



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 317 786**

② Número de solicitud: 200702147

⑤ Int. Cl.:
A23L 1/275 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **31.07.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2009**

Fecha de la concesión: **28.01.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Fernández García, Elisabet;
Ríos Martín, José Julián;
Garrido Fernández, Juan y
Pérez Gálvez, Antonio**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

②④ Título: **Agregado o complejo molecular carotenoide soluble, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

②⑤ Resumen:

Agregado o complejo molecular carotenoide soluble, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

El objeto de la presente invención es solubilizar en agua una matriz oleosa enriquecida en pigmentos carotenoides formando agregados moleculares que acomplejen la fracción carotenoide lo que les proporcionará la solubilidad en agua y una mayor estabilidad física y química sin necesidad de recurrir a una instrumentación costosa.

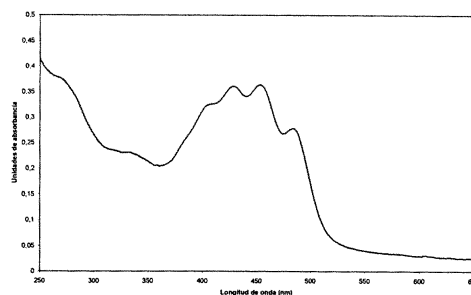


Figura 1

ES 2 317 786 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Agregado o complejo molecular carotenoide soluble, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se circunscribe al sector de la química alimentaria, concretamente a la producción de compuestos colorantes y antioxidantes, y más concretamente, a un concentrado carotenoide procesado convenientemente para aportar cualidades funcionales tanto tecnológicas (color, capacidad antioxidante) como fisiológicas (propiedades bioactivas de los carotenoides) a zumos, bebidas y alimentos deshidratados.

Estado de la técnica

Entre todos los compuestos bioactivos, destacan los carotenoides debido a su amplia presencia y distribución, diversidad estructural y a las acciones biológicas que desempeñan en los mamíferos. El interés que despiertan estos compuestos en la industria alimentaria ha evolucionado desde su mero uso como colorantes, para conferir y corregir el color en alimentos, o su empleo como fuente de pro-vitamina A, hasta incluirlos en el amplio catálogo de componentes bioactivos que, una vez incorporados al organismo a través de la dieta, ejercen funciones como antioxidantes, mejoran la comunicación intercelular y potencian el sistema inmune. Como contraposición a las acciones beneficiosas de estos compuestos están la dependencia absoluta de la dieta para incorporar carotenoides a nuestro organismo y una biodisponibilidad muy poco eficiente, debido al carácter liposoluble de los carotenoides. Para contrarrestar estos factores se recomienda una ingesta adecuada de fuentes ricas en carotenoides (frutas, vegetales y aceites) manteniendo unos niveles apropiados de carotenoides en plasma y aquellos tejidos donde desarrollen su actividad.

Sin embargo, la liposolubilidad de los carotenoides dificulta su empleo en alimentos en los que la matriz es hidrofílica, como zumos y bebidas refrescantes. Para diversificar las fuentes de ingesta, la industria alimentaria ha desarrollado procedimientos con los que se facilita la incorporación de carotenoides a alimentos constituidos básicamente por una matriz hidrofílica y así aumentar su bioaccesibilidad.

El primer recurso extendido es la formulación de carotenoides en dispersiones o emulsiones utilizando agentes emulsionantes para obtener una dispersión “aceite en agua”. Como en todas las emulsiones los parámetros tamaño de gota y su distribución, son los implicados en la estabilidad, reología, reactividad química y eficiencia fisiológica de la emulsión. En el caso de los carotenoides, la estabilidad de la emulsión no sólo se contabiliza en términos físicos sino también químicos por la sensibilidad de estos compuestos a agentes oxidantes. Más concretamente, para los carotenoides se ha descrito la obtención de microemulsiones como los procedimientos descritos en las patentes US 641774, JP 03-089532, EP 96-610003 y WO 00/00250 (ES), utilizando una amplia variedad de surfactantes, generalmente no iónicos, y/o biopolímeros, tanto proteínas como polisacáridos. La obtención de dispersiones no necesita de una instrumentación compleja o costosa pero la formulación requerida suele contener distintos compuestos para estabilizar tanto física como químicamente la dispersión.

