

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 136**

51 Int. Cl.:

A23L 33/12 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

C11C 1/02 (2006.01)

C11C 1/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2009 E 09776547 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2429317**

54 Título: **Composiciones ricas en ácidos grasos omega 3 con un bajo contenido en ácido fitánico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.06.2016

73 Titular/es:

**NATAC PHARMA, S.L. (100.0%)
C/ Faraday, 7, Parque Científico de Madrid
28049 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

CELA LOPEZ, JOSE MANUEL

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 574 136 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).

Composiciones ricas en ácidos grasos omega 3 con un bajo contenido en ácido fitánico

DESCRIPCIÓN

5

Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere al procedimiento para la obtención de composiciones ricas en ácidos grasos omega 3 con contenido en ácido fitánico inferior a 90 µg por gramo de aceite. La presente invención también se refiere a la obtención de composiciones ricas en DHA con un contenido en ácido fitánico inferior a 90 µg por gramo de aceite, más específicamente entre 650-950 mg/g, es decir, entre el 65% y el 95% en peso de DHA y valores de PhA inferiores a 90 µg, preferentemente inferiores a 5 µg por gramo del aceite que forma la composición. Las composiciones obtenidas se utilizan en el campo de los suplementos alimenticios, de los productos nutricionales y productos farmacéuticos debido a su acción profiláctica y a su efecto terapéutico.

15

Antecedentes de la invención

Los ácidos grasos omega 3 son una familia de ácidos grasos poliinsaturados cuya característica común es que el último doble enlace está ubicado en el tercer enlace C-C a partir del grupo metilo final del ácido graso. Los ácidos grasos omega 3 son esenciales, es decir, el cuerpo humano no puede producirlos internamente y por lo tanto es necesario ingerirlos a través de la dieta o a través de composiciones. Debido a su naturaleza poliinsaturada, los ácidos grasos omega 3 tienen funciones fisicoquímicas muy particulares (es decir, muy bajo punto de fusión) por lo tanto se han estudiado ampliamente. Hoy en día, se sabe que hay hasta 10 ácidos grasos omega 3 (es decir, ácido esteárico), aunque su presencia en el cuerpo humano es en muy pequeñas cantidades y su actividad fisiológica es muy baja o está ausente, a excepción del DHA y/o EPA.

20

El ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico o EPA, así como el 4,7,11,13,16,19-docosahexaenoico o DHA son los ácidos grasos omega 3 con más funciones fisiológicas, especialmente el DHA, que tiene funciones específicas en la retina, el esperma, el tejido neural, etc. El DHA y el EPA tienen funciones fisiológicas comunes, aunque el DHA tiene funciones fisiológicas específicas que no tienen otros ácidos grasos, particularmente en los fotorreceptores, tejido neural y esperma entre otros. El consumo de DHA en dosis elevadas aumenta los niveles de EPA, aunque esto no sucede del revés; además, el DHA no altera la síntesis de otros ácidos grasos (Voss *et al.*, 1992).

30

Desde la perspectiva fisiológica, el DHA es el ácido graso omega 3 de mayor interés desde el punto de vista biológico para el consumo humano. Puesto que el EPA y el DHA están presente en las mismas fuentes alimenticias, y dado que el EPA es más abundante, el EPA ha sido inicialmente el que ha llamado la atención, siendo más fácil de obtener. Sin embargo, el conocimiento de estos dos ácidos grasos en los últimos 15 años ha aumentado significativamente el interés por el DHA y por su necesaria purificación ya que, salvo excepciones, como mucho está presente en no más del 10-15 % de las grasas en las fuentes alimenticias más abundantes.

35

La mayoría de las fuentes de obtención de los ácidos grasos omega 3 ricos en DHA son de origen marino: microalgas (es decir, *Schizochytrium sp.*, *Cryptocodinium sp.*, *Ulkenia sp.*, *Euglena sp.*), crustáceos (es decir, krill *Euphausia superba*), peces ricos en grasas (es decir, *Thunnus ibynnus thynnus* o atún rojo), y mamíferos marinos; además de hongos y levaduras (es decir, *Yarrowia lipolytica*) y bacterias (es decir, *Lactobacillus spp.*).

40

La fuente más abundante, con mayor pureza y más adecuada de obtención de ácidos grasos omega 3 ricos en DHA para el consumo humano es el pescado, dado que se producen 140 millones de toneladas de pescado y marisco por año (FAO, 2007) y se estima que la producción de aceite de pescado representa 1 millón de toneladas métricas anuales (IFFO, *International Fishmeal & Fish oil Organization*). El pescado más adecuado es el atún y otras especies con el mayor contenido de omega 3, siendo el porcentaje de DHA superior al 20% en peso; además, puesto que son productos alimenticios, presentan la mayor garantía y seguridad en la salud pública. Por otro lado, junto con el pescado, el krill representa la mayor reserva y biomasa de DHA del planeta. Sin embargo, la explotación del krill para obtener ácidos grasos omega 3 representa un riesgo importante y conocido para las cadenas tróficas y el desarrollo de las especies y de los peces necesarios en la dieta humana. Una posibilidad en el futuro sería obtener tal krill en criaderos de krill, donde no habría riesgo para las cadenas tróficas y además se podrían reproducir en un ambiente libre de contaminantes que podría existir en las aguas marinas.

50

Numerosos autores consideran que el DHA es un nutriente deficiente en la mayor parte de las dietas a nivel mundial. Pero, además de su importancia como tratamiento en las enfermedades de deficiencia de DHA, su acción fisiológica lo convierte en el cofactor de más interés para el tratamiento y la prevención de las enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer o la esquizofrenia; las enfermedades degenerativas de la retina, el cáncer, las enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias crónicas articulares y dermatológicas, renales y urológicas (próstata), alopecia androgénica, alteraciones de la fertilidad masculina y femenina, trastorno déficit de atención primaria o hiperactividad, desarrollo intelectual y cognitivo, así como necesario para el desarrollo

60

visual y en particular de la región macular, enfermedades cardiovasculares, la diabetes y la hipertrigliceridemia.

Para el tratamiento de numerosas patologías es necesario usar dosis decenas de veces superiores a las obtenidas solo con la dieta (en general > 2-4 gramos) lo que hace necesario obtener composiciones de DHA con altas purzas
5 para lograr el consumo de dosis adecuadas (es decir, para obtener una dosis de 4 gramos de DHA a partir de composiciones de aceite al 20% sería necesaria la ingesta de 20 gramos de aceite o 40 geles blandos convencionales de 500 mg).

Los ácidos grasos poliinsaturados son altamente inestables en su forma libre, por tanto su ingesta oral requiere
10 estabilización, lo que puede lograrse a través de esterificación o unión a otras moléculas tales como el glicerol y el etanol, que los hacen más estables y aumenta su biodisponibilidad. El primero vehículo (glicerol) permite una mayor pureza (triglicérido), estabilidad y presenta una máxima biodisponibilidad, evitando la presencia de alcohol, que es particularmente importante en los casos de necesitar dosis altas y cuando, en numerosas aplicaciones, su uso es crónico, además de en el caso de mujeres embarazadas y niños. Se ingieren los triglicéridos en concentraciones
15 centenares de veces superiores como parte de los alimentos normales y son la fuente natural de nutrición y farmacocinética de los ácidos grasos en los tejidos diana. La farmacocinética de los triglicéridos es máxima y permite la máxima pureza del principio activo, el DHA, y por lo tanto los triglicéridos de DHA presentan la mejor absorción y tienen más implicaciones fisiológicas y metabólicas.

En paralelo a la sensibilidad aumentada hacia la relación entre los alimentos y la salud, hay una aceptación
20 aumentada del pescado como una fuente nutritiva saludable. El pescado es una fuente importante de proteínas de alta calidad, minerales y vitaminas, además de ácidos grasos omega 3 poliinsaturados, cuyos beneficios para la salud son bien reconocidos. Sin embargo, un estudio reciente destaca el riesgo asociado con contaminantes ambientales tales como el mercurio y las dioxinas, que como se sabe se acumulan en el pescado.

La síntesis de ácidos grasos y la cadena trófica en los seres vivos son responsables de las propiedades
25 fisicoquímicas de las membranas y de su adaptación fisiológica a las condiciones ambientales (es decir, temperatura). Los ácidos grasos con menor punto de fusión (PF) encontrados en los fosfolípidos y grasas de los seres vivos son el ácido pristánico (PA), el ácido fitánico (PhA), EPA, DHA, el ácido araquidónico (AA) y el ácido esteárico (SDA), que proporcionan condiciones fisiológicas óptimas en bajas temperaturas. Los organismos usan
30 dos estrategias químicas para obtener ácidos grasos con un PF muy bajo: la metilación y la insaturación de los ácidos carboxílicos. Teniendo en consideración las condiciones extremas encontradas en los organismos de origen marino, no es de extrañar que las fuentes más ricas de tales ácidos grasos estén principalmente en aguas marinas frías. En este sentido, los ácidos grasos con el menor PF encontrados en la naturaleza, alimentos y en los productos
35 grasos derivados tales como los aceites de origen marino, son los ácidos grasos de cadena ramificada largos ($C > 18$) con varios grupos metilo, de los cuales el PhA es el que está presente en las mayores concentraciones, y los ácidos grasos lineales omega 3 de cadena larga omega 3 ($C \geq 18$), en donde los dos más importantes por su concentración y abundancia son el DHA y el EPA.

El PhA está presente en la dieta humana o en los tejidos animales a donde puede llegar a partir de la clorofila de las
40 plantas. El PhA se forma a partir del alcohol correspondiente, el fitol, y se oxida para formar PA, lo que explica por qué es habitual encontrar al PA y al PhA juntos. El PhA está implicado en una patología humana, el síndrome de Refsum, el cual se caracteriza por una acumulación de PhA en la sangre y los tejidos, habiéndose descubierto posteriormente que se relaciona con una deficiencia en la ruta de la alfa-oxidación en el hígado.

Mientras que la mayoría de los alimentos contienen menos de 5 μg de PhA/g, los de más alto contenido superan 1
45 mg de PhA/g, y en el caso del pescado se superan los 750 $\mu\text{g}/\text{g}$, siendo su cantidad proporcional al porcentaje de grasa. Se considera como el alimento con la mayor concentración de PhA y de mayor riesgo (Grupo III) para el consumo en enfermedades tales como la Retinitis pigmentaria (RP) y defectos en la oxidación del PhA tales como la enfermedad de Refsum. Por otro lado, los procedimientos de separación de las grasas en la producción de aceite de
50 pescado aumentan de forma significativa la concentración de PhA.

Se conoce que la fracción grasa del pescado es la principal fuente en la dieta de los ácidos grasos omega 3 DHA y
55 EPA, pero también es la principal fuente de PhA. Las fuentes con mayor contenido en EPA y DHA representan la mayoría de la ingesta de DHA y EPA, estando asociadas al mismo tiempo con las más altas concentraciones y fuente de ingesta de PhA. El DHA y el PhA comparten las mismas fuentes, más allá de los productos de uso alimentario y farmacéutico, hallando así las concentraciones más altas de DHA y de PhA en los productos de origen marino y microbiano. Normalmente el PhA se encuentra conjuntamente con el EPA y DHA. Las bacterias, los hongos y las microalgas son los organismos en la naturaleza con la concentración más alta de PhA. Los aceites
60 obtenidos de microorganismos con un rico contenido de DHA y la menor proporción de PhA, con frecuencia superan los 100 $\mu\text{g}/\text{g}$.

Todas las dietas occidentales estudiadas, que incluyen la mediterránea, tienen una ingestión diaria de 100-150 mg de DHA, mientras que numerosos autores establecen una necesidad diaria de 200-300 mg. El DHA es el único

nutriente para el que prácticamente toda la población del mundo es deficiente en su dieta.

Un punto muy importante que no se muestra habitualmente en la bibliografía es que el DHA de la dieta es el 100% de origen animal, dado que no existe DHA en los alimentos de origen vegetal (salvo algunas algas que no son de uso alimentario). Por lo tanto, la necesidad de los vegetarianos es mucho más alta, en particular de los veganos estrictos, y donde pueden encontrarse los niveles más bajos. Su deficiencia es incluso mayor y algunos autores la consideran como un marcador en la enfermedad Retinitis pigmentaria (RP) así como en enfermedades neurodegenerativas metabólicas asociadas con defectos de peroxisomas.

Dado el generalizado interés en la purificación de los ácidos grasos omega 3 principalmente de DHA, de EPA o de los dos, durante décadas ha habido numerosas patentes y procedimientos regulares para obtener aceites refinados ricos en DHA y EPA para obtener purezas más altas.

Sin embargo, como se muestra en la figura 3, los aceites refinados y purificados existen en el mercado, y que se obtienen con procedimientos patentados y de buenas prácticas de fabricación (BPF), contienen altos niveles de PhA, incluso en aquellos aceites con una alta pureza en DHA.

Efectos negativos del PhA en la salud.

El PhA es un factor de riesgo para la salud pública ya que induce el cáncer de próstata, mama, colon... así como trastornos neurológicos y visuales (Lloyd-MD *et al.*, 2008; Allen-NE *et al.*, 2008; Thornburg-G *et al.*, 2006; Xu-J *et al.*, 2005). Además es citotóxico (Komen-JC *et al.*, 2007; Schönfeld et Reiser, 2006; Schönfeld *et al.*, 2006, Heinz, 2005; Elmazar y Nau, 2004). La ingesta de PhA es un factor de riesgo para el desarrollo y/o evolución de las enfermedades: oftalmológicas (retina, cataratas, ojo seco,...), alteraciones olfativas y auditivas, neurológicas (Alzheimer, encefalopatía...) y alteraciones psiquiátricas, alteraciones nefrológicas, cardiovasculares (anomalías eléctricas S. Purkinje, alteraciones del músculo liso, cardiopatía isquémica, aterosclerosis), miopatías y severa amiotrofia grave, alteraciones óseas, alteraciones hepáticas, alteraciones de la fertilidad masculina y femenina, enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias crónicas (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, LES) y cáncer (próstata, colon, mama, riñón, ovario, algunos tipos de leucemia, etc.).

Los mecanismos exactos mediante los cuales el PhA es tóxico para los tejidos neurosensorial y neural, corazón, riñón, hígado, intestino, músculo liso y estriado, próstata, mama, esperma, pulmón y sistema óseo se están siendo esclareciendo gradualmente. Los mecanismos mejor conocidos están relacionados con la sobreexpresión de marcadores tumorales (la alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACAR) o la SPC-2) y la acción desacoplante protonófica de la cadena de transporte de electrones respiratoria en la mitocondria, y en las membranas citoplasmáticas (es decir, fototransducción en la retina). A una dosis muy baja, el PhA es una de las moléculas con mayor inducción de estrés oxidativo *in vivo*, potencia la teratogénesis y es un gran inductor de la aterosclerosis y la muerte por insuficiencia cardíaca.

El PhA es directamente tóxico para la mitocondria y presenta una potente actividad aterogénica. El PhA tiene una actividad tipo rotenona en el desacoplamiento del complejo I en la fosforilación oxidativa en la membrana interna de las mitocondrias, que da como resultado la producción posterior de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación *in vivo* del DHA, y otros ácidos grasos poliinsaturados o PUFA (Kahler-S *et al.*, 2005). Reduce los niveles de DHA en los fosfolípidos, principalmente en los fotorreceptores y el tejido neural, aumentando la sensibilidad a la isquemia, a las lesiones cardiovasculares por reperfusión y a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL_{ox}), aumentando la actividad antiinflamatoria macrófaga, reduciendo la actividad energética y metabólica (inhibiendo la fosforilación oxidativa) e induciendo la mutación del ADN mitocondrial. Esta actividad metabólica tóxica explica por sí misma porqué los fotorreceptores, epitelio pigmentario, tejido neural, corazón (células de Purkinje), riñón, hígado, ovario, esperma, pulmones... todos tejidos ricos en mitocondrias, son los primeros en verse afectados en pacientes con elevadas concentraciones de PhA. El PhA induce apoptosis mediada por Ca²⁺ en las células de Purkinje (Powers-J.M *et al.* 1999) y muerte súbita cardíaca en modelos animales. El PhA produce isquemia, apoptosis de la musculatura lisa vascular, es aterogénico y en particular cardiotóxico. Una deficiencia en la proteína de transporte de esterol-2 (SPC-2) produce la muerte súbita cardíaca por acumulación de PhA en ratones. El PhA induce apoptosis en cultivos de células del músculo liso vascular (CMLV) en seres humanos, ratones y cerdos.

La actividad modificada de reabsorción de Ca⁺² y la apoptosis de osteoclastos debidas al PhA da como resultado anomalías óseas. Las proteínas unidas a Ca²⁺ en las membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores, en donde la calmodulina está particularmente concentrada, son responsables del flujo de Ca²⁺ que controla múltiples acontecimientos en fotorreceptores, que incluye fototransducción y transducción sináptica. La función de la calmodulina está mediada por numerosas proteínas ligadas a ella, que incluye GTPasas. Cuando se reduce la concentración de la calmodulina en los fotorreceptores, se producen defectos en la visión, en particular en la adaptación a la luz y a la oscuridad.

El PhA es directamente tóxico para las células ganglionares ciliares afectando a los nervios ganglionares parasimpáticos en la región posterior de la órbita ocular, responsables de la contracción de la pupila y de la acomodación de la visión (presbicia, hipermetropía, fotosensibilidad, etc). El PhA interfiere con la función de células ciliares, del cuerpo basal y de las proteínas unidas a los microtúbulos requeridas para la biogénesis del cilio, que
 5 mediada la interacción de los diferentes tipos de miosina y prenilación de las Rab GTPasas en el cilio primario de los fotorreceptores, que afecta el transporte de proteínas esenciales tales como opsina, a células olfatorias, la cóclea, las células renales, el sistema respiratorio, el esperma, las microvellosidades intestinales, así como al movimiento de los melanosomas en el epitelio pigmentario de la retina. La RP, que presenta alteraciones en el metabolismo del PhA, es un modelo de la alteración de las células ciliares, encontrándose anomalías del axonema del esperma y de
 10 los bastones ciliados, que afectan a la renovación de los segmentos externos de los bastones que dependen del cuerpo ciliar, dando como resultado daño visual irreversible. Además, en la RP con síndromes no asociados, se encuentran alteraciones de los potenciales evocados auditivos y alteraciones de la audiometría compatibles con las alteraciones cocleares características de las células ciliares. Las alteraciones significativas del cuerpo ciliar dan como resultado RP y sordera de una manera que es comparable al síndrome de Usher y otros tales como en
 15 pacientes no asociados a síndromes con alteraciones auditivas.

Las proteínas G pequeñas de la familia Rho y Rab necesitan la adición de estos residuos isoprenilo a su extremo C para la función normal de la GTPasa. La ruta de señalización de la Rho-GTPasa es críticamente necesaria para la dirección de la intervención terapéutica en enfermedades nefrológicas, trastornos neurológicos (mielinización),
 20 progresión del cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, etc. El PhA y otros isoprenoides afectan la señalización de la Rho-GTPasa, en particular la ruta Rac, de manera opuesta al DHA y las estatinas. El PhA modifica a las Rho-GTPasas de manera comparable a algunas toxinas bacterianas en el epitelio y en la mucosa respiratoria y digestiva para desarrollar los procesos infecciosos e invasivos; procesos tumorales y metástasis (es decir, próstata, mama), lesiones renales (glomerular, tubular etc.) y desmielinización.

25 Estas GTPasas son el mecanismo principal que explica por qué el DHA sin el PhA es más eficaz que el resto del DHA con el PhA en numerosas aplicaciones de la presente innovación.

30 Siguiendo esta misma línea, el PhA y el PA son controladores de los principales y más potentes mediadores de los fenotipos angiogénesis y de inflamación. La inducción de la angiogénesis, TNF alfa, GBP-1, GBP-2 y citocinas inflamatorias (CI) mediante PhA y PA es un factor determinante para el desarrollo de cáncer (metástasis), enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas, renales, pulmonares y neurológicas.

35 El PhA se convierte en PA por oxidación, y ambos, el PhA y el PA inducen apoptosis mediada por la formación de UNAM de la óxido nítrico sintetasa y elevadas concentraciones de la proteína dentro de las 2 horas del tratamiento (Idel *et al.*, 2002). Además, el PhA y el PA controlan los principales y más potentes mediadores del fenotipo de la angiogénesis y la inflamación. También, el PhA y el PA son los inductores más potentes de la activación y secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Idel *et al.*, 2002). La expresión de la proteína de unión a guanilato humana (GBP)-1 se induce altamente por citocinas inflamatorias (CI) y, por lo tanto, pueden caracterizar células activadas por CI. GBP-1 es un marcador de activación celular nuevo que caracteriza el fenotipo activado por CI de células
 40 endoteliales. GBP-1 es un regulador principal de la respuesta antiangiogénica de células endoteliales a las CI. GBP-1 es una proteína citoplasmática y su expresión en células endoteliales se induce de forma selectiva mediante interferón-gamma, interleucina-1 alfa, interleucina-1 beta o TNF-alfa, pero no mediante otras citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento. El PhA y el PA son inductores de TNF alfa y del interferón gamma. La expresión de GBP-1 está altamente asociada con las células endoteliales vasculares pero era indetectable en la piel, pero estaba altamente inducida en vasos de enfermedades cutáneas con un componente altamente inflamatorio que incluye psoriasis, reacciones farmacológicas adversas y sarcoma de Kaposi. Se ha demostrado que la expresión de GBP-1 y de la metaloproteínasa-1 de la matriz (MMP-1) está inversamente relacionada *in vitro* e *in vivo*, y que GBP-1, pero
 45 no la expresión de otras proteasas, inhibe selectivamente la expresión de MMP-1 en células endoteliales. Este último hallazgo indicó que la inhibición de la formación de capilares se debe específicamente a la represión de la expresión de MMP-1 mediante GBP-1, y no se ve afectada por la actividad antiproliferativa del dominio helicoidal de GBP-1 (Guenzi *et al.*, 2003).

