

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 906**

21 Número de solicitud: 201130105

51 Int. Cl.:
B01D 11/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **27.01.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
03.10.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
C/ EINSTEIN, 3
28049 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**Torres Olivares, Carlos F.;
Casado Bañares, Víctor y
Reglero Rada, Guillermo**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **FLUIDO SUPERCRÍTICO Y SU EMPLEO EN PROCEDIMIENTOS DE FRACCIONAMIENTO
SUPERCRÍTICO PARA LA PURIFICACIÓN DE LISOFOSFOLÍPIDOS.**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con un disolvente que comprende un fluido supercrítico y un co-disolvente, donde dicho co-disolvente comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico, así como el uso de dicho disolvente en un procedimiento de extracción de lisofosfolípidos a partir de una mezcla de lípidos con un alto porcentaje de lípidos neutros.

ES 2 387 906 A1

DESCRIPCION

Fluido supercrítico y su empleo en procedimientos de fraccionamiento supercrítico para la purificación de lisofosfolípidos

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se encuadra dentro de los procedimientos de purificación de fosfolípidos, en particular de lisofosfolípidos, a partir de mezclas que comprenden mezclas de fosfolípidos y lípidos neutros, mediante el empleo de fluidos supercríticos.

ANTECEDENTES

- 10 Los lisofosfolípidos (LPLs) han atraído recientemente la atención debido al descubrimiento de su importante actividad biológica además de su ya conocido papel en el metabolismo de fosfolípidos. Los lisofosfolípidos están implicados en muchos procesos fisiológicos y patológicos como la inflamación, reproducción, angiogénesis, carcinogénesis, aterosclerosis y regulación del sistema nervioso (Moolenaar, W.H. Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000, 905, 1–10). La elucidación del mecanismo implicado en los papeles enzimáticos, biológicos, celulares y de membrana pasa por la disponibilidad de fuentes diversas de estos compuestos. Una amplia variedad de rutas químicas y enzimáticas han sido descritas en la literatura (Paola D'Arrigo and Stefano Servi. Synthesis of Lysophospholipids, *Molecules* 2010, 15, 1354-1377). En la mayoría de los casos tras el proceso de síntesis se requiere una etapa de purificación que permita aislar el lisofosfolípido producido. Un método clásico para eliminar lípidos neutros de mezclas que contienen fosfolípidos es la precipitación con acetona (The Japan Chemical Society (ed.), "Shin Jikken Kagaku Koza (A New Series of Lectures on Experimental Chemistry) 20, Seibutsu-Kagaku (Biochemistry) (I)", pp. 418-419, 1978). Según este método los lípidos neutros son separados como compuestos solubles en acetona y los fosfolípidos quedan como compuestos insolubles. De este modo se encuentran disponibles lecitinas de 98 % de pureza en fosfolípidos. Sin embargo, este procedimiento en presencia de lisofosfolípidos, incluso repetido en varias ocasiones, no es capaz de reducir el contenido de lípidos neutros por debajo del 15 % (US 5,153,125). Otros métodos implican el fraccionamiento con disolventes y su combinación con columnas cromatográficas. Todos estos métodos son muy laboriosos e implican la utilización de disolventes que reduce su aplicabilidad en el campo alimentario.

- 30 En los últimos años, se ha prestado mucha atención a los fluidos supercríticos para una amplia gama de aplicaciones en la búsqueda de disolventes más respetuosos con el medio ambiente (Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. Ed. José L. Martínez. CRC Press. 2008). Entre estas aplicaciones, es posible citar la separación de lípidos neutros de fosfolípidos. No obstante, diversos estudios indican que, conforme aumenta el contenido en fosfolípidos, la extracción de lípidos neutros es cada vez más difícil. La situación resulta aún más compleja en presencia de lisofosfolípidos ya que se ha descrito que éstos pueden llegar a formar complejos iónicos con los ácidos grasos libres (Nisar A. Shaikh., Assesment of various techniques for the quantitative extraction of lysophospholipids from myocardial tissues, *Anal. Biochem.* 216(2):313-21, 1994).