Otro procedimiento para la obtención de soluciones acuosas de carotenoides es la encapsulación. La encapsulación es el proceso por el que compuestos liposolubles, como los carotenoides, y que ejercen el rol de “huéspedes”, son introducidos en una matriz, material pared o “anfitrión” que los recubre impidiendo con ello su degradación por contacto directo con agentes oxidantes. En función de la matriz y método de encapsulación empleado, el producto final será un polvo, un sólido que puede ser molido a diferentes tamaños de partícula o una dispersión del conjunto resultante “huésped-anfitrión”. Entre los métodos generales de encapsulación más ampliamente utilizados en la industria alimentaria destacan el secado por aspersión, la aspersión por enfriamiento o congelación, la extrusión y la inclusión de complejos. Se han descrito diferentes técnicas de encapsulación de carotenoides mediante secado por aspersión resultando como más eficiente el uso de maltodextrinas de distintos pesos moleculares (valores de equivalentes de dextrosa de 4, 15, 25, 36,5) como matriz de encapsulación. Esta técnica tiene un coste bajo en comparación con otras como la aspersión por congelación aunque al proporcionar un área superficial elevada se incrementa la posibilidad de oxidación. Otros procedimientos descritos utilizan la técnica de aspersión por congelación empleando matrices amorfas, como pullulan, un polisacárido lineal de glucosa, PVP40 y PVP360, que son poliamidas de diferente peso molecular. Para la encapsulación de carotenoides también se ha descrito la técnica de inclusión de complejos, utilizando beta-ciclodextrina como “anfitrión” para la encapsulación molecular. Las patentes JP 62267261, JP 04244059 y WO 9513047 describen procedimientos para ello. En este caso el pigmento se asocia, mediante uniones no covalentes, con beta-ciclodextrina generando un agregado soluble en agua. En general, la encapsulación es una técnica más eficiente proporcionando una mayor estabilidad a la preparación pero se requiere una instrumentación más costosa.

Finalmente, se pretende disminuir la sensibilidad de los carotenoides a factores oxidantes que con relativa facilidad pueden disminuir de forma significativa la concentración de estos compuestos en el alimento al que se adicionan.

Referencias bibliográficas

- Carotenoid nanodispersions for use in water-based systems and a process for their preparation. **Fullmer, L., Emmick, T.** US 641774 (20030815) [Fullmer, Ankeny, IA, USA] 2005.

ES 2 317 786 B1

- Process for producing carotenoid emulsion. **Mori, T. Ogata, T., Shimamura, S., Tanaka, H., Taniguchi, K., Kitayama, M.** JP 03-089532 (20030328) [Kuraray, Okayama, Japan] 2004.

5 - Water dispersible compositions containing natural hydrophobic pigment, method of preparing same and their use. **Winning, M., Isager, P. P.** EP 96-610003 (19960122) [Chr. Hansen, 2970 Hoersholm, Denmark] 2003.

- Method for the production of a water-dispersible formulation containing carotenoids. **Eller, T., Christiansen, C., Collados de la Vieja, A. J., Muñoz, A., Morales, E.** WO 00/00250(ES) (20000713) [Vitafine, E-24080 Leon, Spain] 2002.

10 - Preparation of cyclodextrin inclusion compounds containing β -carotene as material for drug, food and cosmetics. **Hasebe, K., Ando, Y., Chikamatsu, Y., Hayashi, K.** Patent JP 62267261; 1987.

15 - Preparation of cyclodextrin inclusion compounds containing β -carotene as food dyes and antioxidants. **Muraio, T., Maruyama, T., Yamamoto, Y.** Patent JP 04244059; 1992.

- Decolorized carotenoid-cyclo-dextrin complexes. **Schwartz, J. L., Shklar, G., Sikorski, C.** Patent WO 9513047; 1995.

20 **Descripción de la invención**

Descripción Breve

25 Un aspecto de la invención lo constituye un agregado o complejo molecular carotenóide, en adelante complejo carotenóide de la invención, constituido por una fracción monoéster de sacarosa asociada, no covalentemente, con una fracción o pigmento carotenóide.

30 Un aspecto preferente de la invención lo constituye el complejo carotenóide de la invención que presenta, preferentemente, una relación monoéster de sacarosa:pigmento carotenóide de 1:1 ó 2:1.

Otro aspecto preferente de la invención lo constituye el complejo carotenóide de la invención en el que el carotenóide pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: β -caroteno, licopeno, zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina, capsantina y luteína.

35 Otro aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de elaboración del complejo carotenóide, en adelante procedimiento de la invención, basado en el uso de una enzima con actividad ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa, EC 2.4.1.19) y porque comprende las siguientes etapas:

- 40 i) mezcla en agua del carotenóide con un exceso de monoéster de sacarosa,
- ii) adición de una enzima con actividad ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa) a la solución de i) permitiendo su acción a temperatura adecuada, preferentemente entre 60 y 90°C, y más preferentemente a 70°C, durante al menos 2 horas, preferentemente entre 2 y 24 horas, y
- 45 iii) eliminación del exceso de monoéster de sacarosa, preferentemente mediante centrifugación o filtrado.

Otro aspecto de la invención lo constituye el uso del complejo carotenóide de la invención, en adelante uso de la invención, en la elaboración de un aditivo alimentario o compuesto terapéutico al que aportan sus cualidades funcionales tanto tecnológicas (color, capacidad antioxidante) como fisiológicas (propiedades bioactivas de los carotenoides). Entre los alimentos se puede contar por ejemplo, zumos, bebidas y alimentos deshidratados.

Descripción detallada

55 El carácter lipofílico de los pigmentos carotenoides impide su solubilidad en agua. En la presente invención se consigue formar agregados polisacáridos, que interaccionan con el carotenóide, dando lugar a estructuras más complejas (con uniones no covalentes), que confieren al conjunto propiedades que son compatibles con las del agua. Por tanto, la invención se enfrenta al problema de aportar nuevos aditivos alimentarios bioactivos en formatos solubles.

