

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 452**

51 Int. Cl.:
A61K 8/99 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C11B 5/00 (2006.01)
A61K 36/02 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06706424 .6**
96 Fecha de presentación: **26.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1838171**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **Obtención y aplicación de un extracto de Cryptocodium sp. eficaz como antioxidante**

30 Prioridad:
26.01.2005 DE 102005003624

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.10.2012

73 Titular/es:
Lonza Ltd
Münchensteinerstrasse 38
4002 Basel , CH

72 Inventor/es:
FABRITIUS, Dirk y
HOHMANN, Doreen

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 388 452 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).

DESCRIPCION

Obtención y aplicación de un extracto de *Crypthecodinium* sp. eficaz como antioxidante

La presente invención se refiere a un extracto de *Crypthecodinium* sp., a un procedimiento para su obtención, así como a su empleo, en especial para la estabilización antioxidación de composiciones de ácidos grasos, que contienen uno o varios ácidos grasos altamente insaturados, de cadena larga, y/o uno o varios ésteres de ácidos grasos altamente insaturados, de cadena larga.

Los ácidos grasos altamente insaturados, de cadena larga (Polyunsaturated Fatty Acids; PUFAs), constituyen ácidos grasos esenciales del metabolismo humano. PUFAs se pueden subdividir en dos grandes grupos. Además del grupo de ω -6 PUFAs, que se formulan partiendo de ácido linoleico, existe el grupo de ω -3 PUFAs, que se sintetizan partiendo de ácido α -linolénico.

PUFAs son componentes importantes de membranas celulares, de la retina y de la córnea, y precursores para hormonas importantes, a modo de ejemplo para las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos.

Además de la función como componente, en el transcurso de los últimos años se ha mostrado en medida creciente que PUFAs tienen directamente múltiples efectos positivos sobre el organismo humano, o bien enfermedades.

Una pluralidad de estudios clínicos han mostrado que PUFAs pueden ofrecer una contribución importante para la curación o mitigación, por ejemplo en el caso de cáncer, artritis reumatoide, alta presión sanguínea y neurodermitis, y muchas otras afecciones. En este caso, con frecuencia es especialmente ventajoso el empleo de ácido docosahexenoico (DHA; ácido todo-cis 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico) y sus derivados, en especial de ésteres de DHA, ya que éstos (en especial los ésteres etílicos y los triglicéridos) tienden a tener un sabor agradable, y se absorben fácilmente por el sistema digestivo. Estos conocimientos eran causantes de que instituciones y autoridades internacionales hayan dado recomendaciones que regulan la cantidad de ingesta diaria de PUFAs.

PUFAs no se pueden sintetizar por el hombre de-novo, ya que les faltan los sistemas enzimáticos que pueden introducir un doble enlace en la cadena de carbono en posiciones $> C9$ (Δ 12-desaturasa). Sólo mediante la alimentación de los denominados ácidos grasos precursores (precursores, por ejemplo ácido α -linolénico) a través de la alimentación, el hombre es capaz de sintetizar ácidos grasos altamente insaturados. No obstante, se cuestiona si esta cantidad es suficiente para cubrir la demanda de ácidos grasos altamente insaturados.

La mayor parte de ácidos grasos esenciales se absorbe a través de la alimentación. En especial aceites vegetales están enriquecidos con ácidos grasos ω -6, (a modo de ejemplo, aceite de onagra vespertina contiene ácido γ -linolénico (GLA)), pero sólo hasta una longitud de cadena de C18, y aceites de pescado, o bien aceites de microorganismos con ácidos grasos ω -3 (por ejemplo aceite de salmón contiene ácido eicosapentenoico (EPA) y ácido docosahexenoico (DHA; ácido todo-cis 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico)). En principio, aceites de pescado y aceites de microorganismos constituyen las únicas fuentes comerciales de ácidos grasos altamente insaturados. No obstante, en general, el contenido en PUFAs deseados es demasiado reducido, y éstos se presentan en una mezcla, pudiendo estar igualmente contenidos PUFAs de acción antagonista. Para ingerir la dosis de PUFAs diaria recomendada se debe tomar una cantidad elevada de aceite. En especial, esto se puede aplicar a aquellos pacientes que deben tomar dosis elevadas de PUFAs (a modo de ejemplo en el caso de fibrosis cística). Para conseguir una acción lo más selectiva posible de PUFAs aislados, se deben emplear PUFAs enriquecidos, o bien altamente puros. Por lo tanto, en el estado de la técnica existe una demanda elevada de PUFAs altamente puros.

Se emplearon numerosos procedimientos aislados o en combinación, para aislar (o al menos concentrar) y recuperar determinados ácidos grasos y sus derivados a partir de una pluralidad de fuentes presentes en la naturaleza. Estos procedimientos incluyen la cristalización fraccionada a bajas temperaturas, la destilación molecular, la cristalización de aductos de urea, la extracción con disoluciones de sales metálicas, el fraccionado de fluido supercrítico en columnas en contracorriente y procedimientos de HPLC.

Debido a su sensibilidad a la oxidación, PUFAs se deben estabilizar por regla general mediante adición de antioxidantes apropiados. Con ese fin se emplean comercialmente, sobre todo, tocoferoles naturales, en especial mezclas de α -, β -, γ - y δ -tocoferol extraídas a partir de aceite de soja, y/o tocotrienoles. Por lo demás es sabido que tales compuestos, como por ejemplo palmitato de ascorbilo, pueden ejercer acción sinérgica. Por lo tanto, se emplean adicionalmente a tocoferol.

No obstante, la acción de antioxidantes naturales no aumenta ilimitadamente con concentración creciente. A modo de ejemplo, en el caso de α -tocoferol, la actividad se invierte ya con 100 ppm, y no se produce una acción pro-oxidativa. Esto significa que una dosificación excesiva puede ejercer también un efecto negativo.

