La oleorresina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 71,02 % de trans-luteína, el 5,52 % de trans-zeaxantina y el 19,81 % de isómeros cis/epóxidos.

Se homogeneizó la oleorresina (18,20 kg), que contenía 46,12 g/kg de xantofilas obtenida por extracción con etanol, a 45 °C con 90 litros de agua de proceso en el reactor de 200 litros durante 20 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La mezcla separada se filtró al vacío. La oleorresina de caléndula así obtenida en el filtro se transfirió al recipiente. Este procedimiento se repitió una vez más con los mismos 90 litros de agua de proceso a la misma temperatura para eliminar todas las impurezas solubles en agua. A la oleorresina obtenida se añadieron 18,0 litros de etanol que contenía un 6 % de humedad y se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos para obtener una mezcla homogénea uniforme. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La capa inferior del disolvente se drenó y la oleorresina así obtenida se retuvo en el reactor. El procedimiento se repitió dos veces añadiendo otros 18,0 litros de etanol cada vez para lavar la oleorresina.

Se obtuvo una oleorresina enriquecida (6,44 kg) que contenía 118,99 g/kg de xantofilas (el 11,89 % de xantofilas) con una recuperación química del 91,32 %. La oleorresina enriquecida así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 70,95 % de trans-luteína, el 4,52 % de trans-zeaxantina y el 19,66 % de isómeros cis/epóxidos.

Ejemplo 8

Hidrólisis de la oleorresina enriquecida con álcali alcohólico

Se homogeneizaron 6,44 kg de la oleorresina de caléndula enriquecida obtenida en el Ejemplo 7 que contenía 118,99 g/kg de xantofilas (11,89 % de xantofilas) durante 10 minutos en un reactor de 100 litros bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C ya sea con vapor de agua o con agua caliente en el encamisado del reactor como medio de calentamiento. El NaOH etanólico se preparó tomando 3,22 kg de NaOH con una pureza del 95 % y disolviéndolo en 13,0 litros de etanol. El NaOH etanólico preparado se introdujo lentamente en el reactor que contenía la masa homogeneizada (1:2 volúmenes de oleorresina). La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 26 litros de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 70 °C a la masa reaccionada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La oleorresina de caléndula saponificada diluida que comprendía los cristales de carotenoides se filtró en una prensa de filtración para recuperar los cristales. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 105 litros de agua caliente adicional bombeada a través de la prensa de filtración para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de alrededor de 7,0. Los cristales húmedos se recogieron luego de la prensa de filtración y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de aproximadamente 55 °C durante 1 hora.

Se obtuvieron cristales de xantofila purificados (677 g) y la recuperación física del producto final fue del 10,51 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 91,26 % de carotenoides (determinados por espectrofotómetro UV visible) de los cuales el 93,62 % fue todo trans-luteína, el 5,11 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,26 % betacaroteno y el 0,51 % criptoxantina y sin ningún rastro de cis-luteínas y epóxidos (determinados por HPLC). Los cristales de carotenoides así obtenidos, contenían un 8,29 % p/p de contenido de cera cuando se midieron utilizando cromatografía de gases. La recuperación química del producto final fue del 80,62 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,45 % y no se pudo detectar ninguna traza de disolventes residuales por análisis de cromatografía de gases.

Ejemplo 9

Extracción de oleorresina utilizando etanol como disolvente para la extracción y lavado con etanol para enriquecer la oleorresina

Se llevó harina de caléndula de (100 kg) con 12,12 g/kg (1,212 %) de xantofilas (con un perfil de carotenoides de trans-luteína del 76,22 %, el 4,51 % de trans-zeaxantina y el 17,92 % de isómeros cis y epóxidos) a un extractor de 1.000 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujo etanol (600 litros) con un contenido de humedad inferior al 3,0 % en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó a 75 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y se recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió dos veces con el mismo volumen de etanol (600 litros) en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. La cuarta y quinta extracciones se llevaron a cabo utilizando 500 litros de etanol en cada extracción bajo circulación a la misma temperatura. La micela recogida de las cinco extracciones (2.540 litros) se llevó a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La mezcla concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló posteriormente a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 2.280 litros con una pureza medida por cromatografía de gases superior al 99 % y con un nivel de humedad del 3,8 %.

Se obtuvo oleorresina (19,28 kg) que contenía 58,38 g/kg de xantofilas (el 5,838 % de xantofilas) con una recuperación química del 92,87 %. La oleorresina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía un 74,22 % de trans-luteína, un 5,58 % de trans-zeaxantina y un 19,02 % de isómeros cis/epóxidos.

Se homogeneizó la oleorresina (19,28 kg) que contenía 58,38 g/kg de xantofilas obtenida por extracción con etanol, a 45 °C con 96 litros de agua de proceso en el reactor de 200 litros durante 20 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La mezcla separada se filtró al vacío. La oleorresina de caléndula así obtenida en el filtro se transfirió al recipiente. Este procedimiento se repitió una vez más con los mismos 96 litros de agua de proceso a la misma temperatura para eliminar todas las impurezas solubles en agua. A la oleorresina obtenida, se añadieron 19,25 litros de etanol con un 6 % de humedad y se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos para obtener una mezcla homogénea uniforme. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La capa inferior del disolvente se drenó y la oleorresina así obtenida se retuvo en el reactor. El procedimiento se repitió dos veces añadiendo otros 19,25 litros de etanol cada vez para lavar la oleorresina. Se obtuvo una oleorresina enriquecida (7,76 kg) que contenía 132,20 g/kg de xantofilas (el 13,22 % de xantofilas) con una recuperación química del 91,13 %. La oleorresina enriquecida así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 75,28 % de trans-luteína, el 5,64 % de trans-zeaxantina y el 17,96 % de isómeros cis/epóxidos.

Ejemplo 10

Hidrólisis de la oleorresina enriquecida con álcali alcohólico

Se homogeneizaron 7,76 kg de la oleorresina de caléndula enriquecida obtenida en el Ejemplo 9 que contenía 132,20 g/kg de xantofilas (13,22 % de xantofilas) durante 10 minutos en un reactor de 100 litros bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C ya sea con vapor de agua o con agua caliente en el encamisado del reactor como medio de calentamiento. El NaOH etanólico se preparó tomando 3,88 kg de NaOH con una pureza del 95 % y disolviéndolo en 15,0 litros de etanol. El NaOH etanólico preparado se introdujo lentamente en el reactor que contenía la masa homogeneizada (1:2 volúmenes de oleorresina). La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 31 litros de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 70 °C a la masa reaccionada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La oleorresina de caléndula saponificada diluida que comprendía los cristales de carotenoides se filtró en una prensa de filtración para recuperar los cristales. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 120 litros de agua caliente adicional bombeada a través de la prensa de filtración para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de alrededor de 7,0. Los cristales húmedos se recogieron luego de la prensa de filtración y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de aproximadamente 55 °C durante 1 hora.