60 Más concretamente, la presente invención se basa en que los inventores han observado que es posible solubilizar en agua un extracto oleoso enriquecido en pigmentos carotenoides mediante la adición de monoéster de sacarosa que, modificado enzimáticamente, forma agregados moleculares que posteriormente se asocian, no covalentemente, con la fracción carotenóide (Ejemplo 1). La enzima ciclodextringlucanotransferasa cataliza la unión de moléculas de glucosa para formar ciclodextrinas de distinto rango proporcionando receptáculos eficaces para alojar carotenoides.

65 El procedimiento para obtener estos agregados se inicia con la mezcla de una alícuota de la matriz oleosa rica en carotenoides con un exceso de monoéster de sacarosa, adicionando el enzima ciclodextringlucanotransferasa. Este

ES 2 317 786 B1

enzima cataliza diversas reacciones como la ciclación, acoplamiento y la de desproporción. El enzima ejerce su actividad sobre los residuos de glucosa y, desde el punto de vista del mecanismo de reacción, de una forma muy similar a las α -amilasas, aunque la ciclodextringlucanotransferasa no pertenezca al grupo de las hidrolasas. Los inventores desconocen el mecanismo concreto por el que se forman los agregados en el caso de la presente invención, tan sólo
5 que se produce una asociación molecular entre el sustrato y el pigmento carotenoide, gracias a la actividad del enzima, de tal forma que el agregado posee características físicas más polares, modificando, en este sentido, las del carotenoide lo que le permite una buena solubilidad en agua. En concreto y con el sustrato utilizado, monoéster de sacarosa, el enzima produce agregados moleculares de dos y tres unidades. Estos agregados se asocian mediante uniones no covalentes con la fracción carotenoide adicionada inicialmente, en relación 1:1 ó 2:1 de la relación monoéster de sacarosa:pigmento carotenoide, obteniendo un complejo soluble en agua. El proceso de formación del complejo es en
10 realidad una encapsulación molecular lo que resulta una gran ventaja para la fracción acomplejada (carotenoides) ya que la protege de la degradación por radiación UV, altera su reactividad química, aumentando su estabilidad frente a las soluciones orgánicas en que el pigmento está solubilizado en forma libre, y se hace soluble en agua. Los dos procesos, tanto la reacción enzimática de formación de agregados moleculares a partir del monoéster de sacarosa como la formación del complejo con el pigmento carotenoide tienen lugar simultáneamente, verificándose el proceso en
15 agua aproximadamente entre 60 y 90°C, preferentemente 70°C, y entre 2 y 24 horas. El complejo es lo suficientemente estable como para impedir la transferencia de la fracción carotenoide desde la fase acuosa al disolvente extractante (hexano, éter etílico) (Ejemplo 1). La solución acuosa obtenida se centrifuga o filtra para eliminar restos del monoéster de sacarosa que no hayan reaccionado.

20 La solución carotenoide resultante es de una elevada capacidad colorante que se puede utilizar en dilución para colorear bebidas y zumos. Otra posibilidad es su liofilización, obteniendo un polvo que se puede emplear para transferir color a alimentos deshidratados.

25 Por lo tanto, un aspecto de la invención lo constituye un agregado o complejo molecular carotenoide, en adelante complejo carotenoide de la invención, constituido por una fracción monoéster de sacarosa asociada, no covalentemente, con una fracción o pigmento carotenoide.

30 Un aspecto preferente de la invención lo constituye el complejo carotenoide de la invención que presenta, preferentemente, una relación monoéster de sacarosa:pigmento carotenoide de 1:1 ó 2:1.

Una realización preferente lo constituye el complejo carotenoide de la invención en la que el monoéster de sacarosa es palmitato de sacarosa.

35 Otro aspecto preferente de la invención lo constituye el complejo carotenoide de la invención en el que el carotenoide pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: β -caroteno, licopeno, zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina, capsantina y luteína. Los carotenoides utilizados en el procedimiento pueden estar en forma purificada o en forma de extracto oleoso de origen vegetal, como por ejemplo oleorresinas de β -caroteno y licopeno u oleorresinas de marigold (*Tagetes erecta*) y de pimientón (*Capsicum annuum L.*) sometidas
40 previamente a desesterificación.

Los carotenoides desde el punto de vista químico, pertenecen a la familia de los terpenos. Se conocen alrededor de 600 compuestos de esta familia, que se dividen en dos tipos básicos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, sus derivados oxigenados. A estos tipos hay que unir los apocarotenoides, de tamaño menor, formados por
45 ruptura de los carotenoides típicos.

Otro aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de elaboración del complejo carotenoide, en adelante procedimiento de la invención, basado en el uso de una enzima con actividad ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa, EC 2.4.1.19) y porque comprende las siguientes etapas:

- 50
- i) mezcla en agua del carotenoide con un exceso de monoéster de sacarosa,
 - ii) adición de una enzima con actividad ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa) a la solución de i) permitiendo su acción a temperatura adecuada, preferentemente entre 60 y 90°C, y más preferentemente a 70°C,
55 durante al menos 2 horas, preferentemente entre 2 y 24 horas, y
 - iii) eliminación del exceso de monoéster de sacarosa, preferentemente mediante centrifugación o filtrado.