Alternativamente, el documento WO03092628 propone el empleo de un aceite elaborado cuidadosamente. En este caso, la elaboración se efectuará de modo que en primer lugar se hace reaccionar una biomasa que contiene ácidos grasos poliinsaturados con un enzima, y a continuación se aísla el lípido. A pesar de que el aceite obtenible de este modo no se oxida aparentemente en tal grado en primer lugar, éste presenta la sensibilidad a la oxidación característica para ácidos grasos poliinsaturados.

La WO 00 54575 describe composiciones de ácido graso que se estabilizan mediante adición de fosfolípidos.

Por lo tanto, considerando este estado de la técnica era tarea de la presente invención indicar posibilidades para la estabilización antioxidativa mejorada de composiciones de ácido graso. En este caso, el aumento de la acción antioxidativa se conseguirá en lo posible sin adición de sustancias nocivas para la salud, para posibilitar aplicaciones de la composición de ácido graso en el sector de productos alimenticios sin reparos.

Otra tarea de la presente invención consistía en la indicación de un procedimiento para la obtención de la composición de ácido graso según la invención, que permite su obtención del modo más sencillo posible, a escala industrial y económicamente.

Además se indicarán campos especialmente ventajosos de aplicación de la composición de ácidos grasos según la invención. Estos, así como otras tareas, que no se citan expresamente, pero se pueden derivar naturalmente del contexto aquí discutido, o resultan inevitablemente del mismo, se solucionan mediante un extracto eficaz como antioxidante procedente de *Crypthecodinium* sp. Se describen derivaciones convenientes del extracto según la invención en las sub-reivindicaciones referidas a la reivindicación 1. Las reivindicaciones 11 a 19 representan composiciones de ácidos grasos estabilizadas antioxidación bajo protección. La reivindicación de procedimiento protege un modo de obtención especialmente apropiado de la composición de ácido graso según la invención, y las reivindicaciones de empleo describen campos de aplicación especialmente ventajosos de la composición de ácido graso según la invención.

Poniéndose a disposición un extracto eficaz como antioxidante a partir de *Crypthecodinium* sp., se consigue, de modo no previsible sin más, hacer accesible un extracto con acción antioxidativa especialmente elevada, que es apropiado en especial para la estabilización antioxidativa de composiciones de ácido graso, sobre todo de aquellas composiciones de ácido graso que contienen al menos un ácido graso insaturado y/o al menos un éster de ácido graso insaturado. Según la invención, en este caso se consigue el aumento de la acción antioxidativa sin adición de sustancias nocivas para la salud, es decir, es posible un empleo sin reparos de la composición de ácidos grasos según la invención en el sector de productos alimenticios. De este modo se emplea aceite de *Crypthecodinium* cohnii en la alimentación de lactantes, y en los USA se clasifica como GRAS ("Generally regarded as safe").

La composición de ácido graso según la invención se puede obtener de modo sencillo, a escala industrial y económicamente.

Según la presente invención, la composición de ácido graso contiene al menos un extracto eficaz como antioxidante a partir de *Crypthecodinium* sp., preferentemente a partir de *Crypthecodinium* cohnii. El concepto "composición de ácido graso" comprende en este contexto tanto composiciones que contienen ácidos grasos libres, como también composiciones que contienen derivados de ácidos grasos, preferentemente ésteres de ácidos grasos, en especial triglicéridos de ácidos grasos, pudiendo ser en principio iguales o diferentes los restos ácido graso.

Según la invención, ácidos grasos designan ácidos carboxílicos alifáticos que pueden ser saturados o mono- o poliinsaturados, y presentan preferentemente 6 a 30 átomos de carbono.

Los extractos obtenibles a partir de *Crypthecodinium* sp. son conocidos en sí. Según la invención se pueden emplear tanto extractos de cepas tipo salvaje de *Crypthecodinium* sp., como también extractos de cepas de *Crypthecodinium* sp. mutadas o recombinadas.

En el presente contexto, el concepto "extracto de *Crypthecodinium* sp." comprende todas las composiciones que se pueden obtener mediante extracción de una biomasa, preferentemente de un aceite, de *Crypthecodinium* sp. con un disolvente, preferentemente con un disolvente orgánico y/o supercrítico, en especial con un disolvente orgánico. El empleo de mezclas de disolventes es igualmente posible.

Según la invención, el extracto presenta una eficacia antioxidativa, que es preferentemente mayor que la de la biomasa a partir de la cual se obtiene el extracto: por lo tanto, éste presenta preferentemente un valor de peróxido que es menor que el valor de peróxido de la biomasa empleada preferentemente, de modo preferente recién aislada, a partir de la cual se obtiene el extracto, y asciende preferentemente como máximo a un 50,0 %, preferentemente como máximo un 25,0 %, convenientemente como máximo un 10,0 %, en especial como máximo un 1,0 % del valor de peróxido de la biomasa, a partir de la cual se obtiene el extracto. En este caso, el valor de peróxido se determina

preferentemente según AOCS Official Method Cd-3d 63 (American Oil Chemists Society), convenientemente tras almacenaje al descubierto durante 2 semanas.

5 La capacidad antioxidativa del extracto según la invención es preferentemente mayor que 15000 equivalentes de Trolox, preferentemente mayor que 20000 equivalentes de Trolox, convenientemente mayor que 25000 equivalentes de Trolox, de modo especialmente preferente mayor que 30000 equivalentes de Trolox, y en especial mayor que 35000 equivalentes de Trolox (µg/ml). Trolox® es el nombre comercial de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico empleado habitualmente.