- 40 Se ha observado que la adición de pequeños porcentajes de etanol al fluido supercrítico mejora sin embargo la extracción de los lípidos neutros en presencia de fosfolípidos (WO2007/123424 y Catchpole, O.J. et al., The extraction and fractionation of specialty lipids using near critical fluids, *J. of Supercritical Fluids* 2009, 47, 591–597). Sin embargo, dicha extracción no contempla la presencia de lisofosfolípidos en la mezcla cuya mayor polaridad, como se ha mencionado anteriormente, dificulta notablemente su purificación.

- 45 Por todo ello, se hace necesario el desarrollo de un procedimiento que permite la extracción de lisofosfolípidos a partir de mezclas con lípidos neutros, con al menos el mismo grado de pureza que el que se consigue con otras técnicas convencionales, pero minimizando el uso de disolventes orgánicos que permitan un uso más seguro del producto final.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 50 Los autores de la presente invención han encontrado que el empleo de un fluido supercrítico que contiene una disolución alcohólica de un ácido orgánico permite, no sólo una eficaz extracción de los lisofosfolípidos, sino reducir considerablemente el empleo de disolventes orgánicos con respecto a técnicas tradicionales del estado de la técnica como la precipitación en acetona o el fraccionamiento combinado con columnas cromatográficas citadas anteriormente.

- 55 Además, la presencia de un ácido orgánico en la disolución alcohólica adicionada al fluido supercrítico permite mejorar la separación entre los lisofosfolípidos y los lípidos neutros. Así, los ejemplos aportados en la presente solicitud han demostrado que, tras el procedimiento de extracción utilizando dicha mezcla de fluido supercrítico y solución alcohólica de ácido orgánico, se consiguen extraer lisofosfolípidos con un mayor grado de pureza que

cuando dicho ácido orgánico está ausente, incluso partiendo de mezclas en las cuales el porcentaje de fosfolípidos que comprenden los lisofosfolípidos es menor con respecto al contenido de lípidos neutros.

Así, en un primer aspecto la presente invención se dirige a un disolvente que comprende:

- un fluido supercrítico; y
- 5 - un co-disolvente que comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento (de aquí en adelante Procedimiento 1) para la separación de lisofosfolípidos a partir de una mezcla de lípidos que comprende:

- a) proporcionar una mezcla de lípidos que comprende lisofosfolípidos, fosfolípidos y lípidos neutros;
- b) proporcionar un disolvente que comprende:
 - 10 - un fluido supercrítico; y
 - un co-disolvente que comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico;
- c) poner en contacto la mezcla de lípidos y el disolvente;
- d) separar el disolvente que contiene los componentes solubles de los componentes insolubles.

15 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento (de aquí en adelante Procedimiento 2) para la separación de lisofosfolípidos a partir de una mezcla de lípidos que comprende:

- a) proporcionar una mezcla de lípidos que comprende lisofosfolípidos, fosfolípidos y lípidos neutros;
- b) proporcionar una disolución alcohólica que comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico;
- 20 c) adicionar la disolución alcohólica sobre la mezcla de lípidos;
- d) poner en contacto el producto obtenido tras la etapa c) con un fluido supercrítico;
- e) separar el disolvente que contiene los componentes solubles de los componentes insolubles.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 El disolvente objeto de la presente invención comprende un fluido supercrítico y un co-disolvente, donde dicho co-disolvente comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico.

Por fluido supercrítico se entiende cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico. Por encima, pero próximo a dicho punto, la sustancia se encuentra en estado fluido pero comparte las propiedades de un líquido y un gas. Así, el fluido tiene una densidad similar a la de un líquido, mientras que su viscosidad y difusividad son similares a las de un gas.

30 En una realización particular, el fluido supercrítico es CO₂ supercrítico.

Por su parte, el alcohol es un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono, tal como metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol o tert-butanol. En una realización preferente, el alcohol es etanol.

35 Como ácido orgánico se puede emplear cualquiera que permita su disolución en la solución alcohólica. En particular, se prefiere el uso de un ácido orgánico de entre 1 a 6 átomos de carbono tal como por ejemplo ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico o ácido cítrico. En una realización aún más preferente, el ácido orgánico es ácido fórmico.

