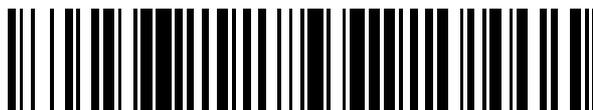


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 958**

51 Int. Cl.:

A23D 9/02 (2006.01)

C11C 1/02 (2006.01)

C11C 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2010 E 10732258 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2438819**

54 Título: **Método para producir un concentrado de ésteres de los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico**

30 Prioridad:

02.06.2009 CL 13432009

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

09.07.2013

73 Titular/es:

**GOLDEN OMEGA S.A. (100.0%)
Av. El Golf N° 150 Piso 15 Las Condes
Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**HÄRTING GLADE, TOMÁS FRANCIS;
DÍAZ FUENZALIDA, MIGUEL ÁNGEL y
MARKOVITS ROJAS, ALEJANDRO**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 411 958 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para producir un concentrado de ésteres de los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico.

Campo de la invención.

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para obtener un concentrado de ésteres de los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico a partir de aceites marinos crudos o refinados.

Antecedentes de la invención.

10 Se conoce bien la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de tipo ω -3, los ácidos (todo cis)-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico, a continuación en el presente documento EPA, y (todo cis)-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico, a continuación en el presente documento DHA, para ingredientes de productos alimenticios o farmacéuticos y está documentada debido a su utilidad, entre otros, para prevenir la arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares, aliviar estados inflamatorios y retrasar el crecimiento de tumores. Como consecuencia, los expertos recomiendan una ingesta diaria de dichos ácidos grasos que oscila entre 0,5 y 10 g.

15 Una de las fuentes más ricas de EPA y DHA son los aceites de pescado de diferente origen tal como sardinas, jurel, anchoa, salmón, bacalao y otros. Normalmente, el contenido combinado de EPA y DHA en dichos aceites es de aproximadamente el 10 al 35% en peso. Por consiguiente, los primeros intentos para proporcionar complementos alimenticios y productos farmacéuticos ricos en EPA y DHA se basaron en aceites de pescado refinados para eliminar su olor y sabor desagradables característicos, para su utilización como ingredientes para un producto alimenticio o farmacéutico adecuado para consumo humano. Estos procedimientos de refinado recurrían principalmente a los procedimientos clásicos para el refinado de aceites vegetales y adaptaciones específicas de dichos procedimientos a la materia prima en cuestión (Lindsay, documento USP 4.915.876; Chang, documento USP 4.874.629; Marschner, documento USP 4.804.555; Stage, documento USP 4.599.143; Merck, documento USP 4.838.997).

25 No obstante, los intentos actuales para proporcionar EPA y DHA a partir de aceites marinos refinados adecuados como ingrediente para un producto alimenticio o farmacéutico, no han tenido éxito en la provisión de un producto cuyas propiedades organolépticas fuesen aceptables y estuvieran libres de los efectos secundarios típicos tales como reflujo gástrico, irritación del estómago y la piel y meteorismo, entre otros. Estos efectos se acentúan cuando se consumen EPA y DHA en cantidades superiores a 1 g, es decir, dosis equivalentes a aproximadamente 5 g de aceite de pescado, que producen los efectos secundarios mencionados en el consumidor.

30 Por consiguiente, los esfuerzos para proporcionar EPA y DHA se han dirigido a la producción de concentrados de estos ácidos a partir de aceites marinos. Estos concentrados pueden contener entre el 40 y el 95% de EPA y DHA en peso, o bien en forma de ácidos libres, o bien en forma de ésteres, normalmente ésteres etílicos o bien mono, di o triglicéridos. El objetivo de estos procedimientos es proporcionar concentrados de EPA y DHA que tienen mejores propiedades organolépticas de sabor, olor y color, que pueden usarse directamente en productos para uso terapéutico en seres humanos, como principio activo farmacéutico o como ingredientes alimenticios en general. No obstante, el estado de la técnica no proporciona procedimientos que puedan proporcionar productos que cumplan con las características de tener buenas propiedades sensoriales, almacenamiento a largo plazo y estabilidad oxidativa para mantener sus propiedades organolépticas deseables a lo largo del tiempo, es decir, productos en los que no se produzca su reversión en el tiempo a un olor y sabor a pescado y que carezcan de los efectos secundarios típicos de los aceites marinos y derivados, tales como reflujo gástrico, flatulencia, alergia entre otros.

40 Los concentrados de EPA y DHA disponibles comercialmente en la actualidad no se usan directamente como ingrediente alimenticio, sino que en su lugar se utilizan en forma de jarabes en los que se ha camuflado el sabor o en forma de pastillas recubiertas con azúcar o microencapsuladas, todo esto con el fin de ocultar o minimizar el sabor y olor no deseados que se desarrollan en el tiempo en dichos productos. Adicionalmente, estos concentrados no son adecuados tampoco para usos terapéuticos que normalmente requieren dosis relativamente altas de EPA o DHA, de varios gramos al día, porque a estas dosis los efectos secundarios no deseados de los concentrados incluso se acentúan más.

50 Otro enfoque para proporcionar EPA o DHA para consumo humano derivados de aceites marinos ha sido el desarrollo de procedimientos para obtener EPA o DHA puros, tal como se da a conocer en la patente estadounidense 6.846.942. No obstante, la obtención de EPA o DHA puros significa hacerlos pasar en primer lugar a través de una etapa en la que se obtiene una mezcla de EPA y DHA; comercialmente no parece haber una ventaja en este enfoque, y tal como puede observarse en los documentos de la tabla 1, la mayoría de los procedimientos dados a conocer tratan sobre la preparación de concentrados que contienen EPA y DHA o bien en forma de ácidos libres o bien en forma de ésteres.

55 En la tabla 1, se muestran numerosos procedimientos dados a conocer en la técnica, dirigidos a la obtención de concentrados de ácidos grasos ω -3 a partir de aceite.

La patente europea n.º 0 409 903 da a conocer un procedimiento para preparar mezclas que contienen EPA y DHA

5

a partir de aceites animales o vegetales. El procedimiento comprende las etapas de saponificar la materia prima, el aceite animal o vegetal, acidificar la mezcla saponificada inmediatamente y luego extraer los ácidos formados con éter de petróleo hasta agotamiento. Entonces se lavan los extractos con agua, se elimina el disolvente y se somete el residuo a una o más etapas de destilación molecular a una presión de 0,133 Pa y una temperatura de entre 110 - 120°C. Se obtiene un destilado que contiene entre el 35 y el 90% de EPA y DHA.

Tabla 1: Patentes y solicitudes de patente para métodos o procedimientos para la producción de DHA y EPA

Documento	Título
20030027865	Método para aislar ácidos grasos altamente purificados usando cristalización
20040022923	Aceites marinos con niveles reducidos de contaminantes
20040236128	Método para preparar EPA puro y DHA puro
20050201997	Promotor para la eliminación de dioxinas
20050256326	Procedimiento para disminuir los contaminantes ambientales en un aceite o una grasa, un fluido para disminuir los contaminantes ambientales volátiles, un complemento alimenticio
20080268117	Método para purificar aceites que contienen EPA y DHA
3682993	Purificación de aceites
4554107	Aceites de pescado refinados y el procedimiento para producir los mismos
4599143	Procedimiento para la desodorización física y/o el refinado de aceites, grasas, ésteres orgánicos comestibles con un alto punto de ebullición
4623488	Aceites de pescado refinados y el procedimiento para producir los mismos
4675132	Ácidos grasos poliinsaturados de aceites de pescado
4692280	Purificación de aceites de pescado
4792418	Método para la extracción y purificación de ácidos grasos poliinsaturados que se originan a partir de fuentes naturales
4838997	Procedimiento para la desodorización de aceites de triglicéridos
4855154	Procedimiento para la desodorización de aceites marinos
4874629	Purificación de aceite de pescado
4915876	Procedimiento para la desodorización y estabilización de aceites poliinsaturados
4966734	Desodorización de mezclas de ésteres grasos
5006281	Procedimiento para la producción de aceites animales
5023100	Aceite de pescado
5130061	Procedimiento para la extracción de ésteres de ácidos grasos poliinsaturados a partir de aceites de pescado
5679809	Concentrado de ésteres etílicos de ácidos grasos poliinsaturados
5693835	Aceite de pescado con menos aroma a pescado y un método para su preparación
5945318	Refinado de composiciones de aceite
6190715	Procedimiento para producir aceite de pescado comestible refinado a partir de arenque y otros peces similares que contienen ácidos grasos omega-3 de cadena larga
6204401	Purificación de glicéridos de ácidos grasos poliinsaturados
6214396	Método y planta para la extracción de aceite de pescado y productos resultantes
6261608	Método para la preparación de aceite de pescado refinado
6528669	Recuperación de ácidos grasos poliinsaturados partiendo de aductos de urea
6537787	Métodos enzimáticos para el enriquecimiento con ácidos grasos poliinsaturados
6664405	Método para aislar ácido graso insaturado altamente purificado usando cristalización
6846942	Método para preparar EPA puro y DHA puro
EP0409903B1	Procedimiento para preparar ácidos grasos poliinsaturados
EP0749468B1	Refinado de composiciones de aceite
EP0968264B1	Purificación de glicéridos de ácidos grasos poliinsaturados
EP1153114B1	Esterificación de aceite marino catalizada por lipasa
EP1178103A1	Purificación de aceite crudo con ácidos grasos poliinsaturados
EP1202950B1	Recuperación de ácidos grasos poliinsaturados partiendo de aductos de urea
EP1996686A1	Omega-3
JP2007138181	Procedimiento para preparar material con un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga)

La patente estadounidense 5.130.061 da a conocer un procedimiento para la preparación de una mezcla de ésteres etílicos de EPA y DHA altamente concentrados a partir de aceite de pescado. El procedimiento dado a conocer incluye las etapas de transesterificación de aceite de pescado con alcohol etílico, seguido de la extracción del producto transesterificado con hexano y la purificación del extracto mediante cromatografía en gel de sílice. Entonces, se somete el producto purificado a una o más etapas de destilación molecular a una presión de

10

aproximadamente 0,001 mmHg y una temperatura de entre 65 y 70°C. Opcionalmente, antes de la destilación, puede cristalizarse el producto resultante de la cromatografía en acetona a -40°C y luego someterse a destilación.