Se obtuvieron cristales de xantofila purificados (1.062 g) y la recuperación física del producto final fue del 13,68 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 91,58 % de carotenoides (determinados por espectrofotómetro UV visible), de los cuales el 93,33 % fue todo trans-luteína, el 5,62 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,24 % betacaroteno

y el 0,46 % criptoxantina y sin ningún rastro de cis-luteínas y epóxidos (determinados por HPLC). Los cristales de carotenoides así obtenidos, contenían un 8,00 % p/p de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química del producto final fue del 94,80 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,42 % y no se pudo detectar ninguna traza de disolventes residuales por análisis de cromatografía de gases.

5 Ejemplo 11

Extracción de luteína a partir de harina de caléndula utilizando etanol y enriquecimiento en etanol

A) Extracción de luteína a partir de harina de caléndula con alcohol etanol

Se llevaron 12,5 kg de harina de caléndula rica en luteína que tenía 8,99 g/kg (0,89 %) de carotenoides totales (con un perfil de carotenoides del 74,58 % de trans-luteína, el 4,28 % de trans-zeaxantina, el 1,94 % de betacaroteno, el 1,02 % de criptoxantina y el 18,08 % de isómeros cis y epóxidos medidos por HPLC, a un extractor de 200 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujeron 125 litros de etanol con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con un contenido de humedad inferior al 1,0 % al extractor y se hicieron circular. La temperatura se elevó hasta 75 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió dos veces más con el mismo volumen de etanol 125 litros cada una en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. Se llevaron 325 litros de micelas recogidas de las tres extracciones a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 262 litros con una pureza medida por cromatografía de gases superior al 99 % y con un nivel de humedad del 2 %. Se obtuvieron 2,55 kg de oleorresina que contenía 39,43 g/kg de carotenoides totales (el 3,943 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 89,47 %. La recuperación química de la luteína fue del 95,17 %. La oleorresina de caléndula rica en luteína así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 79,33 % de trans-luteína, el 4,24 % de trans-zeaxantina y el 15,53 % de isómeros cis/epóxidos, el 0,18 % de betacaroteno, el 0,53 % de criptoxantina, determinados por HPLC.

B) Enriquecimiento de oleorresina de caléndula rica en luteína utilizando etanol

Se homogeneizaron 2,55 kg de oleorresina de caléndula rica en luteína que contenía 39,43 g/kg de carotenoides totales, obtenida en la etapa A), a 45 °C con 12,75 litros de agua de proceso en un recipiente durante 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La mezcla separada se filtró al vacío. La oleorresina de caléndula así obtenida en el filtro se transfirió al recipiente. Este procedimiento se repitió una vez más con los mismos 12,75 litros de agua de proceso a la misma temperatura para eliminar todas las impurezas solubles en agua. A la oleorresina obtenida, se añadieron 5,0 litros de etanol con un contenido de humedad de aproximadamente un 8 % y se agitó a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. Se decantó y drenó la capa superior de etanol. Los lavados con etanol se repitieron tres veces más añadiendo 5,0 litros de etanol cada vez para enriquecer la oleorresina. Se obtuvieron 0,695 kg de oleorresina enriquecida que contenía 125,09 g/kg de carotenoides totales (el 12,509 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 86,46 %. La oleorresina enriquecida en luteína así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 80,71 % de trans-luteína, el 3,79 % de trans-zeaxantina, el 0,21 % de betacaroteno, el 0,61 % de criptoxantina y el 14,63 % de isómeros cis/epóxidos, determinados por HPLC.

Ejemplo 12

Extracción de zeaxantina a partir de harina de caléndula rica en zeaxantina utilizando etanol y enriquecimiento en etanol

A) Extracción de zeaxantina a partir de harina de caléndula rica en zeaxantina utilizando etanol

Se llevaron 20 kg de harina de caléndula rica en zeaxantina, (obtenida de Ball Horticulture Inc abarcada por el documento de patente n. ° US 6.784.351) que tenía 3,29 g/kg (0,329 %) de carotenoides totales con un perfil de carotenoides del 59,08 % de trans-zeaxantina, el 14,80 % de betacaroteno, el 11,77 % de trans-luteína, el 2,76 % de alfa-criptoxantina, el 2,33 % de beta-criptoxantina, el 1,98 % de alfa-caroteno, el 0,82 % de cis-luteína, el 0,22 % de crisantemaxantina y el 6,24 % de otros carotenoides no identificados determinados por HPLC, a un extractor de 200 litros de capacidad con instalación de circulación.

Se introdujeron 120 litros de etanol, con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con un contenido de humedad inferior al 5 %, al extractor y se hicieron circular. La temperatura se elevó hasta 75 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió 3 veces más, cada una con 60 litros de etanol en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. Se llevaron 260,2 litros de micela recogidos de las 4 extracciones anteriores a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un

5 evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 224 litros con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con un nivel de humedad del 5,5 %. Se obtuvieron 9,26 kg de oleorresina que contenía 6,79 g/kg de carotenoides totales (el 0,679 % de carotenoides) con una recuperación del 95,55 %. La recuperación química de la zeaxantina fue del 85,49 %. La oleorresina de caléndula rica en trans-zeaxantina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 52,86 % de trans-zeaxantina, el 9,49 % de betacaroteno, el 13,08 % de trans-luteína, el 7,75 % de alfa-criptoxantina, el 3,28 % de beta-criptoxantina, el 2,87 % de alfa-caroteno, el 3,93 % de cis-luteína y el 0,97 % de crisantemaxantina y el 5,39 % de otros carotenoides no identificados, determinados por HPLC.

B) Enriquecimiento de oleorresina de caléndula rica en zeaxantina utilizando etanol.