50 El PhA potencia los efectos teratogénicos del ácido retinoico (Elmazar & Nau, 2004), teniendo particular relevancia, dado el DHA que está frecuentemente asociado con el PhA, está recomendado durante el embarazo, la lactancia y en los alimentos infantiles.

60 La retinitis pigmentaria (RP) es un modelo ideal para estudiar la toxicidad del PhA en presencia del DHA, como se verá adicionalmente a lo largo de este documento. Las propiedades fisicoquímicas del PhA lo hacen un importante competidor del DHA cuando se incorpora en la posición 2 de los fosfolípidos (la posición habitual del DHA en los fotorreceptores). El PhA tiene un número elevado de enlaces con libre rotación (14) y tiene un punto de cristalización muy bajo, permitiendo una elevada fluidez en la membrana. Sin embargo, el PhA carece de la conformación estructural característica del DHA para las interacciones Van der Waals con la hélice alfa de la rodopsina,

necesarias para su movilidad en la membrana y estructura terciaria. En consecuencia, el PhA reduce la actividad de la rodopsina y de la fototransducción. El PhA tiene la capacidad de desacoplar las membranas de los fotorreceptores dando como resultado el fracaso de la fototransducción (hiperpolarización continua) hallada en la RP. El PhA no es sensible a la degradación por oxidación y es resistente a las condiciones distróficas tales como las encontradas en la RP. Esto ocurre especialmente en casos de deficiencia en DHA, tal como en la RP, consecuencia de la distrofia, donde es la única enfermedad donde hay una deficiencia de DHA, considerándose la un marcador de la enfermedad.

El PhA modifica la función de los fotorreceptores a través de su incorporación a los fosfolípidos y triglicéridos, desplazando al DHA (McColl y Converse, 1995; Powers *et al.*, 1999, Mönning *et al.*, 2004) y reduciendo los niveles de DHA debido a la lipoperoxidación y el daño mitocondrial que induce el PhA. El PhA también tiene la capacidad tóxica para actuar como transportador de protones (agente desacoplante) no sólo en la mitocondria sino también en las membranas de los fotorreceptores (Gutknecht-J, 1988), alterando así la polarización de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Desplazamiento del DHA por el PhA.

El PhA modifica la función de los fotorreceptores a través de su incorporación a los fosfolípidos y los triglicéridos, desplazando así al DHA del segundo carbono de los fosfolípidos en las membranas de ERO y la mitocondria. Por lo tanto, el desplazamiento del DHA de las membranas por PhA modifica la función de los fotorreceptores, comportándose como un antagonista del DHA en la fototransducción, alterando la homeostasis del calcio y la regeneración de la rodopsina. El desplazamiento del DHA mediante PhA es uno de los diversos mecanismos de acción en algunas enfermedades (es decir, ER = enfermedad de Refsum), siendo un mecanismo parcialmente patógeno.

Mientras que el DHA es un inhibidor de la apoptosis así como un factor neurotrófico o de supervivencia para los fotorreceptores, el PhA es uno de los inductores de la oxidación y apoptosis *in vivo* más potentes, interfiriendo de manera antagonista con los mecanismos de acción del DHA. Los niveles de PhA en el aceite interfieren con la actividad del DHA, dado que la capacidad del DHA para inhibir la apoptosis en la retina está reducida mediante la presencia del PhA de una manera dependiente de la dosis.

El PhA produce apoptosis en los fotorreceptores en modelos animales con RP, produciendo un daño irreversible en las mitocondrias. En estas condiciones, los péptidos responsables de la supervivencia de los fotorreceptores son incapaces de inhibir la apoptosis. Sin embargo, el DHA, es el único ácido graso que neutraliza las especies reactivas en la retina en estados distróficos. El PhA es particularmente citotóxico en las retinas distróficas y el DHA reduce sus efectos. Se ha probado que el DHA es un inhibidor del estrés oxidativo y del daño mitocondrial irreversible que provoca la degeneración de los fotorreceptores (Rotstein *et al.* 2003).

Por lo tanto, puede concluirse que el PhA, además de ser citotóxico, es un antagonista del DHA, con todo lo que esto implica. Concretamente, el PhA, de manera antagonista para el DHA, induce la apoptosis a través de la mitocondria.

En la actual invención se han desarrollado dos experimentos preclínicos que inducen apoptosis en los fotorreceptores con Paraquat (Figura 1) y MNU (figura 2), para estudiar el efecto anti apoptosis del DHA *in vitro* e *in vivo* en relación con la concentración del PhA. En los dos experimentos se demuestra que la capacidad anti apoptótica de DHA en los fotorreceptores está inversamente correlacionada con la concentración de PhA. La actividad anti apoptótica más alta se obtiene con concentraciones entre 0 y 20 µg/g, aquí la proporción Bcl-2/Bax era significativamente más baja que en los ratones alimentados con < 5 µg/g.

Toxicidad del PhA

No es necesaria una alteración metabólica o interacción farmacológica o alimentaria de la oxidación del PhA para presentar toxicidad, puesto que una dosis nutritiva de PhA a través de una dieta convencional también da como resultado variaciones significativas del PhA y aumento del riesgo para la salud y de toxicidad. A modo esquemático la toxicidad del PhA a través de su consumo a dosis bajas está relacionada con las situaciones siguientes:

1. Dentro del proceso oxidativo del PhA se incluye parte del proceso fisiopatológico: la inducción de la AMACAR. El efecto del PhA en la salud también se determina por la sobreexpresión de determinados marcadores moleculares asociados con numerosos cánceres de gran valor epidemiológico: cáncer de próstata, cáncer colorrectal y de células renales. Hay evidencia de que este mismo marcador se relaciona con cánceres de ovario, mama y endocrinos relacionados con una resistencia a la insulina. El PhA es esencial para la supervivencia de varias líneas celulares tumorales (próstata, riñón, mama, colon, pulmón) dando como resultado la sobreexpresión de la AMACAR y de SPC-2. Se han descrito casos con deficiencias en AMACAR con neuropatía, RP y un aumento de PhA y PA (Ferdinanduse *et al.*, 2000).

2. Deficiencia en la oxidación del PhA con acumulación aumentada de PhA en pacientes de RP, tal como en la enfermedad de Refsum infantil o de adulto, el síndrome de Zellweger, la adrenoleucodistrofia neonatal y la condrodysplasia punctata rizomélica.

5 3. Sin embargo, otras enfermedades genéticas presentan aumentos del PhA en comparación con la población normal debido a defectos en los peroxisomas tales como en: a) Enfermedades con mitocondriopatías (Complejo IV), deficiencia de COX, síndrome de Leigh, síndrome Renal Fanconi (Fingerhut R *et al.*, 1994).

10 4. se eliminan más de 50 mg/día de PhA a través de oxidación y del citocromo P450. Se conoce bien que el citocromo P-450 mediada la oxidación del PhA, pero también se conoce que existen fuertes inhibidores del citocromo P450 (es decir, antimicóticos azólicos, ácido valproico, cimetidina, eritromicina, sulfametoxazol, opioides, ciclosporina, inhibidores de la proteasa, antidepressivos, hiperforina, barbitúricos, antihistamínicos, tamoxifeno, cannabinoides, S-warfarina, etc.). Así, ciertos fármacos pueden aumentar la concentración del PhA de manera significativa. Numerosos tratamientos farmacológicos inhiben la degradación metabólica del PhA, que se acumula y se hace principalmente retinotóxico, neuro y cardiotóxico. El PhA puede interactuar con los antagonistas del calcio, agentes anti angiogénicos, inmunosupresores y antiinflamatorios. La rápida oxidación del PhA (alfa-oxidación=90 % de oxidación del PhA) en el cuerpo humano está mediada por diferentes isoenzimas del citocromo P-450 (es decir, CYP2C8). Uno de los fármacos más destacados, debido a su interés comercial y uso, son los fármacos hipolipemiantes: los fibratos y las estatinas, los inhibidores del P450 CYP2C8 que inhiben fuertemente el metabolismo oxidativo del PhA, dando como resultado una acumulación del PhA. Los fibratos activan la β -oxidación en los peroxisomas, pero la degradación del PhA necesita la alfa-oxidación que se inhibe mediante los fibratos a través de la inhibición del citocromo P450 CYP2C8. El PhA es en parte probable responsable de su principal efecto secundario: la rabdomiolisis.

25 5. Deficiencias secundarias en la oxidación del PhA: en la enfermedad de Alzheimer se reduce en los peroxisomas la actividad de las enzimas dependientes de tiamina, dando como resultado una cantidad reducida de la hidroxifitanoi-CoA liasa necesaria para la oxidación del PhA. En paralelo, al aumento en los niveles de acetilcolina encontrado en la enfermedad de Alzheimer se ha hallado un aumento de los niveles de PhA.

30 6. Alteraciones nutricionales (anti metabolitos: tiaminasas y antagonistas de tiamina, acetilcolina) que afectan al descenso de la tiamina, donde el pirofosfato de tiamina es un cofactor en la oxidación del PhA (a través de las ligasas) así como deficiencias en la tiamina de las cuales las más conocidas son las relacionadas con el síndrome de Wernicke-Korsakoff, la enfermedad cardiovascular fatal beriberi y el síndrome neurotóxico debido a consumo de carpa y salmónidos. Los antagonistas de la tiamina se encuentran en sustancias tales como conservantes alimentarios (es decir, sulfitos) procedentes de plantas y alimentos frecuentes (es decir, té, uva, cítricos...), resistentes a la ebullición (orto e hidroxifenoles) como el ácido caféico, el ácido clorogénico y el ácido tánico, la quercetina y la rutina (muy utilizados en farmacología y como complementos alimenticios); las tiaminasas procedentes de los alimentos (frecuentes en el pescado, principalmente de piscifactorías, el 80% del consumo), rumen, productos lácteos y carnes de rumiantes: los alimentos ricos en PhA); consumo de alcohol, zumo de pomelo (y en menor grado el zumo de naranja, mandarina, manzana, uva y sus derivados) y la cafeína, pueden aumentar en menor grado los depósitos de PhA. Un modelo interesante es una enfermedad genética que produce deficiencia de tiamina y sordera neurosensorial. El alcohol y la piritiamina (antimetabolito de la tiamina) sólo necesitan 100 μ g/ml para producir deficiencia grave de tiamina en menos de 7 días. Estas interacciones hacen notar que no sólo es importante evaluar la cantidad de PhA y fitol contenida en los alimentos, sino que los alimentos asociados a la dieta, los tratamientos farmacológicos, los complementos alimenticios y los hábitos pueden afectar a la acumulación del PhA procedente de la dieta.

50 7. Por otro lado, los datos epidemiológicos no dejan duda con respecto al efecto tóxico a dosis que se consideran normales (50-100 mg/día), siendo tóxico a dosis tan bajas como 0,1 μ mol/mg de grasa. Incluso a concentraciones mucho más bajas, el PhA es una de las moléculas con mayor capacidad inductora de oxidación *in vivo*, interactuando con algunos mecanismos fisiológicos esenciales del DHA y reduciendo sus niveles *in vivo*, dañando su estructura a través de la lipoperoxidación. A concentraciones en sangre muy bajas, 300 μ g/ml o < 1 mmol/l (<1% total de ácidos grasos) y aproximadamente el 5-10% del total de ácidos grasos del tejido nervioso, produce una neuropatía grave y la muerte. En estudios de toxicidad *postmortem* asociados a la acumulación de PhA (enfermedad de Refsum) los niveles más altos encontrados en solo algunos tejidos habían llegado al 8,5% del total de ácidos grasos²³. La enfermedad de Refsum, tanto en adultos como en niños, con acumulación grave de PhA, es un modelo ideal para estudiar la toxicidad del PhA que incluye retinitis pigmentaria, nistagmo, hipotonía, ataxia, retraso mental y del crecimiento, dismorfias faciales y óseas, hepatomegalia e hipocolesterolemia.

60 DHA y PhA

La toxicidad del PhA está relacionada con enfermedades y situaciones en donde se recomienda y utiliza la ingesta de DHA, tal como la retinitis pigmentaria (RP), en donde el DHA se comporta como un marcador de la enfermedad y

el PhA es el agente etiológico de la RP. Las enfermedades que comúnmente requieren DHA para su tratamiento al mismo tiempo son inducidas por el PhA. Además de las oncológicas la más evidente de todas es la RP. Los ácidos grasos de cadena ramificada PhA y PA, son marcadores en distintas enfermedades de RP (Refsum, adrenoleucodistrofia neonatal (NALD), condrodisplasia punctata rizomélica, Zellweger, Usher IV) asociadas con un defecto en el metabolismo de la alfa y betaoxidación del PA. El PhA es la única causa de la RP en estos casos.

Durante décadas se ha sabido que existen deficiencias de DHA en todos los tejidos diana en la RP. Todos los pacientes con RP presentan alteraciones en el metabolismo del DHA y una parte significativa de los mismos tiene concentraciones elevadas de PhA que, hasta cierto punto, es la causa de la evolución de la enfermedad. El grado de deficiencia de DHA no está asociado con la evolución y el pronóstico de la enfermedad. En este sentido, la RP autosómica dominante no sistémica es la más benigna de todas las formas hereditarias (Cela-López, Jm, Tesis Doctoral), incluso en niveles de DHA que estaban por debajo de los tomados de forma esporádica (Schaefer *et al.* 1995). Sin embargo, la ingesta oral de 2 g/día de DHA en pacientes con XLRP no normalizan los niveles de DHA, debido a una pérdida de DHA en retinas distróficas, siendo necesario ingerir 4 g/día para normalizar los niveles de DHA en los fosfolípidos de los eritrocitos. La evolución y el pronóstico de los diversos tipos de RP dependen de la dosis farmacológica del DHA y del momento de inicio de su ingesta, así como de los niveles del PhA. Por lo tanto, se puede afirmar que la concentración de PhA está relacionada con el peor pronóstico en la evolución de la enfermedad y en la pérdida de la función central (región macular).

20 **Se han encontrado niveles aumentados de ácido fitánico en los tratamientos con “DHA”**

Cuatro muestras de 4 pacientes llegaron al laboratorio de los inventores para evaluar el efecto beneficioso de un tratamiento con DHA en dos síndromes con RP. El tratamiento con 4 g/día de DHA (4,86 mg de fitánico) de cuatro pacientes con enfermedad de Refsum juvenil y síndrome de Zellweger durante 3 meses, aumentó la presencia de ácidos grasos de cadena ramificada: fitánico y pristánico en el 50% y el 44%. De modo paralelo, se observó un empeoramiento completo del estado clínico: neurológico, sordera y RP (agudeza visual y campo visual). El Laboratorio de Enfermedades peroxisómicas del Kennedy Krieger Institute (Baltimore) informa de manera rutinaria en todos los resultados analíticos a todos los pacientes que estudian durante el año, que la ingesta de DHA de pescado aumenta los niveles tóxicos de ácido fitánico y por tanto siempre recomiendan el DHA de algas. Los datos muestran que los concentrados comerciales de DHA son tóxicos en pacientes con RP asociado con defectos peroxisómicos.

En 1994, la Asociación de Pacientes con RP (AARPE España) llevó a cabo un estudio con 17 pacientes con RP con o sin síndromes (Refsum, Zellweger, NADL, Kearns, Bordet-Bield, RP autosómica recesiva y RP esporádica) que tenían niveles aumentados de ácido fitánico en plasma. Todos tomaron aceite de DHA con distintas cantidades de ácido fitánico (desde 5 mg hasta 11,5 mg por día) en periodos variables de 1 mes hasta 3 años. Todos ellos mostraron niveles aumentados de ácido fitánico desde el 23% hasta el 82%, independientemente de la fuente de aceite de pescado. Tras 1 año, la progresión de la RP fue mayor de lo esperado en pacientes con RP sin síndromes (11 pacientes) (AV 8,3% menos), aunque en aquéllos con síndromes (6) la pérdida de función visual fue bastante valiosa. Posteriormente, se retiró el tratamiento con DHA rico en ácido fitánico y se separaron los pacientes en dos grupos de acuerdo con los niveles plasmáticos de ácido fitánico (niveles moderados: 5–30 µg/ml; niveles altos 30–900 µg/ml). Se introdujo el tratamiento con 4 g de DHA bajo en ácido fitánico (<90 µg/ml) y se evaluaron los niveles de ácido fitánico y la función visual. En el grupo con niveles de ácido fitánico moderados (no asociado con síndromes), se observó una reducción progresiva de los niveles de ácido fitánico que se volvieron normales en el plazo de 12 meses (Figura 4). En paralelo, se observó una regresión en la evolución de la enfermedad con una función visual comparable a la obtenida antes de comienzo del tratamiento con DHA rico en ácido fitánico.

50 **La toxicidad del PhA está ligada al consumo de fuentes ricas en DHA y EPA (es decir, atún) dado que está presente en porcentajes muy bajos (aproximadamente el 0,1 %) en los aceites.**

El PhA se encuentra en la dieta del ser humano o en los tejidos animales, en donde puede proceder de la clorofila de extractos vegetales, así es como puede acumularse en los tejidos animales. El PhA se forma a partir del fitol y se oxida formando el ácido pristánico (PA). Dadas las importantes variaciones que existen en la dieta grasa de la población (vegetarianos, ovolactovegetarianos,...), se han encontrado variaciones (hasta 6,7 veces) den los niveles de PhA en sangre relacionados de forma exclusiva con el consumo de PhA a partir de la dieta convencional, donde las dietas vegetarianas presentan hasta 10 veces menos PhA mientras que, al mismo tiempo, son extremadamente deficientes en DHA.

Mientras que el ácido fitánico es un factor de riesgo para el cáncer de próstata, el DHA es un factor protector para el mismo tipo de cáncer. Las pruebas superan a los numerosos estudios moleculares y están apoyadas por datos epidemiológicos y numerosos estudios farmacológicos, algunos de los cuales están muy avanzados (Fase II), con respecto al papel del DHA en combinación con otros fármacos quimioterapéuticos (celecoxib, plaquetaxel) en la prevención y el tratamiento de primario del cáncer de próstata así como del cáncer gástrico (Ballet *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007). También existen pruebas epidemiológicas suficientes del papel del ácido fitánico en la inducción

de cáncer de próstata (Walsh, 2005; Xu *et al.*, 2005; Thornburg *et al.*, 2006; Mobley *et al.*, 2003). Además, existen tres estudios separados que asocian la ingesta de pescado graso, carne roja y productos lácteos (fuentes con las concentraciones más altas de ácido fitánico) con el cáncer de próstata.

5 En el campo de las patentes, se conocen documentos para refinar aceites que contienen EPA y DHA, tales como el documento US 4.874.629 (1989) que se refiere a un procedimiento para tratar aceites que contienen ácidos grasos omega 3, tal como de salmón, sardinas y otros pescados que contienen EPA y DHA y consiste esencialmente en : a) someter el aceite a destilación al vacío a 30-150 °C durante 2-5 horas y poniendo en contacto el aceite con un adsorbente seleccionado entre gel de sílice y ácido silícico para reducir la alta temperatura de ebullición y los
10 sabores polares más volátiles y otros constituyentes no deseados tales como polímeros, colesterol, pigmentos, pesticidas y metales pesados; y b) recuperar posteriormente el aceite de la mezcla. Más tarde, los mismos autores, en el documento US 5.023.100 aplican el procedimiento anterior para producir un aceite comestible con EPA y DHA, que puede combinarse con aceite vegetal y/o aceite de romero para mejorar su estabilidad oxidativa.

15 Asimismo, el documento US2008/0268117 A1 describe un método para refinar aceites que contienen EPA y DHA que comprende: (a) añadir al aceite un alcohol alifático de C1-C4, preferentemente etanol en solución acuosa al 60-70 %, a una temperatura a la que el aceite y el alcohol se separan en dos fases (alrededor de 10 °C); (b) calentar la mezcla hasta que el aceite y el alcohol se hacen miscibles (50-80 °C); (c) enfriar la mezcla a una temperatura en la que el aceite y el alcohol se separan (unos 10 °C); y (d) recuperación de la fase oleosa. Se especifica que tal
20 procedimiento es especialmente adecuado para la preparación de aceites que van a usarse en productos alimenticios y farmacéuticos debido al hecho de que el procedimiento mencionado anteriormente elimina los contaminantes orgánicos tales como el colesterol y los metales pesados tales como el mercurio. De hecho, menciona que los aceites así preparados son especialmente adecuados para preparar una fórmula infantil (documento US 5.013.569) y composiciones para el tratamiento de la artritis reumatoide (documento US 4.843.095).