Muchos de los procedimientos dados a conocer pueden proporcionar productos con propiedades organolépticas aceptables pero en todos ellos, se producen los efectos secundarios descritos anteriormente y la reversión al olor y sabor a pescado se produce con el tiempo, a diferencia de en el producto obtenido por medio del procedimiento de la presente invención que mantiene sus propiedades organolépticas neutras en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente durante un periodo de al menos tres meses y sin provocar efectos secundarios significativos en el consumidor. Por características organolépticas neutras, se quiere decir un producto que tiene propiedades organolépticas aceptables en ausencia de aditivos para enmascarar el sabor o el olor, mientras que se entiende que características organolépticas aceptables son un producto evaluado por un panel sensorial cualificado compuesto por al menos 9 miembros que evalúan propiedades del producto tales como aspecto, aroma y sabor con una calificación de cada parámetro igual a o mayor que el 60% del valor máximo de dicho parámetro, y la propiedad de rancidez, con una calificación igual a o mayor que el 80% del valor máximo de dicho parámetro.

Además del requisito de estabilidad y propiedades organolépticas aceptables, los concentrados de EPA y DHA también deben cumplir con una serie de normas reguladoras con respecto a su contenido de compuestos orgánicos contaminantes conocidos como contaminantes orgánicos persistentes (COP) que son sustancias químicas que persisten en el medio ambiente, se acumulan en la cadena alimentaria e implican un riesgo de provocar efectos adversos a la salud humana y el medio ambiente. Entre estos contaminantes, que incluyen actualmente 17 sustancias reconocidas durante la Tercera Conferencia de las Partes del Convenio de Estocolmo de mayo de 2007, están derivados de dioxinas, furanos, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc., cuya concentración en los aceites de pescado ha ido aumentando con el tiempo, de modo que están realizándose esfuerzos para desarrollar procedimientos que puedan eliminar estos contaminantes de los aceites de pescado. Entre las Partes del Convenio de Estocolmo existen actualmente normas estrictas con respecto a los límites máximos admisibles de los COP en productos para consumo humano, entre los que se incluyen aceite de pescado y productos derivados de los aceites de pescado. Se encuentran procedimientos dirigidos específicamente a la eliminación de los COP, entre otros, en los procedimientos dados a conocer en las solicitudes de patente US 2005/0256326 y US 2004/0022923 y la solicitud internacional WO 02/06430. Otro grupo de contaminantes regulados son los metales pesados tales como arsénico, mercurio, cadmio y plomo, entre otros.

Los procedimientos para la producción de concentrados de EPA y DHA descritos en la patente europea n.º 0 409 903 y en la patente estadounidense US 5.130.061 no se refieren al problema de la presencia de COP. Por tanto, para comparar la eficacia para la eliminación de contaminantes de los procedimientos dados a conocer con la eficacia del procedimiento de esta invención para el mismo objeto, se reprodujeron los procedimientos mencionados con materias primas que tenían una concentración conocida de COP y se compararon con los productos obtenidos mediante el procedimiento del presente documento. Se muestran los resultados en los ejemplos comparativos 1 y 2.

En la patente estadounidense 6.846.946, se hace mención al problema de los bifenilos policlorados (PCB) pero no se da a conocer ninguna solución referente a su eliminación.

Se ha encontrado que, de manera sorprendente, el procedimiento de esta invención, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, puede proporcionar un producto con propiedades organolépticas aceptables, sin producir una reversión al olor y sabor a pescado durante un tiempo de almacenamiento en condiciones ambientales de al menos tres meses y también a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, también puede reducir o eliminar eficazmente los COP y metales pesados. Adicionalmente, el procedimiento dado a conocer no provoca la isomerización cis-trans no deseada de los isómeros de EPA y DHA de propiedades metabólicas desconocidas, sino que al contrario y de manera bastante sorprendente, reducen el contenido en isómeros trans cuando se encuentran en las materias primas.

Pronova BioPharma (www.pronova.com) da a conocer un procedimiento para la producción de concentrados de ésteres etílicos de EPA y DHA para su uso como principio activo farmacéutico. En dicho procedimiento, en primer lugar se desacidifica aceite de pescado crudo para obtener aceite de pescado refinado y este aceite de pescado refinado se somete a un procedimiento de separación dirigido específicamente a la eliminación de contaminantes por medio del procedimiento dado a conocer en la solicitud estadounidense 2005/0256326. El aceite de pescado refinado obtenido se transesterifica posteriormente con alcohol etílico. El producto transesterificado se somete a varias etapas de destilación molecular. Se trata el destilado con urea, luego se blanquea y vuelve a someterse a destilación molecular, obteniéndose un producto final con hasta el 90% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga entre EPA y DHA. Una desventaja del procedimiento es la posibilidad de transisomerización durante la etapa de separación. Adicionalmente, el producto comercial revierte al olor y sabor a pescado y pueden observarse todos los efectos secundarios mencionados previamente tras la ingestión del producto.

El procedimiento desarrollado por Napro Pharma (www.napro-pharma.no/production) para la producción de un concentrado de ésteres etílicos de EPA y DHA es similar al procedimiento de Pronova BioPharma, pero sin la etapa de separación y la etapa de tratamiento con urea, pero el producto también revierte al olor y sabor a pescado y pueden observarse todos los efectos secundarios mencionados previamente tras la ingestión del producto.

En comparación con los concentrados de EPA y DHA obtenidos mediante el procedimiento del estado de la técnica, los concentrados obtenidos mediante el procedimiento de la invención tienen ventajas sorprendentes e inesperadas con respecto a la técnica anterior tal como resultará evidente a partir de la descripción detallada de la invención. Estas ventajas incluyen la característica de un producto estable y organolépticamente neutro, que carece de efectos secundarios y niveles de contaminantes orgánicos persistentes que cumplen con las normas reguladoras internacionales. Además, tal como se mencionó anteriormente el procedimiento no sólo impide la formación de isómeros cis-trans, sino que al contrario, de manera sorprendente e inesperada, reduce la concentración de isómeros trans cuando están presentes en la materia prima. Como resultado de todas estas características combinadas, el producto obtenido mediante el procedimiento de esta invención es especialmente adecuado para su uso en terapias que requieren altas dosis de EPA y DHA y como ingrediente alimenticio.

El documento WO-A-02/06430 se refiere a aceites marinos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, tales como DHA y EPA y niveles reducidos de contaminantes.

El documento US-A-2006/0011012 se refiere a composiciones de ácidos grasos que comprenden EPA y DHA.

El documento WO-A-2009/009040 se refiere a una composición de ácidos grasos que comprende EPA y DHA.

El documento WO-A-2007/091070 se refiere a un procedimiento para preparar sales de ácidos grasos insaturados solubles en agua, por ejemplo de EPA y DHA.

Sumario de la invención.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento novedoso para la preparación de un concentrado de ésteres de EPA y DHA a partir de aceites marinos que tiene propiedades organolépticas neutras, estabilidad y un contenido de contaminantes orgánicos persistentes por debajo de los límites permitidos y, por consiguiente, adecuado para consumo humano o bien como producto farmacéutico o bien como ingrediente alimenticio.

Dicho objetivo se logra mediante un concentrado que comprende ésteres etílicos de EPA y DHA obtenidos por medio de un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto aceite marino crudo o refinado con uno o más álcalis y agua a una temperatura no superior a 100°C hasta que se obtiene una mezcla, comprendiendo la mezcla aceite marino saponificado;
- b) poner en contacto la mezcla saponificada con uno o más disolventes orgánicos para formar una fase refinada, que comprende las sales alcalinas de ácidos grasos y una fase de extracto;
- c) separar la fase de extracto de la fase refinada;
- d) mezclar la fase refinada con una disolución acuosa de un ácido para formar una fase acuosa y una fase no acuosa que comprende ácidos grasos;
- e) separar la fase acuosa de la fase no acuosa;
- f) mezclar la fase no acuosa separada con un alcohol y un catalizador de esterificación a una temperatura de no más de 150°C hasta que se obtiene una mezcla esterificada que comprende ésteres de ácidos grasos;
- g) retirar el catalizador de la mezcla esterificada para obtener una mezcla esterificada libre de catalizador;
- h) eliminar el disolvente de la mezcla esterificada libre de catalizador para obtener ésteres de ácidos grasos, e
- i) destilar los ésteres en una columna de destilación de recorrido corto a una temperatura como máximo de 180°C y a una presión inferior a 1 mbar para obtener un concentrado que comprende ésteres de EPA y DHA.

Las etapas del procedimiento convergen de manera sinérgica hacia el objetivo de la invención de manera coordinada.

Descripción detallada de la invención.

Materia prima.

Para llevar a cabo la invención, puede usarse cualquier materia prima que contenga EPA o DHA, preferiblemente aceites de pescado. Materias primas adecuadas para la invención, tales como aceites de sardina, anchoa, jurel, caballa del Pacífico, atún, bacalao, salmón, krill y moluscos y mezclas de dichos aceites, aceites de los subproductos del procesamiento de animales marinos tales como las vísceras de los animales marinos, y también aceites de microalgas tal como, por ejemplo, *Nannochloropsis* sp y plancton. En la presente invención, el término aceite también incluye grasas o ceras que contienen EPA o DHA y sus subproductos, tales como glicéridos y ácidos grasos.

Aunque se prefiere el uso de una materia prima con un índice Totox menor que 30, el procedimiento de la presente invención también puede llevarse a cabo con materias primas que tienen un mayor índice Totox tal como se muestra en los ejemplos.