El co-disolvente supone, por tanto, una disolución alcohólica en la cual el ácido orgánico se encuentra disuelto en el alcohol.

40 La proporción de ácido orgánico en la disolución alcohólica está comprendida entre el 1 y 20% en volumen con respecto al volumen total de dicha disolución, más preferentemente entre 5 y 15%, aún más preferentemente en torno al 10%.

La proporción de co-disolvente que se adiciona al fluido supercrítico puede oscilar entre el 1 y 10% en peso con respecto al peso del fluido supercrítico, más preferentemente entre 2 y 5%, aún más preferentemente en torno al 3%.

Preferentemente, el disolvente de la invención comprende CO₂ supercrítico y una disolución etanólica del ácido orgánico, donde la proporción de dicha disolución etanólica está comprendida entre el 1 y el 10% en peso con respecto al peso del CO₂.

5 El disolvente de la invención se puede preparar poniendo en contacto el fluido supercrítico con el co-disolvente en una cámara de mezcla siguiendo procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

Los procedimientos 1 y 2 para la extracción de lisofosfolípidos de la presente invención parten de una mezcla de lípidos que comprende lisofosfolípidos, fosfolípidos y lípidos neutros.

10 Por "lípidos neutros" se entienden aquellos lípidos apolares, sin carga, principalmente hidrofóbicos. Ejemplos de estos lípidos incluyen los ácidos grasos, los acilglicéridos como mono, di y triglicéridos, y los cédidos. En una realización preferente, dichos lípidos neutros son ácidos grasos, ésteres de los mismos como éster metílico y etílico, acilglicéridos o mezclas de los mismos.

15 El material de partida que conduce a la preparación de la mezcla de lípidos utilizada en el procedimiento de la invención puede ser cualquier fosfolípido o una mezcla de éste con acilglicéridos, ya sean mono, di y/o triglicéridos. En una realización particular, cuando se desea extraer lisofosfatidilcolina, dicho material de partida es fosfatidilcolina hidrogenada.

En una realización particular, el material de partida, ya sea un fosfolípido o una mezcla de éste con acilglicéridos, es sometido a un tratamiento de hidrólisis y/o transesterificación en presencia de enzimas acil hidrolasas, tal como por ejemplo fosfolipasa A2. Dicho proceso de hidrólisis conduce a la obtención de una mezcla de lisofosfolípidos, fosfolípidos y lípidos neutros.

20 Cuando el material de partida es un fosfolípido se obtienen mezclas de lisofosfolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos, ya sean éstos libres o en forma de sus ésteres metílico o etílico. Cuando el material de partida es una mezcla de fosfolípidos y lípidos neutros como mono, di y triglicéridos se obtienen mezclas de lisofosfolípidos, fosfolípidos, ácidos grasos ya sean éstos libres o en forma de sus ésteres metílico o etílico y mono, di y triglicéridos.

25 En una realización particular, la mezcla de lípidos a extraer contiene entre 30% y 60% en peso de fosfolípidos, de los cuales entre el 1 al 99% en peso son lisofosfolípidos, y entre 40% y 70% de ácidos grasos libres. Preferentemente, los fosfolípidos comprenden una proporción de lisofosfolípidos de más del 90% en peso.

Preferentemente, el fosfolípido es fosfatidilcolina y el lisofosfolípido es lisofosfatidilcolina.

30 En una realización preferente, la mezcla de lípidos utilizada en los procedimientos 1 y 2 de la invención se encuentra en forma seca. Para ello, tras el proceso de hidrólisis en presencia de acil hidrolasas comentado anteriormente, se puede llevar a cabo un procedimiento en el que el enzima y el medio de reacción se eliminan mediante sucesivas etapas de centrifugación y lavados, desecando finalmente el producto hasta que su contenido en agua es menor del 3%.

Procedimiento 1

35 En una realización particular, y siguiendo el procedimiento 1 de la invención, una vez obtenida la mezcla de lípidos a extraer que comprende fosfolípidos, lisofosfolípidos y lípidos neutros y obtenida según se ha descrito previamente, ésta se pone en contacto con el disolvente de la invención definido previamente.