25 También existen documentos para la obtención de triglicéridos de EPA y DHA, como por ejemplo, el documento ES 2035751 T3 que se refiere a un procedimiento para preparar un triglicérido que tiene al menos un ácido graso largo C8+ en la molécula, que se caracteriza por la interesterificación, en presencia de una lipasa, del ácido graso de cadena larga libre o uno de sus ésteres de alquilo inferiores C1-C4 con un triglicérido que tiene uno o más ácidos grasos de cadena corta C2-C6 en la molécula, y separar mediante evaporación durante la reacción el ácido graso libre de cadena corta o su éster de alquilo inferior, y composición en la que el ácido poli-insaturado es EPA o DHA o una mezcla de ambos. El documento GB 2350610 A describe la preparación de DHA a partir de este aceite como un triglicérido a través de un procedimiento que utiliza una combinación de una transesterificación de los triglicéridos con un alcohol alquílico inferior, destilación y una transesterificación enzimática selectiva con un alcoxi alcohol catalizada por lipasas que pueden inmovilizarse. También, el documento US2008/0114181 A1 se refiere a un método para la esterificación de ácidos grasos en triglicéridos, con alcoholes alifáticos C1-C8. El método utiliza una resina de intercambio iónico ácido como catalizador, la cual se pone en contacto con la mezcla de la reacción que contiene un triglicérido que al menos tiene el 1 % de ácidos grasos libres y un alcohol alifático C1-C8, en condiciones adecuadas para la esterificación.

40 Asimismo, se conoce como obtener EPA y DHA como ésteres etílicos, por ejemplo, en el documento US 5.679.809, que describe un procedimiento para la obtención de un concentrado de ésteres etílicos a partir de ácidos grasos poliinsaturados, preferentemente EPA y DHA, que consiste en mezclar el aceite que contiene los ácidos grasos con etanol en presencia de un catalizador para formar un éster etílico del ácido graso, cuya fase se separa mezclándola con urea y etanol, que después se enfría hasta que se produce una fase sólida y después se separa la fase líquida, a partir de la que se obtiene una fracción enriquecida en los ácidos grasos poliinsaturados deseados. Otro documento que también utiliza la urea para separar los ácidos grasos saturados y la mayoría de los monoinsaturados del resto de ácidos grasos presentes en aceites de animales marinos es el documento EP 0347509 A1, que obtiene como producto final una mezcla de EPA y DHA. El documento US 5734071 que logra un producto que contiene EPA + DHA a partir de un aceite de pescado utilizando un método similar con urea y el documento ES 2018384 que prepara una composición con EPA y DHA en cantidades relativas de 1:2 a 2:1, donde estos ácidos grasos constituyen el 75 % en peso de los ácidos grasos totales, también con un método que utiliza concentración mediante fraccionamiento con urea y destilación molecular y/o extracción con fluido en condiciones supercríticas o cromatografía.

55 El documento ES 2056852 T3 también reivindica un procedimiento para la extracción del éster etílico del DHA a partir de aceite de pescado, que incluye la transesterificación del aceite de pescado con etanol en presencia de ácido sulfúrico, seguido de extracción de la mezcla con hexano, cromatografía en gel de sílice, tratamiento del residuo en acetona enfriada hasta -40 °C, filtración, evaporación de la acetona y destilación molecular en dos etapas a 0,133 Pa, la primera etapa a 80-100 °C y la segunda a 105-125 °C.
60

Existen gran cantidad de documentos que mencionan la utilización del DHA para diversos estados de necesidad y enfermedades mencionados anteriormente. A modo de ejemplo se menciona el documento CN 1557453 (A) que describe una composición para aumentar la memoria y mejorar el conocimiento que comprende la hierba licopodio

dentado, raíz de rhodiola y un concentrado de aceite de pescado con 50 mg de DHA como principio activo. Especifica que fortalece la transmisión de la información entre conexiones sinápticas neuronales, mejorando la resistencia a la anoxia, estabilizando la estructura de las células nerviosas y proporcionando a dichas células nerviosas materia nutritiva esencial.

5 Además, el DHA se ha mencionado en distintos documentos como poseedor de propiedades beneficiosas para la salud, como por ejemplo, como una sustancia nutritiva para el cerebro humano y para revitalizar la inteligencia (documento CN 1130040 (A)). En el documento JP 8098659 (A) se menciona que el DHA, como un éster o fosfolípido, tiene un efecto mejorado frente al estrés. El documento CN 1105205 (A) proporciona una descripción de
10 una cápsula que contiene del 11-45 % de DHA puro junto con calcio, vitaminas y almidón, para tonificar el cerebro y activar la inteligencia. Y el documento ES 2277557 A1 se refiere a la utilización del DHA para la fabricación de una composición farmacéutica dirigida al tratamiento del daño celular oxidativo.

15 También se pueden encontrar en el estado de la técnica documentos para separar y refinar de forma selectiva el EPA y el DHA. Así, el documento EP 1065196 A1 se refiere a un procedimiento para separar y refinar de forma selectiva EPA y DHA o sus ésteres a partir de una mezcla de los ácidos o ésteres, que comprende: (a) pasar un fluido acuoso con una sal de plata a través de una columna con tierra de diatomeas de modo que la sal de plata se adhiera a la tierra de diatomeas; (b) pasar una solución con disolventes de una mezcla que contenga los ácidos grasos altamente insaturados o sus derivados, a través de la columna con tierra de diatomeas y sales de plata; y (c)
20 pasar un disolvente para separar los ácidos grasos deseados.

El documento US 6.846.942 B2 se refiere a un método para la preparación de EPA y DHA puros que comprende: a) disolver la mezcla de DHA y EPA en acetona y añadir iones de magnesio, lo que produce sales de EPA y DHA que tienen distinta solubilidad en acetona, b) enfriar la solución obtenida en (a) para precipitar la sal de EPA, c) filtrar la
25 sal de EPA precipitada, y d) acidificar el precipitado obtenido para obtener EPA puro, y e) evaporar el disolvente del filtrado para obtener el DHA puro. Cuando se obtiene la mezcla de EPA y DHA a partir de un aceite de pescado, este se somete primero a una alcoholisis o saponificación para transformar los triglicéridos en ácidos libres.

30 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de una composición que no solo debe ser beneficiosa para la dieta y la salud debido a la presencia de DHA en cantidades eficaces para la salud, es decir, en cantidades altas de DHA, sino que al mismo tiempo debería contener la menor cantidad posible de PhA para poder evitar sus efectos al ingerir DHA.

35 **Objeto de la invención**

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención es un procedimiento para obtener una composición rica en ácidos grasos omega 3 a partir de un aceite de origen marino, con niveles de PhA inferiores a 90 µg/g, en el que el procedimiento mencionado comprende las siguientes etapas:

- 40 a) se saponifica un aceite de origen marino para la obtención de sales de ácidos grasos.
- b) se acidifican las sales de ácidos grasos de la etapa a) para la obtención de aceite acidificado.
- 45 c) se somete el aceite acidificado de la etapa b) a ultracentrifugación en un gradiente de glicerol a una temperatura de 10 °C en vacío (27 Pa)
- d) se somete el gradiente de glicerol de la etapa c) a cristalización en un intervalo de temperatura de entre 0 y -57 °C, obteniéndose una fase sólida y una fase líquida, en donde la fase sólida contiene ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y PhA y la fase líquida contiene ácidos grasos poliinsaturados omega
50 3 con un contenido en PhA por debajo de 90 µg/g
- e) se separa la fase líquida de la etapa d) de la fase sólida para su recuperación a través de decantación.

Adicionalmente, el procedimiento comprende una etapa adicional en la cual los ácidos grasos omega 3 se esterifican para la obtención de triglicéridos omega 3 con un contenido en PhA por debajo de 90 µg/g.
55

La etapa de saponificación a del presente objeto de la invención, se lleva a cabo en una realización preferente con KOH, agua y etanol agitando la mezcla a una temperatura de 40 °C a 300 rpm durante 1 hora, en una atmósfera inerte. En otra realización preferente, la etapa de acidificación b) se lleva a cabo mezclando las sales de ácidos grasos obtenidas en la etapa (a) con ácido acético al 70 % en una atmósfera inerte a 200 rpm.
60

Si la ultracentrifugación de la etapa c es isopícnica, esto implica que las condiciones de centrifugación usadas deberían ser de 100000 g durante 42 horas. Si la ultracentrifugación es de acuerdo con un gradiente de densidad sin equilibrio, entonces las condiciones de centrifugación deberían ser 100000 g durante 24 horas.

En otra realización preferente, si la etapa de ultracentrifugación es isopícnica, la etapa de cristalización se lleva a cabo a una temperatura de 0 °C.

- 5 En otra realización preferente, si la etapa de ultracentrifugación es isopícnica, la etapa de cristalización se lleva a cabo a una temperatura de -30 °C.

En otra realización preferente, si la etapa de ultracentrifugación es en gradiente de densidad sin equilibrio, la etapa de cristalización se lleva a cabo a una temperatura de - 30 °C

- 10 Un segundo objeto de invención comprende una composición, obtenida siguiendo el procedimiento descrito en la primera invención, de ácidos grasos omega 3 en un intervalo del 65 % al 99 % en peso, con un contenido en PhA por debajo de 90 µg/g, preferentemente con un contenido en ácidos grasos omega 3 en un intervalo del 75 % al 99 % en peso, más preferentemente donde los ácidos grasos omega 3 representan al menos un 90 % en peso.

- 15 En una realización preferente la composición, obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención, comprende ácidos grasos omega 3 en un intervalo del 65 % al 99 % en peso, con un contenido en PhA por debajo de 5 µg/g, preferentemente con un contenido en ácidos grasos omega 3 en un intervalo del 75 % al 99 % en peso, más preferentemente donde los ácidos grasos omega 3 representan al menos el 90 % en peso.

- 20 En otra realización preferente, la composición obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención, los ácidos grasos omega 3 comprenden DHA en un intervalo de entre el 65 % y el 95 % en peso, con un contenido de PhA por debajo de 90 µg/g, preferentemente con un contenido en DHA del 75 % al 95 % en peso, más preferentemente con un contenido en DHA de al menos el 80 % en peso.

- 25 En otra realización preferente, la composición obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención, los ácidos grasos omega 3 comprenden DHA en un intervalo del 65 % al 95 % en peso con un contenido de PhA por debajo de 5 µg/g, preferentemente con un contenido en DHA del 75 % al 95 % en peso, más preferentemente con un contenido en DHA de al menos el 80 % en peso.

- 30 En otra realización preferente, la composición de ácidos grasos omega 3 obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención, comprenden adicionalmente EPA en un intervalo del 5 al 35 % en peso.

- 35 En otra realización preferente, la composición de ácidos grasos omega 3 que comprende DHA obtenida, de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención, comprenden adicionalmente EPA en un intervalo del 5 al 35 % en peso.

- 40 En una realización preferente, en la composición obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención, el porcentaje en peso de DHA es del 80,65 % y el porcentaje en peso de EPA es del 13,38 %, siendo el porcentaje en peso total de ácidos grasos en la composición mencionada del 91,75 %.

- 45 En una realización preferente, la composición obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención, comprende adicionalmente cofactores, extractos y/o principios activos para el uso farmacéutico o alimentario.

- En una realización preferente, la composición obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito en la primera invención comprende adicionalmente excipientes y/o adyuvantes destinados al uso farmacéutico o alimentario.

- 50 Un tercer objeto de invención se refiere a un complemento nutricional que comprende las composiciones descritas en el segundo objeto de la invención en un formato bebible, de geles blandos o duros, de emulsión acuosa o polvo.

Un cuarto objeto de invención se refiere a un producto alimenticio que comprende las composiciones descritas en el segundo objeto de invención en un formato bebible, de geles blandos o duros, de emulsión acuosa o polvo.

- 55 Un quinto objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto rico en ácidos grasos omega 3 de acuerdo con el segundo objeto de la invención o como obtenible mediante un método de acuerdo con el primer objeto de la invención o un transportador o diluyente de forma farmacéutica.

- 60 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de afección alérgica, enfermedades de la superficie ocular y ojo seco, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en blefaritis, blefaroconjuntivitis, conjuntivitis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedades corneales, tratamiento contra el rechazo de trasplantes corneales, aumento de la densidad corneal celular promedio a través de paquimetría antes y después de cirugía Lasik.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades degenerativas de la retina no asociadas con distrofias genéticas, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en degeneración macular húmeda o seca asociada a la degeneración senil, retinopatía diabética, glaucoma, alteraciones de la presión intraocular, retinopatía asociada a miopía, desprendimiento de retina, desprendimiento de retina regmatógeno en ojos miope tras LASIK, edema macular secundario de origen isquémico, edema macular quistoide, síndrome de Irvine-Gass, escotoma de Berlín, coroidosis, coriorretinitis, neurorretinitis sífilítica, rubéola, citomegalovirus, melanoma maligno de coroides, venenos de mercurio (enfermedad de Minamata, acrodinia, síndrome de Hunter-Russel), vasculitis retiniana (enfermedad de Eales) o retinosquiasis traumática hemorrágica.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de distrofias hereditarias de la retina distintas de retinitis pigmentaria, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad de Stargardt, coroideremia ligada a X, amaurosis congénita de Leber, retinosquiasis ligada a X, distrofia vitreoretiniana de Goldman-Favre. Distrofia vitreoretiniana de Wagner y síndrome de Stickler, pars planitis familiar.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la retinitis pigmentaria.

Un noveno objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de síndromes relacionados con la retinitis pigmentaria.

En una realización preferente las distrofias de retina tratadas son RP no sindrómicas como resultado de mutaciones específicas y/o insuficiencia en la síntesis o el transporte hepático del DHA o como consecuencia de estrés metabólico y se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en todos los tipos mendelianos de RP no sistémica típica tal como sectorial, bilateral, unilateral, bilateral, inversa; RP autosómica dominante; RP autosómica recesiva, RP ligada a X, RP simple o esporádica, RP vitreoretiniana, RP punctata albescens, RP sin pigmento, atrofia coroidea, girata de coroides y/o atrofia de retina, RP con distrofia de conos y bastones, síndrome de Usher tipo I, II, III y IV, RP iatrogénica tal como NP 207, tioridazina, cloroquina, hidroxicloroquina, clorpromazina.

En otra realización preferente las distrofias de retina tratadas son síndromes genéticos con defectos peroxisómicos con RP y/o deficiencias en DHA y aumentos en PhA y PA que presentan alteraciones neurológicas, cardiovasculares, osteomusculares y/o dermatológicas variables, y se seleccionan preferentemente del grupo que comprende: síndrome de Zellweger, enfermedad de Refsum infantil, adrenoleucodistrofia neonatal, trastorno de la biogénesis peroxisómica, condrodisplasia punctata rizomélica (CDPR), deficiencias en acil-CoA oxidasa, deficiencias en enzimas bifuncionales, enfermedad de Refsum, deficiencia en la β -oxidación, queratodermia ictiosiforme familiar (síndrome de Sjogren-Larsson). Enfermedades con mitocondriopatías (complejo IV): deficiencia en COX, síndrome de Leigh.

En otra realización preferente las distrofias de retina tratadas son síndromes genéticos con defectos peroxisómicos, mitocondriales y/o relacionados con RP y alteraciones de la retina relacionadas y se seleccionan preferentemente del grupo que comprende s. de Bassen-kornzweig, s. de Batten o lipofuscinosis, hipoprebetalipoproteinemia, s. de Usher, s. de Hallervorden-Spatz, aceruloplasminemia, s. de Kearns-Sayre, distrofia muscular de Becker y de Duchenne, s. de Lawrence-Moon-Bardet-Biedl, s. de Lawrence-Moon, s. de Bardet-Biedl, s. de Grafe, amaurosis congénita de Leuber, s. de Hallgreen, s. de Cokayne, s. de Alstrom, s. de Pelizaeus-Merzbacher, ataxia cerebelosa, ataxia de Friedreich, lipofuscinosis (maurótico familiar idiopático: Tay-Sachs o Haltia-Santavuori, Biel-Schowsky-Jansky, E. de Vogt-Spielmeyer-Batten-Mayou, enfermedad de Kufs), displasia osteoneuroendocrina, mucopolisacaridosis (s. de Hurler, s. de Hunter, s. de Scheire, MPS I-H/S, Sanfilippo), s. de Bassen Kornzweig, displasia negro-retiniana, displasia ósea, síndrome renal-óculo-óseo, s. de Edwards, s. óculo cerebrorenal ligado a X recesivo o s. de Lowe, síndrome de Lignac-Fanconi (cistinosis), neuropatía gigante axonal, demencia familiar danesa, etc.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de uveítis y enfermedades relacionadas, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en iritis; pars planitis, coroiditis, coriorretinitis, uveítis anterior y/o posterior, iridocicloroiditis, uveítis infecciosa tal como brucelosis, herpes simple, herpes zóster, leptospirosis, enfermedad de Lyme, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, sífilis, toxocariasis, toxoplasmosis, tuberculosis, candidiasis, síndromes de uveítis tales como epitelopatía pigmentaria placode multifocal posterior aguda, retinocoroidopatía de Birdshot, iridociclititis heterocrómica de Fuchs, síndrome de coroiditis multifocal y panuveítis, síndrome de puntos blancos evanescentes múltiples, coroidopatía punteada interna, croiditis serpigiosa; trastornos sistémicos asociados con uveítis tales como espondilitis anquilosante, enfermedad de Behcet, enfermedad granulomatosa crónica, entesitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad reumatoide juvenil,

artritis reumatoide, esclerosis múltiple, poliarteritis nudosa, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, enfermedad de Whipple, síndromes de mascarada en segmentos anteriores y/o posteriores tales como retinoblastoma, desprendimiento de retina, melanoma maligno, leucemia, xantogranuloma juvenil, cuerpo extraño intraocular, linfoma, esclerosis múltiple y/o reticulosarcoma.

5 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la enfermedad degenerativa de la retina y afecciones oftalmológicas secundarias relacionados con enfermedades vasculares preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en retinopatía hipertensiva, neuropatía óptica isquémica hipertensiva, 10 coroidopatías hipertensivas tales como esclerosis coroidea, trombosis venosa central o ramificada, estrías de Elschnig y Slegrist, aterosclerosis, isquemia cerebral y neuro oftalmológica, síndrome del cayado aórtico, enfermedad de Takayasu, arteritis de Takayasu, panarteritis, iridociclitis, escleritis, neovascularización prerretiniana producida por isquemia y que puede dar como resultado hemorragias vítreas, edema corneal, Tyndall en humor acuoso, retinopatía diabética proliferativa o glaucoma neovascular, insuficiencia carotídea o isquemia ocular crónica, 15 obstrucción de la arteria oftálmica, obstrucción de la arteria retiniana central, trastornos de coagulación tales como deficiencia en proteínas S y C, retinitis, panoftalmia, coroiditis, estasis papilar, hemorragias de retina tales como manchas de Roth, lesiones debidas a inmunocomplejos, neuropatía óptica, retinopatía isquémica, oftalmoplejía, pseudotumor orbitario, síndrome isquémico ocular, infarto en el lóbulo occipital, diplopía, edema palpebral, ptosis palpebral, telangiectasia del párpado, de conjuntiva, de retina, obstrucción aguda de la arteria retiniana central, oftálmica o de sus ramificaciones, obstrucción de las arterias ciliares posteriores tal como neuropatía óptico-isquémica de origen no arterítico, síndrome isquémico ocular crónico producido por hiperfusión y/o visión borrosa o 20 síndrome de Shy-Drager.

25 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de pérdida de la agudeza visual no asociada con el uso en la retina y otros usos oftalmológicos seleccionados preferentemente del grupo que consiste en cataratas, vitritis, desprendimiento vítreo, endoftalmitis, hipermetropía, miopía y/o presbicia.

30 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de trastornos neurológicos y/o psiquiátricos en particular neurodegenerativos preferentemente seleccionados del grupo que consiste en neuropatías sensoriales motoras hereditarias, ataxia, espasticidad, neuritis, enfermedad de Alzheimer, demencia, déficit de atención primaria, depresión, trastornos bipolares y esquizotípicos, esclerosis múltiple y/o esclerosis lateral 35 amiotrófica.

40 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades oncológicas preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en metástasis y las líneas tumorales más prevalentes, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer renal, hepatocarcinoma, cáncer de cerebro, glioblastoma, melanoma, 45 retinoblastoma, vesícula biliar, mieloma múltiple, cánceres endocrinos y/o cánceres relacionados con una resistencia a la insulina.

45 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de nefropatías (nefritis y nefrosis) preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en nefropatías por IgA, nefropatía asociada a lupus eritematoso sistémico, insuficiencia renal, glomerulopatía, tubulopatía, enfermedad vascular intersticial y/o renal.

50 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en modificaciones isquémicas, arteriosclerosis, hipertrigliceridemia, hiperlipemias, arritmias ventriculares, hipertensión, diabetes y/o enfermedades cardiovasculares en las que están aumentados los niveles de la apoproteína a (apo (a)).

55 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de iatrogenias preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en rabdomiolisis, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, edema, lipodistrofia y/o inmunosupresión, asociada a estatinas, corticoides, antirretrovirales y/o inmunosupresores.

60 Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la fibromialgia y/o el síndrome de fatiga crónica.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la artrosis y la osteoporosis.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades osteomusculares e inflamatorias crónicas preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis juvenil, enfermedad de Sjogren, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, artrosis, osteoporosis.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades dermatológicas, preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en alopecia androgénica, acné rosácea, acné vulgar, eccemas y/o psoriasis.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de afecciones alérgicas, asma y/o enfermedades respiratorias crónicas.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades del sistema digestivo y enfermedades inflamatorias intestinales preferentemente seleccionadas del grupo que consiste en gastritis autoinmunitaria, viral y/o tóxica, esofagitis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis pseudomembranosa, colitis colagenosa, alteraciones de la permeabilidad intestinal, síndromes de malabsorción, intolerancia alimentaria y alergias y/o hemorroides.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades parasitarias e infecciosas.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del déficit de DHA. En una realización preferente tal déficit es debido a síndromes de malabsorción gastrointestinal seleccionados del grupo que comprende fibrosis quística, síndromes de malabsorción intestinal, pancreatitis, insuficiencia pancreática y/o colelitiasis. En otra realización preferente, el déficit de DHA es debido a trastornos alimentarios seleccionados del grupo que comprende anorexia y/o bulimia. En una tercera realización preferente, el compuesto de este objeto de invención se refiere a compensar la deficiencia de DHA nutricional común observada en sociedades humanas, preferentemente en el grupo que comprende mujeres embarazadas, mujeres en la lactancia y niños preferentemente durante el primer año de vida.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención como cofactor o coadyuvante con otros medicamentos para reducir sus efectos secundarios y/o aumentar su actividad terapéutica cuando está asociado con: estatinas, fármacos antiinflamatorios, corticoides, inmunosupresores, fármacos antihipertensivos; tratamiento como hipolipemiente, antiinflamatorios, enfermedades autoinmunitarias, alergias, tratamiento frente al rechazo de trasplantes de órganos y/o antihipertensivos.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con el segundo objeto de la invención para mejorar las condiciones fisiológicas que aumentan la agudeza visual, las funciones de memoria y cognitivas, que aumentan el rendimiento deportivo y que reducen lesiones y/o reducen la fatiga neuromuscular normal.