Según la invención, el concepto "biomasa de un organismo" comprende tanto células enteras del organismo, como también componentes celulares aislados del organismo.

10 El extracto de *Cryptocodinium* sp. se obtiene convenientemente cultivándose el microorganismo, cosechándose la biomasa a partir del cultivo, disgregándose y aislándose el extracto.

15 Para el aislamiento del extracto se emplean preferentemente procedimientos de extracción con disolventes orgánicos, en especial hexano, o con líquidos supercríticos. En este caso se emplean de modo especialmente preferente procedimientos de extracción con disolventes orgánicos. El extracto se extrae convenientemente a partir de la biomasa mediante percolado de la biomasa desecada con hexano. Tales extracciones con disolventes orgánicos se describen, entre otras, en la WO9737032, en la WO9743362 y la EP 5154460. También se encuentra una descripción detallada en Journal of Dispersion Science and Technology, 10, 561-579, 1989 "Biotechnological Processes for the Production of PUFAs".

20 Alternativamente, la extracción se puede efectuar también sin disolvente. En la EP-A-1178118 se describe un procedimiento especialmente conveniente en este contexto. En este procedimiento se evita un disolvente, obteniéndose una suspensión acuosa de biomasa y separándose la fase oleaginosa mediante centrifugado de la fase acuosa.

25 Según una variante especialmente preferente de la presente invención, la obtención del extracto se efectúa mediante se efectúa mediante prensado mecánico puro de una biomasa a partir de *Cryptocodinium* sp. y subsiguiente extracción con al menos un disolvente orgánico o al menos un disolvente supercrítico, preferentemente con un disolvente orgánico, en especial con hexano.

Según otra variante especialmente preferente de la presente invención, la obtención del extracto se efectúa mediante destilación.

30 En el ámbito de la presente invención se ha mostrado también especialmente ventajoso transesterificar la biomasa, preferentemente con un alcohol alifático con 1 a 12 átomos de carbono, preferentemente con 1 a 6 átomos de carbono, en especial con 1 a 4 átomos de carbono. En este caso ha dado buen resultado muy especialmente el empleo de metanol y etanol, en especial de etanol. El transesterificado se efectúa preferentemente bajo catálisis ácida, en especial bajo empleo de ácido sulfúrico y/o ácido clorhídrico. Según otra variante especialmente preferente, el transesterificado se consigue por vía enzimática.

35 La biomasa transesterificada se extrae a continuación preferentemente con al menos un disolvente orgánico o supercrítico, preferentemente con un disolvente orgánico, en especial con hexano. La proporción del volumen total de disolvente respecto al volumen de masa de reacción (inclusive el agua añadida) se puede variar también en un amplio intervalo, y es 1 : 3 a 4 : 3 de modo especialmente preferente. Según una forma de ejecución especialmente preferente, la mezcla se extrae con varias partes de disolvente, que se combinan al final.

40 En el ámbito de esta forma de ejecución se emplea preferentemente un extracto de hexano de una biomasa de *Cryptocodinium* sp. como biomasa a transesterificar, que se transesterifica entonces como se describe anteriormente. Este proceso sirve para la concentración y purificación del extracto eficaz como antioxidante. El extracto concentrado y purificado de este modo presenta convenientemente, referido a su peso total, un contenido en ácidos grasos con 6 a 30 átomos de carbono, y en ésteres de ácidos grasos, que comprenden restos alquilo de ácido graso con 6 a 30 átomos de carbono, de menos de un 20,0 % en peso, preferentemente de menos de un 10,0 % en peso, en especial de menos de un 5,0 % en peso.

La composición del extracto se puede variar en un amplio intervalo. En el ámbito de una primera forma especialmente preferente de ejecución de la presente invención, el extracto de *Cryptocodinium* sp. es obtenible

i) saponificándose una biomasa de *Cryptocodinium* sp., y

50 ii) extrayéndose la biomasa saponificada con un disolvente, que presenta una solubilidad en agua menor que 0,1 g de disolvente por g de agua a 25°C.

En este caso se procede preferentemente según el método DGF F-II 1 (75).

El saponificado de la biomasa se puede efectuar de modo conocido en sí. En este caso ha dado buen resultado especialmente la reacción de la biomasa con al menos un hidróxido metálico alcalino, preferentemente con NaOH y/o KOH, en especial con KOH, en disolución alcohólica, preferentemente en disolución metanólica o etanólica. Temperaturas de reacción especialmente apropiadas se sitúan en el intervalo de 25 a 100°C.

La extracción de la mezcla de productos saponificada puede variar en un amplio intervalo. Según una variante preferente se añade agua a la mezcla, y se extrae con un disolvente, que presenta una solubilidad en agua menor que 0,1 g de disolvente por g de agua a 25°C. La proporción del volumen total de disolvente respecto al volumen de masa de reacción (inclusive el agua añadida) se puede variar también en un amplio intervalo, y de modo especialmente preferente es 1 : 3 a 4 : 3. Según una forma de ejecución especialmente preferente, la mezcla se extrae con varias partes de disolvente, que se combinan al final. Disolventes especialmente apropiados según la invención incluyen los disolventes orgánicos diclorometano, dietiléter, metiletilcetona, acetato de etilo, éter de petróleo, pentano y hexano, así como los disolventes supercríticos propano, butano y dióxido de carbono, siendo preferentes en la mayor parte de los casos los disolventes orgánicos, sobre todo dietiléter y hexano, en especial dietiléter.

La eliminación de agua remanente a partir de la capa de disolvente de extracción se puede conseguir, a modo de ejemplo, mediante lavado de la capa con una salmuera (es decir, una disolución salina saturada), mediante secado con un tamiz molecular y/o mediante secado con una sal anhidra (por ejemplo sulfato sódico o sulfato de magnesio).