5 Para llevar a cabo el procedimiento de la presente invención, se saponifica aceite marino crudo o refinado usando un álcali para hidrolizar los glicéridos u otros ésteres de ácidos grasos presentes en el aceite marino crudo o refinado para obtener una mezcla saponificada que comprende las sales alcalinas de los compuestos saponificables del aceite marino crudo o refinado y la materia no saponificable. Para ello, se pone en contacto aceite marino crudo o refinado con agua y uno o más álcalis apropiados, y opcionalmente, uno o más disolventes tales como alcoholes e hidrocarburos o con uno o más antioxidantes apropiados. Los álcalis apropiados para el proceso de saponificación incluyen hidróxidos de sodio, potasio, litio, magnesio y mezclas de dichos hidróxidos. La cantidad de álcali oscila entre 5 y 40 gramos de álcali por cada 100 g de aceite marino crudo o refinado, aunque la razón preferida de álcali con respecto a aceite marino crudo o refinado es de aproximadamente 15 gramos de álcali por 100 g de aceite marino crudo o refinado. La cantidad de agua usada oscila entre 10 y 500 g de agua por 100 g de aceite marino crudo o refinado, aunque la razón preferida de agua con respecto a aceite marino crudo o refinado oscila entre 50 y 200 g de agua por 100 g de aceite marino crudo o refinado. Cuando se usan alcoholes tales como etanol, la cantidad de alcohol oscila entre 10 y 500 g de alcohol por 100 g de aceite marino crudo o refinado, aunque la razón preferida de alcohol con respecto a aceite marino crudo o refinado oscila entre 50 y 200 g de alcohol por 100 g de aceite marino crudo o refinado. Cuando se usan hidrocarburos tales como hexano, la cantidad de disolvente oscila entre 10 y 500 g de disolvente por 100 g de aceite marino crudo o refinado, preferiblemente oscila entre 50 y 200 g de disolvente por 100 g de aceite marino crudo o refinado. Cuando se usan los antioxidantes apropiados, tales como, por ejemplo, BHT, tocoferoles o ácido ascórbico y sus derivados, la cantidad de antioxidante usada es preferiblemente no mayor que 1 g por 100 g de aceite marino crudo o refinado. El contacto entre el aceite marino crudo o refinado, agua, uno o más álcalis y opcionalmente uno o más disolventes, puede llevarse a cabo o bien de manera continua o bien de manera discontinua en un recipiente con agitación a una temperatura de entre 10 y 100°C, preferiblemente a temperaturas de entre 40 y 85°C y a presiones de entre 0,1 y 5 bar, preferiblemente a presión atmosférica. El tiempo para completar la saponificación del aceite marino crudo o refinado en el caso de la operación de manera discontinua o, el tiempo de residencia en el caso de una operación continua oscila entre 10 y 400 minutos, preferiblemente entre 30 y 120 minutos.

30 La mezcla que comprende aceite marino saponificado se pone en contacto con uno o más disolventes orgánicos hasta que se forman una fase de extracto y una fase refinada inmisible con la fase de extracto, comprendiendo la fase de extracto disolvente orgánico y material disuelto y comprendiendo la fase refinada las sales alcalinas de los ácidos grasos. Se separan dichas fases o bien mediante sedimentación o bien mediante centrifugación. La puesta en contacto entre la mezcla que comprende aceite marino crudo o refinado saponificado y los disolventes orgánicos puede llevarse a cabo o bien de manera discontinua o bien de manera continua a temperaturas de entre 10 y 100°C, preferiblemente de entre 20 y 80°C, y a presiones de entre 0,1 y 5 bar, preferiblemente a presión atmosférica. Los disolventes o mezclas de disolventes orgánicos apropiados para la extracción pueden elegirse del grupo que consiste en éter de petróleo, pentano, hexano, heptano, octano, ciclohexano, metil-ciclohexano, acetona, tolueno, xileno, metil-xileno, etil-benceno, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno, tricloruro de etileno, percloruro de etileno, dimetilsulfóxido y tetrahidrofurano. No obstante, los disolventes preferidos comprenden hidrocarburos alifáticos tales como éter de petróleo, pentano, hexano, heptano, octano o mezcla de estos disolventes. La razón del disolvente o disolventes en relación con la mezcla saponificada oscila entre 50 y 1000 g por 100 g de mezcla, preferiblemente entre 100 y 500 g por 100 g de mezcla. Una vez que se separa la fase refinada de la fase de extracto, si se desea, puede ponerse de nuevo en contacto con uno o más disolventes en las condiciones dadas a conocer para formar una segunda fase de extracto y una segunda fase refinada, y puede llevarse a cabo el procedimiento de extracción adicional de las fases refinadas, si se desea.

50 En la etapa de acidulación, se pone en contacto la fase refinada con una disolución de un ácido tal como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido tricloroacético o carbónico, hasta que se forman una fase acuosa y una fase no acuosa que comprende ácidos grasos. La cantidad de ácido usado en la etapa de acidulación puede ser de hasta 1,5 veces la cantidad estequiométrica de álcali usada en la etapa de saponificación, preferiblemente 1,05 veces la cantidad estequiométrica de álcali requerida para la neutralización total de la fase refinada. La cantidad de ácido requerida para acidificar la fase refinada puede determinarse midiendo la alcalinidad total de la fase refinada. La puesta en contacto de la fase refinada y el ácido para formar una mezcla de acidificación puede llevarse a cabo o bien de manera discontinua o bien de manera continua en un recipiente con agitación a temperaturas de entre 10 y 100°C, preferiblemente de entre 20 y 60°C, y presiones de entre 0,1 y 5 bar, preferiblemente a presión atmosférica y con un tiempo de residencia, en el caso de la operación continua, que oscila entre 1 y 120 minutos, preferiblemente entre 5 y 60 minutos. Opcionalmente, la mezcla también puede incluir un antioxidante o una mezcla de antioxidantes tales como, BHT, tocoferoles o ácido ascórbico y sus derivados. Tras eso, se separa la fase no acuosa de la fase acuosa mediante sedimentación o centrifugación. La fase no acuosa separada se lava con una mezcla de lavado que comprende agua, un alcohol monohidroxilado, acetona o una disolución acuosa de sulfato de sodio o cloruro de sodio, a temperaturas de entre 10 y 100°C, preferiblemente de entre 20 y 60°C y a presiones de entre 0,1 y 5 bar, preferiblemente a presión atmosférica. La fase no acuosa lavada puede filtrarse opcionalmente para eliminar los sólidos insolubles. El término fase no acuosa usado a continuación designa tanto la fase no acuosa lavada así como la fase no acuosa lavada y filtrada, obtenida tras la etapa de

acidulación tal como se describió anteriormente.

Opcionalmente, puede eliminarse el disolvente de cualquiera de las fases no acuosas parcial o completamente mediante evaporación del disolvente, preferiblemente a presión reducida y a temperaturas inferiores a 150°C obteniéndose lo que se denomina una fase no acuosa con disolvente eliminado parcial o totalmente.

5 Opcionalmente, puede someterse cualquiera de las fases no acuosas o de las fases no acuosas con disolvente eliminado parcial o totalmente a una etapa de cristalización. Para ello, se mezcla la fase con un disolvente o mezcla de disolventes seleccionado del grupo que consiste en éter de petróleo, pentano, hexano, heptano, octano, ciclohexano, metil-ciclohexano, tolueno, xileno, metil-xileno, etil-benceno, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno, tricloruro de etileno, percloruro de etileno, dimetilsulfóxido, dimetil-formamida y tetrahidrofurano, metanol, etanol, acetona y metil etil cetona. Disolventes preferidos son hexano, etanol, acetona o mezclas de éstos. La cantidad de disolvente que va a usarse en esta etapa puede variar entre 50 y 1000 g por 100 g de la fase que se cristaliza, preferiblemente entre 100 y 500 g por 100 g de la fase que se cristaliza. La mezcla formada se enfría posteriormente hasta una temperatura que oscila entre 0 y -50°C, preferiblemente entre -20 y -40°C hasta la formación de una fase cristalizada sólida en una fase líquida. La operación de cristalización puede llevarse a cabo de manera discontinua o de manera continua y preferiblemente a presión atmosférica. La fase sólida cristalizada y la fase líquida se separan posteriormente mediante filtración o centrifugación, preferiblemente a la misma temperatura final de la cristalización. Entonces, los disolventes de la fase líquida se eliminan, parcial o totalmente, mediante evaporación del disolvente para obtener lo que se denomina entonces primera fase con disolvente eliminado parcial o totalmente producida en la etapa de cristalización que comprende EPA y DHA en mayor concentración que la del aceite marino crudo o refinado utilizado.

Opcionalmente, puede tratarse cualquiera de las fases no acuosas o cualquiera de las fases no acuosas con disolvente eliminado parcial o totalmente o la primera fase con disolvente eliminado parcial o totalmente producida en la etapa de cristalización, con urea u otro compuesto que forma complejos o aductos con ácidos grasos o sus derivados. Para ello, se forma una disolución a una temperatura de entre 50 y 100°C, consistiendo la disolución en entre 5 y 40 g de la fase que se somete al tratamiento con urea por cada 100 g de una disolución del compuesto que forma complejos o aductos en un disolvente orgánico, preferiblemente urea en etanol, que contiene aproximadamente 30 g de urea por 100 g de etanol. Entonces, la disolución se enfría hasta temperatura ambiente o menos, formando una fase sólida que comprende complejos o aductos y una fase líquida libre de sólidos. Los complejos o aductos y la fase líquida libre de sólidos se separan o bien mediante filtración o bien mediante centrifugación, y la fase líquida libre de sólidos se lava con agua o una disolución ácida hasta que se ha extraído el compuesto restante que forma complejos o aductos que está disuelto en esa fase. Entonces, los disolventes de la fase líquida libre de sólidos se eliminan, o bien total o bien parcialmente, para obtener lo que se denomina segunda fase con disolvente eliminado parcial o totalmente producida en la etapa de formación de complejos, y que comprende EPA y DHA en una concentración mayor que la que hay en la materia prima.