40 Para ello, el disolvente, ubicado previamente en una cámara de mezcla donde se ponen en contacto el fluido supercrítico y el co-disolvente, es bombeado a una celda de extracción donde se encuentra la mezcla de lípidos a extraer.

De forma preferente, el fluido supercrítico es CO₂ y el co-disolvente una disolución etanólica de un ácido orgánico, preferentemente ácido fórmico.

En una realización particular, el disolvente es bombeado de forma continua a la celda de extracción. En otra forma de realización particular, el disolvente es bombeado de forma pulsada a la celda de extracción.

45 En otra forma de realización particular, la temperatura a la que se efectúa el contacto entre la mezcla de lípidos y el disolvente oscila entre 35 y 65°C.

En otra forma de realización particular, la presión a la que se efectúa el contacto entre la mezcla de lípidos y el disolvente oscila entre 100 y 350 bares.

50 Tras la puesta en contacto de la mezcla de lípidos con el disolvente, se obtiene un sólido que queda retenido en la celda de extracción y que contiene principalmente los fosfolípidos y los lisofosfolípidos de la mezcla inicial.

Asimismo, se obtiene un extracto que contiene el material más soluble en el disolvente, en particular, ácidos grasos o una mezcla de éstos con acilglicéridos.

Procedimiento 2

5 En una realización particular, y siguiendo el procedimiento 2 de la invención, sobre la mezcla de lípidos a extraer que comprende fosfolípidos, lisofosfolípidos y lípidos neutros y obtenida según se ha descrito previamente, se adiciona una disolución alcohólica que comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico.

En una realización preferente, el alcohol es etanol y el ácido orgánico es ácido fórmico.

10 En otra realización preferente, la proporción de ácido orgánico en la disolución alcohólica está comprendida entre el 1 y 20% en volumen con respecto al volumen total de dicha disolución, más preferentemente entre 5 y 15%, aún más preferentemente en torno al 10%.

La disolución alcohólica se prepara por simple disolución del ácido orgánico en el alcohol.

La adición de la disolución alcohólica sobre la mezcla de lípidos a extraer se puede realizar en la celda de extracción donde se vaya a efectuar la etapa de separación/extracción de la mezcla de lípidos.

15 Posteriormente, el producto obtenido tras adicionar la disolución alcohólica sobre la mezcla de lípidos se pone en contacto con un fluido supercrítico. De forma preferente, dicho fluido supercrítico es CO₂.

En una realización particular, el fluido supercrítico es bombeado de forma continua a la celda de extracción. En otra forma de realización particular, el fluido supercrítico es bombeado de forma pulsada a la celda de extracción.

20 En otra forma de realización particular, la temperatura a la que se efectúa el contacto entre la mezcla de lípidos y el fluido supercrítico oscila entre 35 y 65°C.

En otra forma de realización particular, la presión a la que se efectúa el contacto entre la mezcla de lípidos y el fluido supercrítico oscila entre 100 y 350 bares.

25 Tras la puesta en contacto de la mezcla de lípidos con el fluido supercrítico, se obtiene un sólido que queda retenido en la celda de extracción y que contiene principalmente los fosfolípidos y los lisofosfolípidos de la mezcla inicial. Asimismo, se obtiene un extracto que contiene el material más soluble en el disolvente, principalmente, ácidos grasos o una mezcla de éstos con acilglicéridos.

30 Con el fin de aislar el sólido del extracto obtenido según cualquiera de los procedimientos 1 y 2 de la invención, se puede llevar a cabo cualquier procedimiento de separación conocido por un experto en la materia. En una realización particular, para aislar el sólido del extracto se realiza una despresurización en cascada. El sólido obtenido en la primera despresurización no contiene cantidades significativas del disolvente empleado (fluido supercrítico y co-disolvente o disolución alcohólica) ya que este disolvente es muy soluble en las condiciones de presión y temperatura en las que se lleva a cabo esta despresurización y el disolvente condensa principalmente tras la segunda despresurización.