Tras la extracción se concentra preferentemente el extracto, de modo conveniente evaporándose parcial o completamente el disolvente.

En el ámbito de otra forma especialmente preferente de ejecución de la presente invención, el extracto de *Crypthecodinium* sp. es obtenible mediante extracción de una biomasa de *Crypthecodinium* sp. con un alcohol con 1 a 12, preferentemente 1 a 6, en especial 1 a 4 átomos de carbono y/o con una cetona con 3 a 6, preferentemente 3 o 4 átomos de carbono. En este caso, la extracción con un alcohol es preferente frente a la extracción con una cetona. Alcoholes muy especialmente apropiados para los presentes fines son, en cada caso por separado o en mezcla, metanol y etanol. Cetonas especialmente apropiadas comprenden acetona y/o metiletilcetona, en especial acetona.

En el ámbito de esta forma de ejecución se emplea preferentemente un extracto de hexano de una biomasa de *Crypthecodinium* sp. como biomasa a extraer, que se extrae con un alcohol y/o cetona. Este proceso sirve para la concentración y purificación del extracto eficaz como antioxidante. El extracto concentrado y purificado de este modo presenta convenientemente, referido a su peso total, un contenido en ácidos grasos con 6 a 30 átomos de carbono y ésteres de ácido graso, que comprenden restos ácido graso con 6 a 30 átomos de carbono, de menos de un 20,0 % en peso, preferentemente de menos de un 10,0 % en peso, en especial de menos de un 5,0 % en peso.

La proporción de volumen total de alcohol o cetona respecto al volumen de biomasa se puede variar en este caso en un amplio intervalo, y asciende de modo especialmente preferente de 3 : 1 a 3 : 4. Según una forma de ejecución especialmente preferente, la mezcla se extrae con varias partes de alcohol o cetona, que se combinan al final.

Tras la extracción, el extracto se concentra preferentemente, de modo conveniente evaporándose parcial o completamente el disolvente.

El extracto obtenible de este modo se extrae preferentemente a su vez con una cetona con 3 a 6 átomos de carbono, preferentemente con acetona y/o metiletilcetona, en especial con acetona. La proporción del volumen total de cetona respecto al volumen del primer extracto se puede variar en este caso en un amplio intervalo, y asciende de modo especialmente preferente de 3 : 1 a 3 : 4. Según una forma de ejecución especialmente preferente, el primer extracto se extrae con varias partes de cetona, que se combinan al final. Tras la extracción, el segundo extracto resultante se concentra preferentemente, de modo conveniente evaporándose parcial o completamente el disolvente.

En el ámbito de la presente invención, la composición de ácido graso contiene además componentes de una biomasa distinta de *Crypthecodinium*, preferentemente una biomasa de *Thraustochytriales*, en especial de una biomasa de *Ulkenia* sp. Biomazas distintas de *Crypthecodinium* sp. son igualmente conocidas en sí. Según la invención se pueden emplear tanto biomazas de cepas de tipo salvaje, como también biomazas de cepas mutadas o recombinantes, que generan de manera eficiente DHA (ácido todo-cis 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico) y/o DPA (ácido todo-cis 4,7,10,13,16-docosapentenoico). Tales cepas mutadas o recombinantes incluyen microorganismos que, en comparación con el porcentaje de la cepa de tipo salvaje original, bajo empleo del mismo sustrato, contienen un porcentaje más elevado de DHA y/o DPA en grasas, y/o, en comparación con la cantidad obtenida

mediante la cepa de tipo salvaje original, bajo empleo del mismo sustrato, contienen una cantidad total de lípidos más elevada.

5 Según una forma especialmente preferente de ejecución de la presente invención, la composición de ácido graso según la invención contiene un extracto de biomasa distinta de *Cryptocodinium* sp. En este caso, el extracto se obtiene convenientemente cultivándose el respectivo microorganismo, cosechándose la biomasa a partir del cultivo, disgregándose y aislándose el extracto. En la WO 03/033631 A1, a cuya manifestación se hace referencia explícitamente en el presente caso, se describe un procedimiento muy especialmente conveniente en este contexto.

10 Para el aislamiento del extracto se emplean preferentemente procedimientos de extracción con disolventes orgánicos, en especial hexano, o con líquidos supercríticos. Convenientemente se extrae el extracto a partir de la biomasa mediante percolado de la biomasa desecada con hexano. Tales extracciones con disolventes orgánicos se describen, entre otras, en la WO9737032, en la WO9743362 y la EP 5154460. También se encuentra una descripción detallada en Journal of Dispersion Science and Technology, 10, 561-579, 1989 "Biotechnological Processes for the Production of PUFAs".

15 Alternativamente, la extracción se puede efectuar también sin disolvente. En la EP-A-1178118 se describe un procedimiento especialmente conveniente en este contexto. En este procedimiento se evita un disolvente, obteniéndose una suspensión acuosa de biomasa y separándose la fase oleaginosa mediante centrifugado de la fase acuosa.

20 Según una variante especialmente preferente de la presente invención, la obtención del extracto se efectúa mediante se efectúa mediante prensado mecánico puro de una biomasa a partir de *Cryptocodinium* sp. y subsiguiente extracción con al menos un disolvente orgánico o supercrítico, preferentemente con al menos un disolvente orgánico, en especial con hexano.