15 Se introdujeron 7,25 kg de la oleorresina de caléndula rica en zeaxantina obtenida de la etapa A) que contenía 6,79 g/kg de carotenoides, obtenida mediante extracción con etanol y se homogeneizó con 22,0 litros de agua de proceso a 45 °C en un recipiente durante 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La mezcla separada se filtró al vacío. La oleorresina de caléndula así obtenida en el filtro se transfirió al recipiente. Este procedimiento se repitió una vez más con los mismos 22,0 litros de agua de proceso a la misma temperatura para eliminar todas las impurezas solubles en agua. A la oleorresina obtenida se le añadieron 7,25 litros de etanol con un contenido de humedad de aproximadamente un 8 % y se agitó a 45 °C durante un período de 10 a 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. Se decantó y drenó la capa superior de etanol. Los lavados con etanol se repitieron dos veces más añadiendo 7,25 litros de etanol cada vez. Se obtuvieron 0,948 kg de oleorresina enriquecida que contenía 46,98 g/kg de carotenoides totales (el 4,698 % carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 90,48 %. La recuperación química de la zeaxantina fue del 92,28 %. La oleorresina de caléndula rica en trans-zeaxantina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 53,99 % de trans-zeaxantina, el 10,02 % de betacaroteno, el 15,03 % de trans-luteína, el 8,25 % de alfa-criptoxantina, el 2,42 % de beta-criptoxantina, el 1,90 % de alfa-caroteno, el 4,28 % de cis-luteína y el 0,1 % de crisantemaxantina y el 3,99 % de otros carotenoides no identificados, determinados por HPLC.

Ejemplo 13

30 Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1.

Se mezclaron la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 11 y la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 12, en la relación de 88:12 por peso físico, respectivamente. Se homogeneizaron 0,3 kg de oleorresina de caléndula combinada que contenía 114,32 g/kg de carotenoides totales (11,43 % de carotenoides) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad de 3 cuellos bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El KOH alcohólico se preparó tomando 120 g de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una pureza del 90 % y disolviéndolo en 0,45 litros (1:1,5 volúmenes con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se introdujo lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 1,2 litros (1:4 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 2,4 litros (1:8 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de aproximadamente 7,0. Los cristales húmedos (70,2 g) se recuperaron del filtro y se transfirieron al recipiente. Se introdujeron 0,21 litros de etanol (1:3 volúmenes con respecto a los cristales húmedos) en el recipiente y se agitó durante 10 minutos a una temperatura mantenida a 50 °C. La disolución se filtró luego a través de un embudo Buchner. Los cristales húmedos se recogieron luego del filtro y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de alrededor de 55 °C durante 1 hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y el nivel de etanol fuera inferior a 100 ppm.

Se obtuvieron 26,62 g de cristales de carotenoides purificados ricos en trans-luteína y trans-zeaxantina y la recuperación física del producto final fue del 8,63 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 89,52 % de carotenoides totales en peso, determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 89,91 % fue todo trans-luteína, el 9,03 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,37 % beta-criptoxantina y el 0,06 % de betacaroteno y sin ninguna traza de cis-luteínas ni epóxidos, determinados por HPLC.

Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 80,48 % de trans-luteína en peso y un 8,08 % en peso de trans-zeaxantina estando la relación en peso de la trans-luteína con respecto a la trans-zeaxantina, en una relación de aproximadamente 10:1 (9,95). Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 10,40 % de contenido de

cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química de los carotenoides del producto final fue del 69,49 %, con una recuperación química de luteína del 78,71 % y una recuperación química de zeaxantina del 86,22 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,22 % con 58,82 ppm de etanol.

Ejemplo 14

- 5 Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 5:1.

Se mezclaron la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 11 y la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 12, en la relación de 70:30 por peso físico, respectivamente. Se homogeneizaron 0,3 kg de oleorresina de caléndula combinada que contenía 101,86 / kg de carotenoides totales (10,18 % de carotenoides) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad con 3 cuellos bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El KOH alcohólico se preparó tomando 120 g de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una pureza del 90 % y disolviéndolo en 0,45 litros (1:1,5 volúmenes con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se introdujo lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se introdujeron 1,2 litros (1:4 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 2,4 litros (1: 8 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de aproximadamente 7,0. Los cristales húmedos (78,5 g) se recuperaron del filtro y se transfirieron al recipiente. Se añadieron 0,23 litros de etanol (1:3 volúmenes con respecto a los cristales húmedos) al recipiente y se agitaron durante 10 minutos a una temperatura mantenida a 50 °C. La disolución se filtró luego a través de un embudo Buchner. Los cristales húmedos se recogieron luego del filtro y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de alrededor de 55 °C durante 1 hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y el nivel de etanol fuera inferior a 100 ppm.

Se obtuvieron 21,59 g de cristales de carotenoides purificados ricos en luteína y zeaxantina y la recuperación física del producto final fue del 7,19 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 91,39 % en peso de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 82,64 % fue todo trans-luteína, el 16,29 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,70 % beta-criptoxantina y el 0,10 % betacaroteno y sin ninguna traza de cis-luteínas ni epóxidos, determinados por HPLC.

Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 75,52 % en peso de trans-luteína y un 14,88 % en peso de trans-zeaxantina, estando la relación en peso de la trans-luteína con respecto a la trans-zeaxantina en una relación de aproximadamente 5:1 (5,07).

Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 8,46 % de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química de los carotenoides del producto final fue del 64,61 %, con una recuperación química de luteína del 69,12 % y una recuperación química de zeaxantina del 76,22 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,28 % con 23,30 ppm de etanol.

40 Ejemplo 15

Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 1:1.

Se mezclaron la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 11 y la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 12, en la relación de 18:82 en peso, respectivamente. Se homogeneizaron 0,3 kg de oleorresina de caléndula mezclada que contenía 62,24 / kg de carotenoides totales (el 6,22 % de carotenoides) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad con 3 cuellos bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El KOH alcohólico se preparó tomando 120 g de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una pureza del 90 % y disolviéndolo en 0,45 litros (1:1,5 volúmenes con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se introdujo lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 1,2 litros (1:4 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 2,4 litros (1:8 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de aproximadamente 7,0. Los cristales húmedos (62,2 g) se recuperaron del 15 filtro y se transfirieron al recipiente. Se introdujeron 0,18 litros de etanol (1:3 volúmenes con respecto a los cristales húmedos) en el recipiente

y se agitó durante 10 minutos a una temperatura mantenida a 50 °C. La disolución se filtró luego a través de un embudo Buchner. Los cristales húmedos se recogieron luego del filtro y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de alrededor de 55 °C durante 1 hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y el nivel de etanol fuera inferior 20 a 100 ppm.

5 Se obtuvieron 11,28 g de cristales de carotenoides purificados ricos en trans-luteína y en trans-zeaxantina y la recuperación física del producto final fue del 3,76 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 92,34 % en peso de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 48,52 % fue todo trans-luteína, el 46,38 % fue todo trans-zeaxantina, 25 el 1,22 % beta-criptoxantina y el 2,30 % beta-caroteno y sin ninguna traza de cis-luteínas ni epóxidos, determinados por HPLC.