35 Entonces, se somete cualquiera de las fases no acuosas o cualquiera de las fases no acuosas con disolvente eliminado parcial o totalmente o la primera fase con disolvente eliminado parcial o totalmente producida en la etapa de cristalización o la segunda fase con disolvente eliminado parcial o totalmente producida en la formación de complejos a una etapa de esterificación. Para ello, la fase se mezcla con un alcohol monohidroxilado tal como metanol o etanol o con un alcohol polihidroxilado tal como glicerol en una razón que oscila entre 500 g de alcohol por cada 100 g de la fase, y 20 g de alcohol por cada 100 g de fase, preferiblemente entre 20 y 200 g, y con un catalizador tal como ácido sulfúrico, p-toluenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico o con una resina tal como Amberlite, en una razón de 0,05 a 10 g de catalizador por cada 100 g de fase. La etapa de esterificación puede llevarse a cabo o bien de manera discontinua o bien de manera continua en un reactor con agitación, a una temperatura de entre 10 y 150°C, preferiblemente de entre 30 y 80°C y a una presión de entre 0,1 y 5 bar, preferiblemente a presión atmosférica. El tiempo de esterificación en el caso de la operación discontinua o el tiempo de residencia en el caso de la operación continua oscilan entre 30 y 600 minutos, preferiblemente entre 60 y 240 minutos. Al final de la etapa de esterificación, se obtiene una mezcla esterificada que comprende ésteres de ácidos grasos. Entonces, el catalizador se retira de la mezcla esterificada mediante filtración en el caso de catalizador sólido o mediante neutralización y lavado con disoluciones acuosas en el caso de catalizador líquido, para formar una mezcla esterificada libre de catalizador. Se elimina el disolvente de la mezcla esterificada libre de catalizador mediante evaporación, preferiblemente a presión reducida y temperaturas menores que 150°C, para obtener una mezcla con disolvente eliminado que comprende ésteres de ácidos grasos.

Posteriormente, la mezcla de ésteres de ácidos grasos con disolvente eliminado se destila en una columna de destilación de recorrido corto para obtener un destilado y un residuo.

55 El destilado o el residuo puede destilarse de nuevo en las condiciones anteriores, obtenerse un segundo destilado y un segundo residuo. El procedimiento puede repetirse hasta que se obtiene un destilado o un residuo que contiene la concentración deseada de ésteres de EPA y DHA o un concentrado de EPA y DHA. Las destilaciones pueden llevarse a cabo a una temperatura menor que 180°C, preferiblemente menor que 150°C y una presión menor que 1 mbar, preferiblemente menor que 0,1 mbar. Los concentrados resultantes pueden comprender hasta el 95% en peso de ésteres de EPA y DHA.

La fracción que contiene EPA y DHA o cualquier éster puede someterse adicionalmente a una o más etapas de purificación adicionales tales como, fraccionamiento por medio de enfriamiento a una temperatura menor que -5°C y separación de los sólidos mediante filtración o centrifugación; desodorización en columnas rellenas o columnas de platos a presión reducida, y temperatura inferior a 200°C , preferiblemente menor que 150°C usando o bien nitrógeno o bien vapor de agua para la desodorización; adsorción por medio del uso de tierra de infusorios, carbono activo, zeolitas y tamiz molecular, entre otros. Asimismo, opcionalmente, los concentrados de EPA y DHA pueden transesterificarse con glicerina para formar glicéridos de EPA y DHA concentrados.

Pueden añadirse uno o más antioxidantes apropiados al concentrado de EPA y DHA, tales como tocoferol, ésteres de tocoferol, ácido ascórbico y sus derivados, extracto de romero, extracto de boldo, entre otros. Preferiblemente, la cantidad de antioxidante en los concentrados es inferior al 1% en peso, preferiblemente inferior al 0,5% del concentrado.

Los concentrados de EPA y DHA obtenidos están libres de los efectos secundarios no deseados asociados con el consumo de derivados de aceite de pescado, tal como reflujo gástrico, irritación del estómago y la piel y meteorismo, entre otros. Adicionalmente, y de manera sorprendente, los concentrados de EPA y DHA no presentan reversión al olor o sabor a pescado, permitiendo su utilización como ingredientes de productos alimenticios o farmacéuticos, sin necesidad de recurrir a enmascaradores del sabor y el olor, encapsulaciones y microencapsulación. Además, el procedimiento dado a conocer reduce significativamente el contenido de contaminantes orgánicos persistentes y metales pesados que podrían estar presentes en el aceite de pescado, por debajo de los niveles máximos permitidos a nivel internacional. Además, el procedimiento no genera ácidos grasos trans y además, pero de manera sorprendente e inesperada, también puede reducir el contenido de ácidos grasos trans cuando están presentes en la materia prima.

Descripción de la figura.

Con referencia a la figura 1, se alimenta aceite de pescado crudo a través del conducto (1) a un reactor de saponificación (4), un recipiente con agitación al que también se alimenta una corriente de disolución de hidróxido de sodio a través del conducto (2) en una razón igual al índice de saponificación del aceite o en exceso hasta el 20% y a través del conducto (3) se alimenta una corriente de etanol acuoso al 50% al reactor. El reactor (4) funciona a una temperatura de entre 40 y 85°C a una presión entre 1 y 2 bar y con un tiempo de residencia de 45 minutos para generar la mezcla saponificada. Dicha mezcla saponificada se alimenta a través del conducto (7) a una columna de extracción a contracorriente (8) que opera a una presión de entre 2 y 5 bar, y a una temperatura de entre 20 y 60°C . Se alimenta la columna de extracción (8) con una mezcla de hidrocarburos alifáticos a través del conducto (9) cuyo punto de ebullición oscila entre 60 y 80°C para recuperar a través del conducto (10) una fase de extracto que comprende una mezcla de hidrocarburos alifáticos y material extraído en dicha fase y para recuperar a través del conducto (11) una fase refinada que comprende sales alcalinas de ácidos grasos. La fase refinada se alimenta a través del conducto (11) a un reactor de acidulación (12) al que se alimenta una corriente de ácido clorhídrico también a través del conducto (13) a una razón igual a la alcalinidad total de la fase refinada o en un exceso hasta del 10%. El reactor (12) funciona a una temperatura de entre 20 y 70°C con agitación, una presión de 1 a 2 bar y un tiempo de residencia de hasta 30 minutos para generar una mezcla acidulada. La mezcla acidulada se alimenta al sedimentador (15) a través del conducto (14) para separar la fase no acuosa de la fase acuosa de la acidulación. El sedimentador (15) funciona a una temperatura de entre 20 y 70°C , a una presión entre 1 y 2 bar y un tiempo de residencia de entre 5 y 60 minutos. La fase acuosa se retira a través del conducto (16) para su posterior tratamiento, para recuperar disolventes y glicerina. A través del conducto (17) la fase no acuosa separada en el sedimentador (15) se alimenta a un reactor de lavado (18) en el que se pone en contacto con agitación con la corriente (19) que comprende una disolución de etanol al 50% en agua, para producir una mezcla de lavado. El reactor (18) funciona a una temperatura de entre 20 y 70°C , una presión de 1 y 2 bar y un tiempo de residencia de entre 1 y 30 minutos. La mezcla de lavado del reactor (18) se alimenta a un decantador (21) a través del conducto (20) para separar la fase ligera de la fase pesada de la mezcla de lavado. El decantador (21) funciona a una temperatura de entre 20 y 70°C , a una presión entre 1 y 2 bar y un tiempo de residencia de entre 5 y 60 minutos. La fase pesada se retira a través del conducto (22) para su posterior tratamiento, para recuperar disolventes o para recircular la misma o parte de la misma al reactor de lavado (18). A través del conducto (23), la fase ligera separada en el sedimentador (21) se alimenta a un reactor de esterificación (24) que también se alimenta a través del conducto (25) con una corriente de una disolución de ácido p-toluenosulfónico disuelto en etanol. El reactor (24) funciona a una temperatura de entre 40 y 85°C con agitación, a una presión entre 0,5 y 2 bar y con un tiempo de residencia de 180 minutos para producir una mezcla esterificada. La mezcla esterificada se alimenta a través del conducto (26) al reactor de lavado y neutralización (27) en el que se pone en contacto con agitación, a una temperatura de entre 20 y 70°C , a una presión de 1 y 2 bar y con un tiempo de residencia de entre 1 y 30 minutos, con la corriente (28) que comprende una disolución de carbonato de sodio al 5% en agua, para generar una mezcla de lavado neutralizada. La mezcla de lavado neutralizada del reactor de lavado (27) se alimenta a un sedimentador (31) a través del conducto (30) para separar una mezcla de ésteres de ácidos grasos y una fase acuosa. El decantador (31) funciona a una temperatura de entre 20 y 70°C , a una presión entre 1 y 2 bar y un tiempo de residencia de entre 6 y 60 minutos. La fase acuosa se retira a través del conducto (32) para su posterior tratamiento para recuperar disolventes. A través del conducto (33) la mezcla de ésteres de ácidos grasos separada en el sedimentador (31) se alimenta a un evaporador de película descendente (34) que funciona a una temperatura de entre 50 y 180°C , a una presión entre 1 y 100 mbar y un tiempo de residencia no mayor que 30 minutos, para obtener un destilado y un residuo con disolvente eliminado.

que comprende ésteres de ácidos grasos. A través del conducto (35) el destilado se alimenta a un tanque de almacenamiento no mostrado. Los ésteres de ácidos grasos con disolvente eliminado se alimentan a través del conducto (36) a un evaporador de recorrido corto (37) que opera a una temperatura de entre 50 y 180°C, a una presión entre 0,001 y 1 mbar. A través del conducto (38) el destilado se retira del evaporador de recorrido corto (37) y a través del conducto (39) el residuo de la destilación del evaporador de recorrido corto (37) se retira y se alimenta al evaporador de recorrido corto (40). El evaporador de recorrido corto (40) funciona a una temperatura de entre 50 y 180°C, a una presión entre 0,001 y 1 mbar. A través del conducto (41) se retira el residuo de la destilación del evaporador de recorrido corto (40) y a través del conducto (42), se retira el destilado del evaporador de recorrido corto (40), que comprende una mezcla concentrada de ésteres de EPA y DHA.