35 A continuación, se describen algunos ejemplos ilustrativos que ponen de manifiesto las características y ventajas de la invención, no obstante, no se deben interpretar como limitativos del objeto de la invención tal como está definido en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Extracción de lisofosfolípidos en presencia de ácido fórmico a partir de una mezcla que contiene 60% de lípidos neutros

40 10 gramos de una mezcla compuesta por un 40 % de fosfolípidos, de los cuales más del 95% es lisofosfatidilcolina y el resto fosfatidilcolina, y aproximadamente un 60 % de ácidos grasos libres fue extraída con 5 Kg. de CO₂ que contenía 3% de una disolución de ácido fórmico (4,76 % v/v) en etanol. El residuo no extraído por el CO₂ (4,8 gramos) contenía aproximadamente 80 % de fosfolípidos y 20 % de ácidos grasos libres. El extracto (5 gramos) estaba constituido únicamente por ácidos grasos libres.

45 Ejemplo 2: Extracción de lisofosfolípidos en presencia de ácido fórmico a partir de una mezcla que contiene 60% de lípidos neutros

50 10 gramos de una mezcla compuesta por un 40 % de fosfolípidos, de los cuales más del 95% es lisofosfatidilcolina y el resto fosfatidilcolina, y aproximadamente un 60 % de ácidos grasos libres fue extraída con 5 Kg. de CO₂ que contenía 3% de una disolución de ácido fórmico (9 % v/v) en etanol. El residuo no extraído por el CO₂ (4 gramos) contenía aproximadamente 84 % de fosfolípidos y 16 % de ácidos grasos libres. El extracto (5.8 gramos) estaba constituido únicamente por ácidos grasos libres.

Ejemplo comparativo: Extracción de lisofosfolípidos en ausencia de ácido orgánico a partir de una mezcla que contiene 47% de lípidos neutros

5 10 gramos de una mezcla compuesta por un 52 % de fosfolípidos, de los cuales más del 90% es lisofosfatidilcolina y el resto es fosfatidilcolina, y aproximadamente un 47 % de ácidos grasos libres fue extraída con 5 Kg. de CO₂ que contenía un 3% de etanol. El residuo no extraído por el CO₂ (7 gramos) contenía aproximadamente 70 % de fosfolípidos y 30 % de ácidos grasos libres. El extracto (3 gramos) estaba constituido únicamente por ácidos grasos libres.

REIVINDICACIONES

1. Un disolvente que comprende:
 - un fluido supercrítico; y
 - un co-disolvente que comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico.
- 5 2. Disolvente según la reivindicación 1, donde el fluido supercrítico es CO₂ supercrítico.
3. Disolvente según reivindicaciones 1 ó 2, donde el alcohol es etanol.
4. Disolvente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el ácido orgánico tiene de 1 a 6 átomos de carbono.
5. Disolvente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el ácido orgánico es ácido fórmico.
- 10 6. Disolvente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la proporción de co-disolvente que se adiciona al fluido supercrítico se encuentra entre el 1 y 10% en peso con respecto al peso del fluido supercrítico.
7. Disolvente según reivindicación 6, donde la proporción de co-disolvente que se adiciona al fluido supercrítico se encuentra entre el 2 y 5% en peso con respecto al peso del fluido supercrítico.
- 15 8. Disolvente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la proporción de ácido orgánico en el co-disolvente está comprendida entre el 1 y 20% en volumen con respecto al volumen total del co-disolvente.
9. Disolvente según reivindicación 8, donde la proporción de ácido orgánico en el co-disolvente está comprendida entre el 5 y 15% en volumen con respecto al volumen total del co-disolvente.
- 20 10. Disolvente según reivindicación 1, donde el fluido supercrítico es CO₂ supercrítico, el alcohol es etanol y la proporción del co-disolvente está comprendida entre el 1 y el 10% en peso con respecto al peso del CO₂.
11. Un procedimiento para la separación de lisofosfolípidos a partir de una mezcla de lípidos que comprende:
 - a) proporcionar una mezcla de lípidos que comprende lisofosfolípidos, fosfolípidos y lípidos neutros;
 - b) proporcionar un disolvente que comprende:
 - un fluido supercrítico; y
 - un co-disolvente que comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico;
 - c) poner en contacto la mezcla de lípidos y el disolvente; y
 - d) separar el disolvente que contiene los componentes solubles de los componentes insolubles.
- 25 12. Procedimiento según reivindicación 11, donde el fluido supercrítico es CO₂ supercrítico.
- 30 13. Procedimiento según reivindicaciones 11 ó 12, donde el co-disolvente es una disolución etanólica de un ácido orgánico.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde la temperatura a la que se efectúa el contacto entre la mezcla de lípidos y el disolvente oscila entre 35 y 65°C.
- 35 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, donde la presión a la que se efectúa el contacto entre la mezcla de lípidos y el disolvente oscila entre 100 y 350 bares.
16. Un procedimiento para la separación de lisofosfolípidos a partir de una mezcla de lípidos que comprende:
 - a) proporcionar una mezcla de lípidos que comprende lisofosfolípidos, fosfolípidos y lípidos neutros;
 - b) proporcionar una disolución alcohólica que comprende un alcohol de entre 1 a 4 átomos de carbono y un ácido orgánico;
 - 40 c) adicionar la disolución alcohólica sobre la mezcla de lípidos;
 - d) poner en contacto el producto obtenido tras la etapa c) con un fluido supercrítico;
 - e) separar el disolvente que contiene los componentes solubles de los componentes insolubles.