25 En el ámbito de la presente invención se ha mostrado muy especialmente ventajoso transesterificar la biomasa, preferentemente con un alcohol alifático con 1 a 12 átomos de carbono, preferentemente con 1 a 6 átomos de carbono, en especial con 1 a 4 átomos de carbono. En este caso ha dado buen resultado especialmente el empleo de metanol y etanol, en especial de etanol. El transesterificado se efectúa preferentemente bajo catálisis ácida, en especial bajo empleo de ácido sulfúrico y/o ácido clorhídrico. La biomasa transesterificada se extrae a continuación, preferentemente con un disolvente orgánico, en especial con hexano. La proporción del volumen total de disolvente respecto al volumen de la masa de reacción (inclusive el agua añadida), se puede variar también en un amplio intervalo, y asciende de modo especialmente preferente de 1 : 3 a 4 : 3. Según una forma de ejecución especialmente preferente, la mezcla se extrae con varias partes de disolvente, que se combinan al final.

30 La composición de la biomasa puede variar en un amplio intervalo. La biomasa distinta de *Cryptocodinium* sp contiene al menos un ácido graso insaturado y/o al menos un éster de ácido graso, convenientemente un éster alquílico de ácido graso, preferentemente un glicérido, en especial un triglicérido, que comprende al menos un resto ácido graso poliinsaturado, que presenta preferentemente 6 a 30 átomos de carbono. Según una forma de ejecución especialmente preferente, al menos un 10 %, de modo especialmente preferente al menos un 25 %, y en especial al menos un 30 % de ácidos grasos y/o de restos ácido graso en la biomasa, es DHA, o bien restos DHA.

Un "glicérido", como la expresión que se emplea en este caso, es un éster de glicerina y al menos un ácido graso, esterificándose uno a tres grupos hidroxilo de glicerina con uno o varios restos ácido graso. Si se presentan varios restos ácido graso, los restos ácido graso pueden ser iguales o diferentes.

40 En muchos materiales de partida apropiados, la fracción principal de glicéridos son triglicéridos, es decir, ésteres de tres restos ácido graso y glicerina. En este caso, cada resto de ácido graso puede ser saturado (es decir, todos los enlaces entre los átomos de carbono son enlaces sencillos) o insaturados (es decir, existe al menos un doble o triple enlace carbono-carbono). El tipo de restos ácido graso insaturados se caracterizan ocasionalmente con una ω en este caso. Este número indica la posición del primer doble enlace, si se cuenta partiendo del grupo metilo terminal del ácido graso o del resto ácido graso.

45 Las fracciones relativas de componentes aislados de la composición de ácido graso según la invención se pueden seleccionar libremente en principio, y ajustar a la respectiva aplicación. No obstante, en el ámbito de la presente invención se ha mostrado especialmente conveniente que la composición de ácido graso, referido respectivamente a su peso total, contenga un 0,1 a un 50,0 % en peso, preferentemente un 0,1 a un 25,0 % en peso, convenientemente un 0,2 a un 10,0 % en peso, en especial un 0,5 a un 50,0 % en peso, preferentemente un 0,1 a un 25,0 % en peso, convenientemente un 0,2 a un 10,0 % en peso, en especial un 0,5 a un 5,0 % en peso de extracto de *Cryptocodinium* eficaz como antioxidante, y un 50,0 % a un 99,9 % en peso, preferentemente un 75,0 a un 99,9 % en peso, convenientemente un 90,0 a un 99,8 % en peso, en especial un 95,0 a un 99,5 % en peso de componentes de una biomasa distinta de *Cryptocodinium* sp, dando por resultado las fracciones relativas citadas previamente en total un 100,0 % en peso preferentemente.

La composición de ácido graso según la invención presenta una fracción relativamente elevada de ácidos grasos poliinsaturados y contiene, referido respectivamente a su fracción total, preferentemente al menos un 10,0 % en peso, convenientemente al menos un 25,0 % en peso, preferentemente al menos un 50,0 % en peso, en especial al menos un 70,0 % en peso de ácido docosahexenoico (ácido todo-cis 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico) y/o docosahexenoato de alquilo (todo-cis 4,7,10,13,16,19-docosahexenoato de alquilo), preferentemente ácido docosahexenoico, docosahexenoato de metilo y/o docosahexenoato de etilo.

Frente a composiciones de ácido graso estabilizadas convencionalmente, la composición de ácido graso según la invención se distingue por una estabilidad a la oxidación más elevada. Por lo tanto, la adición de antioxidantes conocidos en sí, como por ejemplo α -, β -, γ - y δ -tocoferol, no es indispensable. Correspondientemente, la composición de ácido graso según la invención no contiene antioxidantes adicionales según una forma de ejecución preferente.

No obstante, ya que la estabilidad antioxidativa de la composición de ácido graso según la invención se puede aumentar aún frecuentemente mediante la adición complementaria de antioxidantes, la composición según la invención, según una forma muy especialmente preferente de ejecución de la invención, contiene al menos un antioxidante, preferentemente de acción sinérgica, preferentemente al menos un tocotrienol, α -, β -, γ - y δ -tocoferol, convenientemente α -, β -, γ - y δ -tocoferol, en especial α -, β -, γ - y δ -tocoferol y palmitato de ascorbilo, ascendiendo la fracción relativa de estos componentes preferentemente a un 0,01 hasta un 5,0 % en peso, en especial un 0,05 a un 0,5 % en peso, referido respectivamente al peso total de la composición de ácido graso.

La obtención de la composición de ácido graso según la invención se efectúa de modo conocido en sí, preferentemente mediante mezclado de los correspondientes componentes. En este caso se ha mostrado muy especialmente conveniente disolver el extracto de *Cryptocodinium* sp. eficaz como antioxidante y los componentes de la biomasa distinta de *Cryptocodinium* sp. por separado en un disolvente, preferentemente éter de petróleo, hexano, pentano, etanol, metanol, acetonitrilo, diclorometano, metiletilcetona, dietiléter y/o acetato de etilo, convenientemente hexano y/o dietiléter, en especial dietiléter, mezclar las disoluciones entre sí a continuación, y eliminar el disolvente seguidamente, de modo preferente mediante evaporación.