Descripción de las figuras

Figura 1. Capacidad de inhibición de la apoptosis de los fotorreceptores (%) mediante DHA inducida mediante Paraquat *in vitro* a distintas concentraciones de PhA (azul) e índice Bcl-2/Bax (verde). La línea roja muestra el grado de apoptosis sin tratamiento con DHA. En este experimento se aprecia claramente que los aceites con DHA < 5 µg/g de PhA tienen una actividad inhibitora de la apoptosis mayor que las con concentraciones mayores y el estrés oxidativo producido también es menor. Esto determina que el DHA < 5 µg/g *in vitro* tiene una mayor actividad fisiológica para el tratamiento de las distrofias de retina como un inhibidor de apoptosis.

Figura 2. Capacidad de inhibición de la apoptosis de los fotorreceptores (%) mediante DHA inducida mediante MNU *in vivo* a distintas concentraciones de PhA (azul) e índice Bcl-2/Bax (verde). La línea roja muestra el grado de apoptosis sin tratamiento con DHA. Este experimento confirma las observaciones vistas *in vitro*, concluyendo que el consumo oral del DHA < 5 µg/g tiene una mayor actividad fisiológica para el tratamiento oral de distrofias de la retina como inhibidor de apoptosis.

Figura 3. Esta figura representa las principales casas comerciales y productos del mercado, así como las encontradas con los menores niveles de PhA del mercado cuando se llevó a cabo el estudio. La mayoría de sus

fabricantes garantizan su calidad y procedimientos, cumpliendo con las BPF alimentarias y farmacéuticas, de acuerdo con la Farmacopea Europea y la FDA, estando expresamente aprobadas para su uso alimentario. Son motivo objeto de patentes y están siendo estudiadas sistemáticamente en investigación humana. Se puede ver que los aceites comerciales a distintas purezas de DHA contienen niveles altos de PhA y significativamente distintos independientemente de la pureza del DHA.

Figura 4. Reducción de los niveles de PhA en pacientes sin síndromes con DHA < 5 µg/ml. Esta figura muestra la evolución de 11 pacientes con RP sin síndromes asociados con DHA que contiene PhA <5 µg/g tratados previamente con DHA que contiene PhA ≥ 5 µg/g. En esta figura se puede ver que los pacientes con RP que tenían DHA con niveles de PhA >5 µg/g aumentaron sus niveles de PhA (T0), mostrando una reducción significativa de los niveles de PhA cuando toman DHA con PhA < 5 µg/g. Esto demuestra que el DHA con PhA < 5 µg/g es seguro como tratamiento en pacientes con RP.

Figura 5. Cálculo del punto de fusión (PF) a través de CDB (calorimetría diferencial de barrido) de los dos diastereoisómeros de PhA.

El método de CDB es una técnica termo analítica que diferencia el calor necesario para aumentar la temperatura de una muestra. Las principales funciones de la técnica es el estudio de las transiciones de fase o del estado físico tales como el punto de fusión (PF). La técnica presenta una gran sensibilidad para estimar el PF. Para la presente invención se han creado dos estándares para cada isómero de PhA, dado que no están disponible en el mercado mundial.

Se ha purificado PhA de atún. El gráfico representa el PF de una muestra que contenía > 96,5 % de PhA separada de un aceite rico en DHA (> 700 mg/g) de atún, siguiendo el procedimiento de la presente invención. Se ha llevado a cabo una CDB y se han encontrado dos picos claramente diferenciados. Para este fin, se ha cristalizado a -50 °C y separado ambas fases que se han analizado por medio de CG-EM que indicó que eran las dos fracciones de PhA. La técnica CDB se repite una vez más y se aprecia de forma pura un único pico a -45 °C y -65 °C para cada una de las fases separadas. A través de cristalografía se verifica y se comprueba que el isómero PhA(3S) tiene un PF a -45 °C y el PhA(3R) tiene un PF a -65 °C.

De esta manera, por medio de CDB se ha desarrollado un método sencillo para llevar a cabo un análisis cuantitativo de los dos isómeros de PhA. Esto hace posible verificar que el isómero PhA(3S) pueda evaluarse para la selección del método de separación del PhA más eficaz en la presente invención. Sin descartar otros procedimientos en el futuro para la separación de PhA de distintas muestras de aceites ricas en DHA y omega 3.

Como se describe en la presente invención, los dos isómeros muestran actividades fisiopatológicas distintas en la salud humana. La determinación de los isómeros a través de este análisis sería un marcador epidemiológico, clínico y nutricional de gran importancia para determinar la actividad de otros marcadores moleculares tales como el AMACAR (asociado al 3S y no con 3R) en el cáncer contra la toxicidad del predominante (3R).

Figura 6. Cristalización fraccional por densidad (CFD): Fraccionamiento de gradiente de densidad en equilibrio o isopícnica de un aceite sin procesar rico en omega 3. Fracción (a) color verde, fracción (b) color azul y fracción (c) color naranja.

El diagrama representa la formación de las fracciones de ácido graso producidas cuando se expone el aceite a una centrifugación isopícnica. Los ácidos grasos omega 3 (fracción c) que corresponden a la densidad más grande en el aceite utilizado en el punto de partida, se convierte en fraccionado en la parte más alejada del eje del rotor, mientras que las fracciones a y b con menores densidades están más cercanas al eje del rotor. La cristalización del gradiente y de las fracciones a y b permite separar la fase líquida, en donde los ácidos grasos omega 3 permanecen en la fracción c.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para la obtención de ácidos grasos omega 3 que contienen ácido fitánico en niveles inferior a 90 µg/g por gramo de aceite. Concretamente, la presente invención proporciona a un método de procedimiento de separación de ácidos grasos omega 3 presentes en animales marinos, microorganismos y algas a través de un gradiente de temperatura, enfriando los extractos hasta formar una fase sólida que concentra el PhA y los ácidos grasos saturados y monoinsaturados y una fase líquida, que concentra los ácidos grasos omega 3, preferentemente el DHA, esencialmente libre de PhA. El procedimiento descrito, puede utilizarse para la obtención y purificación de cualquier ácido graso altamente insaturado existente en la naturaleza.

Conviene que el aceite utilizado para la obtención de ácidos grasos omega 3, preferentemente DHA, sustancialmente libre de PhA, sea lo más fresco posible de modo que se evite una probable degradación u oxidación de los ácidos grasos. Se consideran, de forma inicial, aceites adecuados como producto de partida por ser la principal fuente de omega 3 la mayoría de los pescados (esencialmente los grasos), los cultivos de algas

unicelulares, y el Krill. Sin embargo, el omega 3 se puede obtener también de otras fuentes marinas (es decir: atún, bacalao, salmón, sardina, gallineta nórdica, ballena, foca, tiburón, algas no unicelulares, etc.), de fuentes bacterianas y hongos. Las fuentes más valiosas son las de origen microbiano (obtenidas de cultivos controlados y fermentadores) que contienen mayores niveles de PhA e isoprenoides, junto con las fuentes marinas. Algunas especies todavía sin explotar (es decir, diatomeas) provocarían un enorme interés como productoras de PhA, como lo haría el aceite de hígado de bacalao como fuente de pristano. En el futuro, se podría utilizar aceite de especies animales, vegetales, microbianas y/o fúngicas modificadas genéticamente para aumentar la producción de omega 3, especialmente de DHA. Los niveles de PhA son elevados tanto en peces desarrollados en piscifactorías como en el medio natural.

El procedimiento, materia objeto de la invención, consiste en varias fases, aunque algunas de ellas son opcionales:

1. Refinar de forma preliminar (opcional):

La finalidad de esta fase es la eliminación de grasas insaponificables. Es aplicable exclusivamente a materias primas sin procesar, sin refinar, tal como aceite de pescado sin procesar.

2. Hidrólisis de triglicéridos y ésteres:

La finalidad de esta fase es permitir el procedimiento para la obtención de ácidos grasos libres a partir del aceite.

La hidrólisis puede ser: a) saponificación + acidólisis; o b) hidrólisis mediante lipasa.

En procedimiento de saponificación formará sales de ácidos grasos. La acidificación formará una fase de ácidos grasos libres no polar (aceite acidificado), y una fase polar de sales que se eliminarán por la apertura de la base del reactor.

3. Centrifugación (isopícnica o no isopícnica):

En este paso se somete el aceite acidificado obtenido en la fase anterior a ultracentrifugación por gradiente de glicerol. La centrifugación puede ser isopícnica o por gradiente de densidad sin equilibrio.

Cuando la centrifugación es isopícnica se lleva a cabo una cristalización fraccionada por gradiente de densidad, utilizando un gradiente de glicerol, conduciendo al equilibrio.

Si tras la centrifugación se reduce drásticamente la temperatura en un gradiente de glicerol, a 0 °C se obtienen tres fracciones: dos sólidas, una con los ácidos grasos saturados; la segunda con los ácidos grasos insaturados y PhA, que se eliminan, y una tercera fracción líquida con los ácidos grasos poliinsaturados que contiene entre el 65-99 % de ácidos omega 3 y niveles de DHA del 65-85 %, con menos de 90 µg/g de PhA.

Puede reducirse la temperatura a -30 °C durante 24 horas, utilizando un gradiente de glicerol, obteniéndose como resultado dos fases: una fase sólida que contiene los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, PhA y el gradiente de glicerol; y una fase líquida que contiene los ácidos grasos poliinsaturados con niveles de ácidos omega 3 del 65-99 %, con niveles de DHA del 65-85 %, conteniendo menos del 5 µg/g de PhA.

Si la centrifugación no es isopícnica, la temperatura debería reducirse drásticamente a -30 °C al gradiente de glicerol, donde se generan dos fracciones: una fracción sólida que contiene ácidos grasos saturados y monoinsaturados y el PhA y una fracción líquida que contiene ácidos grasos poliinsaturados con niveles del 65-99 % de ácidos omega 3, con niveles de DHA del 65-85 % conteniendo menos del 90 µg/g de PhA.

4. Esterificación de los ácidos grasos libres:

La finalidad es estabilizar los ácidos grasos libres como ésteres o como etil ésteres o como triglicéridos (que serían un primer producto final)

En los procedimientos de purificación de aceite no se separa el PhA, a no ser que se establezca una fase específica para esta finalidad, dado que las propiedades fisicoquímicas del PhA (C20) son comparables a los ácidos grasos omega 3 de cadena larga (C_≥18): PF, punto de fusión, valor de saponificación, índice de yodo, solubilidad en agua y en disolventes, polaridad para disolventes, rotación óptica, etc. A estudio comparativo, el DHA y el PhA comparten el mismo número de aceptores de enlaces de H (2) y de donantes (1), enlaces con libre rotación (14), área superficie polar (26,3 Å²), solubilidad en agua a 25 °C (0,001) y volumen molar comparativo (347,0 frente a 354,8 cm³), peso molecular (328,49 frente a 312,53), entalpía de vaporización (77,28 frente a 74,2 kJ/mol), polarizabilidad (41,97x10⁻²⁴ frente a 38,09x10⁻²⁴), índice de refracción (1,52 frente a 1,454). El PhA, PA, EPA, DHA, SDA tienen el PF más bajo entre todos los ácidos grasos, que está entre -40 °C y -80 °C).

La eliminación de los productos de saponificación y eliminación de estearina de las grasas saturadas basadas en la saponificación y reducción de ácidos grasos saturados utilizando complejos de urea, aumenta la concentración de PhA en la fracción rica en omega 3. En aceites de pescado purificados, todos los casos analizados revelaron un aumento de la concentración de PhA (>0,1 %), y sólo en determinados procedimientos que obtienen una alta pureza de DHA (>700 mg/g) se reduce el anteriormente mencionado aumento de los procedimientos de refinado y purificación iniciales (<0,1 %) (Figura 3). Esto implica que todos los procedimientos de refinado y purificación llevados a cabo con aceite de pescado (es decir: con un DHA máximo < 200 mg/g), el PhA no se elimina y, por el contrario, el aumento de los niveles de concentración de omega 3 produce un aumento proporcional de PhA, habida cuenta que el PhA tiene un comportamiento fisicoquímico altamente comparable al encontrado en el omega 3, lo cual no es el caso cuando se compara con el resto de los ácidos grasos saturados.

La formación de complejos de urea y las variaciones metodológicas en la cristalización de estos complejos están patentadas (documento WO1995/011216) y están optimizadas debido a su gran aplicación en la industria, y se utilizan ampliamente en los procedimientos de purificación de los aceites de pescado. Se ha comprobado que la reacción etanol-urea en la formación de complejos de urea en estos procedimientos provoca la formación de etil-carbamato o uretano (EC) y su presencia en los aceites purificados. El uretano, descubierto hace más de 150 años, es un conocido agente carcinógeno y está bajo investigación de la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos), formando parte de un listado de sustancias peligrosas para el medio ambiente desde 1980 (CERCLA), como establecen en la editorial los miembros de la FDA Canas y Yurawecz . Por lo tanto, la presente invención proporciona resultados mejorados de los procedimientos actuales de desodorización y purificado, que evitan frecuente pero no deseable uso de procedimientos en la industria, tales como la desodorización (altas temperaturas) y procedimientos de purificación y refinado con urea, que son obviamente inadecuados y no recomendados para eliminar el PhA.

En los procedimientos de refinado por enfriamiento y purificación patentados se utilizan normalmente a temperaturas superiores a -5 °C y en algunas ocasiones se han llevado a cabo a temperaturas hasta -20 °C. Sin embargo, un procedimiento útil de este tipo para separar ácidos grasos saturados no es aplicable para el PhA, dado que se concentraría en la fracción del omega 3, puesto que el EPA, DHA, PhA y PA tienen un PF aproximado de -54 °C, -43 °C, -65 °C y -80 °C, respectivamente.

El PhA y el PA forman parte de los triglicéridos encontrados en el aceite de pescado de manera comparable a los ácidos grasos omega 3. En la actualidad, se utilizan con frecuencia procedimientos de hidrólisis enzimática; es la esterificación selectiva que concentra los ácidos grasos omega 3 y en particular el DHA. Se demostró hace un largo tiempo que en toda la biología del PhA, éste tiene tendencia a situarse en el 2° carbono de los triglicéridos y fosfolípidos, como se encuentra en el DHA y otros PUFA; también es conocido que el PhA y el DHA y otros omega 3 comparten la misma resistencia a la saponificación y la hidrólisis enzimática. La lipasa pancreática hidroliza ácidos grasos de cadena corta más rápidamente que los de cadena larga, mientras que el PhA, PA, DHA, EPA actúa de forma muy lenta, siendo resistente a la lipólisis (Brockhoff, 1970; Ellingboe & Steinberg, 1972). Tal resistencia es comparable a la encontrada en el DHA y el PhA (Nus *et al.*, 2006), debido a los efectos esteéricos comparables del PhA, PA, DHA y EPA (Faber, 2004 y Bottino-NR *et al.*, 1967). Más aún, el uso de procedimientos enzimáticos podría, al igual que en los otros procedimientos, aumentar los niveles de PhA. Los procedimientos tales como hidrólisis completa y de lipasa inespecífica son tan eficaces como la saponificación e hidrólisis catalizada con sólidos, no modificando los niveles de PhA.

Por estos motivos, no hay procedimientos que separen el PhA en aceites con omega 3 y DHA sin una modificación de la composición del aceite o a través de procedimientos de refinado, necesitando así un procedimiento específico para la separación de PhA.

La Figura 3 muestra que los métodos para obtener DHA substancialmente puro (>700 mg/g), dan como resultado variaciones que no son eficaces el propósito de la presente invención. Probablemente los métodos cromatográficos son la mejor opción, y aunque no es específico para separar el PhA, lo es de hecho para obtener DHA substancialmente puro. Los métodos industriales de separación por cromatografía, a priori, no son lo suficientemente sensibles para separar el PhA y el PA a costes razonables, encontrándose niveles fuera del intervalo necesario para la presente invención, como sucede con la destilación molecular, que tiene el mismo tiempo, mayor riesgo de tener niveles aumentados de benzo(a)pireno, debido al uso de altas temperaturas. Los métodos cromatográficos más destacados (es decir, SFC) se basan en la polaridad y los efectos esteéricos. La fuerza de absorción depende no sólo de la polaridad, el tiempo de lavado y las características de los grupos funcionales de la molécula, sino también de los factores esteéricos. Como se estableció anteriormente, el PhA y el DHA tienen funciones esteéricas, peso molecular, etc. más próximas al DHA que el EPA y otros ácidos grasos. Dado la baja concentración del PhA y teniendo en cuenta que en todos los procedimientos de pureza de DHA, el EPA aumenta también de modo considerable, no es sorprendente encontrar análisis que ponen de manifiesto que el PhA está también presente de forma inadecuada y en donde, en algunos casos, su presencia alcanza niveles elevados en todos los aceites de atún, que contiene 700 mg/g y encontrándose de forma frecuente niveles de 400 µg/g, aunque en otros

procedimientos patentados se pueden encontrar niveles más altos que 1500 µg/g (>0,1 %), que indican un nivel de PhA más alto que el encontrado en pescado si procesar (atún).

5 Dada la baja concentración de PhA (<0,1 %) encontrada en los estudios de cromatografía de uso analítico convencionales, no se determinan PhA y PA. Para esta finalidad es necesario adaptar las técnicas de cromatografía (CG) a un nivel mucho más alto de sensibilidad para la detección específica del PhA.

10 Dada las características fisicoquímicas del PhA y del DHA, sería necesario adaptar la técnica a muy elevados niveles de pureza con costes muy elevados para reducir el PhA. A partir de esta estrategia y sin el coste y la tecnología industrial necesaria, se ha purificado el DHA a partir de aceites de pescado (concretamente de atún, dado que presenta los niveles de concentración más altos de DHA) a partir de técnicas de cromatografía de laboratorio y a partir de destilación molecular, hasta obtener 830 mg/g, mientras que se ha encontrado una media aritmética de niveles de PhA de 57 µg/g, mostrando una elevada variabilidad (+ 31 µg/g). A partir de esto, los métodos específicos industriales para la purificación del DHA no son eficaces para eliminar el PhA presente en los aceites de pescado.

15 Hay una relación indirecta entre el consumo de aceite con elevados niveles de pureza de DHA y un consumo menor de PhA, debido esencialmente al hecho geométrico que existe de tomar una cantidad más alta de aceite de aceites con menor pureza, para obtener la misma cantidad de DHA. Aparte de esto, los productos comerciales de alta pureza no presentan ninguna reducción de los niveles de PhA. Las diferencias entre los métodos utilizados para refinar o purificar el DHA y los ácidos grasos omega 3 varían significativamente (Figura 3), aunque todos ellos presentan niveles de concentración más elevados que los deseados.

20 Por lo que se refiere a la presente invención, se ha desarrollado un procedimiento específico de separación de PhA, que debiera ser llevado a cabo en las etapas iniciales o fase de refinado, para obtener un aceite que contenga todos los niveles de pureza de DHA y/o distintas combinaciones de omega 3, obteniéndose aceites ricos en DHA y omega 3 con niveles muy bajos de PhA o incluso sin PhA (límite de la detección: 5 µg/ml). Por lo tanto, este procedimiento puede adaptarse a todos los procedimientos industriales y a productos con distintos niveles de puridades.

25 Esta invención también implica que ya no es necesario purificar uno o más ácidos grasos o modificar la composición natural del aceite para obtener aceite bajo en PhA o aceite sin PhA. Esto tiene altamente relevante cuando se utilizan mezclas naturales de ácidos grasos omega 3 para fines alimentarios o para la salud. También, este método es ventajoso, dado que ya no son necesarios los procedimientos de desodorización y de purificación de los ácidos grasos omega 3, obteniéndose una calidad alimentaria y farmacéutica menos riesgosas que los métodos llevados a cabo en la actualidad.

30 La presente invención se refiere a un método específico para separar físicamente el PhA encontrado en cualquier aceite que contenga >5 µg de PhA/g y sea rico en ésteres de ácidos grasos omega 3, para la producción industrial a gran escala de DHA, EPA u otro ácido graso omega 3 a partir de fuentes ricas en omega 3 tales como el pescado, algas, u otros microorganismos con bajos niveles o niveles cero de PhA.

35 Tal método utiliza cristalización para obtener un cambio en el estado físico del aceite, manteniendo el PhA y el PA en estado líquido, puesto que estos tienen PF significativamente más bajos que el DHA y los ácidos grasos omega 3 o que cualquier otro ácido graso.