17. Procedimiento según reivindicación 16, donde el alcohol es etanol.
18. Procedimiento según reivindicaciones 16 ó 17, donde el ácido orgánico es ácido fórmico.
- 5 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde la proporción de ácido orgánico en la disolución alcohólica está comprendida entre el 1 y 20% en volumen con respecto al volumen total de dicha disolución.
20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el fluido supercrítico es CO₂ supercrítico.
- 10 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde la temperatura a la que se efectúa el contacto entre el producto obtenido tras la etapa c) del procedimiento y el fluido supercrítico oscila entre 35 y 65°C.
22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, donde la presión a la que se efectúa el contacto entre el producto obtenido tras la etapa c) del procedimiento y el fluido supercrítico oscila entre 100 y 350 bares.
- 15 23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 22, donde la mezcla de lípidos se encuentra en forma sólida.
24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 23, donde los lípidos neutros se seleccionan entre ácidos grasos, ésteres de los mismos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos y mezclas de los mismos.
- 20 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 24, donde la mezcla de lípidos contiene entre 30% y 60% en peso de fosfolípidos, de los cuales entre el 1 y el 99% en peso son lisofosfolípidos, y entre 40% y 70% de ácidos grasos libres.
26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 25, donde la mezcla de lípidos contiene entre 30% y 60% en peso de fosfolípidos, de los cuales más del 90% en peso son lisofosfolípidos, y entre 40% y 70% de ácidos grasos libres
- 25 27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 26, donde el fosfolípido es fosfatidilcolina y el lisofosfolípido es lisofosfatidilcolina.
28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 27, donde la separación del disolvente que contiene los componentes solubles de los componentes insolubles se realiza mediante despresurización en cascada.
- 30



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130105

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.01.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **B01D11/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2008045516 A1 (QLT USA, INC.) 17.04.2008, página 14, líneas 11-29; página 20, líneas 1-11; reivindicación 13.	1-7
X	KR 200600210046 A (KOREAN COSMETICS CO TLD) 07.03.2006, resumen.	1-4
X	KR 20090025689 A (UNIV PUKYONG NAT) 11.03.2009, resumen.	1-5
X	WO 2009052924 A1 (DSM IP ASSETS B.V.) 30.04.2009, página 4, líneas 32-36; página 5, líneas 1-14,19-29.	1-4
A	TEBERIKLER L., KOSEOGLU S. y AKGERMAN A. "Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture." Journal of American Oil Chemists' Society (2001) Vol. 78, páginas 115-119. Todo el documento.	1-28
A	MONTANARI L., KING J. W., LIST G. R., y RENNICK K. A. "Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents." Journal of Food Science (1996), Vol. 61, páginas 1230-1233. Todo el documento.	1-28
A	XUELI CAO, YOICHIRO ITO. "Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography." Journal of Chromatography (2003) Vol. 1021, páginas 117-124. Todo el documento.	1-28