10 Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 44,80 % en peso de trans-luteína y un 42,82 % en peso de trans-zeaxantina estando la relación en peso de la trans-luteína con respecto a la trans-zeaxantina en una relación de aproximadamente 1:1 (1,04).

Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 7,42 % de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química de los carotenoides del producto final fue del 55,82 % con una recuperación química de luteína del 62,86 % y una recuperación química de zeaxantina del 69,33 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,27 % con 35,55 ppm de etanol.

15

Ejemplo 16

Extracción de luteína a partir de harina de caléndula rica en luteína utilizando alcohol isopropílico y enriquecimiento en etanol

20 A) Extracción de luteína a partir de harina de caléndula rica en luteína utilizando alcohol isopropílico

Se llevaron 12,5 kg de harina de caléndula rica en luteína que tenía 8,99 g/kg (0,89 %) de carotenoides totales (con un perfil de carotenoides del 74,58 % de trans-luteína, el 4,28 % de trans-zeaxantina, el 1,94 % de betacaroteno, el 1,02 % de criptoxantina y el 18,08 % de isómeros cis y epóxidos, medido por HPLC), a un extractor de 125 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujeron 75 litros de alcohol isopropílico, con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con menos del 1 % de contenido de humedad, en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 55 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y recogió en un depósito. La extracción se repitió dos veces más, cada una con 75 litros de alcohol isopropílico bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. La cuarta y quinta extracciones se llevaron a cabo utilizando 62,5 litros de alcohol isopropílico en cada extracción bajo circulación y a una temperatura de 58 °C. Se llevaron 325 litros de micelas recogidas de las cinco extracciones a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 295 litros con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 %. Se obtuvieron 2,0 kg de oleorresina que contenía 51,28 g/kg de carotenoides totales (el 5,12 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 91,26 %. La recuperación química de la luteína fue del 87,23 %. La oleorresina de caléndula rica en luteína así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 71,28 % de trans-luteína, el 5,83 % de trans-zeaxantina, el 1,92 % de betacaroteno, el 1,53 % de criptoxantina y el 19,36 % de isómeros cis/epóxidos, determinados por HPLC.

40

B) Enriquecimiento de la oleorresina de caléndula rica en luteína utilizando etanol.

Se homogeneizaron 2,0 kg de oleorresina de caléndula rica en luteína que contenía 51,28 g/kg de carotenoides totales, obtenida de la etapa A), a temperatura ambiente con 2,0 litros de etanol en un recipiente durante 10 minutos para obtener una mezcla homogénea uniforme. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La capa inferior del disolvente se drenó y la oleorresina así obtenida se retuvo en el recipiente. El procedimiento se repitió dos veces más añadiendo 2,0 litros de etanol cada vez para enriquecer la oleorresina. Se obtuvieron 0,672 kg de oleorresina enriquecida que contenía 142,8 g/kg de carotenoides totales (14,28 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 93,56 %. La oleorresina enriquecida en luteína así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 73,22 % de trans-luteína, el 4,90 % de trans-zeaxantina, el 1,62 % de betacaroteno, el 0,79 % de criptoxantina y el 19,38 % de isómeros cis/epóxidos, determinados por HPLC.

50

Ejemplo 17

Extracción de zeaxantina a partir de la harina de caléndula rica en zeaxantina utilizando alcohol isopropílico y enriquecimiento con etanol

55 A) Extracción de zeaxantina a partir de la harina de caléndula rica en zeaxantina utilizando alcohol isopropílico

Se llevaron 20 kg de harina de caléndula rica en zeaxantina (obtenida de Ball Horticulture Inc abarcada por el documento de patente n. ° US 6.784.351) que tenía 3,29 g/kg (0,329 %) de carotenoides con un perfil de carotenoides del 59,08 % de trans-zeaxantina, el 14,80 % de betacaroteno, el 11,77 % de trans-luteína, el 2,76 % de alfa-criptoxantina, el 2,33 % de beta-criptoxantina, el 1,98 % de alfa-caroteno, el 0,82 % de cis-luteína, el 0,22 % de crisantemaxantina y el 6,24 % de otros carotenoides no identificados, medidos por HPLC, a un extractor de 200 litros de capacidad con instalación de circulación.

Se introdujeron 120 litros de alcohol isopropílico, con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con menos del 1 % de contenido de humedad, en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 55 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió 2 veces más, cada una con 60 litros de alcohol isopropílico en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. Se llevaron 217,2 litros de micela recogidos de las 3 extracciones anteriores a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 188 litros con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 %. Se obtuvieron 3,252 kg de oleorresina que contenía 20,04 g/kg de carotenoides totales (el 2,004 % de carotenoides) con una recuperación del 99,04 %. La recuperación química de la zeaxantina fue del 92,75 %. La oleorresina de caléndula rica en trans-zeaxantina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 53,74 % de trans-zeaxantina, el 14,51 % de betacaroteno, el 15,15 % de trans-luteína, el 3,64 % de alfa-criptoxantina, el 2,26 % de beta-criptoxantina, el 3,11 % de alfa-caroteno, el 1,60 % de cis-luteína y el 0,52 % de crisantemaxantina y el 5,47 % de otros carotenoides no identificados, determinados por HPLC.

B) Enriquecimiento de oleorresina de caléndula rica en zeaxantina utilizando etanol.

Se homogeneizaron 2,31 kg de oleorresina de caléndula rica en zeaxantina que contenía 20,04 g/kg de carotenoides, obtenida de la etapa A) a 45 °C con 10,8 litros de agua de proceso en un recipiente durante 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La mezcla separada se filtró al vacío. La oleorresina de caléndula así obtenida en el filtro se transfirió al recipiente. Este procedimiento se repitió una vez más con los mismos 10,8 litros de agua de proceso a la misma temperatura para eliminar todas las impurezas solubles en agua. A la oleorresina obtenida, se añadieron 5,4 litros de etanol con un contenido de humedad de aproximadamente un 5 % y se agitó a 45 °C durante un período de 10 a 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. Se decantó y drenó la capa superior de etanol. Los lavados con etanol se repitieron dos veces más añadiendo 4,2 litros de etanol cada vez. Se obtuvieron 0,969 kg de oleorresina enriquecida que contenía 40,83 g/kg de carotenoides totales (el 4,083 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 85,47 %. La recuperación química de la zeaxantina fue del 88,88 %. La oleorresina de caléndula rica en trans-zeaxantina enriquecida así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 55,89 % de trans-zeaxantina, el 13,62 % de betacaroteno, el 16,63 % de trans-luteína, el 3,57 % de alfa-criptoxantina, el 2,27 % de beta-criptoxantina, el 3,72 % de alfa-caroteno, el 0,71 % de cis-luteína y el 0,25 % de crisantemaxantina y el 3,34 % de otros carotenoides no identificados, determinados por HPLC.