45 Tabla 1. Referencias del PF experimental de los ácidos grasos más significativos a presión atmosférica.

Nombre	PF	Nombre común	PF
Ácido láurico(C12)	+44 °C	Metil-laurato	+6 °C
Ácido mirístico (C14)	+54 °C	Etil-laurato	+2 °C
Ácido palmítico (C16)	+62 °C	Metil-palmitato	+35 °C
Ácido esteárico (C18)	+69 °C	Etil-palmitato	+25 °C
Ácido oleico (C18:1)	+14 °C	Metil-oleato	-20 °C
Ácido linoleico (C18:2,n6)	-8,5	Etil-oleato	-27 °C
Ácido alfa-linolénico (C18:2,n3)	-16,5	Metil-linoleato	-35 °C
Ácido docosahexaenoico (C22:6,n3)	-43 °C	Etil-linoleato	-38 °C
Ácido araquidónico (C20:4,n6)	-49,5 °C	Metil-linoleato	-40 °C
Ácido eicosapentaenoico (C20:5,n6)	-54 °C	Etil-linolenato	-46 °C
Ácido estearidónico (C18:4,n3)	-57 °C	Etil-docosahexaenoato	-65 °C
Ácido fitánico (C20)	-65 °C	Etil-araquidonoato	-73 °C
Ácido pristánico (C19)	80,5 °C	Etil-eicosapentanoato	-76 °C

- Éste es un método de interés, en cuanto a la eliminación del PhA desde el inicio de la cadena productiva de aceite concretamente en el pescado, que no tiene toxicidad y descrito como que tiene un riesgo menor de formación de ácidos grasos trans y adecuado para obtener una calidad farmacéutica o una alimentaria. La presente invención
- 5 atañe a un método muy adaptable a la tecnología actual, en particular a las tecnologías farmacéutica y alimentaria, dado que la tecnología del frío ya se utilizaba en las dos industrias. El aumento de la presión en el aceite rico en omega 3 para reducir el PF y su coste energético no es una opción, dado que los PUFA y el DHA son sensibles a la hidrogenación.
- 10 Por otro lado, este método junto con la tecnología industrial contemporánea usada para la separación de PhA, permite un aumento del grado de pureza del DHA, EPA y otros ácidos grasos de muy bajo PF, sin añadir otros procedimientos de purificación adicionales. Es también en un procedimiento de purificación de DHA y de los ácidos grasos omega 3, principalmente para pescado.
- 15 La presente invención se refiere a aceites sin refinar y refinados que contengan cualquier proporción de omega 3 y a aceites sujetos a purificación para la obtención de un alto grado de pureza de alguno de los ácidos grasos omega 3, preferentemente DHA, o del contenido total de omega 3. Para esta finalidad, puede basarse en grasas o aceites que contengan cualquier tipo de éster, principalmente triglicéridos, fosfolípidos y etil-ésteres.
- 20 El objetivo principal es obtener aceites omega 3, preferentemente con DHA y con alto nivel de pureza (>700 mg/g), bajo o sin PhA (< 5 µg/g) preferentemente asociado con ésteres ricos en triglicéridos para obtener mayor pureza, estabilidad y biodisponibilidad, sin tener que añadir ingredientes no nutricionales con calidad potencial de interacción, tal como el etanol, cuyo uso como alimento se evita, en especial entre embarazadas y niños, mientras que este es el grupo de población donde es más necesario y más utilizado. Los ácidos grasos libres son altamente
- 25 inestables para su uso oral, aunque su uso como inyectable puede suponer beneficios (es decir, inyección intravitreal). Puesto que los principios activos de la presente invención son los ácidos grasos omega 3, en particular el DHA y teniendo en cuenta que la dosis necesaria es demasiado elevada para su uso terapéutico, los inventores consideran que los triglicéridos son la mejor opción, puesto que es el éster en DHA que permite la mayor concentración del principio activo. La ingesta oral de etil-ésteres está dañada, aunque la ingesta de ácidos grasos
- 30 naturales en la dieta proviene de los triglicéridos. La dieta diaria supone una ingesta natural de más de 100 gramos de triglicéridos, lo que demuestra que el DHA es la ingesta más eficaz entre los mamíferos desde el punto de vista fisiológico y farmacocinéticamente.
- Etil-DHA es una fórmula química apenas usada en seres humanos y en la naturaleza, mientras que la del triglicérido está mucho más biodisponible y sin los inconvenientes y efectos secundarios asociados con el tipo de etil-éster. El DHA como etil-éster es menos eficaz, es fisiológicamente más sensible a la oxidación, no es un alimento (contiene alcohol), no forma parte de ninguna dieta en seres vivos, su uso es limitado (no es adecuado como alimento), interfiere con otros ácidos grasos y aumenta la producción de otros etil-ésteres, interfiere con otros fármacos y alimentos (es decir, café), provoca intolerancia en una parte significativa de la población, tiene efectos secundarios
- 35 dado que es un tipo de ingesta de alcohol y es un metabolito non-oxidativo de etanol que induce hepatotoxicidad y pancreatitis. El presente documento se refiere a la forma de triglicérido del DHA como un fármaco seguro, saludable y más eficaz como fuente de omega 3, mientras que el etil-éster es un procedimiento intermedio para obtener DHA y EPA como triglicéridos.
- 40 El uso principal del producto es la obtención de un medicamento, complemento o alimento rico en DHA más saludable, que presente una mayor actividad fisiológica, sin interferencias o interacciones no asociadas al DHA, menor capacidad oxidativa *in vivo*, menos tóxico y con índice nulo de riesgo para la salud pública asociado al PhA. De acuerdo con las innumerables y recientes evidencias moleculares y estudios preclínicos y epidemiológicos, el PhA es una sustancia no nutritiva pero que está presente en la dieta, que supone uno de los mayores riesgos para la
- 45 salud.
- Este método de separación de PhA es un método de desodorización altamente eficaz. Para llevarlo a cabo, bastará con el tratamiento del aceite de pescado con tierra o con carbono activado, con vistas de eliminar metales pesados, evitando así cualquier calentamiento o desodorización. La presente invención supone no sólo la eliminación del PhA
- 50 y el PA, sino también la eliminación eficaz de las partículas volátiles que provocan el olor característico, evitando también procedimientos que podrían dañar el aceite (altas temperaturas) y reducir el los costes puesto que no se añade ningún procedimiento específico.
- 55 La base de la desodorización del aceite llevada a cabo siguiendo este procedimiento de separación del PhA es relativa:
- 60 a) A la degradación de proteínas, que tienen un PF muy elevado y están en estado sólido a temperatura ambiente. Se separan las proteínas en la fracción sólida o estearina en los aceites de pescado sin procesar.

b) Debido al hecho de que las sustancias volátiles que provocan el olor en el pescado tienen un PF muy bajo. Las sustancias tales como el heptadienal, octadieno, octeno, heptenal, decatrienal y en particular dimetilamina y trimetilamina, tienen un PF evaluado en $-92\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-117\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

5 Durante el procedimiento de enfriamiento y solidificación en el aceite, las sustancias mencionadas anteriormente serán parte de la fracción líquida que es la que va a separarse, y que contiene estas sustancias volátiles junto con el PhA y otros alquenos y alcoholes con bajos niveles de PhA. La desodorización se lleva a cabo mediante procedimiento de enfriado y no calentando, sin la necesidad de ningún procedimiento de purificación. La presente invención permite obtener aceites refinados sin purificar sin llevar a cabo procedimientos convencionales para la
10 desodorización -que aumentan el riesgo de modificar los ácidos grasos poliinsaturados (altas temperaturas).

El PhA está presente fundamentalmente en los triglicéridos (> 80 % aproximadamente) y otros ésteres, detectado en forma libre en pequeñas cantidades, estando presente en la misma posición (C-2) en triglicéridos y fosfolípidos de los aceites, al igual que los ácidos grasos PUFA y debido a sus características fisicoquímicas comparables. La
15 extracción del PhA, como en todos los procedimientos de purificación de DHA u omega 3, no puede llevarse a cabo de forma directa a partir de triglicéridos, que contienen 3 ácidos grasos con PF distinto de acuerdo con su mezcla. Entonces, los ácidos grasos deben obtenerse de forma previa por hidrólisis de los triglicéridos que son parte de los aceites o grasas, para formar ácidos grasos libres a través de la transesterificación (catalítico) para formar los ésteres de alcoholes o a través de la hidrólisis (catalítica) para obtener los ácidos libres. Se pueden originar dos
20 situaciones:

Transesterificación y formación de ésteres de ácidos grasos (es decir: etanol):

25 Sin embargo, aunque se puede llevar a cabo a partir de ésteres alcohólicos obtenidos de transesterificación catalítica (es decir: etanol), el PF de los ácidos grasos se reduce de forma considerable hasta aproximadamente $>20\text{ }^{\circ}\text{C}$, que depende del tipo de alcohol (Tabla 1). Este hecho supone un mayor coste energético dado que para solidificar aceite con DHA, la temperatura debe reducirse $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ más que los casos en donde los ácidos grasos estén libres.

30 Hidrólisis catalítica (es decir: saponificación + acidificación) para obtener ácidos grasos libres:

La hidrólisis catalítica es un método muy extendido para los aceites de pescado tomado como base cualquier método convencional ampliamente desarrollado y utilizado en la industria actual. Servirían de catalizadores cualquier ácido orgánico de calidad alimentaria y farmacéutica, tal como el ácido acético, o catalizadores sólidos
35 tales como las resinas de intercambio iónico (resina de estireno), o catálisis enzimática mediante lipasa (ejemplo: Novozyme 435) ya sea inmovilizadas o en solución.

Los aceites de pescado tienen grasas no saponificables que contiene colesterol, PCB, vitaminas A y D, etc. que deben eliminarse de los aceites ricos en DHA u omega 3, con la finalidad de obtener una calidad farmacéutica o
40 alimentaria. Un método ampliamente utilizado para la separación de las grasas no saponificables (estearina) en los procedimientos de refinado, redituable y eficaz, es la hidrólisis completa mediante la saponificación del aceite de pescado en medio alcalino moderado a bajas temperaturas y en un ambiente inerte para evitar la alteración de los ácidos grasos poliinsaturados. De esta manera, la hidrólisis necesaria en los procedimientos de refinado es útil para proceder con la separación de PhA en la presente invención.

45 Debido a esto, la presente invención se inició a partir de la hidrólisis de los triglicéridos y ésteres encontrados en el aceite de pescado en un medio alcalino moderado (es decir, hidróxido potásico o hidróxido sódico) a baja temperatura, para obtener un aceite líquido y para favorecer la hidrólisis (es decir: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $90\text{ }^{\circ}\text{C}$), hasta la hidrólisis y saponificación completa de los ácidos grasos.

50 La mezcla resultante contiene sales (potásica o sódica) de ácidos grasos que no son adecuadas para el procedimiento descrito en la presente invención puesto que modifican el PF de los ácidos grasos, con lo que se lleva a cabo la acidificación o hidrólisis catalizada realizada mediante el uso de ácidos orgánicos no oxidativos (es decir: ácido acético), añadiéndolo a la mezcla agitada de forma vigorosa para obtener los ácidos grasos en forma libre.

55 Para separar los ácidos grasos libres es posible proceder con la destilación al vacío del aceite (es decir: 2 mmHg) y atmósfera inerte para evitar cualquier daño de los ácidos grasos PUFA libres. Sin embargo, este método facilita la separación de la fase sólida, que contiene la estearina y grasas no saponificables, por decantación y centrifugación, y la fase líquida, que contiene el aceite acidificado, lavando repetidas veces, que contiene acetato sódico o potásico.
60 Esto garantizaría conservar el glicerol.

El glicerol es más seguro que los disolventes de calidad alimentaria o farmacéutica, y supone un método más sencillo dado su necesaria presencia en la fase inicial y en la fase final del producto. Pero el aspecto más destacado es que el glicerol permite la separación por gradiente de densidad, lo que favorece la cristalización de una manera

más eficaz que en los métodos de fraccionamiento utilizados en la actualidad con otras sustancias químicas (es decir, urea), fraccionando ácidos grasos saturados, monoinsaturados y en particular, para la separación del PhA y de los omega 3.

- 5 El glicerol en el aceite acidificado es el agente crioprotector más seguro y un buen humectante, lo que favorece la cristalización de los ácidos grasos saturados en la fase de separación del PhA. Además, la presente invención añade glicerol al aceite acidificado para favorecer el fraccionamiento por gradiente de densidad, que también ayuda a desarrollar no sólo la fracción por gradiente de centrifugación sino también la cristalización.
- 10 Como para la centrifugación por gradiente de densidad utilizada en la presente invención, se necesita un gradiente que cumpla ciertas características: bajo peso molecular (reduce el tiempo de centrifugado), baja viscosidad, densidad mayor que en los solutos (ácidos grasos), transparente bajo la luz UV y buenas propiedades de disolvente. El glicerol, que tiene una elevada densidad (1,25 g/cm³), actúa como un medio para el fraccionamiento por gradiente de densidad o separación de moléculas hasta 1,15 g/cm³ como se detecta en el caso de los ácidos grasos
- 15 encontrados en aceites ricos en omega 3. El glicerol puede mezclarse con agua o cualquier otro disolvente para reducir significativamente su punto eutéctico (es decir: solución de glicerol al 65 % en agua reduce el PF de +18 °C a -47 °C), que le permitiría estar en estado líquido durante el procedimiento de cristalización. El glicerol en una pequeña fracción de disolvente permite reducir la viscosidad (Tabla 2), para comportarse como un gradiente ideal en la centrifugación isopícnica. También puede disminuirse la viscosidad aumentando la temperatura, es especial
- 20 durante la fase de enfriamiento de la presente invención. Es un gradiente ideal para la fracción de los ácidos grasos por centrifugación por gradiente de densidad y cristalización.

La composición de los ácidos grasos, clave en el contenido de estos aceites, no muestra diferencias significativas de peso molecular pero sí en densidad (tres fracciones de ácidos grasos). Su PF se comporta de manera similar,

25 optimizando de forma muy considerable la cristalización de estos ácidos grasos próxima al PF. De las dos técnicas de centrifugación por gradiente de densidad (zonal o isopícnica), la más adecuada para la presente invención es la isopícnica, puesto que provoca fracciones de acuerdo con la densidad, debido a que no hay diferencias significativas en el peso molecular entre el PhA (312,53 g/mol) y el DHA (328,5 g/mol) y el EPA (302,4 g/mol) necesarias para la técnica zonal. Sin embargo, sí se puede utilizar para la separación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados

30 omega 3 y al límite de la técnica (8 %) para la separación de DHA y EPA (aunque en la presente invención se separaron de la misma manera que otras moléculas con diferencias de peso molecular de <10 % (Fuentes-Arderiu et al., 1998).

En la presente invención se lleva a cabo el fraccionamiento por gradiente de densidad antes de la cristalización, para

35 formar 3 fracciones de acuerdo con la densidad correspondiente a las principales fracciones del aceite: ácidos grasos saturados y monoinsaturados y omega 3. Esto provocaría la fracción y la modificación del punto eutéctico de la mezcla de los ácidos grasos del aceite, optimizando en una elevada proporción la solidificación de las fracciones de acuerdo con su PF. Este procedimiento también es eficaz cuando se optimiza la separación del PhA de los

40 omega 3, sin utilizar disolvente.

Tabla 2: Correlación de viscosidad-temperatura para soluciones de glicerol-agua (mPa) (Dorsey, 1940)

Glicerol % p/p	Temperatura (°C)											
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
0	1,792	1,308	1,005	0,8007	0,6560	0,5494	0,4688	0,4061	0,3565	0,3165	0,2838	
10	2,44	1,74	1,31	1,03	0,826	0,680	0,575	0,500	-	-	-	
20	3,44	2,41	1,76	1,35	1,07	0,879	0,731	0,635	-	-	-	
30	5,14	3,49	2,50	1,87	1,46	1,16	0,956	0,816	0,690	-	-	
40	8,25	5,37	3,72	2,72	2,07	1,62	1,30	1,09	0,918	0,763	0,668	
50	14,6	9,01	6,00	4,21	3,10	2,37	1,86	1,53	1,25	1,05	0,910	
60	29,9	17,4	10,8	7,19	5,08	3,76	2,85	2,29	1,84	1,52	1,28	
65	45,7	25,3	15,2	9,85	6,80	4,89	3,66	2,91	2,28	1,86	1,55	
67	55,5	29,9	17,7	11,3	7,73	5,50	4,09	3,23	2,50	2,03	1,68	
70	76	38,8	22,5	14,1	9,40	6,61	4,86	3,78	2,90	2,34	1,93	
75	132	65,2	35,5	21,2	13,6	9,25	6,61	5,01	3,80	3,00	2,43	
80	255	116	60,1	33,9	20,8	13,6	9,42	6,94	5,13	4,03	3,18	
85	540	223	109	58	33,5	21,2	14,2	10,0	7,28	5,52	4,24	
90	1310	498	219	109	60,0	35,5	22,5	15,5	11,0	7,93	6,00	

Temperatura (°C)											
91	1590	592	259	127	68,1	39,8	25,1	17,1	11,9	8,62	6,40
92	1950	729	310	147	78,3	44,8	28,0	19,0	13,1	9,46	6,82
93	2400	860	367	172	89	51,5	31,6	21,2	14,4	10,3	7,54
94	2930	1040	437	202	105	58,4	35,4	23,6	15,8	11,2	8,19
95	3690	1270	523	237	121	67,0	39,9	26,4	17,5	12,4	9,08
96	4600	1580	624	281	142	77,8	45,4	29,7	19,6	13,6	10,1
97	5770	1950	765	340	166	88,9	51,9	33,6	21,9	15,1	10,9
98	7370	2460	939	409	196	104	59,8	38,5	24,8	17,0	12,2
99	9420	3090	1150	500	235	122	69,1	43,6	27,8	19,0	13,3
100	12070	3900	1410	612	284	142	81,3	50,6	31,9	21,3	14,8

La separación de PhA y purificación de ácidos grasos omega 3 mediante: 1-cristalización fraccionada de acuerdo con sus diferentes densidades utilizando un gradiente de densidad.

- 5 Los métodos de separación de los ácidos grasos en aceites son especialmente complicados de llevar a cabo, y en particular en los casos cuando los ácidos grasos comparten propiedades fisicoquímicas que son esenciales para los métodos de separación: destilación, cristalización, extracción con disolventes o cromatografía. La cristalización fraccionada es un procedimiento para separar distintas sustancias cuya solubilidad es distinta en función de variaciones de temperatura. A pesar del hecho que la base de la cristalización fraccionada es refiere a esta propiedad fisicoquímica, en realidad la cristalización fraccionada consiste en la separación de dos o más compuestos químicos de acuerdo con su diferente PF.

10 El método propuesto en la presente invención no ha sido descrito antes, dado que sugiere un método en el cual se pueden separar dos o más componentes, fraccionándolos en términos de densidad y no de solubilidad, de acuerdo con variaciones de temperatura. Por ello, la invención se denomina "cristalización fraccionada mediante densidad" (CFD).

20 El método descrito podría usarse para la separación de componentes: a) con propiedades similares (es decir: soluciones homogéneas) en relación a complejas interacciones que dan como resultado variaciones del diagrama eutéctico de las composiciones o b) incluso en composiciones heterogéneas con distintas solubilidades pero donde alguno de los componentes es altamente sensible a variaciones o elevaciones de temperatura. La presente invención se refiere en especial a la separación de una determinada composición homogénea de aceite en dos o más composiciones variando su punto eutéctico y procediendo a las variaciones de temperatura aplicando un procedimiento de enfriamiento y separación por cristalización fraccionada. El fin principal es separar una fracción compuesta por ácidos grasos saturados y monoinsaturados y PhA, que contiene un punto eutéctico mayor que una fracción que contiene ácidos grasos omega 3.

30 La cristalización y la densidad resultan ser las propiedades más diferenciales cuando se separan los ácidos grasos omega 3, PhA y ácidos grasos saturados. La presente invención permite separar en fracciones de ácidos grasos o micelas (de acuerdo con la liposolubilidad del gradiente) que contienen una elevada proporción de ácidos grasos con menor densidad como ácidos grasos saturados, monoinsaturados y PhA de ácido graso omega 3, con mayor densidad. Estas dos composiciones que pueden ser puras o no (mezcla de distintos ácidos grasos), tienen distintos puntos eutécticos en relación al PF y a la concentración de la composición individual de los ácidos grasos; por cristalización fraccionada se pueden separar dos fracciones de distintas composiciones.

35 Este procedimiento también es particularmente eficaz para separar incluso sustancias similares por cristalización fraccionada, de acuerdo con su densidad. Tal es el caso específico de la presente invención, cuando uno de los PhA componentes (3S) en bajos niveles de concentración tiene un PF similar a un componente(s) (DHA). En la presente invención puede aplicarse la ultracentrifugación por densidad isopícnica o no isopícnica. La aplicación de disolventes habitualmente usados para la obtención de DHA con elevados niveles de pureza no se necesita en el procedimiento de la presente invención.

Opción 1: Cristalización fraccionada mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad isopícnica

- 45 La centrifugación ha demostrado ser el 90 % más rentable en productos químicos, el 70 % en términos de carga de trabajo humano, el 60 % más rápida y más ecológica debido a que no utiliza disolventes para separar ácidos grasos libres y grasas (Feng *et al.*, 2004). La centrifugación y la refrigeración se utilizan ampliamente por la industria alimentaria. En la presente invención es posible favorecer la separación y cristalización de los ácidos grasos omega 3 y del PhA con y sin disolventes. El uso de la ultracentrifugación de gran escala se ha generalizado en la industria

farmacéutica. Debe indicarse que la ultracentrifugación permite separar distintas fracciones de ácidos grasos antes de la cristalización.