10 Ejemplos.

Los ejemplos 1 a 11 ilustran maneras en que puede llevarse a cabo esta invención así como las excepcionales propiedades organolépticas y estabilidad oxidativa de los concentrados obtenidos.

Ejemplo comparativo 1 (EP 0 409 903).

15 Preparación de un concentrado de éster etílico de EPA y DHA a partir de aceite de salmón según el procedimiento dado a conocer por EP 0 409 903.

Se pusieron 300 g de aceite de salmón (muestra M1) cuyas características se muestran en la tabla 2, 150 g de etanol y 150 g de una disolución de hidróxido de sodio en agua destilada al 28% en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml. Se puso la mezcla a reflujo y se purgó con nitrógeno durante una hora, dando como resultado la saponificación completa del aceite de salmón, después de eso se añadieron 160 g de una disolución acuosa de ácido clorhídrico al 26% y se agitó la mezcla vigorosamente durante 5 minutos. Entonces, se añadieron 450 ml de éter de petróleo y se agitó una vez más. Se puso la muestra en un embudo de decantación de 2000 ml y se permitió que sedimentase para la separación en una fase superior y una inferior. Se retiró la fase superior y se extrajo la fase acuosa inferior dos veces más con 450 ml de éter de petróleo. Se recogieron los extractos de éter de petróleo en un embudo de 2000 ml y se lavaron con agua hasta neutralidad. Se evaporó el extracto lavado en un evaporador rotatorio que operaba a 10 mbar y 60°C. Posteriormente, se eliminaron trazas de éter de petróleo alimentando el residuo de la evaporación del evaporador rotatorio a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 1250 ml/h, temperatura de camisa de 90°C, temperatura de condensador a -4°C, velocidad de rodillo de 350 rpm y una presión de 4 mbar. Se obtuvo una mezcla de ácidos grasos de aceite de salmón con el 30,1% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga (muestra M2).

30 Se alimentó la mezcla de ácidos grasos de salmón a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 100 ml/h, temperatura de camisa de 65°C, temperatura de condensador a 4°C, velocidad de los rodillos de 350 rpm, presión de 0,005 mbar y se obtuvieron un primer destilado y un primer residuo. Se sometió el primer residuo a una segunda etapa de destilación de recorrido corto, a una temperatura de 85°C obteniéndose un segundo destilado y un segundo residuo. El segundo destilado contenía el 52,2% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga (muestra M3).

Se muestra el análisis de las muestras del ejemplo comparativo 1 en la tabla 2.

Tabla 2: Análisis de muestras del ejemplo comparativo 1

	Aceite de salmón Muestra M1	Primer destilado Muestra M2	Segundo destilado Muestra M3
EPA, % p/p	10,3	11,4	16,6
DHA, % p/p	15,1	16,8	30,7
ω -3 total, % p/p	28,2	30,1	52,2
PCB, ppb	148,6	133,2	96,7
PCB como dioxinas, ppt	4,6	4,5	4,1
Dioxina+furanos, ppt	2,7	2,4	2,1
Peróxidos, meq/kg	7,2	1,3	1,1
Anisidina	6,1	2,4	1,9
Totox	20,3	8,7	4,1
Metales pesados			
Arsénico, ppb	1200	538	359

Ejemplo comparativo 2 (US 5.130.061).

40 Preparación de un concentrado de éster etílico de EPA y DHA a partir de aceite de salmón según el procedimiento dado a conocer por US 5.130.061.

5 Se mezclaron 300 g del aceite de salmón usado en el ejemplo comparativo 1 y 200 g de una disolución de ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml. Se puso la mezcla a reflujo y se purgó con nitrógeno durante 8 horas. Se eliminó el etanol en exceso mediante destilación a presión reducida mientras que se enfriaba la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. Se diluyó el residuo de la destilación con 400 ml de hexano y se lavó con 500 ml de agua. Se agitó la mezcla heterogénea vigorosamente. Se separó la fase acuosa de la fase de hexano en un embudo de decantación y se lavó la fase de hexano con agua repetidamente hasta que el pH de la fase acuosa fue neutro. Se purificó el extracto hexánico lavado haciéndolo pasar a través de una columna de gel de sílice. Posteriormente, se evaporó el extracto de hexano purificado en un evaporador rotatorio hasta 10 mbar y 60°C. Se eliminaron trazas de disolvente alimentando el residuo de la evaporación a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 1250 ml/h, temperatura de camisa de 90°C, temperatura de condensador a -4°C, velocidad de rodillo de 350 rpm y presión de 4 mbar. Se obtuvo una mezcla de ésteres etílicos que contenía el 27,9% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga (esterificados) (muestra M4).

15 Se alimentó la mezcla de ésteres etílicos a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 100 ml/h, temperatura de camisa 65°C, temperatura de condensador de 4°C, velocidad de rodillo de 350 rpm, presión de 0,005 mbar y se obtuvieron un primer destilado y un primer residuo. Se sometió el primer residuo a una segunda etapa de destilación de recorrido corto, a una temperatura de 85°C obteniéndose un segundo destilado y un segundo residuo. El segundo destilado contenía el 51,6% de ácidos grasos de cadena larga (esterificados) (muestra M5).

Se muestra el análisis de las muestras del ejemplo comparativo 2 en la tabla 3.

20

Tabla 3: Análisis de muestras del ejemplo comparativo 2

	Aceite de salmón Muestra M1	Primer destilado Muestra M4	Segundo destilado Muestra M5
EPA, % p/p	10,3	9,9	17,1
DHA, % p/p	15,1	14,8	29,7
ω -3 total, % p/p	28,2	27,9	51,6
PCB, ppb	148,6	136,4	103,7
PCB como dioxinas, ppt	4,6	4,5	3,9
Dioxina + furanos, ppt	2,7	2,5	2,3
Peróxidos, meq/kg	7,2	7,5	3,9
Anisidina	6,1	6,0	2,4
Totox	20,3	21,0	10,2
Metales pesados			
Arsénico, ppb	1200	945	450

Ejemplo 1.

Preparación de un concentrado de ésteres etílicos de EPA y DHA de aceite de salmón.

25 Se pusieron 300 g del aceite de salmón usado en el ejemplo comparativo 1, 150 g de etanol y 150 g de disolución de hidróxido de sodio en agua destilada al 28% en un matraz Erlenmeyer de 2000 ml. Se puso la mezcla a reflujo y se purgó con nitrógeno durante una hora, dando como resultado la saponificación completa del aceite de salmón.

Se puso la mezcla saponificada en un embudo de decantación de 3000 ml y se añadieron 150 g de etanol, 150 g de agua destilada y 900 g de hexano al embudo. Se agitó la mezcla resultante vigorosamente y se dejó que sedimentase. Se separó la fase hexánica superior y se extrajo la fase acuosa inferior tres veces más con 700 ml de hexano. Se eliminó el disolvente de los extractos hexánicos en un evaporador rotatorio a presión reducida.

30 Se aciduló la fase acuosa añadiendo 200 g de una disolución acuosa de ácido clorhídrico al 20%. Se lavó la fase orgánica resultante con porciones de una disolución acuosa de etanol al 50% hasta pH 4-5 y entonces se evaporó en un evaporador rotatorio a 10 mbar y 60°C. Se obtuvo una mezcla de ácidos grasos que contenía el 29,6% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga (muestra M6).

35 Se mezcló la mezcla de ácidos grasos con 100 g de una disolución de ácido sulfúrico al 1,0% en etanol absoluto y se puso a reflujo durante 2 horas. Se consideró que la reacción había finalizado tras alcanzar la mezcla un índice de acidez constante. Se neutralizó la mezcla que había reaccionado con 40 g de una disolución de carbonato de sodio al 10% en agua destilada seguido por lavados con porciones de 40 g de agua destilada. Posteriormente, se evaporó la mezcla en un evaporador rotatorio a 10 mbar y 60°C. Se eliminaron trazas de disolvente alimentando el residuo de la evaporación a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 1250 ml/h, temperatura de camisa de 90°C, temperatura de condensador a -4°C, velocidad de rodillo de 350 rpm y presión de 4 mbar. Se obtuvo una mezcla de ésteres etílicos que contenía el 30,9% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga

40

(muestra M7).

5

Se alimentó la mezcla de ésteres etílicos a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 100 ml/h, temperatura de camisa de 65°C, temperatura de condensador 4°C, velocidad de rodillo de 350 rpm, una presión de 0,005 mbar obteniéndose un primer destilado y un primer residuo. Se destiló de nuevo el primer residuo en la columna de destilación de recorrido corto a una temperatura de 85°C obteniéndose un segundo destilado y un segundo residuo. El segundo destilado contenía el 52,3% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga (muestra M8).

Se muestra el análisis de las muestras del ejemplo 1 en la tabla 4.

Tabla 4: Análisis de muestras del ejemplo 1

	Aceite de salmón Muestra M1	Ácidos grasos Muestra M6	Ésteres etílicos Muestra M7	Segundo destilado Muestra M8
EPA, % p/p	10,3	10,1	10,3	20,4
DHA, % p/p	15,1	17,2	17,4	29,8
ω -3 total, % p/p	28,2	29,6	30,9	52,3
PCB, ppb	148,6	46,3	44,9	26,7
PCB como dioxinas, ppt	4,6	0,8	1,0	1,2
Dioxina + furanos, ppt	2,7	0,6	0,6	0,8
Peróxidos, meq/kg	7,2	1,1	1,2	0,1
Anisidina	6,1	0,9	1,1	0,3
Totox	20,3	3,1	3,5	0,5
Metales pesados				
Arsénico, ppb	1200	200	205	< 100

10

Ejemplo 2.