Otro aspecto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que el carotenoide de
60 i) se utiliza en forma pura o en forma de extracto oleoso y pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: extracto oleoso de β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina, capsantina y extracto oleoso de pimiento (*Capsicum annuum L.*) sometido previamente a desesterificación.

65 Otro aspecto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que el monoéster de sacarosa de i) se utiliza en forma de un extracto vegetal, preferentemente, enriquecido en un monoéster de sacarosa o en forma pura.

ES 2 317 786 B1

Una realización preferente lo constituye el procedimiento de la invención en el que el monoéster de sacarosa es un extracto de origen vegetal con palmitato de sacarosa.

5 Una enzima con actividad ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa, EC 2.4.1.19) puede obtenerse a partir de distintos microorganismos, entre otros, bacterias *Bacillus*, *Thermoanaerobacter*, etc. Por otro lado, la reacción enzimática puede llevarse a cabo utilizando la enzima CGTasa libre en la solución o inmovilizada a un soporte que permita su reutilización tras su uso. Las diferentes CGTasas útiles para llevar a cabo el procedimiento de la invención pueden ser aisladas y seleccionadas por un experto en la materia.

10 Otro aspecto preferente de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que la enzima ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa) es de origen bacteriano, preferentemente una CGTasa de *Thermoanaerobacter* o de *Bacillus*. Una realización particular sería la utilización de la CGTasa de *Thermoanaerobacter* descrita en el ejemplo de la presente invención.

15 Otro aspecto de la invención lo constituye el uso del complejo carotenoide de la invención, en adelante uso de la invención, en la elaboración de un aditivo alimentario o compuesto terapéutico al que aportan sus cualidades funcionales tanto tecnológicas (color, capacidad antioxidante) como fisiológicas (propiedades bioactivas de los carotenoides). Entre los alimentos se puede contar por ejemplo, zumos, bebidas y alimentos deshidratados.

20 Descripción de las Figuras

Figura 1.- Espectro de absorción electrónica del complejo palmitato de sacarosa:luteína en agua.

25 Figura 2.- Espectro de masas del complejo palmitato de sacarosa:luteína, obtenido mediante la técnica ESI en modo negativo. La identificación de los iones característicos es la siguiente: 579 uma, palmitato de sacarosa; 615 uma, palmitato de sacarosa dihidrato; 1147 uma, aducto palmitato de sacarosa:luteína (1:1); 1183 uma, aducto palmitato de sacarosa:luteína (1:1) dihidrato; 1727 uma, aducto palmitato de sacarosa:luteína (2:1).

30 Figura 3.- Cromatograma obtenido a partir del análisis por HPLC-UV-Vis de una muestra de complejo de luteína. El análisis cromatográfico se realizó en modo isocrático empleando como fase móvil agua:acetonitrilo:ácido fórmico 50:50:0,1 a 1 mL/min.

35 Figura 4.- Cromatograma obtenido a partir del análisis por HPLC-UV-Vis-MS de una muestra de complejo palmitato de sacarosa:luteína. El análisis cromatográfico se realizó en modo isocrático empleando como fase móvil agua:acetonitrilo:ácido fórmico 50:50:0,1 a 1 mL/min y registrado a 434 nm.

40 Figura 5 a y b.- Espectro de masas obtenido mediante un sistema de HPLC-UV-Vis acoplado al espectrómetro de masas, on line, para la muestra de complejo con luteína. La identificación de los iones característicos es la siguiente: 579 uma, palmitato de sacarosa; 615 uma, palmitato de sacarosa dihidrato; 1147 uma, aducto palmitato de sacarosa:luteína (1:1); 1183 uma, aducto palmitato de sacarosa:luteína (2:1) hidrato.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

45 *Obtención del complejo monoéster sacarosa con luteína*

1.1.- Obtención del complejo carotenoide

50 El monoéster de sacarosa utilizado para ejemplificar la invención es palmitato de sacarosa presente en un extracto vegetal enriquecido en dicho monoéster. Este producto lo comercializa la empresa Gattefossé bajo la especificación Sucre Ester 15 (número CAS 26446-38-8). Por otro lado, la fuente de carotenoides es una oleoresina de marigold desesterificada comercializada por la empresa Kemin Foods bajo la denominación FloraGlo Lutein (20% Liquid in Corn Oil).

55 En un tubo de ensayo se pesaron 0,1 gramos de oleoresina, 0,5 gramos de palmitato de sacarosa y se añadieron 30 mL de agua. El tubo se introdujo en un baño de agua a 70°C, agitando la mezcla reactante con un agitador magnético. A continuación, se añadieron 0,5 mL de preparación enzimática Toruzyme 3.0 L comercializada por la empresa Novozymes que contiene la enzima ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa). El enzima se obtiene a partir de una cepa de *Bacillus* a la que se le introdujo el gen para la producción de CGTasa a partir de una cepa de *Thermoanaerobacter*. La mezcla se dejó en agitación durante 3 horas manteniendo la temperatura constante e igual a 70°C.