Se conoce bien el uso de la centrifugación para la separación de macromoléculas, pero todavía no se ha usado para separar moléculas muy pequeñas, tales como los ácidos grasos, con similares pesos moleculares y distintas densidades. Se ha separado el 99 % de DDT, un compuesto liposoluble con un peso molecular comparable al de los ácidos grasos, mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Adamich *et al.*, 1974). En la presente invención se fraccionan por ultracentrifugación de gradiente de densidad isopícnica ácidos grasos con similares pesos moleculares (con 300 Daltons).

El aceite acidificado que contiene ácidos grasos libres se usará en la fase específica de la presente invención: la separación del PhA del aceite rico en omega 3. En este método se cambia el estado físico del aceite mediante la cristalización del propio aceite, que contiene los ácidos grasos omega 3 (es decir: DHA), manteniendo el PhA y el PA en un estado líquido y separando de forma específica el PhA y el PA a partir de la cristalización de las fracciones de DHA, EPA, PhA (3S). Esta técnica permite obtener DHA y EPA con altos grados de pureza >95 % y >99 %, o un triglicérido de calidad alimentaria y farmacéutica (>850 mg/g), sin PhA (< 5 µg/g). También se puede evitar la costosa pérdida de ácidos grasos omega 3.

Los ácidos grasos tienen propiedades de auto-nucleación y no tienen la cualidad de la sobrefusión. El punto de fusión (PF) y el de congelación es el mismo. Debido a esto, para llevar a cabo la purificación de los ácidos grasos omega 3 libres de PhA, sería suficiente obtener dos o más fracciones con puntos eutécticos distintos que permitan el anteriormente mencionado procedimiento de purificación.

Los ácidos grasos saturados tienen un PF elevado (>18 °C) mientras que en los ácidos monoinsaturados el PF es >13 °C. Además, la composición de ácidos grasos saturados y monoinsaturados del aceite sin procesar acidificado es >50 % (para los que se originan en algas) y frecuentemente alcanza el 70 % (aceites de pescado). Sin embargo, la numerosa cantidad y la presencia de especies de ácidos grasos omega 3 reducen significativamente el punto eutéctico, lo que da como resultado un procedimiento de cristalización de enfriamiento ineficaz a temperaturas muy bajas, tales como -20 °C.

Por otro lado, como se aprecia en la Tabla 1, el PF del PhA es 20 °C más alto y 10 °C más bajo los PF del DHA y el EPA, respectivamente. Sin embargo, los isómeros del PhA presentes en determinados aceites (es decir: aceites de pescado) reducen la diferencia existente entre el PhA (3S) y el DHA en aproximadamente 2 °C.

Dado el hecho de que el aceite no cumple las condiciones para la cristalización de sus componentes o ácidos grasos con similares solubilidades para el fraccionamiento, se lleva a cabo un fraccionamiento previo de ácidos grasos mediante cristalización fraccionada por densidad. De esta manera, con la presente invención, se optimiza el método de desodorización, así como la purificación del aceite que contiene omega 3 y la cristalización fraccionada del DHA y omega 3.

Para esta finalidad, inicialmente se lleva a cabo la centrifugación fraccionada por gradiente de densidad o por gradiente autoformado isopícnico. Esta es una técnica usada para separar moléculas de similares pesos moleculares pero con distintas densidades, no sólo en procedimientos de laboratorio sino también esencialmente en procedimientos industriales de la industria farmacéutica, para la purificación y separación proteínas y la creación de vacunas, entre otras aplicaciones.

En esta técnica, el aceite se disuelve en una solución isocrática y bajo una fuerza centrífuga, los ácidos grasos forman un gradiente de acuerdo con su densidad y no con su peso molecular, debido al hecho de que se distribuyen en el reactor durante la centrifugación. La premisa principal es que la máxima densidad del gradiente (es decir, glicerol) debería siempre exceder la densidad de los ácidos grasos. La centrifugación en gradiente de densidad permite que los ácidos grasos se muevan a lo largo del gradiente hasta que alcanzan un punto donde su densidad y la del gradiente son iguales (isopícnica). En este mismo momento tiene lugar la separación por cristalización, ya que la separación convencional hay que hacerla con mucho cuidado y provocaría la contaminación no deseada del aceite omega 3.

Puede utilizarse un gradiente que contenga un disolvente parcialmente apolar (es decir, heptanol) para crear una mezcla de gradiente-aceite homogénea y favorecer la separación de los ácidos grasos individuales sin formar micelas. De esta manera hay una dispersión de los ácidos grasos libres, obteniendo una fracción más pura en ácidos grasos omega 3, sin PhA y sin pérdidas. Sin embargo, esto presenta dos dificultades: la separación del gradiente en el producto final y el hecho de que la separación molecular de ácidos grasos libres necesita un mayor tiempo de ultracentrifugación. Debido a la primera razón, una de las condiciones normales de los gradientes es su solubilidad en agua. Cuando se utiliza un gradiente liposoluble, puede separarse durante el procedimiento final siguiendo este procedimiento y siempre que contenga un PF diferencial con la fracción que va a separarse.

El gradiente utilizado para la presente invención es glicerol, ya que se produce durante del procedimiento, es económico y seguro para el uso alimentario y farmacéutico, sin descartar cualquier otro gradiente para este fin (es decir, sacarosa), siendo en ambos casos su alta viscosidad su mayor inconveniente. Cuando se usa glicerol como gradiente, debe refrigerárselo durante la ultracentrifugación a 10 °C o por debajo del PF del glicerol (18 °C). Sin embargo, se comporta muy bien como líquido superfusionado en disolución con agua u otros disolventes.

En la presente invención se utilizan mezclas de disolventes con glicerol para reducir la viscosidad y bajar el PF del gradiente. Particularmente, es el uso de disolventes es para favorecer la cristalización, pero sobre todo para reducir el punto eutéctico y la viscosidad del gradiente. Es aconsejable el uso, sin ser excluyente, de disolventes de calidad alimentaria y farmacéutica, tales como mezclas de glicerol/agua, isopropanol u otros alcoholes. Los disolventes tales como las mezclas glicerol/agua y la acetona tienen un gran comportamiento anfipático y humectante como disolvente que estimulan la cristalización de los ácidos grasos, en especial a las temperaturas necesarias en la presente invención, ya que tiene un PF muy bajo (-95 °C).

Las mezclas con glicerol más adecuadas son aquellas que permiten al glicerol reducir la viscosidad, reducir moderadamente el PF y significativamente la viscosidad. La reducción de la viscosidad del gradiente es esencial para la resolución de las fracciones y el tiempo de equilibrio para separar con mayor eficacia el PhA. Con las mezclas de glicerol/agua, la proporción ideal es la que le permite la formación de un líquido superenfriado o sobrefusionado, disminuyendo significativamente su PF: glicerol: el 67 % p/p con un PF de -47 °C. Al mismo tiempo se reduce la densidad acortando de forma considerable el tiempo de centrifugado en gradiente densidad, un resultado económico y seguro.

El uso de otras mezclas de glicerol es también posible, usando pequeñas cantidades de disolvente, evitando una caída de la densidad por debajo del DHA ($>0,95 \text{ g/cm}^3$) de forma que se pueda usar como gradiente, actuando los alcoholes como disolventes polares de cadena de corta (C1-C5) para la dispersión de micelas, y preferentemente disolventes para obtener un gradiente parcialmente polar de cadena media (C6-C8) que permite la dispersión de los ácidos grasos libres. La proporción del glicerol en estos alcoholes debe tener mayor densidad y bajo PF. Una cantidad de glicerol entre el 5 % y el 50 % permite una reducción del PF de forma inversamente proporcional en el intervalo de temperaturas durante la ultracentrifugación, reduciendo la densidad y la viscosidad de forma considerable pero siempre $>1 \text{ g/cm}^3$, necesario para la presente invención. Para la presente invención, un gradiente de glicerol al 25 % p/p y un PF de aproximadamente -7 °C permite una optimización del procedimiento de fraccionamiento reduciendo el tiempo de la ultracentrifugación. El glicerol al 50 % p/p es suficiente para obtener un PF de aproximadamente -23 °C y para exceder el máximo de reducción de temperatura de una ultracentrífuga a gran escala.

El uso de gradientes hidrosolubles estimulará la formación de nanomicelas que reducirán el tiempo de equilibrio. Sin embargo, para alcanzar el equilibrio y el fraccionamiento ideales, la composición de estas micelas debe ser altamente homogénea de acuerdo con su densidad. La difusión de los ácidos grasos tendrá lugar siguiendo un patrón de acuerdo con la densidad y no elegido al azar, modificado por la ultracentrifugación en gradiente de densidad. Como ocurrió en el gradiente de centrifugación, se forma el gradiente de densidad de acuerdo con la distancia al eje del rotor; este procedimiento de desarrolla inicialmente formando micelas que contiene los ácidos grasos con la densidad más alta, que formarán la fracción más densa y más alejada al eje del rotor.

El aumento significativo de la densidad de los ácidos grasos, especialmente del PhA y de los ácidos grasos omega 3 saturados, la hacen una técnica eficaz. El principal problema es que un peso molecular relativamente pequeño, necesita velocidades y tiempos muy elevados para obtener la separación. Un exceso de tiempo no afectará a la separación. Sin embargo, como las moléculas tienen tal bajo peso molecular, el tiempo necesitado es elevado (es decir, 48 horas), y aunque no es excepcional en los procedimientos de separación, este tiempo puede optimizarse.

Por medio de una ultracentrifugación isopícnica aplicada en un aceite sin procesar rico en omega 3, se forman 3 fracciones de acuerdo con el peso molecular y la densidad: a) ácidos grasos saturados que contienen principalmente ácido mirístico, palmítico y esteárico con un peso molecular (228-290 g/mol) y una densidad más baja que el aceite ($0,85\text{-}0,86 \text{ g/cm}^3$) b) ácidos grasos monoinsaturados con similar peso molecular y una densidad ligeramente más alta ($0,88\text{-}0,89 \text{ g/cm}^3$) c) ácidos grasos omega 3 con un peso molecular (300-330 g/mol) y densidad más alta ($0,93\text{-}0,95 \text{ g/cm}^3$). El PhA se detecta en la fracción (b) a través de una centrifugación isopícnica con una densidad de ($0,88 \text{ g/cm}^3$).

Esto puede realizarse con gradientes no lineales o lineales, continuos o discontinuos, habiéndose elegido para la presente invención el método lineal continuo debido a su aplicación industrial. Reducir el tiempo necesario para obtener el equilibrio es esencial para la presente invención. Por eso el método más adecuado en este caso es el uso de rotores verticales puesto que reducen considerablemente el tiempo de equilibrio.

La velocidad de la ultracentrifugación puede iniciarse a 30000 rpm o 100000 x g hasta que se alcance el equilibrio. No hay exceso de tiempo en esta técnica. A medida que comienza la ultracentrifugación, los ácidos grasos

comienzan lentamente a difundir con la ayuda del gradiente. Los ácidos grasos saturados cristalizan lentamente a 20 °C y los ácidos grasos monoinsaturados a 10 °C. La formación del equilibrio aumentará significativamente el punto eutéctico del aceite al inicio de la ultracentrifugación y con ello la formación lenta de cristales. Los ácidos grasos no varían significativamente en densidad en un estado sólido.

5 Por lo tanto, la ultracentrifugación a 10 °C contribuye a la cristalización de las fases a descartar (a) y (b), conteniendo ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Por lo tanto, cuando se alcanza el equilibrio es posible separar la fracción líquida que contiene los omega 3 y el gradiente sin riesgo de contaminación.

10 La fracción durante la centrifugación no siempre está completamente cristalizada a 10 °C, dado que la mezcla de ácidos grasos monoinsaturados y de PhA reduce el punto eutéctico. Por esta razón es recomendable el enfriamiento a una temperatura de entre 0 a -5 °C o preferentemente a -30 °C, o a una temperatura por debajo del punto eutéctico de la fracción con ácidos grasos omega 3 purificada, que variará de acuerdo con la composición entre aproximadamente -44 °C y -57 °C, esencialmente dependiendo de la composición del DHA y del EPA.

15 El procedimiento de enfriamiento se puede llevar a cabo simplemente enfriando el vaso de precipitado que contiene el gradiente en equilibrio. Sin embargo este procedimiento de enfriamiento puede tener lugar durante la ultracentrifugación, dado que las ultracentrifugas a gran escala permiten reducir la temperatura a -20 °C, mejorando la cristalización de estas fases. Sin embargo, en la presente invención el procedimiento de refrigeración tiene lugar durante o cerca del punto del equilibrio, garantizando por lo tanto la solidificación del PhA.

20 El ajuste de la temperatura durante la ultracentrifugación a 20 °C o más abajo no es excluyente en la presente invención. Es posible reducir el tiempo de equilibrio y optimizar el procedimiento de ultracentrifugación aumentando la temperatura (es decir, 60 °C) (entre 20 °C y 90 °C), dado que se reduce considerablemente la viscosidad de los ácidos grasos saturados, en particular la de los saturados y monoinsaturados, así como se reduce la viscosidad del gradiente (glicerol), se optimiza el fraccionamiento y se reduce considerablemente el tiempo de centrifugación hasta que se alcanza el equilibrio.

30 Pueden hacerse cambios en el procedimiento de centrifugación isopícnica con el fin de reducir su duración y optimizar la separación del PhA. En este sentido, puede realizarse la cristalización sin alcanzar el equilibrio, para reducir la duración de la ultracentrifugación. Habitualmente, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es de 48-72 horas, dependiendo del gradiente, temperatura, velocidad y rotor utilizado. Puesto que el PhA constituye una fracción muy pequeña y que la pureza química no es un objetivo, es posible obtener las especificaciones de la presente invención sin alcanzar el equilibrio.

35 En el plazo de 24 horas, se ha producido el fraccionamiento de la mayor parte de los ácidos grasos omega 3 y del resto de los ácidos grasos y del PhA. De este modo, la mayor parte de los ácidos grasos incluyendo la mayor parte del PhA es sensible a la cristalización a temperaturas por debajo de las de los ácidos grasos omega 3. De esta manera, los inventores pueden proceder a la cristalización antes de alcanzar el equilibrio, reduciendo la temperatura (es decir, 0 °C) de la ultracentrifugación durante el tiempo que sea necesario (es decir, 24 horas) para separar la fracción líquida que contiene los ácidos omega 3 y el gradiente. Las ultracentrifugas a gran escala permiten alcanzar temperaturas de hasta -20 °C. Haciendo esto, los inventores también pueden separar de forma eficaz el PhA y purificar el aceite que contiene los ácidos grasos omega 3 sin pérdida de cualquier material.

45 Opción 2: Cristalización fraccionada mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad no isopícnica

Aunque es posible la extracción de aceites purificados omega 3 de la fracción, el riesgo de contaminación es alto. También puede reducirse la duración de la ultracentrifugación de forma significativa sin alcanzar un equilibrio completo o cuasiequilibrio del gradiente de densidad. Haciendo esto se podría eliminar una alta concentración de ácidos grasos saturados y una parte del PhA, que de acuerdo con su concentración original y el isómero (3R), podría ser suficiente para obtener las especificaciones de la presente invención. Sin embargo, en la mayoría de las circunstancias, se obtienen mejores resultados cuando la separación es a través de cristalización.

55 En la presente invención pueden establecerse distintos ciclos de temperatura o utilizarse un fraccionamiento zonal para purificar el DHA y el EPA.

60 El isómero PhA (3S), que puede encontrarse habitualmente en pequeñas proporciones en los aceites de pescado y otros aceites de origen marino, con la excepción de mamíferos y microorganismos (es decir, atún rico en DHA), tiene el PF cercano al DHA (Tabla 1 y figura 5). Este isómero constituye un gran escollo para su separación por cristalización. Por lo tanto, la separación de este isómero, en particular cuando se utiliza la presente invención, necesita una centrifugación isopícnica del aceite previa, dadas las diferencias en las densidades del PhA (0,882 g/cm³) y del DHA (0,943 g/cm³), mientras que la temperatura del PF del PhA es inferior en tan solo 2 °C.

El punto eutéctico de los aceites ricos en omega 3 antes de ser fraccionados está por debajo de 40 °C. Con este

procedimiento de separación es posible obtener un comportamiento de la cristalización de las distintas fracciones suficientemente diferencial a partir de los diferentes puntos eutécticos de las composiciones de ácidos grasos de las fracciones. El punto eutéctico de la mezcla en las fracciones (a) y (b) se eleva significativamente, en comparación con la composición original de los ácidos grasos, que contienen el PhA (~0,1 %). En esta fracción también están comprendidos los componentes volátiles responsables del olor característico de los aceites. Dicho punto eutéctico, hace posible la solidificación de la fracción a temperaturas < -20 °C, pero lo suficientemente elevadas como para separar de forma eficaz la fracción (c) de los ácidos grasos omega 3 con un punto eutéctico por debajo de -40 °C. De esta manera el PhA forma parte de la fracción sólida (b) o (b+a). La fracción (b) contiene prácticamente la totalidad del PhA (dos isómeros) de los aceites, lo que permite una separación altamente eficaz del PhA (3S), que tan complicado sería de separar mediante cristalización.

El tiempo de cristalización necesario puede variar entre 18 y 72 horas. La velocidad de enfriamiento debe ser lo suficientemente lenta como para estimular la cristalización de los ácidos grasos, aunque se ha producido cristalización de DHA en 24 horas con una reducción de la temperatura /velocidad de -3,3 °C/hora o velocidad de enfriamiento más baja.

Es posible obtener un crecimiento de los cristales de DHA libres, de forma que una vez separados conservan la menor cantidad posible de fase líquida. Es por esto que podría ser conveniente que durante el procedimiento se formen cristales grandes, bajando lentamente la temperatura. La cristalización puede realizarse en grandes depósitos, mantenidos en cámaras refrigeradas o en congeladores criogénicos a una temperatura inicial de -44 °C.

En aceites no purificados o sin procesar o que contienen una elevada proporción de ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados, se separa el PhA utilizando un ciclo de temperatura -30 °C (entre -20 °C y -40 °C) por debajo del PF de los ácidos grasos omega 3 y del punto eutéctico del aceite. Así es como se puede separar una fracción sólida que contiene los ácidos grasos saturados + los ácidos grasos monoinsaturados + PhA, de la fracción líquida que contiene una elevada pureza en DHA y EPA a través de filtración, si es necesaria.

A esta temperatura, el gradiente de glicerol se cristaliza, manteniéndose en estado líquido únicamente la fracción con la mayor densidad y el menor PF con elevada pureza en omega 3, separándose también el gradiente de los ácidos grasos omega 3. Sin embargo, si se utiliza una mezcla de glicerol/agua al 67 % p/p, permanecerá líquida, lo que permitirá otro procedimiento de centrifugación por gradiente de densidad (es decir, separación de DHA/EPA o aceite rico en DHA/PhA) o para regenerar el gradiente para otro procedimiento de separación de PhA, en otro lote de aceite.

Este procedimiento elimina casi completamente la totalidad de los dos isómeros de PhA. De esta manera se obtiene aceite omega 3 de alta pureza en sus dos componentes principales DHA y EPA (>95 % o >800 mg/g) y habitualmente >99 % desodorizado y con bajo o nulo contenido de PhA. De acuerdo con la proporción de DHA/EPA en el aceite original puede obtenerse:

a) Para un aceite que contiene esencialmente DHA como único ácido graso omega 3 (es decir, *Schizochytrium* sp.) se obtiene un DHA >95 % (>850 mg/g) o >99 % (>900 mg/g).

b) Para una proporción de DHA/EPA >3 (es decir, atún) se obtiene un aceite rico en DHA >700 mg/g que contiene PhA (< 5 µg/g);

c) Para una proporción de DHA/EPA entre 1 y 3 (es decir, salmón) se obtiene un aceite con DHA <700 mg/g que contiene PhA < 90 µg/g;

d) Para una proporción de DHA/EPA <1 (es decir, gallineta nórdica, anchoa, caballa, sardina, bacalao) se obtiene un aceite con EPA >400 mg/g y DHA <400 mg/g que contiene PhA < 5 µg/g.

Con la presente invención también puede fraccionarse el DHA y el EPA, obteniendo un DHA y un EPA de alta pureza y bajo o nulo contenido de PhA. El DHA y EPA presentan una diferencia en el peso molecular del 10 %, suficientemente diferencial para la ultracentrifugación zonal (Arderiu *et al.*, 1998). Para esto, es posible realizar un segundo ciclo de enfriamiento, un procedimiento previo y necesario de ultracentrifugación de gradiente de densidad zonal a -50 °C o entre -44 °C y -54 °C, o a cualquier otra temperatura entre los PF del DHA y EPA. Se obtienen en todos los aceites, independientemente de la composición inicial, una elevada pureza de DHA y de EPA y una baja concentración o sin PhA.

En este punto puede añadirse algún antioxidante lipófilo alimentario o farmacéutico (es decir, tocoferoles) para estabilizar la oxidación de los PUFA. El aceite acidificado con bajo o nulo contenido de PhA requiere una esterificación inmediata de los ácidos grasos libres por alcoholisis o formación de novotriglicéridos, que es el objetivo principal de los inventores, por cualquier método convencional que en la actualidad lleve a cabo en la industria, método enzimático inespecífico o selectivo u otro, con catalizador líquido o sólido (es decir, la patente US 20080114181). En el caso del aceite que contiene etil-éster, se llevará a cabo también la reesterificación para

obtener triglicéridos.