Según otra forma preferente de ejecución de la invención, los componentes se mezclan sin adición de disolvente, empleándose, en caso dado, temperaturas más elevadas, preferentemente en el intervalo de 25°C a 80°C, en especial en el intervalo de 25°C a 60°C.

Los posibles campos de aplicación de la composición de ácido graso según la invención son inmediatamente evidentes para el especialista. En especial son apropiados para todas las aplicaciones que están previstas para PUFAs y ésteres de PUFA. En este caso, la composición de ácidos grasos según la invención se puede emplear directamente en la mayor parte de los casos. No obstante, para algunas aplicaciones es necesario saponificar previamente el éster o los ésteres de ácido graso en la fase líquida. Esto se puede conseguir, a modo de ejemplo, mediante reacción con KOH en etanol y subsiguiente acidificación con un ácido inorgánico u orgánico.

La composición de ácido graso según la invención se emplea en especial como producto activo o componente en composiciones farmacéuticas, como componente en preparados cosméticos, como aditivo de productos alimenticios, como ingrediente de productos alimenticios, como componente de agentes nutricionales funcionales y para la obtención de productos sucesivos de PUFA de concentración más elevada, como ésteres y ácidos.

A continuación se explicará más detalladamente la invención mediante ejemplos, sin que se deba efectuar por ello una limitación de la idea de la invención.

Se determinó el tiempo de inducción, los valores de peróxido y/o la capacidad antioxidativa de las siguientes composiciones de ácido graso.

Control 1

Se empleó un "aceite que contiene DHA" obtenido como se describe en Yokochi et al., Appl. Microb. Biotecnol., (1988), 49, página 72-76. Este se sometió a un refinado completo según pasos de procedimiento conocidos generalmente. A continuación, éste se denomina "aceite que contiene DHA" de manera abreviada.

Control 2-17

"Aceite que contiene DHA" + las cantidades de palmitato de ascorbilo y/o mezcla de tocoferol indicadas en la tabla 1 (añadido un 0,14 %. ©Coviox T70; mezcla de tocoferol natural).

50

Ejemplo 1

La obtención de extracto se llevó a cabo según el método DGF F-II 1 (75).

5 Se pesaron 5,02 g de aceite crudo *Crypthecodinium cohnii* (extracto de hexano) en un matraz esférico de 250 ml, y se mezclaron con 20 mg de pirogalol, 40 ml de metanol, 10 ml de hidróxido potásico al 60 % (g/v) y 3 zeolitas. En el baño de agua caliente a 80°C se saponificó la muestra durante 20 minutos bajo reflujo y ligera corriente de nitrógeno. Tras el enfriamiento se lavó la disolución de jabón 3 veces con 40 ml de agua bidestilada y 2 veces con 50 ml de dietiléter en un embudo de precipitación de 500 ml.

10 Con el dietiléter se efectuó una primera extracción bajo agitación cuidadosa. La fase acuosa se descargó en un vaso de precipitados de 600 ml. La fase de dietiléter se relavó con 40 ml de agua bidestilada, el agua se descargó a la fase acuosa. La fase de dietiléter se descargó en un matraz esférico de 1000 ml. La fase acuosa se trató aún cuatro veces como se ha descrito (adición de dietiléter, extracción, etc), hasta que era incolora. Las fases de dietilo reunidas se concentraron por evaporación en el evaporador rotativo, se secaron por medio de bomba de aceite y se pesaron. Se obtuvieron 921 mg de extracto.

15 Este se combinó con 4 g de "aceite que contiene DHA" (control 5; contiene un 0,1 % de tocoferol) y se mezcló convenientemente con ayuda de 10 ml de dietiléter. Tras eliminación de dietiléter se obtuvo un aceite naranja.

Ejemplo 2

20 Se pesaron 41,9 g de aceite crudo de *Crypthecodinium* en un matraz esférico de 500 ml, se mezclaron con 120 ml de metanol y una varilla de agitación magnética. La carga se agitó intensivamente 3 horas en el agitador magnético. La fase de metanol superior se decantó en un matraz esférico de 250 ml. La carga de aceite se mezcló varias veces con 100 ml de metanol, y se relavó durante una hora. La mezcla de aceite-metanol se introdujo en un embudo de precipitación de 100 ml, y la fase de metanol se trasladó a la ya presente. Esta se concentró por evaporación en el evaporador rotativo, y se secó por medio de bomba de aceite. Se obtuvieron 760 mg de extracto. Se combinó un "aceite que contiene DHA" (control 5; contiene un 0,1 % de tocoferol) con un 2 % en peso de extracto, y se mezcló convenientemente.

Ejemplo 3

25 Se obtuvo como la composición de ácido graso del ejemplo 2, con la salvedad de que el "aceite que contiene DHA" empleado (control 1) se combinó con un 4 % en peso de extracto y se mezcló convenientemente.

Ejemplo 4

30 Se extrajo una biomasa seca de *Crypthecodinium cohnii* directamente con metanol, extrayéndose también una gran fracción de fosfolípidos, lo que condujo a un producto muy tenaz.

Se combinó un "aceite que contiene DHA" (control 1) con un 4 % en peso de extracto y se mezcló convenientemente.

Ejemplo 5

35 Se extrajo una biomasa seca de *Crypthecodinium cohnii* directamente con metanol, extrayéndose también una gran fracción de fosfolípidos, lo que condujo a un producto muy tenaz. Para la eliminación de estos compuestos se lavó el extracto varias veces con acetona, y los componentes solubles en acetona formaron el extracto acetónico de *Crypthecodinium cohnii*.