60 Transcurrido el periodo de reacción, la mezcla se centrifuga a 20000 rpm durante 20 minutos para eliminar el exceso de palmitato de sacarosa que no ha reaccionado. Se puede sustituir la centrifugación por una filtración de la mezcla a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm. El producto final es una solución acuosa de color amarillo intenso. En la Figura 1 se muestra el espectro de absorción electrónica de la solución acuosa obtenida. La concentración del pigmento en la solución se determina espectrofotométricamente. Para ello, una alícuota de la solución (100-200 µL) se mezcla con 2 mL de N,N-dimetilformamida, 2 mL de hexano y 5 mL de agua. La mezcla se

ES 2 317 786 B1

agita vigorosamente en un vortex durante 1 minuto y se centrifuga a 5000 rpm durante 10 minutos. La fase de hexano se recoge, se evapora y el residuo se disuelve con 2 mL de etanol, determinando la absorbancia de esta disolución. El cálculo de la concentración se realiza utilizando la siguiente expresión:

$$C(\text{g/mL}) = \frac{\text{Abs}_{445}}{2550 \times 100}$$

1.2.- Caracterización del compuesto por espectrometría de masas

La ionización a presión atmosférica (APCI, APPI, ESI, etc), y en especial la ionización por electrospray viene siendo la técnica preferentemente utilizada en el estudio de complejos unidos por fuerzas no covalentes debido, sobre todo, a que es un método de ionización de los denominados "soft ionization methods". De los, al menos, cuatro tipos de fuerzas no covalentes más conocidos: iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas existen datos de experimentos llevados a cabo con éxito en la detección de este tipo de compuestos. En todos los casos estas fuerzas son débiles por lo que estos compuestos son muy frágiles a la hora de conseguir la transferencia a la fase gaseosa de los iones en solución.

El proceso de evaporación del solvente en soluciones de complejos unidos por enlaces no covalentes y su transferencia como complejo intacto desde la solución a la fase gaseosa es una etapa crítica. La energía aplicada en el proceso de ionización debe ser la adecuada como para no traspasar la línea entre la producción de un ión o la que produce su disociación.

Los parámetros que afectan a la formación y transporte de los iones a la fase gaseosa son:

1. Composición de la solución (% de fase orgánica).

2. La concentración de analito en la fase móvil.

3. Modificadores de la solución que facilitan la ionización.

4. Energía de electrospray.

5. Valores de tensión de los elementos de la interfase, especialmente el capilar calentado (desolvatación final) y skimmer.

En el presente caso y para el complejo carotenoide realizado con luteína, se seleccionaron las siguientes condiciones:

1. Se parte del preparado del complejo bruto que es previamente liofilizado. Posteriormente se prepara una disolución en agua:acetonitrilo:ácido fórmico 50:50:0,1 a concentración 0,1 μM .

2. El método de ionización seleccionado fue ESI en modo negativo.

3. La tensión de electrospray fue de 3 kV.

4. La introducción de la muestra se hizo mediante bomba de infusión a velocidad 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ y por HPLC on-line para verificación.

5. La temperatura del capilar fue de 175°C. Este valor es claramente insuficiente para desolvatar completamente el spray generado, lo que se traduce en la formación de aductos desprotonados del portador (palmitato de sacarosa) con el agua y el modificador (fórmico), pero por contra se preserva la presencia del aducto de [Portador + Invitado]⁻, es decir, [palmitato de sacarosa + luteína-H]⁻ observándose con intensidades que varían entre 0,1 y 3% a m/z 1147. Asimismo, a m/z 1727 aparece el aducto [2(palmitato de sacarosa)+luteína-H]⁻. Para valores superiores de temperatura del capilar, el ión molecular no aparece, lo que se correspondería con el espectacular incremento de la intensidad del ión de palmitato de sacarosa, consecuencia de la liberación de la molécula de luteína. A temperaturas superiores estos aductos están ausentes.

En la Figura 2 se representa el espectro de masas del complejo de luteína.

1.3.- Confirmación por HPLC-UV-MS

El análisis por HPLC se realizó, no sólo para tratar de verificar los datos obtenidos mediante inyección continua, sino para tratar de evitar en lo posible las posibles interferencias debidas a la matriz de reacción, ya que se esperaba que al eluirlas a través de una columna de C18, aquellas pudieran ser evitadas en su mayoría. No obstante, y como

ES 2 317 786 B1

puede verse en el registro HPLC-UV-Vis (Figura 3) la muestra presenta un perfil de elución muy “ancho”, típico de una mezcla de compuestos (pull de ésteres de sacarosa) del que mediante fragmentogramas de masas pueden ser extraídos los iones de interés.

5 Se inyectaron 50 μL de solución original en agua:acetonitrilo:ácido fórmico 50:50:0,1 filtrada, en un sistema HPLC-UV-Vis-MS online eluido en modo isocrático con agua:acetonitrilo:ácido fórmico 50:50:0,1 a 1 mL/min y registrado a 434 nm. La introducción de muestra en el espectrómetro se hizo en modo split postcolumn (200 μL a la interfase). En la Figura 4 se muestra el cromatograma obtenido. También se obtiene así un registro simultáneo en UV-Vis y MS. La inyección de la muestra por HPLC mostró igualmente la formación del ión molecular desprotonado del
10 aducto [palmitato de sacarosa+luteína-H]⁻ a m/z 1147 así como de [palmitato de sacarosa+2H₂O+luteína-H]⁻ a m/z 1183, (Figura 5 a y b).