Preparación de un concentrado de ésteres etílicos de EPA y DHA a partir de aceite de sardina.

Se duplicó el ejemplo 1 usando aceite de sardina, con un índice Totox de 45. Se muestra el análisis de las muestras en la tabla 5:

Tabla 5: Análisis de muestras Ejemplo 2

	Aceite de sardina	Ácidos grasos	Ésteres etílicos	Segundo destilado
EPA	16,1	16,3	16	30,1
DHA	6,2	6,1	6,2	15,4
ω -3 total	24,1	24,2	23,4	48,2
PCB, ppb	104,6	41,6	44,1	18,5
PCB como dioxinas, ppt	3,2	0,3	0,4	0,6
Dioxina + furanos, ppt	2,1	0,3	0,3	0,4
Peróxidos, meq/kg	10,7	3,5	3,6	0,1
Anisidina	23,6	1,9	1,8	0,1
Totox	45	8,9	9,0	0,2
Metales pesados				
Arsénico, ppb	980	345	330	< 100

15

Ejemplo 3.

Preparación de un concentrado de ésteres etílicos de EPA y DHA a partir de aceite de caballa.

Se duplicó el ejemplo 1 usando aceite de jurel que tenía un índice Totox de 33. Se muestran los resultados del ejemplo en la tabla 6:

Tabla 6: Análisis de muestras del ejemplo 3

	Aceite de jurel	Ácidos grasos	Ésteres etílicos	Segundo destilado
--	-----------------	---------------	------------------	-------------------

EPA	5,4	5,4	5,1	15,7
DHA	16,8	16,9	16,3	32,2
ω -3 total	24,4	24,6	22,6	50,1
PCB, ppb	91	26	27	18
PCB como dioxinas, ppt	3,7	0,9	1,0	1,1
Dioxina + furanos, ppt	3,1	0,5	0,5	0,4
Peróxidos, meq/kg	9,2	4,1	3,8	0,3
Anisidina	14,6	1,1	1,1	0,2
Totox	33	9,3	8,7	0,8
Metales pesados				
Arsénico, ppb	890	210	196	< 100

Ejemplo 4.

Preparación de un concentrado de ésteres etílicos de EPA y DHA a partir de aceite de sardina en un reactor de 200 litros.

5 Se cargó un reactor de acero inoxidable, agitado por turbina, con camisa y deflector, de 200 litros con 15 kg de etanol, 15 kg de una disolución acuosa de hidróxido de sodio al 18,7% y 15 kg de aceite de sardina (muestra M10) cuyas características se muestran en la tabla 7. Se calentó la mezcla hasta 55°C durante una hora y entonces se enfrió hasta 45°C. Entonces, se añadieron 45 kg de hexano y se agitó durante 10 minutos. Se dejó que sedimentase la muestra durante 15 minutos y se separó la fase orgánica de la fase acuosa. Se extrajo la fase acuosa dos veces usando el mismo procedimiento. Se recogieron los extractos hexánicos y se eliminó el disolvente de los mismos a presión reducida. Se aciduló la fase acuosa o refinada a una temperatura de 25°C con 28 kg de una disolución de ácido clorhídrico al 10% y se agitó la mezcla durante 5 minutos. Se dejó que sedimentase la mezcla acidulada durante 15 minutos, para separar las fases acuosa y orgánica. Una vez que se retiró, se lavó la fase orgánica con 10 kg de una disolución acuosa de etanol al 50% hasta pH 5. Se filtró la fase orgánica lavada para separar los sólidos en suspensión. Se diluyó la fase orgánica, lavada y filtrada, con hexano hasta el 20% en peso y se transfirió a un segundo reactor de 150 litros, dotado de un agitador de tipo ancla y camisa de refrigeración, y se enfrió hasta -25°C. Se filtró la mezcla enfriada a -25°C en una bolsa filtrada a través de malla de poliéster de 10 micrómetros. Se cargó el filtrado obtenido en el reactor de 200 litros y se calentó a 55°C a una presión de 200 mbar. Se puso la mezcla de ácidos grasos con disolvente eliminado en contacto con una disolución de 20 kg de urea disuelta en 55 kg de etanol a 80°C. Se agitó la mezcla para formar el complejo con urea y entonces se enfrió hasta 15°C. Se separaron por filtración los sólidos precipitados y se obtuvo un filtrado libre de sólidos. Se enfrió el filtrado libre de sólidos hasta 1°C y se filtró para obtener un segundo filtrado libre de sólidos. Se mezcló el segundo filtrado libre de sólidos con 3 kg de ácido clorhídrico disuelto en 50 kg de agua y 20 kg de hexano, se agitó y se dejó que sedimentase. Se separó la fase acuosa ácida y se lavó la fase orgánica con 5 kg de agua hasta que el pH fue neutro. Se eliminó el disolvente de la fase orgánica a 80°C y 50 mbar. Se obtuvieron 2,3 kg de una mezcla de ácidos grasos que contenía el 77,2 % de ácidos grasos ω -3 (muestra M-11).

30 Entonces, se cargaron 40 g de ácido sulfúrico disuelto en 10 kg de etanol en el reactor y se calentó a 80°C. Posteriormente, se enfrió el reactor hasta 40°C y se añadieron 10 kg de hexano junto con 70 g de carbonato de sodio disuelto en 5 kg de agua. Se agitó la mezcla durante 5 minutos entonces tras sedimentar se separó la fase acuosa de la fase orgánica. Se lavó la fase orgánica con 5 kg de agua y se eliminó el disolvente a 80°C y 50 mbar. Se obtuvieron 2,5 kg de una mezcla de ésteres etílicos de ácidos grasos que contenía el 70,9 % de ácidos grasos ω -3 (muestra M-12).

35 Se eliminaron trazas de disolvente de los ésteres etílicos alimentando la mezcla a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 1250 ml/h, temperatura de camisa de 80°C, temperatura de condensador a -5°C, velocidad de rodillo de 350 rpm y presión de 4 mbar. Se alimentó la mezcla de ésteres etílicos destilados a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 90 ml/h, temperatura de camisa de 85°C, temperatura de condensador a 4°C, velocidad de rodillo de 350 rpm, presión de 0,005 mbar obteniéndose un primer destilado y un primer residuo.

40 Se mezcló el primer residuo con el 1% de Tonsil a 70°C y a presión reducida durante 30 minutos y se filtró obteniéndose un filtrado purificado que se sometió a una segunda etapa de destilación de recorrido corto, a una temperatura de 98°C obteniéndose un segundo destilado y un segundo residuo. El segundo destilado contenía el 86,2% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga. Se enfrió el segundo destilado hasta -25°C durante 12 horas y entonces se filtró. Se alimentó el filtrado resultante a una columna de desodorización, a una temperatura de 100°C usando nitrógeno a 130°C y una presión de 15 mbar durante la desodorización. Se obtuvo un concentrado desodorizado de ésteres etílicos de ácidos grasos ω -3 de cadena larga (muestra M13) al que se añadió una mezcla de ésteres de tocoferol, palmitato de ascorbilo y extracto de romero a una concentración de 2550 ppm.

Se muestra el análisis de las muestras del ejemplo 4 en la tabla 7.

Tabla 7: Análisis de muestras del ejemplo 4

	Aceite de sardina Muestra M10	Ácidos grasos Muestra M11	Ésteres etílicos Muestra M12	Segundo destilado Muestra M13
EPA	10,3	29,9	27,1	29,1
DHA	15,1	44,3	40,5	56,2
ω -3 total	26,1	77,2	70,9	86,3
PCB, ppb	98	44	46	17
PCB como dioxinas, ppt	3,8	1,8	1,7	1,2
Dioxinas+furanos, ppt	4,1	0,4	0,5	0,3
Peróxidos, meq/kg	5,1	0,9	1,3	0,1
Anisidina	8,9	0,8	0,8	0,1
Totox	19,1	2,6	3,4	0,3
Metales pesados				
Arsénico, ppb	1090	304	321	< 100

Ejemplo 5.

5 Preparación de un concentrado de ésteres etílicos de EPA y DHA a partir de aceite de caballa en reactor de 200 litros.

10 Se cargó un reactor de acero inoxidable, agitado por turbina, con camisa y deflector, de 200 litros con 15 kg de etanol, 15 kg de una disolución acuosa de hidróxido de sodio al 17,4% y 15 kg de aceite de jurel del ejemplo 3 y cuyas características se muestran en la tabla 8. Se calentó la mezcla a 75°C durante una hora y entonces se enfrió hasta 45°C. A continuación, se añadieron 45 kg de hexano y se agitó durante diez minutos. Se dejó que sedimentase la mezcla durante 15 minutos y se separó la fase orgánica de la fase acuosa. Se extrajo la fase acuosa dos veces mediante el mismo procedimiento. Se aciduló la fase acuosa o refinada a una temperatura de 25°C con 26 kg de una disolución de ácido clorhídrico al 10% y se agitó durante 5 minutos. Se dejó que sedimentase la mezcla acidulada durante 15 minutos, y entonces se separó la fase acuosa de la fase orgánica. Se lavó la fase orgánica con 10 kg de disolución acuosa al 50% hasta pH 5. Se mezcló la fase orgánica lavada con 100 g de ácido sulfúrico disuelto en 10 kg de etanol y se calentó destilando una mezcla de disolventes hasta que se alcanzó la temperatura de 80°C. Posteriormente, se enfrió el reactor hasta 40°C, se añadieron 350 g de carbonato de sodio disuelto en 5 kg de agua y se agitó durante 10 minutos. Se separó la fase acuosa. Se lavó la fase orgánica con 5 kg de agua y se eliminó el disolvente a 80°C y 50 mbar. Se obtuvieron 14,6 kg de una mezcla de ésteres etílicos de ácidos grasos que contenía el 24,7% de ácidos grasos ω -3. (muestra M-14).