Ejemplo 18

Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en trans-luteína y trans-zeaxantina en una relación en peso de aproximadamente 10:1

Se mezclaron la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida en el Ejemplo 16 y la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida en el Ejemplo 17, en la relación de 86:14 por peso físico, respectivamente. Se homogeneizaron 0,3 kg de oleorresina de caléndula mezclada que contenía 129,20 g/kg de carotenoides totales (12,92 % de carotenoides) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad con 3 cuellos bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El KOH alcohólico se preparó tomando 120 g de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una pureza del 90 % y disolviéndolo en 0,45 litros (1:1,5 volúmenes con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se introdujo lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 1,2 litros (1:4 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C, a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 2,4 litros (1:8 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de alrededor de 7,0. Luego se recogieron los cristales húmedos del filtro y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de alrededor de 55 °C por hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y los niveles de alcohol isopropílico y etanol fueran inferiores a 100 ppm cada uno. Se obtuvieron 35,59 g de cristales de carotenoides purificados ricos en trans-luteína y en trans-zeaxantina y la recuperación física del producto final fue del 11,86 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 91,22

% de carotenoides totales en peso determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 89,84 % fue todo trans-luteína, el 9,04 % fue todo trans-zeaxantina total, el 0,43 % beta-criptoxantina y el 0,37 % betacaroteno y sin ningún rastro de cis-luteínas y epóxidos, determinados por HPLC.

5 Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 82,10 % en peso de trans-luteína y un 8,26 % en peso de trans-zeaxantina estando la relación en peso de la trans-luteína con respecto a trans-zeaxantina en una relación de aproximadamente 10:1 (9,94).

10 Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 8,62 % de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química de los carotenoides del producto final fue del 83,76 % con una recuperación química de luteína del 92,78 % y una recuperación química de zeaxantina del 95,26 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,51 % con 32,3 ppm de etanol, 22,5 ppm de alcohol alcohólico detectado por cromatografía de gases.

Ejemplo 19

Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en luteína y zeaxantina en una relación de aproximadamente 5:1.

15 Se combinaron la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 16 y la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida del Ejemplo 17 en la relación de 60:40 por peso físico, respectivamente. Se homogeneizaron 0,30 kg de oleorresina de caléndula combinada que contenía 103,50 g/kg de carotenoides totales (el 10,35 % de carotenoides) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad con 3
20 cuellos bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El KOH alcohólico se preparó tomando 120 g de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una pureza del 90 % y disolviéndolo en 0,45 litros (1:1,5 volúmenes con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se añadió lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 1,2 litros (1:4 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C, a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 2,4 litros (1:8 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor
30 neutro de aproximadamente 7,0. Los cristales húmedos (83,2 g) se recuperaron del filtro y se transfirieron al recipiente. Se introdujeron 0,25 litros de etanol (1:3 volumen a los cristales húmedos) en el recipiente y se agitó durante 10 minutos a una temperatura mantenida a 50 °C. La disolución se filtró luego a través de un embudo Buchner. Luego se recogieron los cristales húmedos del filtro y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de alrededor de 55 °C durante 1 hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y los niveles de alcohol isopropílico y etanol fueran inferiores a 100 ppm cada uno.

35 Se obtuvieron 22,95 g de cristales de carotenoides purificados ricos en trans-luteína y en trans-zeaxantina y la recuperación física del producto final fue del 7,65 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 91,86 % en peso de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 82,23 % fue todo trans-luteína, el 16,78 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,57 % beta-criptoxantina y el 0,40 % betacaroteno y sin ninguna traza de cis-luteína ni epóxidos, determinados por HPLC.

40 Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 73,56 % de trans-luteína en peso y un 15,01 % en peso de trans-zeaxantina estando la relación en peso de la trans-luteína con respecto a la trans-zeaxantina en una relación de aproximadamente 5:1 (4,9).

45 Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 8,04 % de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química de los carotenoides del producto final fue del 67,89 %, con una recuperación química de luteína del 84,64 % y de zeaxantina del 85,48 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,29 % con 63,2 ppm de etanol y 13,05 ppm de alcohol alcohólico detectado mediante cromatografía de gases.

Ejemplo 20

50 Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en luteína y en zeaxantina en una relación de aproximadamente 1:1

55 Se combinaron la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida en el Ejemplo 16 y la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida en el Ejemplo 17, en la relación de 14:86 por peso físico, respectivamente. Se homogeneizaron 0,30 kg de oleorresina de caléndula combinada que contenía 56,13 g/kg de carotenoides totales (el 5,613 % de carotenoides) durante 10 minutos en un matraz de fondo redondo de 5,0 litros de capacidad con 3 cuellos bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C en un baño de agua caliente. El KOH alcohólico se preparó tomando 120 g de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una

pureza del 90 % y disolviéndolo en 0,45 litros (1:1,5 volúmenes con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se añadió lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 1,2 litros (1:4 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C, a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 2,4 litros (1:8 volúmenes calculados con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de alrededor de 7,0. Los cristales húmedos (25,2 g) se recuperaron del filtro y se transfirieron al recipiente. Se introdujeron 0,075 litros de etanol (1:3 volumen con respecto a los cristales húmedos) al recipiente y se agitó durante 10 minutos a una temperatura mantenida a 50 °C. La disolución se filtró luego a través de un embudo Buchner. Luego se recogieron los cristales húmedos del filtro y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de alrededor de 55 °C durante 1 hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y los niveles de alcohol isopropílico y etanol fueran menores de 100 ppm cada uno.

Se obtuvieron 9,69 g de cristales de carotenoides purificados ricos en trans-luteína y en trans-zeaxantina y la recuperación física del producto final fue del 3,23 %. Los cristales de carotenoides obtenidos contenían un 90,98 % en peso de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 48,78 % fue todo trans-luteína, el 49,87 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,42 % beta-criptoxantina y el 0,93 % beta-caroteno y sin rastros de cis-luteínas, crisantemaxantina, alfa-criptoxantina, alfa-caroteno y epóxidos, se determinaron por HPLC. Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían el 43,73 % en peso de trans-luteína y el 44,70 % en peso de trans-zeaxantina estando la relación en peso de la trans-luteína con respecto a la trans-zeaxantina en una relación de aproximadamente 1:1 (0,978).

Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 8,99 % de contenido de cera cuando se midió utilizando cromatografía de gases. La recuperación química de los carotenoides del producto final fue del 52,38 %, con una recuperación química de luteína del 65,58 % y una recuperación química de zeaxantina del 76,19 %. El producto final tuvo un contenido de humedad del 0,28 % con 12,08 ppm de etanol y 35,06 ppm de alcohol isopropílico detectado por cromatografía de gases.

Ejemplo 21

Extracción, aislamiento y purificación de cristales de carotenoides ricos en luteína y en zeaxantina de las harinas de caléndula que utilizan etanol como disolvente para la extracción seguido de combinación de cristales

A) Extracción de luteína a partir de harina de caléndula rica en luteína utilizando etanol y enriquecimiento de la oleorresina de caléndula rica en luteína utilizando etanol.

Se llevaron 100 kg de harina de caléndula rica en luteína que tenía 8,99 g/kg (el 0,89 %) de carotenoides totales (con un perfil de carotenoides del 74,58 % de trans-luteína, el 4,28 % de trans-zeaxantina, el 1,94 % de betacaroteno, el 1,02 % de criptoxantina y el 18,08 de isómeros cis y epóxidos medidos por HPLC) a un extractor de 2 KL de capacidad con instalación de circulación. Se introdujeron 1.000 litros de etanol, con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con un contenido de humedad inferior al 1,0 %, al extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 75 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y recogió en un depósito. La extracción se repitió dos veces más con el mismo volumen de etanol 1.000 litros cada uno en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. Se llevaron 2.600 litros de micelas recogidos de las tres extracciones a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 2.104 litros con una pureza medida por cromatografía de gases superior al 99 % y con un nivel de humedad del 2 %. Se obtuvieron 20,4 kg de oleorresina que contenía 40,02 g/kg de carotenoides totales (el 4,0 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 91,73 %. La recuperación química de la luteína fue del 97,43 %. La oleorresina de caléndula rica en luteína así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 79,22 % de trans-luteína, el 4,18 % de trans-zeaxantina y el 16,13 % de isómeros cis/epóxidos, el 0,22 % de beta-caroteno, el 0,25 % de criptoxantina, determinados por HPLC.

Se homogeneizaron 18,36 kg de oleorresina de caléndula rica en luteína que contenía 40,02 / kg de carotenoides totales, obtenida de la etapa 1 (a) anterior a 45 °C con 92 litros de agua de proceso en un recipiente durante 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La mezcla separada se filtró al vacío. La oleorresina de caléndula así obtenida en el filtro se transfirió al recipiente. Este procedimiento se repitió una vez más con los mismos 92 litros de agua de proceso a la misma temperatura para eliminar todas las impurezas solubles en agua. A la oleorresina obtenida se añadieron 36 litros de etanol con un contenido de humedad de aproximadamente un 8 % y se agitó a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. Se

decantó y drenó la capa superior de etanol. Los lavados con etanol se repitieron tres veces más añadiendo 36 litros de etanol cada vez para enriquecer la oleorresina. Se obtuvieron 5,24 kg de oleorresina enriquecida que contenía 124,39 g/kg de carotenoides totales (el 12,44 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 88,71 %. La oleorresina rica en luteína enriquecida así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 79,83 % de trans-luteína, el 4,02 % de trans-zeaxantina, el 0,23 % de beta-caroteno, el 0,56 % de criptoxantina y el 15,36 % de isómeros cis/epóxidos, determinados por HPLC.

B) Extracción de zeaxantina a partir de harina de caléndula rica en zeaxantina utilizando etanol y enriquecimiento en etanol

Se llevaron 44 kg de harina de caléndula rica en zeaxantina (obtenida de Ball Horticulture Inc abarcada por el documento de patente nº. US 6.784.351) que tenía 3,29 g/kg (el 0,329 %) de carotenoides totales con un perfil de carotenoides del 59,08 % de trans-zeaxantina, el 14,80 % de betacaroteno, el 11,77 % de trans-luteína, el 2,76 % de alfa-criptoxantina, el 2,33 % de beta-criptoxantina, el 1,98 % de alfa-caroteno, el 0,82 % de cis-luteína, el 0,22 % de crisantemaxantina y el 6,24 % de otros carotenoides no identificados, determinados por HPLC, a un extractor de 500 litros de capacidad con instalación de circulación. Se introdujeron 264 litros de etanol, con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con un contenido de humedad inferior al 5 %, en el extractor y se hizo circular. La temperatura se elevó hasta 75 °C y se mantuvo durante 1 hora en circulación. Después de 1 hora, el extracto se drenó y recogió en un depósito de micela. La extracción se repitió 3 veces más, cada una con 132 litros de etanol en las mismas condiciones de temperatura y tiempo. Los extractos obtenidos se recogieron en el depósito de micela. Se llevaron 578 litros de micela recogidos de las 4 extracciones anteriores a un evaporador, preferiblemente a un evaporador de película descendente o a un evaporador de película agitada para obtener una micela concentrada que contenía el 70 % de sólidos y el 30 % de disolvente. La micela concentrada se destiló posteriormente en una unidad de destilación a presión atmosférica para aumentar la concentración de sólidos hasta el 95 % con un nivel de disolvente de alrededor del 5 %. El disolvente se destiló a presión reducida (de 450 a 600 mm de Hg, es decir, de 60 kPa a 80 kPa) para reducir el nivel de disolvente hasta menos del 1 %. La cantidad total de disolvente recuperado fue de 498 litros con una pureza medida por cromatografía de gases de más del 99 % con un nivel de humedad del 5,2 %. Se obtuvieron 21,1 kg de oleorresina que contenía 6,63 g/kg de carotenoides totales (el 0,663 % de carotenoides) con una recuperación del 96,63 %. La recuperación química de zeaxantina fue del 87,02 %. La oleorresina de caléndula rica en trans-zeaxantina así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 53,20 % de trans-zeaxantina, el 9,26 % de betacaroteno, el 12,93 % de trans-luteína, el 6,38 % de alfa-criptoxantina, el 2,38 % de beta-criptoxantina, el 2,66 % de alfa-caroteno, el 3,63 % de cis-luteína y el 1,23 % de crisantemaxantina y el 8,33 % de otros carotenoides no identificados, determinados por HPLC. Se tomaron 19,57 kg de la oleorresina de caléndula rica en zeaxantina que contenía 6,63 g/kg de carotenoides, obtenidos por extracción con etanol se homogeneizaron con 60,0 litros de agua de proceso a 45 °C en un recipiente durante 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. La mezcla separada se filtró al vacío. La oleorresina de caléndula así obtenida en el filtro se transfirió al recipiente. Este procedimiento se repitió una vez más con los mismos 60,0 litros de agua de proceso a la misma temperatura para eliminar todas las impurezas solubles en agua. A la oleorresina obtenida se añadieron 20 litros de etanol con un contenido de humedad de aproximadamente un 8 % y se agitó a 45 °C durante 10 a 15 minutos. Se dejó asentar y separar el contenido de la mezcla. Se decantó y drenó la capa superior de etanol. Los lavados con etanol se repitieron dos veces más añadiendo 20 litros de etanol cada vez. Se obtuvieron 2,559 kg de oleorresina enriquecida que contenía 46,20 g/kg de carotenoides totales (el 4,62 % de carotenoides) con una recuperación química de carotenoides del 91,11 %. La recuperación química de la zeaxantina fue del 90,53 %. La oleorresina de caléndula rica en trans-zeaxantina enriquecida así obtenida presentó un perfil de carotenoides que contenía el 52,86 % de trans-zeaxantina, el 10,36 % de betacaroteno, el 16,28 % de trans-luteína, el 7,83 % de alfa-criptoxantina, el 2,33 % de beta-criptoxantina, el 2,10 % de alfa-caroteno, el 4,36 % de cis-luteína y el 0,08 % de crisantemaxantina y el 3,8 % de otros carotenoides no identificados, determinados por HPLC.

C) Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en luteína

Se homogeneizaron 4,8 kg de oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida obtenida de la etapa (A) anterior que contenía 124,39 g/kg de carotenoides totales (el 12,43 % de carotenoides) durante 10 minutos en un extractor de 100 litros de capacidad bajo agitación continua a una temperatura de 40 °C mantenida por la circulación de agua caliente en el encamisado. El KOH alcohólico se preparó tomando 1,92 kg de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una pureza del 90 % y disolviéndolo en 7,2 litros (1:1,5 p/v con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se añadió lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 19,2 litros (1:4 p/v calculado con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C, a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un filtro de Nutsche para recuperar los cristales de carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 38,4 litros (1:8 p/v calculado con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y bajar el pH del efluente hasta un valor neutro de alrededor de 7,0. Los cristales húmedos (1160 g) se recuperaron del filtro y se transfirieron al recipiente. Se añadieron 3,48 litros de etanol (1:3 p/v con respecto a los cristales húmedos) al recipiente y se agitó durante 10 minutos a una temperatura mantenida a 50 °C. La disolución se filtró luego a través de un filtro Nutsche. Luego se recogieron los cristales húmedos del filtro Nutsche y se secaron en un secador de lecho fluidizado

a una temperatura de alrededor de 55 °C durante 1 hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y el nivel de etanol fuera inferior a 100 ppm.

5 Se obtuvieron 504,6 g de cristales de carotenoides purificados ricos en trans-luteína y la recuperación física del producto final fue del 10,51 %. Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 90,83 % de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 92,36 % fue todo trans-luteína, el 5,72 % fue todo trans-zeaxantina, el 0,30 % cis-luteínas, el 0,51 % betacaroteno y el 1,11 % criptoxantina, determinados por HPLC. La recuperación química del producto final fue del 76,76 %.

D) Aislamiento y purificación para obtener cristales de carotenoides ricos en zeaxantina.

10 Se homogeneizaron 2,1 kg de la oleorresina de caléndula rica en luteína enriquecida, obtenida de la etapa anterior (C) que contenía 46,20 g/kg de carotenoides totales (el 4,62 % de carotenoides) durante 10 minutos, en un extractor de 50 litros de capacidad con agitación continua a una temperatura de 40 °C mantenida por la circulación de agua caliente en el recipiente encamisado. El KOH alcohólico se preparó tomando 840 g de KOH (40 % calculado con respecto a la oleorresina de entrada) con una pureza del 90 % y disolviéndolo en 3,15 litros (1:1,5 p/v con respecto a la oleorresina) de etanol. El KOH alcohólico preparado se añadió lentamente en un recipiente de reacción que contenía la oleorresina de caléndula homogeneizada. La reacción de saponificación se llevó a cabo a una temperatura de 75 °C durante 30 minutos. Después de asegurar que el grado de saponificación fuera superior al 99 % medido por HPLC, se añadieron 15 8,4 litros (1:4 p/v calculado con respecto a la oleorresina) de agua caliente desmineralizada mantenida a una temperatura de 75 °C, a la oleorresina de caléndula saponificada y se continuó la agitación durante 10 minutos. La mezcla saponificada diluida con cristal de carotenoides se filtró en un embudo Buchner para recuperar los cristales de 20 carotenoides. Los cristales de carotenoides así obtenidos se lavaron con 16,8 litros (1:8 p/v calculado con respecto a la oleorresina) de agua caliente mantenida a una temperatura de 75 °C para eliminar las impurezas y reducir el pH del efluente hasta un valor neutro de aproximadamente 7,0. Los cristales húmedos (475,3 g) se recuperaron del filtro y se transfirieron al recipiente. Se introdujeron 1,42 litros de etanol (1:3 p/v con respecto a los cristales húmedos) en el recipiente y se agitó durante 10 minutos a una temperatura mantenida a 50 °C. La disolución se filtró luego a través 25 de un embudo Buchner. Los cristales húmedos se recogieron luego del filtro y se secaron en un secador de lecho fluidizado a una temperatura de alrededor de 55 °C durante 1 hora o hasta que el nivel de humedad se redujera hasta menos del 0,3 % y el nivel de etanol fuera inferior a 100 ppm.

30 Se obtuvieron 35,2 g de cristales de carotenoides purificados ricos en trans-zeaxantina y la recuperación física del producto final fue del 1,67 %. Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 72,3 % de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 88,60 % fue todo trans-zeaxantina, el 8,29 % fue todo trans-luteína, el 0,21 % crisantemaxantina, el 0,51 % alfacaroteno y el 2,39 % beta-caroteno y sin ningún rastro de cis-luteínas ni epóxidos, determinados por HPLC.

Los cristales de carotenoides así obtenidos contienen un 64,05 % en peso de trans-zeaxantina y un 5,99 % en peso de trans-luteína con una recuperación química del 26,23 % del total de carotenoides.