1.3.- Estabilidad térmica

15 La estabilidad térmica del complejo carotenoide de la invención se determinó provocando su degradación. La obtención de la constante de degradación a varias temperaturas de ensayo permite predecir la estabilidad del complejo carotenoide a cualquier temperatura, según la ecuación de Arrhenius. El experimento se realizó en las siguientes condiciones. Las temperaturas de ensayo seleccionadas fueron 60, 80 y 100°C aplicando un tiempo de calentamiento de la muestra de, aproximadamente, 1-3 vida media. La reacción de degradación se corresponde con una cinética de
20 primer orden obteniendo las siguientes constantes de degradación a las temperaturas ensayadas: $K_{60^\circ\text{C}}$, 0,0147 h⁻¹; $K_{80^\circ\text{C}}$, 0,034901 h⁻¹; $K_{100^\circ\text{C}}$, 0,1823 h⁻¹. Una vez obtenidos los parámetros de la ecuación de Arrhenius se predice la constante de degradación a 25°C y a 4°C y el tiempo de vida media resultando los valores siguientes:

$$25 \quad K_{25^\circ\text{C}}, 8,2206 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}; t_{1/2}, 840 \text{ horas.}$$
$$K_{4^\circ\text{C}}, 1,1405 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}; t_{1/2}, 6075 \text{ horas.}$$

1.4.- Estabilidad oxidativa

30 La estabilidad del complejo carotenoide de la invención se determinó provocando su oxidación espontánea inducida por radicales lo que se traduce en una pérdida progresiva del color en el espectro visible de la solución acuosa del complejo carotenoide. La reacción de oxidación se inicia mediante la adición de una disolución acuosa de un promotor de radicales libres que a una temperatura concreta se descompone espontáneamente en especies radicalarias.
35 El promotor utilizado en este caso fue el 2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidrocloruro, en adelante AAPH, a las concentraciones de 1, 10, 50 y 125 mM. Una alícuota de la solución de complejo carotenoide, se mezcló con un volumen de la disolución de AAPH. La reacción transcurrió en un tubo de ensayo inmerso en un baño termostatzado a 60°C con agitación. El muestreo se realizó cada 2 minutos, tomando de la mezcla reactante una alícuota para determinar la absorbancia a 450 nm. Los datos de absorbancia se transformaron en datos de concentración (expresada en
40 términos de porcentaje de complejo carotenoide remanente respecto al valor inicial). Para el cálculo de la constante cinética se utilizó el método integral. El orden de reacción que mejor se ajustaba a los datos experimentales es el de orden 1 obteniendo las siguientes constantes cinéticas para cada concentración de radical utilizada:

$$45 \quad [\text{AAPH}] = 125 \text{ mM}; K = 0,3277 \text{ min}^{-1}$$
$$[\text{AAPH}] = 50 \text{ mM}; K = 0,2712 \text{ min}^{-1}$$
$$[\text{AAPH}] = 10 \text{ mM}; K = 0,1212 \text{ min}^{-1}$$
$$50 \quad [\text{AAPH}] = 1 \text{ mM}; K = 0,0289 \text{ min}^{-1}$$

55 A partir de los valores de la constante cinética se pudo calcular el tiempo de vida media del complejo carotenoide para cada concentración de radical obteniendo los valores de 2,12 minutos, 2,56 minutos, 5,72 minutos, y 23,98 minutos, para las concentraciones de 125, 50, 10 y 1 mM, respectivamente.

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo o agregado molecular carotenoide **caracterizado** porque está constituido por una fracción monoéster de sacarosa asociada, no covalentemente, con una fracción o pigmento carotenoide.
2. Complejo carotenoide según la reivindicación 1 **caracterizado** porque presenta, preferentemente, una relación monoéster de sacarosa:pigmento carotenoide de 1:1 ó 2:1.
- 10 3. Complejo carotenoide según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el monoéster de sacarosa es palmitato de sacarosa.
4. Complejo carotenoide según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el carotenoide pertenece al siguiente grupo: β -caroteno, licopeno, zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina, capsantina y luteína.
- 15 5. Procedimiento de elaboración del complejo carotenoide según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque se basa en el uso de una enzima con actividad ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa, EC 2.4.1.19) y porque comprende las siguientes etapas:
- 20 i) mezcla en agua del extracto oleoso que contiene el carotenoide con un exceso de monoéster de sacarosa,
- ii) adición de una enzima con actividad ciclodextringlucanotransferasa (CGTasa) a la solución de i) permitiendo su acción a temperatura adecuada, preferentemente entre 60 y 90°C, y más preferentemente a 70°C, durante al menos 2 horas, preferentemente entre 2 y 24 horas, y
- 25 iii) eliminación del exceso de monoéster de sacarosa, preferentemente mediante centrifugación o filtrado.
6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque el carotenoide de i) se utiliza en forma pura o en forma de extracto oleoso y porque pertenece al siguiente grupo: extracto oleoso de β -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, cantaxantina, β -criptoxantina, capsantina y extracto oleoso de pimiento (*Capsicum annuum L.*) sometido previamente a desesterificación.
- 30 7. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque el monoéster de sacarosa de i) se utiliza en forma de un extracto vegetal, preferentemente, enriquecido en un monoéster de sacarosa o en forma pura.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el monoéster de sacarosa es un extracto de origen vegetal con palmitato de sacarosa.
9. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque la enzima ciclodextringlucanotransferasa (CG-Tasa) de ii) es de origen bacteriano, preferentemente una CGTasa de *Thermoanaerobacter* o de *Bacillus*.
- 40 10. Uso del complejo según las reivindicaciones 1 a la 4 en la elaboración de un aditivo alimentario o compuesto terapéutico al que aportan sus cualidades funcionales tanto tecnológicas como fisiológicas.
- 45 11. Uso según la reivindicación 10 **caracterizado** porque el alimento pertenece al siguiente grupo: zumos, bebidas y alimentos deshidratados.
- 50
- 55
- 60
- 65