20 Se eliminaron trazas de disolvente de los ésteres etílicos alimentando la mezcla a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 1250 ml/h, temperatura de camisa de 80°C, temperatura de condensador a -5°C, velocidad de rodillo de 350 rpm y presión de 4 mbar. Se alimentaron los ésteres etílicos destilados a una columna de destilación de recorrido corto KDL5 UIC, a una velocidad de flujo de 90 ml/h, temperatura de camisa de 85°C, temperatura de condensador a 4°C, velocidad de rodillo de 350 rpm, una presión de 0,005 mbar, obteniéndose un primer destilado y un primer residuo.

25 Posteriormente, se sometió el primer residuo a una segunda destilación de recorrido corto, a una temperatura de 96°C y se obtuvieron un segundo destilado y un segundo residuo. El segundo destilado contenía el 51,2% de ácidos grasos ω -3 de cadena larga (muestra M15). Finalmente, se mezclaron 2000 ppm de acetato de tocoferol (Grindox Toco 70, Danisco) con el segundo destilado.

30 Se muestra el análisis de las muestras del ejemplo 5 en la tabla 8.

Tabla 8: Análisis de muestras del ejemplo 5

	Aceite de jurel	Ésteres etílicos Muestra M14	Segundo destilado Muestra M15
EPA	5,4	5,8	12,9
DHA	16,8	16,1	35,7
ω -3 total	24,4	24,7	51,2
PCB, ppb	91	31	15
PCB como dioxinas, ppt	3,7	1,4	1,0
Dioxina + furanos, ppt	3,1	0,7	0,4

Peróxidos, meq/kg	9,2	3,4	0,1
Anisidina	14,6	0,9	0,3
Totox	33	7,7	0,5
Metales pesados			
Arsénico, ppb	890	269	< 100

Ejemplo 6.

Isómeros cis/trans de EPA en los concentrados de los ejemplos 2 y 3.

5 Se saponificó un gramo del segundo destilado del ejemplo 2 con una disolución de hidróxido de potasio en metanol acuoso a 10°C durante 24 horas. Entonces, se aciduló la mezcla saponificada con ácido clorhídrico al 1%, a 10°C. Se extrajo la mezcla acidulada con éter de petróleo tres veces. Se recogieron los extractos de éter de petróleo, se lavaron con una disolución acuosa de metanol al 20% y se eliminó el disolvente del extracto lavado en un vaporizador rotatorio a 20°C y 5 mbar. Se metiló el residuo usando trifluoruro de boro. Se obtuvieron 870 mg de ésteres metílicos de ácidos grasos ω -3 de cadena larga. Se preparó una muestra de ésteres metílicos de ácidos grasos ω -3 de cadena larga del segundo destilado del ejemplo 3 de manera similar.

10 De manera similar, se prepararon ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de sardina del ejemplo 2 y aceite de jurel del ejemplo 3 usando la técnica descrita.

15 Se inyectó un patrón de éster metílico de ácido todo-cis(5, 8, 11, 14, 17)-eicosapentaenoico en un cromatógrafo de gases, serie 7890A dotado de detector selectivo de masas de 5975Cinert, de Agilent Technologies, usando una columna SP 2560 de 100 metros, que tenía un diámetro interno de 0,25 mm y un grosor de película de 0,20 micrómetros. El programa cromatográfico era: temperatura inicial de 140°C durante 5 minutos; temperatura creciente a la velocidad de 2°C/min hasta 240°C y se mantuvo a 240°C durante 30 minutos. La temperatura del inyector y el detector era de 250°C. Se usó helio extrapuro como portador. Se almacenaron los espectros de masas del patrón en la biblioteca de datos.

20 Posteriormente, se inyectaron las muestras de los ésteres metílicos preparados a partir de las muestras del segundo destilado de los ejemplos 2 y 3 y de los ésteres metílicos obtenidos a partir de los aceites originales de los ejemplos 2 y 3 en el cromatógrafo. Se usó el software Chemstation para obtener una "calidad de coincidencia" del 99% para cada una de las muestras metiladas. Adicionalmente, se compararon los cromatogramas y espectrogramas de todos los ésteres metílicos cromatografiados y no se detectaron nuevos picos asociados con la isomerización de EPA.

25 Adicionalmente, se determinó el contenido de isómeros trans de los ácidos grasos de desde 16 hasta 22 átomos de carbono, según la metodología de AOCS Ce 1h-05. Se muestran los resultados en la tabla 9. Tal como puede observarse, en las pruebas de los ejemplos 2 y 3, no se generaron isómeros trans y hubo de forma inesperada una disminución de dichos isómeros en el producto final.

Tabla 9: Análisis de ácidos grasos trans en concentrados de los ejemplos 2 y 3.

% pp de ácidos grasos trans de ésteres metílicos	Aceite de sardina Ejemplo 2	Segundo destilado Ejemplo 2	Aceite de jurel Ejemplo 3	Segundo destilado Ejemplo 3
C16:1 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
C18:1 T	2,02%	1,18%	0,37%	0,28%
C18:2 T	0,22%	0,05%	0,15%	0,13%
C18:3 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
C20:1 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
C22:1 T	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Ejemplo 7.

30 Evaluación sensorial y determinación de la estabilidad de muestras de ésteres etílicos de ácidos grasos de los ejemplos 2 y 3.

35 Se evaluaron las propiedades organolépticas y la estabilidad por un panel cualificado de 12 panelistas. Se proporcionaron a cada panelista las muestras que debían evaluar en pequeños vasos codificados con 3 dígitos aleatorios y que contenían 15 ml de las muestras. Se llevó a cabo la evaluación en un laboratorio de evaluación sensorial aproximadamente a las 11:00 de la mañana.

Para valorar las características sensoriales de los productos, se consideraron los siguientes parámetros: aspecto, aroma, sabor, rancidez y presencia de sabores y olores extraños. La escala de medición para dichos parámetros osciló entre 1 y 9 puntos, en la que 9 representa, en el caso de sabor "excelente, típico, excepcionalmente

agradable" y 1 "raro, desagradable, asqueroso". En el caso de la rancidez, el criterio tenía un intervalo de 5 puntos en el que 5 significa "sin rancidez" y 1 "extremadamente rancio".

5 La tabla 10 presenta los resultados promedio obtenidos en la valoración organoléptica de las muestras de ésteres etílicos de ácidos grasos M15 de muestras recientes, el ejemplo 5 (A) y las mismas muestras tras 29 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. No se añadieron agentes de enmascaramiento del sabor, olor o aspecto a las muestras.

Tabla 10: Resultados de la evaluación organoléptica y estabilidad Ejemplo 7

Muestra	Aspecto	Aroma	Sabor	Rancidez
M15 Ejemplo 5 (A)	7,5	7,6	7,1	4,7
M15 Ejemplo 5 (B)	7,9	7,4	7,2	4,6

Aspecto: puntuación de 7,5, lo que significa que el aspecto es "bueno".

Aroma: la puntuación obtenida fue de 7,6, que lo califica como "bueno".

10 Sabor: con respecto al sabor, la muestra puntuó 7,1 lo que significa "bueno".

Rancidez: las muestras puntuaron 4,6 lo que significa "de baja rancidez".

Tal como puede observarse, todas las muestras tenían propiedades organolépticas y estabilidad aceptables.

Ejemplo 8.

Efectos secundarios de muestras ingeridas.

15 Para comparar los efectos secundarios provocados por diferentes concentrados de EPA y DHA obtenidos a partir de aceite de pescado, se dividieron 10 voluntarios en dos grupos, A y B, de 5 individuos cada uno.

Se mezclaron 900 g de yogur con 100 gramos de preparación comercial de ésteres etílicos de ácidos grasos que contenía 33 g de EPA y 22 g de DHA (muestra 1). De forma paralela, se mezclaron 100 g de ésteres etílicos del ejemplo 5, muestra M15 también con 900 g de yogur (muestra 2).

20 Cada miembro del grupo A ingirió 150 g de mezcla de yogur de la muestra 1, y cada miembro del grupo B ingirió 150 g de mezcla de yogur de la muestra 2. Tres horas tras la ingestión, 4 miembros del grupo A y 1 miembro del grupo B notificaron que estaban experimentando reflujo gástrico.

25 Una semana más tarde, se repitió la prueba con los mismos individuos de los grupos A y B usando la muestra 1 y la muestra 2 recién preparadas tal como se describió anteriormente pero esta vez se les administró a los miembros del grupo A la muestra 2 y se les administró a los miembros del grupo B la muestra 1. Tres horas tras la ingestión, ninguno de los miembros del grupo A experimentó reflujo gástrico mientras que los 5 miembros del grupo notificaron que estaban experimentando reflujo gástrico.

30 Puede concluirse que los concentrados de EPA y DHA preparados según el procedimiento dado a conocer en el presente documento no presentan los efectos secundarios característicos asociados comúnmente con la ingestión de derivados de aceite de pescado.

Ejemplo 9.

Evaluación sensorial de una muestra mantenida en condiciones oxidativas.

35 Se mantuvo una placa Petri de 15 cm de diámetro con 20 g de muestra M15 del ejemplo 5 en un horno de convección forzada a 45°C durante 6 horas. Posteriormente, se retiró la muestra del horno y se permitió que se enfriase.

Se evaluó la muestra por un panel de 5 personas. No se detectó olor a pescado.

Se repitió la prueba con la muestra M3 del ejemplo comparativo 1. Se percibió un olor a pescado rancio por el panel.

Se repitió la prueba con la muestra M5 del ejemplo comparativo 2. De nuevo, se percibió un olor a pescado rancio por el panel.