El diagrama como ejemplo para desarrollar triglicéridos de DHA > 700 mg/g y < 0,5 µg/g de PhA. Sin embargo habitualmente pueden obtenerse concentraciones de DHA > 900 mg/g (el máximo teórico de pureza de DHA en un aceite es un triglicérido 100 % puro que contendría aproximadamente 960 mg/g). El procedimiento elegido es el mismo para todas las materias, aunque la concentración de DHA dependerá de las materias primas elegidas al comienzo y del procedimiento opcional para fraccionar el DHA para separar el EPA. En este sentido, para todos los aceites fuente que contienen DHA/EPA > 3 los procedimientos de purificación de omega 3 darán como resultado en purezas de DHA > 700 mg/g. Ejemplos:

Materia prima 1: Aceite que contiene sólo DHA sin un contenido significativo en ácidos grasos omega 3.

- Es decir, aceites a partir de biomasa o microorganismos (es decir; *Schizochytrium* sp.) que contienen triglicéridos DHA > 400 mg/g y PhA > 120 µg/g.

Materia prima 2: Aceites ricos en omega 3 con distintas proporciones de DHA/EPA como el único contenido significativo en ácidos grasos omega 3.

- DHA/EPA <1. Es decir, aceite refinado de gallineta nórdica (el 30 % de omega 3) que contiene triglicéridos DHA > 100 mg/g; EPA > 150 mg/g y PhA > 1900 µg/g
- DHA/EPA >3. Es decir, aceite refinado de atún (el 30 % de omega 3) que contiene triglicéridos DHA > 200 mg/g; EPA >60 mg/g y PhA > 1300 µg/g

- DHA/EPA >3. Es decir, aceite de atún refinado purificado (el 70 % de omega 3) que contiene triglicéridos DHA > 500 mg/g, EPA < 150 mg/g y PhA > 1600 µg/g

Materia prima 3: Se producen y se obtienen aceites de DHA purificados con bajo un contenido en EPA > 700 mg/g, regularmente como etil-éter y formulaciones purificadas (es decir, destilación molecular). No necesitan la purificación de los ácidos grasos omega 3, sólo debe extraerse el PhA.

- DHA/EPA > 7. Es decir, aceite refinado de atún purificado (el 90 % de omega 3) que contiene triglicéridos DHA > 700 mg/g, EPA < 150 mg/g y PhA > 400 µg/g

El procedimiento está simultáneamente libre de PhA y PA, pero como se indica, solo el PhA presenta cantidades clínicamente significativas, que es la razón por la que los inventores se refieren siempre al PhA y solo mencionan el PA en los resultados y de forma esporádica en la patente. El PA se separa en el mismo punto de fraccionamiento por cristalización que el PhA. El ejemplo 1 muestra cuanto PA existía antes y cuanto quedó en el análisis final del producto final (ejemplo 1).

Para ilustrar la invención, se muestran distintos extractos obtenidos de distintos aceites, ricos en DHA y con un bajo contenido en PhA. Los siguientes ejemplos no son exclusivos de la presente invención. Los extractos obtenidos se pueden utilizar más tarde en distintas formulaciones galénicas, preferentemente cápsulas, como complementos para la salud o medicinas para el tratar distintas enfermedades.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimiento para obtener un extracto que contiene triglicéridos con DHA > 700 mg/g y PhA < 5 µg/g, mediante ultracentrifugación isopícnica y cristalización.

La materia prima usada es aceite de atún sin procesar no desodorizado y no purificado (Sanco) que contiene DHA (210 mg/g), EPA (67 mg/g) y omega 3 total (285 mg/g). Tras cuantificar los ácidos grasos del aceite a través de cromatografía de gases y espectrofotometría de masas, se determinó la presencia de PhA (1,3 mg/g). Se establecen dos ciclos de temperatura decrecientes por su mayor eficacia y para lograr rápidamente el fin principal de esta innovación de DHA sin PhA.

1. Saponificación

En un reactor de 5 litros con un agitador los inventores procedieron a saponificar 1000 g de aceite de atún sin procesar con 250 g de KOH, 280 ml de agua y 10 ml etanol para iniciar la reacción a una temperatura de 40 °C en una atmósfera inerte (nitrógeno), agitando la mezcla a 300 rpm durante 1 hora.

2. Formación de acidificación de los ácidos grasos libres a partir de sus sales

A la mezcla de potasio obtenida en la etapa anterior se añaden 3 litros de ácido acético (ácido no oxidante) al 70 % y se mezclan vigorosamente durante 60 minutos a 200 rpm en atmósfera inerte (nitrógeno). Las sales de acetato potásico formadas, precipitan y se eliminan a través de filtración. Una vez asentado, se forman dos fases: una fase apolar y otra fase polar con mayor densidad que contiene el ácido acético restante, que se elimina a través de una

5 apertura en la base del reactor. Después, se realiza un lavado añadiendo al reactor 4 litros de agua purificada y agitando durante 30 minutos a 150 rpm, una vez asentado y se forman dos fases: una apolar que contiene el aceite y una apolar, que contiene el agua, en la base del reactor. La fase apolar se elimina a través de la apertura en la base del reactor. Después, se limpia otras 4 veces más añadiendo 4 litros de agua hasta obtener un aceite acidificado de atún.

10 3. Centrifugación isopícnica

Se centrifuga el aceite de atún acidificado obtenido en la etapa anterior a 150 rpm durante 20 minutos, formándose una fase sólida o estearina y una fase líquida que contiene los ácidos grasos libres que se aspira para utilizarse en la siguiente etapa. Se preparan 2400 ml de gradiente a partir de una mezcla de glicerol/agua al 25 % p/p, añadiendo 1800 de agua y 535 ml de glicerol, en el cual se añaden los ácidos grasos libres previamente obtenidos y el glicerol a temperatura ambiente.

15

Se homogeneiza la mezcla a 3000 g durante 1 h en una ultracentrífuga Hitachi-Koki CC40 y un rotor C40CT4 Core (H). Después, en vacío (27 Pa) y a una temperatura inicial de 10 °C se aumenta la velocidad de centrifugación hasta 100000 g durante 42 h. A las 24 horas de ultracentrifugación se disminuye de forma brusca la temperatura a 0 °C, manteniéndola durante 18 horas hasta alcanzar al equilibrio. De este procedimiento de centrifugación se obtienen 2 fracciones sólidas desechables en el eje del rotor, conteniendo una de ellas ácidos grasos saturados y la otra ácidos grasos monoinsaturados y PhA.

20

Para el análisis de la fase líquida, se obtiene una muestra utilizando una pipeta. Se somete la muestra a un análisis de CG-EM y posteriormente se comprueba la concentración de PhA y DHA, que resultan <90 µg/ml y 740 mg/g, respectivamente.

25

En este caso particular, las fracciones no se separan, a pesar de que podría obtenerse un producto con concentración de PhA por debajo de 90 µg/mg y una concentración de DHA de 740 mg/g, respectivamente.

30

4. Separación mediante cristalización de los ácidos grasos omega 3

A continuación, se lleva a cabo el enfriamiento directo o brusco a una temperatura de -30 °C durante 24 horas del cilindro que contiene las 3 fracciones obtenidas durante la etapa anterior. A esta temperatura se producen dos fases: una sólida y una líquida. La fracción sólida contiene los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, PhA, ácido pristánico y el gradiente de glicerol, mientras que la fase líquida contiene la mezcla de ácidos grasos poliinsaturados rica en DHA. La fracción líquida, que es la más alejada del radio del eje del cilindro, se separa de la fracción sólida a través de la apertura de la base del cilindro.

35

Esta fracción líquida contiene ácidos grasos omega 3 ricos en DHA, con bajo o nulo contenido en PhA. Se analizan los 281 g de ácidos grasos ricos en DHA obtenidos mediante CG-EM. El análisis indica que en los omega 3 antes y después de la refrigeración a -30 °C es del 96,7 % y el 97,2 % respectivamente y los niveles de PhA están por debajo de 90 µg/g antes de la refrigeración e por debajo de 5 µg/g tras la refrigeración.

45

5. Esterificación de los ácidos grasos libres del aceite en triglicéridos

Para la esterificación de los ácidos grasos libres obtenidos durante la etapa 4, se utiliza el método descrito en la patente US20080114181. Utilizando un condensador de Soxhlet, se mezcla la resina de estireno al 5 % y con los ácidos grasos libres (200 g) y glicerol (50 g), introduciendo un termoagitador mecánico en la mezcla a 185 rpm, 40 °C y 20 minutos. A continuación, se añaden 80 ml de etanol a la mezcla y se eleva la temperatura hasta 60 °C y la agitación hasta 235 rpm. Se mantiene la reacción durante 24 horas a presión atmosférica, en una atmósfera inerte (nitrógeno). Después se enfría la mezcla hasta temperatura ambiente y la resina o el catalizador se recuperan por filtración del aceite. Se elimina el etanol, obteniendo una mezcla de triglicéridos.

50

Se toma una muestra del producto final para su análisis por CG-EM tal como se describe y los resultados obtenidos son los mostrados en el ejemplo 1 más adelante (que incluye ácidos grasos libres).

60 En el ejemplo 3 se determina el análisis por CG/EM del aceite para determinar la composición de los triglicéridos, glicéridos parciales y ácidos grasos libres obtenidos.

Del procedimiento realizado durante las 5 fases, se obtiene un aceite completamente desodorizado que contiene triglicérido de DHA a una concentración > 700 mg/g y PhA < 5 µg/g y un total de 870 mg/g de omega 3 (>95 %).

Ejemplo 2: Procedimiento continuo para obtener DHA \geq 700 mg/g y PhA $<$ 90 μ g/g

5 Para llevar a cabo este ejemplo se empleó como materia prima de partida aceite refinado de Gallineta nórdica (*Sebastes* sp.) (LYSI) con un contenido en omega 3 de 315 mg/g, de los cuales 110 mg/g son DHA y 165 mg/g EPA, y 1,9 g/kg de PhA.

1. Saponificación y 2. Acidificación

10 Los inventores procedieron a la saponificación y acidificación de 1000 g de gallineta nórdica siguiendo las mismas proporciones y el procedimiento utilizados en el ejemplo 1.

15 A partir del aceite acidificado se pueden hacer dos cosas. El aceite acidificado se divide en 2 porciones idénticas para la separación del PhA y la purificación de los ácidos grasos omega 3, utilizando una porción para la siguiente etapa:

a) Ultracentrifugación isopícnica y cristalización

1. Centrifugación isopícnica

20 Se centrifugan 500 g de aceite acidificado a 150 rpm durante 20 minutos formando una fase sólida o estearina (274 g), se aspira el sobrenadante líquido que contiene los ácidos grasos libres que van a usarse a continuación sobre un gradiente de glicerol como se indica en el Ejemplo 1. Al igual que en el ejemplo anterior, una vez que se ha alcanzado al equilibrio, se obtienen dos fases sólidas que contienen ácidos grasos saturados, monoinsaturados y PhA y una tercera fase líquida que contiene ácidos grasos poliinsaturados ricos en DHA.

2. Separación mediante cristalización de los ácidos grasos omega 3

30 Se procede a enfriar a una temperatura de -30 °C durante 24 horas el cilindro que contiene las tres fases descritas anteriormente, para solidificar el gradiente y obtener por lo tanto una fracción sólida que contiene ácidos grasos saturados, insaturados y PhA y una líquida que contiene ácidos grasos omega 3. La fracción líquida se separa a través de la apertura en la base del cilindro, obteniendo 156 g de aceite acidificado.

35 De acuerdo con las especificaciones del aceite de gallineta nórdica sin procesar de partida, puede estimarse que la fracción sólida descartada contiene ácidos grasos saturados (68 %), ácidos grasos monoinsaturados (31 %) y 2,2 g de PhA. Se analizan por CG-EM los 156 g de aceite acidificado rico en omega 3 obtenidos, que tienen una pureza en omega 3 del 98,3 % y niveles de PhA $<$ 90 μ g/g.

3. Esterificación de los ácidos grasos libres de triglicéridos (igual que en el ejemplo 1)

40 El procedimiento de esterificación empleado es el descrito en la etapa 5 del primer ejemplo. Utilizando un condensador Soxhlet se mezcla la resina de estireno al 5 % y los ácidos grasos libres (200 g) y glicerol (50 g) introduciendo un termoagitador mecánico en la mezcla a 185 rpm, 40 °C y 20 minutos. A continuación, se añaden 80 ml de etanol a la mezcla y se aumenta la temperatura hasta 60 °C y la agitación hasta 235 rpm. Se mantiene la reacción durante 24 horas a presión atmosférica en una atmósfera inerte (nitrógeno). Entonces se enfría la mezcla hasta temperatura ambiente y la resina o el catalizador se recuperan por filtración del aceite. Se elimina el etanol, obteniéndose una mezcla de triglicéridos. De la muestra obtenida para su análisis por CG-EM se determina que el aceite obtenido contiene menos del 0,4 % de ácidos grasos libres con una concentración de DHA de 470 mg/g y PhA $<$ 90 μ g/g.

b) Centrifugación no pícnica (en gradiente de densidad sin equilibrio)

2. Ultracentrifugación

55 Se centrifugan 491 g de aceite acidificado, a partir del aceite restante obtenido durante las fases 1 y 2 del procedimiento (a) del ejemplo, a 150 rpm durante 20 minutos formando una fase sólida o estearina (267 g) y una fase líquida, que contiene los ácidos grasos libres, que se aspira. Esta fase líquida se añade a un gradiente de glicerol, preparado como se especifica en la fase 3 del ejemplo 1 y se centrifuga a 100000 g x durante 24 horas sin alcanzar el equilibrio.

3. Separación mediante cristalización de los ácidos grasos omega 3

60 Se procede a enfriar directamente el aceite contenido en el cilindro de la centrifuga a -30 °C durante 24 horas. Como resultado se genera una fase sólida, 85 g, que contiene los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y el PhA y

una fase líquida, 145 g, que contiene los ácidos grasos omega 3. Se separa la fracción líquida a través de la apertura en la base del cilindro.

5 Como resultado de este procedimiento y a través de análisis por CG-EM de la fase líquida, se determina que el producto obtenido contiene una pureza de omega 3 del 92,4 % y niveles de PhA <90 µg/g.

4. Esterificación de los ácidos grasos libres de triglicéridos

10 Para esterificar los ácidos grasos libres obtenidos en la fase anterior, al igual que en el Ejemplo 1, se utiliza el método descrito en la patente US 20080114181. Utilizando un condensador Soxhlet, se mezcla la resina de estireno al 5 % y los ácidos grasos libres (200 g) y glicerol (50 g) introduciendo un termoagitador mecánico en la mezcla a 185 rpm, 40 °C y 20 minutos. A continuación se añaden 80 ml de etanol a la mezcla y se eleva la temperatura hasta 60 °C y la agitación hasta 235 rpm. Se mantiene la reacción durante 24 horas a presión atmosférica. El procedimiento tiene lugar en atmósfera inerte (nitrógeno). Después, se enfría la mezcla hasta temperatura ambiente y la resina o el catalizador se recuperan por filtración del aceite. Se elimina el etanol calentando el aceite a 90 °C.

A partir de la muestra obtenida para su análisis mediante CG-EM, se determina que el aceite obtenido contiene menos del 0,6 % de ácidos grasos libres con una concentración de DHA de 440 mg/g y de PhA < 90 µg/g.

20 Dado que en este Ejemplo 2 el producto de partida contenía una cantidad menor de DHA, el producto final también contiene una cantidad menor de DHA. Aun así, podemos concluir que de este procedimiento se es capaz de obtener 4 veces la cantidad de DHA (de 110 mg/g a 440 mg/g) y reducir el PhA 200 veces. Después de repetir el procedimiento utilizando el producto obtenido como producto de partida, se obtiene una composición con 740 mg/g de DHA y menos de 90 µg/g de PhA.

25

Ejemplo 3: Análisis del producto

Para determinar las cantidades totales de ácidos grasos se han realizado los siguientes análisis:

30 **i) Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases - espectrofotometría de masas (CG-EM):**

Reactivos: etanol al 96 %, éter de petróleo, hexano, metanol, KOH 0,8 mol/l (Sigma-aldrich).

35 Instrumento: Detector selectivo de masas Agilent HP 6890 Series CG SYSTEM - 5793; HP Analytical CD-ROM EM Chemstation Libraries Version A.00.00.

Procedimiento: Se mezclaron 50 mg de ácidos grasos en un tubo de ensayo de 10 ml y se agitaron en una mezcla de éter y hexano (2:1), 5 ml de metanol y 1 ml de KOH 0,8 mol/l. Se añadió agua y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se llevó a cabo el análisis por CG/EM.

40

CG/EM: Columna cromatográfica HP-1, 17 m x 200 µm x 0,11 µm. Temperatura del inyector: 280 °C; temperatura de interfase: 290 °C; velocidad: 5 °C/min desde 100 °C hasta 260 °C; columna de helio con flujo de 0,9 ml/min; muestra del inyector: 1 µl; temperatura de la fuente de ionización: 230 °C; temperatura del electrodo 150 °C.

45 **ii) Análisis del PhA mediante cromatografía de gases (CG):**

EXTRACCIÓN: En un tubo con rosca añadir 1 ml de muestra, 9,5 ml de cloroformo/metanol (2:1) y 2 ml de KCl, agitar en un vórtex y centrifugar 20 minutos a 3000 rpm. Separar y se descartar la capa superior (acuosa), filtrar con papel de filtro sobre sulfato de sodio. Recuperar el filtrado (fase orgánica) en un tubo con una rosca superior y evaporar.

50

DERIVATIZACIÓN: Añadir al extracto seco 1 ml de trifluoruro de boro en metanol, calentar a 100 °C durante 30 minutos y enfriar los tubos. Añadir 3 ml de agua y 3 ml de n-hexano, agitar y dejarlo reposar. Separar y guardar la fase superior, añadir a la capa acuosa 3 ml de n-hexano y agitar. Juntar las fases orgánicas, filtrar con papel de filtro sobre sulfato de sodio, evaporar hasta desecar y diluir la muestra con n-hexano, inyectar 2 µl.

55

INSTRUMENTOS: Cromatografía de gases de Agilent Technologies 6890N con ionización de llama (FID). Columna: TRB-WAX 30 m 0,25 mm 0,5 µm. Estándar: Éster metílico de ácido fitánico (Sigma). Reactivo derivatizante: Trifluoruro de boro al 20 % en metanol (Merck). Programa de cromatografía: Temperatura del horno: 205 °C. Temperatura del inyector: 250 °C. Temperatura del detector: 260 °C.

60

iii) Análisis del producto obtenido como resultado del procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Se analizó el producto obtenido en el Ejemplo 1 mediante CG-EM para ácidos grasos y PhA.

El % total de ácidos grasos omega 3 obtenidos del análisis es la suma de DHA+EPA+SDA+DPA. La composición comprende otros ácidos grasos omega 3 en fracciones muy bajas o no detectables debido a la técnica, que no se tienen en cuenta ni en la farmacopea ni en el análisis (es decir, C28:8,n3).

5

Prueba	Especificación		Resultado
	Límite bajo	límite alto	
Absorbancia 233 nm	0,00	0,73	0,21
Color	0	5	2 Gardner
Índice de anisidina	0	20	12
Índice de acidez	0	2	1,23 mg de KOH/g
Valor Totox (Índice de oxidación total)	0	26	11
Valor de peróxido	0	5	2 mEqO2/kg
Colesterol	0	1	0,1 mg/g)
DHA	720	1000	740 mg/g)
EPA	0	150	123 mg/g)
Otros Omega 3	0	50	46 mg/g)
Omega 3 total	87,5	100	909 mg/g)
Otros ácidos grasos poliinsaturados	0	1	0,6 mg/g)
Ácidos grasos saturados	0	1	< 1 mg/g)
Ácidos grasos monoinsaturados	0	1	< 1 mg/g)
PhA	0	5	< 5 µg/ml)
Ácido pristánico	0	2	< 2 µg/ml)
Excipiente: Antioxidante a base de tocoferol	2500	4000	3000 ppm)

Así, las proporciones de la composición obtenida son:

- Ácidos grasos: 91,75 %

10

De los cuales el 80,65 % son DHA, el 13,38 % EPA, el 5,07 % otros omega 3, el 0,69 % otros poliinsaturados, el 0,08 % son otros saturados y el 0,08 % monoinsaturados. El % de impurezas de PhA y PA es <0,000005 % y <0,000002 % respectivamente.

15

- Otros lípidos no saponificables el 0,1 %

- Glicerol (esterificado) el 8,1 %

- Etanol (esterificado) el 0,11 %

20

- Excipientes: tocoferoles (3,5 ppm- 0,000003 %)

- Impurezas pesadas, dioxinas... (< 0,000001 %)

25 iv) Análisis toxicológico de benzopireno (CG-EM):

Thermo-Finnigan AS 2000 en un 5- mm ID Focusliner (Restek, USA) y programa informático Xcalibur 1.2 (ThermoFinnigan Corp.). Columna cromatográfica 30 m x 0,25 mm (ID) x 0,25 mm, Rtx-5 ms (Restek, USA). Temperatura del inyector: 280 °C; temperatura de interfase: 285 °C; velocidad: 25 °C/min desde 75 °C hasta 150 °C; a una velocidad de 4 °C/min hasta 265 °C; y finalmente a una velocidad de 30 °C/min hasta 285 °C. Columna de helio con un flujo de 40 cm/seg; muestra del inyector: 1 µl; temperatura de la fuente de ionización: 200 °C. Se operó en modo selectivo de iones (MSI) con una emisión de 250 mA y voltaje a 70 eV y un control de iones m/z ± 0,5. Para la cuantificación de las muestras de aceite se utilizaron 20, 50, 100, 500, 1000 ng/ml de benzopireno. Se utilizó como control interno perileno-d12 (200 ng/ml).