Se combinó un "aceite que contiene DHA" (control 1) con un 4 % en peso de extracto acetónico y se mezcló convenientemente.

Ejemplo 6

40 Se obtuvo como la composición de ácido graso del ejemplo 2, con la salvedad de que el "aceite que contiene DHA" empleado (control 5) se combinó con un 4 % en peso de extracto y se mezcló convenientemente.

Determinación por Rancimat

Aparato: 743 Rancimat

Fabricante: Metrohm

Ajustes de aparato:

método: (análogo al método AOCS Cd12b-92)

temperatura: 80°C

5 flujo de gas: 20 L/h

criterio de detención: punto final

Puesta en práctica y principio de medida

10 El aceite a medir (3 g) se pesa en un recipiente de reacción, se coloca en el bloque de calefacción y se expone a una temperatura definida y a una corriente de aire. En este caso se forman productos de oxidación volátiles, como ácido fórmico, que se transfieren a través de un tubo de aire al aparato de medida, en el que se mide la conductividad con el electrodo de conductividad en agua destilada. Esta se registra hasta el punto final a intervalos de tiempo. De esta curva se forma automáticamente la segunda derivación, que tiene su máximo en el punto de ensilladura. El tiempo hasta el punto de ensilladura se denomina tiempo de inducción.

15 Cuanto más elevada es la estabilidad de la respectiva muestra, tanto más prolongado es también el tiempo de inducción. Por consiguiente, mediante la comparación de tiempos de inducción medidos se puede sacar conclusiones sobre el estado anti/oxidativo de una muestra, así como comparar eficazmente entre sí la eficacia de antioxidantes.

Para los materiales indicados a continuación se midieron los tiempos de inducción reunidos en la tabla 1.

Tabla 1: tiempos de inducción según el ensayo de Rancimat

Muestra	Adición	Tiempo de inducción (h)
Control 1	---	1,1
Control 2	0,01 % en peso de Toc	1,9
Control 3	0,025 % en peso de Toc	3,7
Control 4	0,05 % en peso de Toc	5,5
Control 5	0,1 % en peso de Toc	5,7
Control 6	0,15 % en peso de Toc	6,8
Control 7	0,2 % en peso de Toc	7,7
Control 8	0,5 % en peso de Toc	7,0
Control 9	1,0 % en peso de Toc	7,5
Control 10	2,0 % en peso de Toc	6,6
Control 11	0,025 % en peso de Toc + 0,025 % en peso de AP	4,3
Control 12	0,1 % en peso de Toc + 0,025 % en peso de AP	9,0
Control 13	0,1 % en peso de Toc + 0,5 % en peso de AP	8,5
Control 14	0,1 % en peso de Toc + 0,1 % en peso de AP	7,4

ES 2 388 452 T3

Control 15	0,2 % en peso de Toc + 0,05 % en peso de AP	11,6
Control 16	0,2 % en peso de Toc + 0,1 % en peso de AP	10,6
Control 17	0,2 % en peso de Toc + 0,2 % en peso de AP	7,0
Ejemplo 1	18,7 % en peso de UVA + 0,2 % en peso de Toc	17,9
Ejemplo 2	2,0 % en peso de extracto de MeOH + 0,1 % en peso de Toc	14,3
Ejemplo 6	4,0 % en peso de extracto de MeOH + 0,1 % en peso de Toc	17,6
Ejemplo 5	4 % en peso de extr. ace.	41,5
<p>AP: palmitato de ascorbilo</p> <p>Toc: mezcla de tocoferol</p> <p>uVA: fracciones no saponificables (véase más arriba)</p> <p>extracto de MeOH: extracto de MeOH (véase más arriba)</p> <p>extracto acetónico (véase más arriba)</p>		

Determinación de los valores de peróxido

5 Los anteriores materiales se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante tiempos predeterminados en matraces Erlenmeyer, y a continuación se analizaron respecto a sus valores de peróxido. La determinación de los valores de peróxido se efectuó según AOCs Official Method Cd-3d 63 (American Oil Chemists Society). Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 2. Estos muestran que mediante empleo del extracto de metanol (ejemplo 3) se puede aumentar claramente la estabilidad antioxidativa frente al "aceite que contiene DHA" sin estabilizador adicional (control 1) o al "aceite que contiene DHA" estabilizado convencionalmente (control 2). En este caso se puede aumentar adicionalmente la estabilidad antioxidativa mediante la adición complementaria de tocoferol.

10 **Tabla 2: valores de peróxido tras almacenaje abierto**

Tiempo de almacenaje	Control 1	Control 2	Ejemplo 3	Ejemplo 6
0 días	0,5	0,7	0,6	0,6
2 días	3,0	1,2	1,4	1,3
7 días	9,5	3,0	1,9	2,7
14 días	17,8	4,2	2,8	2,1
21 días	74,5	24,9	3,1	4,2

Determinación de la capacidad antioxidativa (ASÍ O ANTIOXIDANTERRR)

Se determinó de la siguiente manera la capacidad antioxidativa (BUSCARRR) de los controles 1 y 5, así como del ejemplo 5.

15 Método

Se midieron las muestras según el método Photochem. El Photochem® funciona según el método de luminiscencia fotoquímica (PCL). Con ayuda de un fotosensibilizador se generan radicales aniónicos de superóxido, que se

5 identifican a través de su reacción con una sustancia quimioluminógena (por ejemplo Luminol) y la medida de la luz producida de este modo. Cuantos más capturadores de radicales (antioxidantes) están contenidos en la muestra, tanto más intensamente se debilita la intensidad de la luminiscencia fotoquímica dependiendo de la concentración. Los resultados se indican en unidades de concentración equivalentes de Trolox. El aparato funciona con kits estandarizados para la medida de la capacidad antioxidativa integral de antioxidantes aislados y la superóxido-dismutasa.