35 E) Combinación de cristales ricos en luteína y cristales ricos en zeaxantina

Se combinaron los cristales obtenidos de la etapa (C) y los cristales obtenidos de la etapa (D) en relaciones específicas en el mezclador de laboratorio durante 10 minutos o hasta alcanzar una uniformidad de color en la mezcla final. La muestra mezclada se analizó para determinar sus carotenoides totales y su perfil por HPLC. Las tres mezclas se 40 mezclaron en una relación de 10:1 de trans-luteína con respecto a trans-zeaxantina tomando diferentes cantidades en cada mezcla. El perfil teórico de la mezcla 10:1 de trans-luteína con respecto a trans-zeaxantina sería del 90,12 % de carotenoides totales medidos por espectrofotómetro UV visible, y el 89,1 % de trans-luteína, el 8,91 % de trans-zeaxantina y el 1,97 % de otros carotenoides, medidos por HPLC.

45 Mezcla 1: se tomaron 225 g de luteína y 9 g de zeaxantina y se mezclaron como se mencionó anteriormente. Los cristales de carotenoides así obtenidos contenían un 90,08 % de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 88,9 % fue todo trans-luteína, el 9,73 % fue todo trans-zeaxantina y el 1,37 % de betacaroteno y otros carotenoides sin ningún rastro de cis-luteínas ni epóxidos, determinados por HPLC. La relación obtenida en la mezcla anterior fue de 9,13.

50 Mezcla 2: se tomaron 150 g de luteína y 6 g de zeaxantina y se mezclaron como se mencionó anteriormente. Los cristales de carotenoides obtenidos en la mezcla 2 contenían un 88,96 % de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 89,46 % fue todo trans-luteína, el 8,59 % fue todo trans-zeaxantina y el 1,95 % de betacaroteno y otros carotenoides sin ningún rastro de cis-luteínas ni epóxidos, determinados por HPLC. La relación obtenida en la mezcla anterior fue de 10,41.

55 Mezcla 3: se tomaron 100 g de luteína y 4 g de zeaxantina como se mencionó anteriormente. Los cristales de carotenoides obtenidos en la mezcla 3 contenían un 90,38 % de carotenoides totales determinados por espectrofotómetro UV visible, de los cuales el 90,63 % fue todo trans-luteína, el 8,14 % fue todo trans-zeaxantina y el 1,23 % de betacaroteno y otros carotenoides sin ningún rastro de cis-luteínas ni epóxidos, determinados por HPLC. La relación obtenida en la mezcla anterior fue de 11,13.

Resulta evidente a partir del experimento anterior que la mezcla de cristales después de la purificación individualmente da como resultado relaciones variadas de luteína con respecto a zeaxantina tales como 9,13, 10,41 y 11,13. También resulta evidente que las recuperaciones de cristales purificados de zeaxantina obtenidos anteriormente son tan bajas como del 26,23 %, lo que no es rentable a escala comercial.

- 5 VENTAJAS: Las versiones descritas anteriormente del objeto de estudio y su equivalente tienen muchas ventajas, incluidas las que se describen a continuación.

La ventaja de la presente invención, es que el ensilaje se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas controladas para fijar y enriquecer los carotenoides y evitar la formación de productos de oxidación no deseados, tal como los epóxidos. Otra ventaja de la presente invención, es que el 99 % de los ésteres de carotenoides en la oleoresina enriquecida se pueden saponificar en menos de 30 minutos. Además, el producto obtenido no se somete a calor durante un tiempo más largo para evitar la formación de productos oxidativos degenerados. La masa saponificada se precipita inmediatamente con la ayuda de una mezcla de alcohol y agua en condiciones de calor, lo que ayuda a eliminar la mayoría de las impurezas en una sola etapa. La masa cristalizada se filtra y se lava con agua caliente para eliminar las impurezas. Los cristales húmedos recogidos se secan para obtener cristales de carotenoides. El procedimiento completo para obtener los cristales de carotenoides derivados de flores y/o de pétalos de flores de caléndula se completa dentro del intervalo de 4-5 horas.

La presente invención también tiene ventajas en su naturaleza ecológica orgánica, la combinación de tiempo y temperatura, y el uso de sólo disolventes seguros de la clase 3. Todos estos factores contribuyen al rendimiento y la estabilidad del producto y reducen el coste de producción a escala comercial. También aumenta la seguridad del producto para su uso como nutracéutico, cosmeceúutico, suplemento alimenticio o dietético.

Otra ventaja es que los cristales de carotenoides que tienen diferentes relaciones de cristales de luteína y de zeaxantina preparados por el procedimiento de la presente invención, dan como resultado una composición que es más bioactiva y biodisponible.

Otra ventaja de la presente invención es que evita la preparación de cristales de zeaxantina purificados que tienen recuperaciones muy bajas que no son económicamente viables.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el aislamiento de cristales de carotenoides, que comprende:
secar una parte de la planta para obtener una harina;
5 someter a extracción la harina con etanol, isopropanol, o mezclas de los mismos a una temperatura en el intervalo de 50 °C a 75 °C para obtener oleorresina;
enriquecer la oleorresina lavando con agua de proceso a 45 °C, seguido de homogeneización durante un período de 10 a 20 minutos con etanol, sedimentar, separar y drenar el etanol a una temperatura en el intervalo de 25 °C a 50 °C para obtener una oleorresina enriquecida;
10 hidrolizar la oleorresina enriquecida con álcali alcohólico a una temperatura en el intervalo de 70 °C a 80 °C para obtener la mezcla de reacción;
añadir agua caliente a una temperatura de 65 °C a 75 °C a la mezcla de reacción para precipitar los cristales de carotenoides; y
filtrar, lavar y secar los cristales de carotenoides;
15 seleccionándose la fuente vegetal del grupo que consiste en flores de caléndula (*Tagetes erecta*), pétalos de caléndula, frutos de pimiento rojo, y bayas de Goji (*Lycium barbarum*).
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las partes de la planta se ensilan en condiciones anaeróbicas controladas antes del secado.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el alcohol empleado para someter a extracción a la harina es etanol.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación de oleorresina con respecto a etanol está en el intervalo de 1:0,5 a 1:4 (p/v).
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el álcali alcohólico es, o bien hidróxido de sodio etanólico, o bien hidróxido de potasio etanólico.
- 25 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la relación de mezcla de reacción con respecto a agua caliente está en el intervalo de 1:1 a 1:1,5 (v/v).