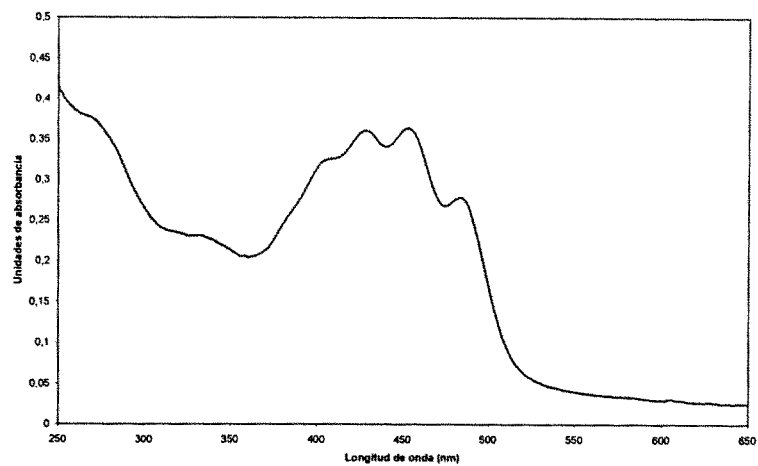


Figura 1

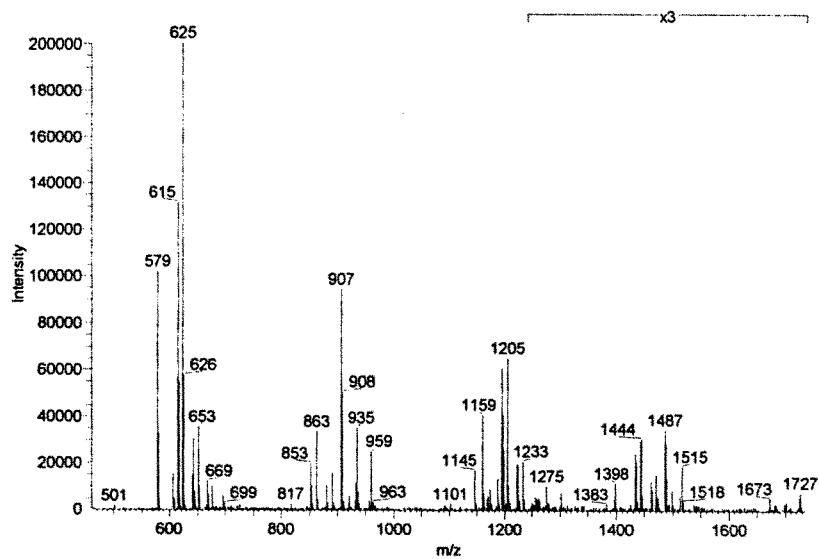


Figura 2

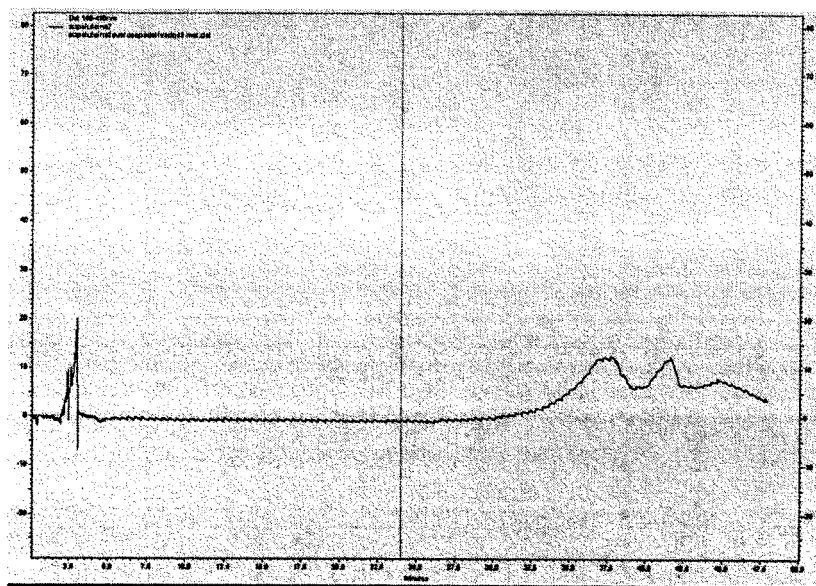


Figura 3

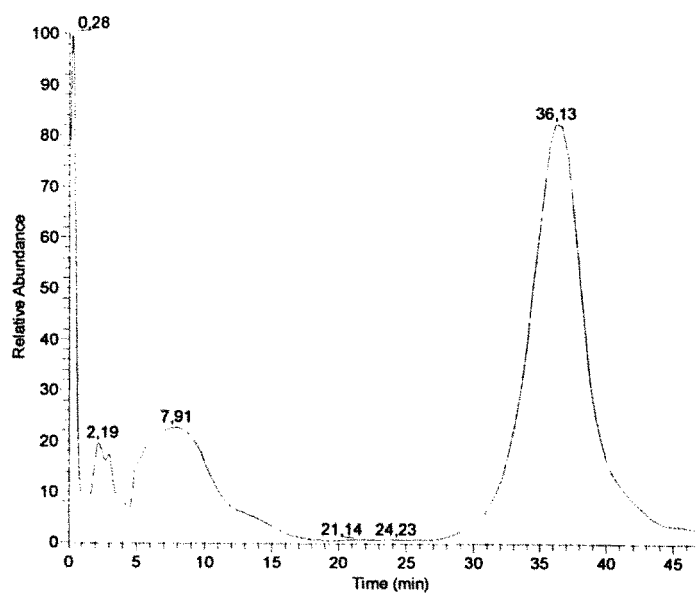


Figura 4

ES 2 317 786 B1

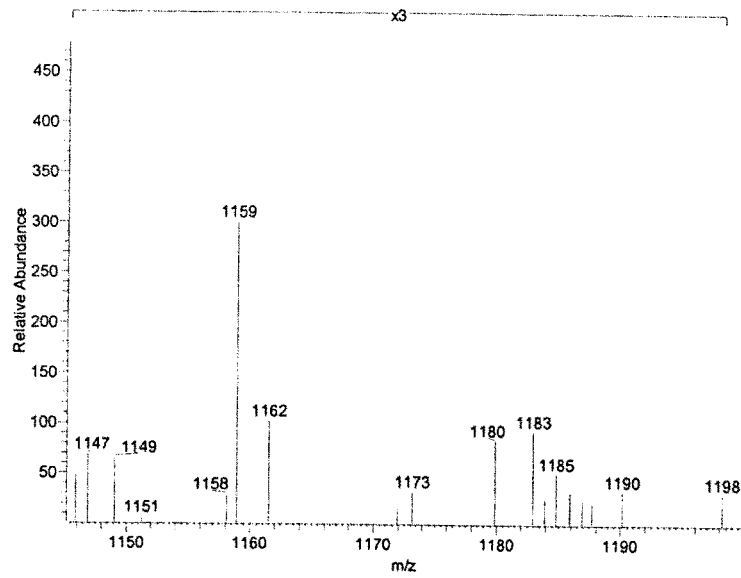


Figura 5a

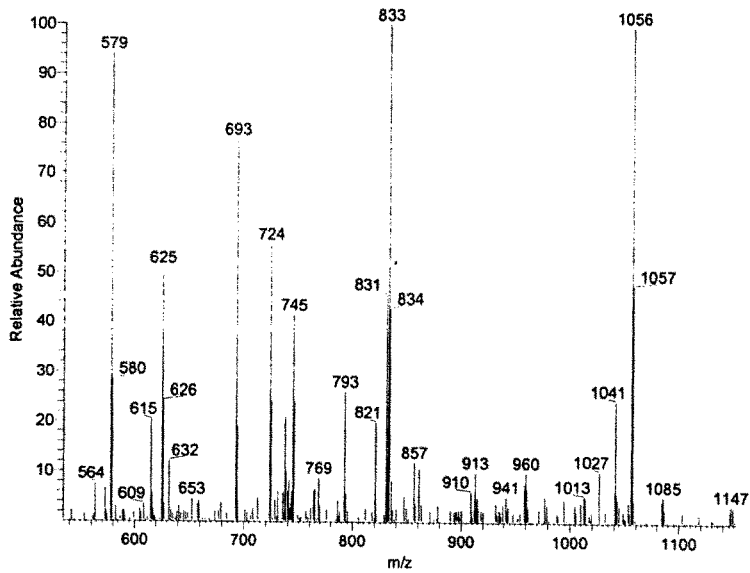


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 317 786

② Nº de solicitud: 200702147

③ Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A23L 1/275** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GB 918399 A (HOFFMANN LA ROCHE) 13.02.1963	1
Y	WO 9513047 A1 (SCHWARTZ JOEL L.) 18.05.1995	1-11
Y	JP 4153271 A (SUNTORY LTD.) 26.05.1992	1-11
A	WO 2007044659 A2 (PHARMANEX LLC.) 19.04.2007	1-11
A	US 2004109920 A1 (BIOACTIVES LLC.) 10.06.2004	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

10.03.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1