Para la determinación de los equivalentes de Trolox se diluyeron las muestras con n-hexano y se emplearon directamente para la medida.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 3.

10

Tabla 3: capacidad antioxidativa de algunas muestras

Muestra	Capacidad antioxidativa de equivalentes de Trolox (µg/ml)
Control 1	20,4
Control 5	328
Ejemplo 5	1143

15 Se puede identificar que los ejemplos según la invención presentan capacidades antioxidativas relativamente elevadas. En este caso se debe considerar que la cantidad de extracto añadido no se puede igualar a la cantidad eficaz como antioxidante en la mezcla. De este modo son posibles purificaciones adicionales, y éstas conducen a extractos aún más eficaces como antioxidantes. Naturalmente, el alcance de la protección comprende concentrados purificados en medida aún mayor hasta los compuestos eficaces como antioxidantes.

REIVINDICACIONES

- 1.- Empleo de un extracto de *Crypthecodinium* sp. con acción antioxidativa para la estabilización antioxidativa de composiciones de ácidos grasos a partir de una biomasa distinta de *Crypthecodinium* sp.
- 5 2.- Empleo según la reivindicación 1, presentando el extracto una capacidad antioxidativa de más de 2500 equivalentes de Trolox.
- 3.- Empleo según la reivindicación 2, caracterizado porque el extracto es obtenible
- i) saponificándose una biomasa de *Crypthecodinium* sp., y
- ii) extrayéndose la biomasa saponificada con un disolvente, que presenta una solubilidad en agua menor que 0,1 g de disolvente por g de agua a 25°C.
- 10 4.- Empleo según la reivindicación 3, caracterizado porque el extracto es obtenible mediante extracción de una biomasa saponificada de *Crypthecodinium* sp. con hexano, pentano, acetato de etilo, dietiléter, diclorometano, dimetiletilcetona y/o dióxido de carbono supercrítico.
- 15 5.- Empleo según la reivindicación 2, caracterizado porque el extracto es obtenible mediante extracción de una biomasa de *Crypthecodinium* sp. con un alcohol con 1 a 12 átomos de carbono y/o con una cetona con 3 a 6 átomos de carbono.
- 6.- Empleo según la reivindicación 5, caracterizado porque el extracto es obtenible mediante extracción de una biomasa de *Crypthecodinium* sp. con metanol, isopropanol, acetona y/o etanol.
- 20 7.- Empleo según la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque el extracto es obtenible mediante extracción de una biomasa de *Crypthecodinium* sp. con un alcohol con 1 a 12 átomos de carbono y subsiguiente extracción con una cetona.
- 8.- Empleo según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el extracto es un extracto de *Crypthecodinium*.
- 9.- Empleo según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el extracto es obtenible mediante un procedimiento en el que se transesterifica una biomasa de *Crypthecodinium* sp.
- 25 10.- Empleo según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el extracto es obtenible mediante un procedimiento en el que se extrae mecánicamente una biomasa de *Crypthecodinium* sp.
- 30 11.- Composición de ácido graso estabilizada antioxidación, que contiene al menos un ácido graso insaturado, caracterizada porque la composición de ácido graso contiene al menos un extracto de *Crypthecodinium* sp. con acción antioxidativa y componentes de una biomasa distinta de *Crypthecodinium* sp., no conteniendo la composición de ácido graso otros antioxidantes adicionales.
- 12.- Composición de ácido graso estabilizada antioxidación según la reivindicación 11, caracterizada porque contiene componentes de una biomasa de *Thraustochytriales*.
- 13.- Composición de ácido graso estabilizada antioxidación según la reivindicación 12, caracterizada porque contiene componentes de una biomasa de *Ulkenia* sp.
- 35 14.- Composición de ácido graso estabilizada antioxidación según al menos una de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizada porque los componentes de la biomasa distinta de *Crypthecodinium* sp. son obtenibles mediante un procedimiento en el que se transesterifica una biomasa distinta de *Crypthecodinium* sp.
- 40 15.- Composición de ácido graso estabilizada antioxidación según al menos una de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizada porque contiene, referido respectivamente al peso total de la composición de ácido graso, un 0,1 a un 50,0 % en peso de al menos un extracto según al menos una de las reivindicaciones 1 a 10 y un 50,0 a un 99,9 % en peso de componentes de una biomasa distinta de *Crypthecodinium* sp.
- 16.- Composición de ácido graso estabilizada antioxidación según al menos una de las reivindicaciones 11 a 15 precedentes, caracterizada porque contiene, referido a su peso total, al menos un 25,0 % en peso de ácido docosahexenoico y/o éster alquílico de ácido docosahexenoico.

- 17.- Procedimiento para la obtención de una composición de ácido graso estabilizada antioxidación, caracterizado porque se mezcla al menos un extracto de *Crypthecodinium* sp. con acción antioxidativa y componentes de una biomasa distinta de *Crypthecodinium* sp., no conteniendo la composición de ácido graso otros antioxidantes adicionales.
- 5 18.- Empleo de una composición de ácido graso según al menos una de las reivindicaciones 11 a 16 como producto activo o componente en composiciones farmacéuticas.
- 19.- Empleo de una composición de ácido graso según al menos una de las reivindicaciones 11 a 16 como componente en preparados cosméticos.
- 10 20.- Empleo de una composición de ácido graso según al menos una de las reivindicaciones 11 a 16 como aditivo de productos alimenticios y/o como ingrediente de productos alimenticios.
- 21.- Empleo de una composición de ácido graso según al menos una de las reivindicaciones 11 a 16 como componente de piensos.