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
19.09.2012

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/5

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

B01D

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 8-28	SI
	Reivindicaciones 1-7	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 8-28	SI
	Reivindicaciones 1-7	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2008045516 A1 (QLT USA, INC.)	17.04.2008
D02	KR 200600210046 A (KOREAN COSMETICS CO TLD)	07.03.2006
D03	KR 20090025689 A (UNIV PUKYONG NAT)	11.03.2009
D04	WO 2009052924 A1 (DSM IP ASSETS B.V.)	30.04.2009
D05	TEBERIKLER L., KOSEOGLU S. y AKGERMAN A. "Selective extraction of phosphatidylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture." Journal of American Oil Chemists' Society (2001) Vol. 78, páginas 115-119. Todo el documento.	2001
D06	MONTANARI L., KING J. W., LIST G. R., y RENNICK K. A. "Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents." Journal of Food Science (1996), Vol. 61, páginas 1230-1233. Todo el documento.	1996
D07	XUELI CAO, YOICHIRO ITO. "Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography." Journal of Chromatography (2003) Vol. 1021, páginas 117-124. Todo el documento.	2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un disolvente que comprende un fluido supercrítico y un co-disolvente que comprende un alcohol de entre 1-4 átomos de carbono y un ácido orgánico (reivindicaciones 1-10).

Le presente solicitud de invención también consiste en unos procedimientos de separación de lisofosfolípidos utilizando dicho disolvente (reivindicaciones 11-28).

El documento D01 consiste en unos métodos de extracción de un poliéster biodegradable mediante el uso de un fluido supercrítico.

EL documento D02 consiste una composición cosmética para aliviar la irritación de la piel que comprende extracto de soja negra extraído mediante fluido supercrítico.

El documento D03 consiste en un método para la eliminación de material fotorresistente con la implantación de iones utilizado en la fabricación de semiconductores.

El documento D04 consiste en un proceso de obtención de carnosol a partir del ácido carnósico.

El documento D05 consiste en un método para la extracción selectiva de fosfatidilcolina a partir de la lecitina de soja utilizando dióxido de carbono supercrítico y etanol (ver todo el documento).

El documento D06 consiste en un método para la extracción de aceite y fosfolípidos de los copos de soja mediante dióxido de carbono supercrítico y etanol (ver todo el documento).

El documento D07 consiste en un estudio del efecto de varios parámetros como la presión, la temperatura y el tamaño de la partícula de la muestra, sobre la producción y composición de aceite de semilla de uva mediante su extracción con fluido supercrítico (ver todo el documento).

El objeto de las reivindicaciones 1-28 difiere de los documentos D05-D07 en que el co-disolvente no está comprendido por un ácido orgánico junto con el etanol.

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

1.1.- Reivindicaciones 1-7.

El documento D01 divulga un disolvente que comprende un fluido supercrítico como el dióxido de carbono supercrítico, y un co-disolvente que puede estar formado por etanol y ácido fórmico. Dicho co-disolvente se encuentra en el 5% en peso con respecto al peso del fluido supercrítico (ver página 14, líneas 11-29, página 20, líneas 1-11 y reivindicación 13).

El documento D02 divulga un disolvente que comprende CO₂ supercrítico, etanol y un ácido orgánico de entre 1 a 6 átomos de carbono (ver resumen).

El documento D03 divulga un disolvente que comprende CO₂ supercrítico, etanol como co-disolvente y ácido fórmico como aditivo (ver resumen).

El documento D04 divulga un disolvente que comprende CO₂ supercrítico, etanol y un ácido orgánico de entre 1 a 6 átomos de carbono (ver página 4, líneas 32-36 y página 5, líneas 1-14 y 19-29).

Las características de las reivindicaciones 1-7 ya son conocidas de los documentos D01-D04. Por lo tanto esas reivindicaciones no son nuevas ni implican actividad inventiva a la vista de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.

1.2.- Reivindicaciones 8-28.

Ninguno de los documentos citados en el Informe del Estado de la Técnica, o cualquier combinación relevante de ellos revela un procedimiento para la separación de lisofosfolípidos con las etapas reivindicadas en las reivindicaciones 8-28.

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 8-28 son nuevas y no implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.