40 Se repitió la prueba con la muestra de ésteres etílicos de ácidos grasos 33/22 EPA/DHA usada en el ejemplo 8. De nuevo, se percibió un olor a pescado rancio por el panel.

Ejemplo 10.

Determinación de la estabilidad oxidativa de la muestra M15.

Se midió la estabilidad a la oxidación de una parte de la muestra M15 del ejemplo 5 por medio del método de prueba Rancimat. El tiempo de inducción a 80°C fue de 28,11 ± 0,97 horas. En paralelo, se llevaron a cabo pruebas Rancimat con la muestra de ésteres etílicos 33/22 usada en el ejemplo 8. El tiempo de inducción a 80°C fue de 1,67 ± 0,10 horas.

5 Ejemplo 11.

Espectro de masas de una muestra.

Se determinó una muestra del residuo hexánico del ejemplo 4 mediante CG-EM en un cromatógrafo HP7890 acoplado a un aparato 5975Cinert dotado de un detector de masas. El informe cromatográfico indicó la presencia en la muestra de más de 50 compuestos en una concentración mayor que 1000 ppm tal como puede observarse en la tabla 11.

Tabla 11: Análisis de CG-EM del residuo hexánico del ejemplo 4

N.º	Nombre del compuesto	Coincidencia, %	N.º CAS
1	beta-Pineno	93	000127-91-3
2	Monoéster (2-etilhexílico) de ácido 1,2-bencenodicarboxílico	50	004376-20-9
3	N-(3-Aminopropil)-1,4-butanodiamina	47	000124-20-9
4	3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol	30	000078-70-6
5	1-Anilinoisquinolina	41	013797-20-1
6	1-Nonadeceno	94	018435-45-5
7	1R-alfa-Pineno	96	007785-70-8
8	3,4,4a,5,6,7-Hexahidro-4a-[(metilamino)metil]-2(1H)-naftalenona	43	1000197-08-7
9	2,3-Dihidro-4-metil-8-nitro-1H-1,5-benzodiazepin-2-ona	52	037546-88-6
10	2-Decanona	55	000693-54-9
11	3,5-di-terc-Butil-4-hidroxibenzaldehído	64	001620-98-0
12	Alcohol 3,5-di-terc-butil-4-hidroxibencílico	93	000088-26-6
13	3-Careno	95	013466-78-9
14	4-Metil-1-(1-metiletil)-3-ciclohexen-1-ol	93	000562-74-3
15	3-Fluoro-2,2,3,4,4,5,5,6,6,7,7-undecametil-[1,2,3,4,5,6,7]oxahexasilepano	49	1000311-73-1
16	4,4'-Etilenbis(2,6-di-terc-butilfenol)	94	001516-94-5
17	Éster metílico (todo-Z) del ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	38	002566-90-7
18	4-[4-Metilamino-1-metilbutilamino]-7-cloroquinolina	27	031510-53-9
19	5-(2-Aminopropil)-2-metilfenol	38	021618-99-5
20	Éster metílico (todo-Z) del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	86	002734-47
21	5-Androsten-17-alfa-etinil-3-beta,17-beta-diol	70	1000126-90-5
22	2,2,2-Tricloroacetamida	53	000594-65-0
23	1-Metil-2-(1-metiletil)-benceno	97	000527-84-4
24	2,4-Dimetil-benzo[h]quinolina	46	000605-67-4
25	Éster metílico del ácido 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-hidroxi-benzoico	60	002511-22-0
26	Alcohol alfa-(1-aminoetil)-m-hidroxibencílico	25	000054-49-9
27	3-Metil-butanamida	38	000541-46-8
28	Hidroxitolueno butilado	89	000128-37-0
29	(3-beta)-Colest-5-en-3-ol	99	000057-88-5
30	Isobutirato de citronelilo	64	000097-89-2
31	1,2,4-Trietenil-ciclohexano	45	002855-27-8
32	2-Metil-2-(4-metil-3-pentenil)-ciclopropanometanol	38	000541-05-9
33	4,4,5,7,8-Pentametil-dihidrocumarina	46	039170-97-3
34	dl-Alanil-1-fenilalanina	43	108740-86-9
35	Dodecano	58	000112-40-3
36	4-metil-dodecano	58	006117-97-1
37	Eucaliptol	98	000470-82-6
38	N-fenil-heptanamida	38	056051-98-0
39	Hexadecano	95	000544-76-3
40	Éster etílico del ácido hexadecanoico	98	000628-97-7
41	(Z)-5,11,14,17-Eicosatetraenoato de metilo	50	059149-01-8
42	Pentadecano	96	000629-62-9
43	2,6,10,14-tetrametil-pentadecano	91	001921-70-6
44	p-alfa-dimetil-fenilamina	43	000064-11-9
45	2,6-bis(1,1-Dimetiletil-etiletil)fenol	50	004130-42-1

46	3-(1,1-Dimetiletil)-4-metoxi-fenol	60	000088-32-4
47	Éster butilhexílico del ácido ftálico	59	1000308-99-5
48	Ácido pterin-6-carboxílico	22	000948-60-7
49	Escualeno	99	007683-64-9
50	Tetradecano	92	000629-59-4
51	Éster 5-alfa-colestan-3-beta-ílico del ácido tiocianico	38	020997-50-6
52	Éster 5-alfa-colestan-3-beta-ílico del ácido tiocianico	52	020997-50-6
53	2,5-Dibutil-tiofeno	59	006911-45-1
54	Tridecano	92	000629-50-5
55	Éster etílico del ácido undecanoico	70	000627-90-7

- 5 Tal como puede concluirse a partir de los datos mostrados en la tabla 11, el procedimiento dado a conocer puede eliminar una gran familia de compuestos en aceites marinos, incluyendo tanto compuestos que se producen de manera natural diferentes a ácidos grasos ω -3 y contaminantes, que podrían ser responsables de los efectos secundarios y reversiones no deseadas del sabor y el olor de muchos concentrados de aceite de pescado.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener un concentrado de ésteres de EPA y DHA a partir de aceites marinos crudos o refinados, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - 5 a). poner en contacto aceite marino crudo o refinado con uno o más álcalis y agua a una temperatura como máximo de 100°C hasta que se obtiene una mezcla que comprende aceite marino saponificado;
 - b). poner en contacto la mezcla saponificada con uno o más disolventes orgánicos para formar una fase refinada que comprende sales alcalinas de ácidos grasos y una fase extraída;
 - c). separar la fase extraída de la fase refinada;
 - 10 d). mezclar la fase refinada con una disolución acuosa de un ácido para formar una fase no acuosa que comprende ácidos grasos y una fase acuosa;
 - e). separar la fase acuosa de la fase no acuosa;
 - f). mezclar la fase no acuosa separada con un alcohol y un catalizador de esterificación a una temperatura como máximo de 150°C hasta que se obtiene una mezcla esterificada que comprende ésteres de ácidos grasos;
 - 15 g). retirar el catalizador de la mezcla esterificada para obtener la mezcla esterificada libre de catalizador;
 - h). eliminar el disolvente de la mezcla esterificada libre de catalizador para obtener ésteres de los ácidos grasos, e
 - i). destilar los ésteres de ácidos grasos en una columna de destilación de recorrido corto a una temperatura de al menos 180°C y una presión inferior a 1 mbar para obtener un concentrado que comprende ésteres de EPA y DHA.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el álcali en la etapa (a) se elige del grupo que consiste en hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio y sus mezclas, y la razón en peso de álcali con respecto a aceite crudo o refinado es de aproximadamente 0,15:1 y la razón en peso de agua con respecto a aceite crudo o refinado es de entre 0,5:1 y 2:1.
- 25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla de la etapa (a) comprende etanol y la razón en peso de etanol con respecto a aceite crudo o refinado es de entre 0,5:1 y 2:1.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla de la etapa (a) comprende hexano y la razón en peso del hexano con respecto al aceite crudo o refinado es de entre 0,5:1 y 2:1.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla de la etapa (a) comprende uno o más antioxidantes y la razón en peso del antioxidante con respecto al aceite crudo o refinado es inferior a 1:100.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla de la etapa (a) se mantiene a una presión de aproximadamente 1 bar y a una temperatura de no más de 100°C durante un periodo de tiempo de entre 30 y 120 minutos para obtener aceite marino saponificado.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa (b) la temperatura es de entre 20 y 60°C, la presión es de aproximadamente 1 bar, el disolvente usado se elige del grupo que consiste en petróleo, pentano, hexano, heptanos y octano y la razón en peso del disolvente que va a hacerse reaccionar es de entre 1:1 y 5:1.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa (d) el ácido se elige del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido fórmico, ácido tricloroacético y ácido carbónico, la temperatura es de entre 20 y 70°C, la presión es de aproximadamente 1 bar y porque la razón estequiométrica del ácido con respecto al álcali de la etapa (a) es de aproximadamente 1,05:1.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el alcohol de la etapa (f) se elige del grupo que consiste en metanol, etanol y glicerol, la temperatura es de entre 30 y 80°C, la presión de aproximadamente 1 bar y la mezcla de esterificación se mantiene a una temperatura de entre 30 y 80°C durante un tiempo de entre 60 y 240 minutos para formar la mezcla esterificada.
- 45 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los ésteres de ácidos grasos se destilan a una presión menor que 0,1 mbar y una temperatura menor que 150°C.
- 50 11. Concentrado de ésteres de EPA y DHA obtenido según el procedimiento de la reivindicación 10, caracterizado porque el contenido total de ésteres de EPA y DHA es de al menos el 40% en peso del

concentrado, el contenido de isómeros trans de dichos concentrados es igual a o menor que el contenido de isómeros trans del aceite marino crudo o refinado, teniendo los concentrados propiedades organolépticas neutras y estabilidad oxidativa, siendo su contenido de PCB menor que 90 ng/g y siendo su contenido de dioxinas y furanos como mucho de 2 pg/g de concentrado.

Figura 1