35

v) Análisis toxicológico PCB y dioxinas furanos (PCDD/Fs)

Se realiza un inmunoensayo para determinar el PCB y sustancias relacionadas y dioxinas/furanos utilizando un kit de inmunoensayo de PCB1 y DF1 de CAPE technologies. Para eso se aplica un método simplificado (Harrison y Carlson, 2000).

5 **vi) Análisis toxicológico de metales pesados:**

Se toman 6 muestras de aceite acidificado y se pesa 1 g de cada una de ellas en un crisol de porcelana de peso conocido. Se mineraliza el aceite mediante calcinación en un horno de mufla seguida de una digestión ácida por presión atmosférica. El método analítico utilizado fue la voltimetría de impulso anódico diferencial (VIAD) de redisolución aniónica con electrodo de gota de mercurio, aplicando un barrido de potencia diferencial entre -1150 y 75 mV. También se utilizó la espectroscopía de absorción atómica de generación de hidruro (HGAAS) para el arsénico y de vapor frío para el mercurio. El líquen *Evernia prunatri* L (IAEA-336) fue el material de referencia, siguiendo en todo momento los métodos y criterios de la normativa vigente (DOCE, 1990). Se usó el programa informático para estadística SPSS 12-0 para Windows XP, realizando la prueba t para muestras independientes y ANOVA de un factor.

15 **vii) Análisis toxicológico del producto obtenido en el ejemplo 1**

Toxicología	límite bajo	límite alto	Resultado
Arsénico	0	0,1	< 0,1 ppm
Plomo	0	0,1	< 0,1 ppm
Mercurio	0	0,1	< 0,1 ppm
Cadmio	0	0,1	< 0,1 ppm
PCBs	0	0,09	< 0,09 ppm
Furanos Dioxinas (Tec.-OMS)	0	1	0 pg
Bezopireno (A)	0	2	2 µg/kg

20 **Ejemplo 4. Encapsulado del producto final.**

Para el consumo oral, se pueden preparar cápsulas de gelatina blanda (gelatina, glicerol, agua) sin descartar otra tecnología de cápsula blanda vegetal para el encapsulado de aceites. Otra composición posible para las cápsulas es añadir al aceite (>95 %) potenciadores del sabor (es decir, 5-6,5 % de aceites esenciales de limón) para rellenar cápsulas blandas masticables (es decir, cubiertas de gel "de muestras" 1,5 %-2,5 % de limón). Con un análisis final de: Energía: 14,7 Kcal; Proteínas: 0,283 g; Carbohidratos: 0,170 g; Grasas: 1,4 g; DHA: 1 g.

También pueden prepararse emulsiones con agua u otra sustancia hidrosoluble, mezclándolas con potenciadores del sabor para consumirse como líquido bebible y para preparar liposomas. El producto final también puede obtenerse en polvo. Otros usos distintos al consumo oral son posibles, en particular como inyecciones intravenosas e intravítreas como emulsiones isotónicas (solución salina).

El producto final de la presente patente es el desarrollo de un complemento y medicamento que contiene el 100 % de aceite líquido obtenido en el Ejemplo 1 en una cápsula de gelatina blanda transparente de tamaño 24 oblonga (composición: gelatina, glicerol, agua) que contiene 1389 mg de aceite de los cuales 1000 mg son DHA. También es posible usar cápsulas con envoltura gastroresistente.

Esta fórmula puede contener cofactores esenciales para el tratamiento de la retinitis pigmentaria tal como: taurina, L-histidinato de beta alanil cinc, ácido lipoico, éster-ascorbato, pigmentos: a) zeaxantina dipamitato (ES *Lycium barbarum*), b) delfidinina (ES *Vaccinium myrtillus* con bajo contenido en cianidina), miricetina, naringenina, hesperitina y sus glucósidos, asiaticósido, ginkgoflavonglucósidos A + B; y galato de epigallocatequina, derivados de vincamina.

45 **i) cofactores utilizados**

Aminoácidos, minerales, vitaminas, coenzimas	Dosis mínima al día	Dosis máx. al día
L-Taurina	250 mg	1000 mg
L-Carnosina (beta-alanil-L-histidina de zinc)	90 mg	375 mg
N-acetil cisteína	100 mg	400 mg
Glutation reducido	12,5 mg	50 mg

Aminoácidos, minerales, vitaminas, coenzimas	Dosis mínima al día	Dosis máx. al día
Acetil-L-carnitina	50 mg	200 mg
Selenio elemental (seleniometonina)	37,5 µg	150 µg
Cinc elemental (glicinato de zinc)	7,5 mg	30 mg
Cobre (gluconato)	25 mcg	100 mcg
Palmitato de retinol (A)	0,5 mg	0,5 mg
Colecalciferol (D)	5 mcg	5 mcg
Éster-C ascorbato de calcio (C)	250 mg	1000 mg
α tocoferil succinato (E)	25 mg	100 mg
d-Biotina (H)	1 mg	1 mg
Piridoxina HCL (B6)*	62,5 mg	250 mg
Cianocobalamina (B12)	25 µg	100 µg
Nicotinamida (B5)	62,5 mg	250 mg
Niacina (B3)	12,5 mg	50 mg
Tetrahidrofolato (B9)	100 mcg	400 mcg
Pirofosfato de clorhidrato de tiamina	25 mg	100 mg
Ácido lipoico	25 mg	100 mg
Ácido dihidrolipoico	100 mg	400 mg
Coenzima Q10**	25 mg	100 mg

ii) Extractos utilizados

Extractos de plantas estándar	Principio activo	Dosis máx. al día
ES <i>Daucus carota</i> C. Carotenoide: Neo-Life Dynamite (GNLD)	β-caroteno Luteína Zeaxantina Licopeno	90 mg 22,5 mg 22,5 mg 37,5 mg
ES <i>Vaccinium myrtillus</i> L (Salvaje: <i>V. angustifolium</i> Aiton) (1) Antho 50® (Antocianósidos 50 %) 80 %	Antocianósidos (15 difer.) Glucósidos de delphinidina (30 %) Preferentemente miricetina glucósidos	750 mg 450 mg Según Est.
ES <i>Lycium barbarum</i> L Polisacaridos LBP (20-90 %) HPLC (2)	Polisacáridos Dipamitato de zeaxantina Betaína	750 mg 40 mg Según Est.
ES <i>Vinca minor</i> L (3)	Fumarato de Brovincamina Vinburnina Vincamina	145 mg 15 mg 120 mg
ES <i>Ginkgo biloba</i> L (extracto EGb 761 50:1 24 % de Ginkgoflavonglucósidos)	Ginkgoflavonglucósidos A + B Glucósidos de miricetina	180 mg Según Est.
ES Centella asiática (40 %-90 %) Asiaticósido HPLC)	Asiaticósido	90 mg
ligninoglucósidos de corteza de ES <i>Eucommia ulmoides</i> (4)	Aucubina 60 %	60 mg
esteroles de ES <i>Equisetum arvense</i> 60 %	Campesterol	30 mg
ES <i>Myrica rubra</i> (o <i>carolinensis</i>) (4)	Glucósidos de miricetina	Según Est.
ES <i>Solanum melongena</i> var. Marunasu L (Nasunin)	Glucósidos de delphinidina	Según Est.
ES <i>Camellia sinensis</i> 98 % Polifenoles 80% EGCG cafeína < 0,5 % HPLC	Galato de epigallocatequina (EGCG)	Según Est.
ES <i>Citrus paradisi</i> L (4)	Glucósido de naringenina (3 hidroxí-grupos	Según Est.)

Extractos de plantas estándar	Principio activo	Dosis máx. al día
ES <i>Citrus aurantium</i> L (4)	Glucósido de hesperitina (3 hidroxigrupos Según Est.)	

iii) Análisis de principios activos relevantes

Sustancias fitoquímicas	Dosis mín. al día	Dosis máx. al día
Asiaticósido	22,5 mg	90 mg
Glucósidos de delfinidina	175 mg	700 mg
Galato de epigallocatequina (EGCG)	50 mg	200 mg
Ginkgolido A	18,75 mg	75 mg
Ginkgolido B	26,25 mg	105 mg
Glucósidos de miricetina	50 mg	200 mg
Polisacáridos LBP-x (<i>Lycium</i> sp.)	187,5 mg	750 mg
Vincamina	30 mg	120 mg
Zeaxantina total (como dipalmitato 57%)	17,5 mg	70 mg

5 iv) Análisis de otros principios activos en la composición

Sustancias fitoquímicas	Dosis mín. al día	Dosis máx. al día
Luteína total	30 mg	30 mg
Beta Caroteno	100 mg	100 mg
Fumarato de brovincamina	145 mg	145 mg
Vinburnina	15 mg	15 mg
Betaína	-	-
Acubina	60 mg	60 mg
Campesterol	30 mg	30 mg
Flavonoides totales	3500 mg	3500 mg
Antocianidinas totales	1200 mg	1200 mg
Flavonoles totales	600 mg	600 mg
Glucósidos de quercetina	150 mg	150 mg
Flavonas totales	300 mg	300 mg
Rutina	100 mg	100 mg
Flavanoles totales	400 mg	400 mg
Flavononas totales (4)	1500 mg	1500 mg
Glucósidos de naringenina	200 mg	200 mg
Glucósidos de hesperitina	200 mg	200 mg
Narirutin (naringenin-7-rutinósido)	300 mg	300 mg
Hesperirutin (hesperitin-7-rutinósido)	300 mg	300 mg

Los distintos glucósidos (es decir, delfinidina y miricetina) a través de por distintos mecanismos, aumentan la concentración de DHA en la retina y en los fotorreceptores e inhiben los fotorreceptores apoptóticos provocados por la luz (Laabich *et al.*, 2007).

Ejemplo 5: Experimentos para determinar la actividad inhibidora del DHA y sus mecanismos de acuerdo con PhA, ya sea *in vivo* (administración oral) o *in vitro*:

15 A) Experimento A: Apoptosis de los fotorreceptores inducida por Paraquat

Amplificación de la señal de tiramida (TSA)-FISH (PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.); anticuerpos secundarios, anticuerpos monoclonales para Bax (sc-7480), Bcl-2 (sc-7382), rodopsina RET-P1 (sc-57433) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. - EE.UU.), PhA, ácido docosahexaenoico, dicloruro de Paraquat, (Sigma-Aldrich). Los disolventes y reactivos tenían calidad HPLC y analítica.

Se prepararon cultivos purificados de neuronas de ratas albinas Wistar, de acuerdo con Politi *et al.*, (1966) y se trataron en un medio con poli-ornitina según describe Adler-R (1982). A los cultivos de neuronas se le añadieron en el primer día de cultivo concentraciones iguales de DHA (9 mM) con 7 concentraciones distintas de PhA (1/5/20/100/500/2500 y 12500 µg de PhA/g de aceite), encontradas habitualmente en los aceites ricos en DHA de origen marino y 2 controles sin DHA, con y sin Paraquat. A los 3 días de cultivo, se añadió Paraquat, incubándolo durante 24 horas antes de la fijación durante una hora con paraformaldehído en una solución salina tamponada con fosfato (NaCl al 0,9 % en NaH₂PO₄ 0,01 M [pH 7,4]), seguido de 15 minutos con Triton X-100 (0,1 %). En la apoptosis, se determinó y cuantificó la expresión de Bax y Bcl-2 de acuerdo con el método de Rotstein-NP *et al.* (2003). Para los estudios citoquímicos, se cuantificaron aleatoriamente 10 campos/muestra, donde los resultados representan la media de 3 muestras/placa para cada concentración de DHA con PhA.

La capacidad anti apoptótica del DHA en los fotorreceptores se correlaciona de forma inversa con la concentración de PhA (Figura 1). Puede obtenerse la mayor actividad anti apoptótica utilizando DHA en concentraciones de 0 y 4 µg/ml de PhA, donde no se detectan diferencias significativas. La actividad anti apoptótica es notablemente más alta en los aceites con DHA con 0 y 4 µg/g de PhA que en los aceites con DHA con concentraciones de ≥ 20 µg/g y ≥ 100 µg/g de PhA respectivamente, donde se reduce de forma significativa la actividad anti apoptótica del DHA. A concentraciones de PhA de 2500 mg/g, la actividad para inhibir la apoptosis de los fotorreceptores se neutraliza y a concentraciones más altas se induce la apoptosis de los fotorreceptores a pesar de la presencia del DHA. El índice de Bcl-2/Bax, además de estar inversamente correlacionado con la apoptosis de los fotorreceptores y el estrés oxidativo, indica que el DHA en concentraciones ≤ 20 µg/g tiene significativamente menos estrés oxidativo que las concentraciones ≥ 100 µg/g.

B) Experimento B: Apoptosis de la retina inducida por MNU

Se utilizaron los mismos materiales y métodos de cuantificación e inmunohistoquímicos que en el Experimento A. Para inducir la apoptosis se utilizó N-nitroso-N-metilurea (MNU) (Sigma-Aldrich) en lugar de utilizar Paraquat. En lugar de analizar los cultivos *in vitro* como en el Experimento A, se analizaron retinas de ratas albinas Wistar sacrificadas. Para este fin, se seleccionaron 8 ratas S-D de 42 días de edad y se alimentaron durante 4 semanas con una dieta basal convencional. Se alimentó cada animal de un modo distinto: una rata estaba en una dieta de control convencional, mientras que para las otras 7 ratas esta dieta se modificó con DHA al 15 %, que tenía concentraciones de PhA distintas como en el Experimento A: 0/4/20/100/500/2500/12500 µg de PhA/g de aceite. Tras estas 4 semanas, se les inyectó una única inyección intraperitoneal de MNU (75 mg/kg de peso corporal). Todas las ratas estuvieron con la misma dieta durante 6 días, sacrificándose al séptimo día, tras 24 horas de ayuno, cuando se llevó a cabo la extracción de las retinas, siguiendo los procedimientos de fijación e inmunohistoquímico como en el Experimento A. Para los estudios citoquímicos se cuantificaron aleatoriamente 10 campos/muestra, donde los resultados representan la media de 10 muestras/ojo.

Al igual que revelaron los resultados *in vitro* (Figura 1), la capacidad anti apoptótica de los fotorreceptores del DHA está inversamente correlacionada con la concentración de PhA. El comportamiento de la concentración de PhA en aceites con DHA *in vitro* también es comparable al observado *in vivo* (Figura 2). Se obtiene la mayor actividad anti apoptótica en concentraciones entre 0 y 20 µg/g, donde no hay diferencias significativas pero, como era el caso con los niveles *in vitro* de 20 µg/g de PhA, la proporción de Bcl-2/Bax era significativamente más baja entre ratas las alimentadas con < 5 µg/g. No hay neutralización del efecto inhibitor de la apoptosis de DHA. Las ratas alimentadas con DHA < 5 µg/g no revelan modificaciones de la actividad anti apoptosis y los marcadores Bax y Bcl-2 con respecto a DHA sin PhA añadido.

Estos dos ejemplos confirman *in vivo* e *in vitro*, que DHA sin PhA es más eficaz y seguro en el tratamiento de enfermedades degenerativas tales como RP, que muchas de las marcas de DHA comerciales con altos niveles de PhA. Estos ejemplos describen mecanismos decisivos de acción del DHA en enfermedades descritas en toda esta patente y cómo el PhA interfiere en su efecto. Esto está en total acuerdo con las numerosas pruebas epidemiológicas y estudios moleculares y preclínicos sobre el efecto perjudicial del PhA y su efecto antagonista con DHA. La actividad de DHA sin PhA en enfermedades neurodegenerativas, urogenitales, enfermedades osteomusculares, enfermedades cardiovasculares y las aplicaciones descritas en la presente innovación, es mayor que la de otros DHA comerciales debido al efecto antagonista de PhA, como se describe en la presente innovación y en particular en la actividad mitocondrial y anti apoptótica observada en estos ejemplos.

Ejemplo 6. Uso de una composición con alto contenido en DHA y sin de PhA para el estudio clínico de la retinitis pigmentaria

En el presente estudio se encuentran por primera vez una elevada frecuencia de varias alteraciones tales como: alteraciones auditivas subclínicas, cardiovasculares graves (arritmias), próstata, hipertensión, diabetes y tiroiditis en pacientes de RP sin síndromes asociados.

5 A lo largo de las últimas décadas, se ha encontrado que el ácido docosahexaenoico (DHA) está reducido en los pacientes de RP, en donde el PhA está aumentado en parte de ellos. Distintos estudios de intervención con animales sugieren beneficios del DHA en niveles controlados de PhA. El DHA es esencial para la supervivencia de los fotorreceptores y para la fototransducción.

10 Para determinar si la ingesta de DHA con PhA < 5 µg/g a una dosis más allá de la nutritiva, podría tratar la RP y qué clase de ventajas clínicas podría tener, se llevó a cabo un ensayo clínico siguiendo un estudio de doble ciego cruzado aleatorizado de intervención. Se eligieron aleatoriamente 40 pacientes con RP, con una media de edad de 46 años (17-70). Se emprendieron las siguientes pruebas: electroretinograma, potenciales evocados visuales (PEV), perimetría automatizada, agudeza visual (AV), audiometría, examen oftalmológico clínico y convencional, análisis de sangre de hemostasis y ácidos grasos. Se llevó a cabo un estudio de doble ciego cruzado aleatorizado de intervención con dos grupos (A y B) que se trataron con una dosis oral de 740 mg/día (dos veces la dosis nutritiva) de DHA bebible y con menos (<0,20 mg de PhA) durante 10 meses, cada uno con un control de los hábitos de estilo de vida. Tras la terminación de esta primera fase del estudio, se cruzaron ambos grupos y se repitió la misma intervención de nuevo en una segunda fase.

25 Resultados: Antes de comenzar el estudio, el 61 % de los pacientes tenían PVE alto de forma anómala, con atrofia macular. El 81 % de los ojos tenía un campo visual < 10° de los cuales el 35,5 % tenía una AV ≥ 0,5 (20/40). Los pacientes con ceguera legal de acuerdo con los valores de AV representaban el 25,8 %. Un 6,4 % tenía una AV < 20/200. La AV promedio era de 0,41 ± 0,22. En pacientes con RP el 48 % tienen una AV ≤ 20/40, que aumenta hasta el 62,5 % más allá de los 60 años con una AV promedio de 0,39±0,21. Se produce una reducción anual de la AV de 0,06. Un subgrupo de pacientes (n=8) mostró altos niveles de PhA y tenía una AV≤0,2. Este subgrupo representaba los únicos pacientes con RP en donde el tratamiento con DHA no dio como resultado una mejora en la AV. En los pacientes restantes (n = 32), que tenían niveles normales de PhA, el tratamiento con DHA dio como resultado un aumento significativo de AV de 0,055 y 0,119 en los grupos A y B. Todas las formas hereditarias de la RP autosómica dominante, simple, autosómica recesiva y esporádica, tenían un aumento en AV: 0,104, 0,091, 0,068 y 0,025 respectivamente. Los ojos con VA1≤0,2, VA2=02-0,5, VA3≥0,5 aumentaron de una manera proporcionar su AV en 0,02, 0,08 y 0,13 respectivamente. En tales pacientes con niveles normales de PhA, se observaron también cambios en el campo visual, aunque no hubo un aumento significativo de la sensibilidad foveal y parafoveal (5,3 %, 9,8 % respectivamente) en el grupo A; y (6,6 %, 11,3 % respectivamente) en el grupo B. En ambos grupos, los niveles de colesterol HDL1 aumentaron en un 30 %.

30 Los pacientes con RP tienen una alta incidencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes e hipertiroidismo. No se encontraron efectos adversos. La función visual parece estar más relacionada con la edad de aparición de los síntomas que con la edad del paciente así como con la concentración de PhA. El tipo dominante tiene un mejor pronóstico que el recesivo. El subgrupo con altos niveles de PhA tiene un peor pronóstico y no muestra mejora en la AV a continuación del tratamiento con 740 mg/día de DHA. En el subgrupo con niveles normales de PhA, el 76,5 % de los pacientes mejoraron su AV, independientemente del patrón hereditario. El tratamiento no produjo mejoras en el campo visual. Este ensayo piloto parece mostrar que el DHA podría ser útil en el tratamiento de al menos la función de la visión central y para determinar a qué dosis podría evitarse la distrofia de retina en la RP, teniendo en cuenta que un subgrupo de pacientes mostraba altos niveles de PhA.

50 **Ejemplo 7. DHA farmacocinético y el efecto en la función visual periférica y central en la RP y tolerabilidad de DHA a 2 dosis: 4 g/día (60 mg/kg) y 8 g/día (120 mg/kg) frente a placebo como tratamiento único de la RP.**

Un estudio aleatorizado, doble ciego controlado con placebo con un grupo paralelo, a 24 meses de tratamiento de doble ciego.

55 Pacientes (n=18) con una edad promedio de 42 años (24-68) de la Asociación de RP (AARPE). De 21 pacientes admitidos en el protocolo, se aleatorizaron 18 al doble ciego; sin embargo, se excluyeron 3 del análisis de intención de tratar porque no se realizó la evaluación de doble ciego o sus centros carecían de pacientes en todos los grupos de tratamiento. Se evaluaron los acontecimientos adversos en los 18 pacientes. De estos, 18 pacientes completaron el tratamiento. Se llevó a cabo un control de hábitos y del DHA y PhA de la dieta. Se emprendieron las siguientes pruebas: electroretinograma, potenciales evocados visuales (PEV), perimetría automatizada, análisis toxicológico e inmunitario, hemostasia y ácidos grasos y subproductos de oxidación.

60 La variable de resultado principal (función visual central) era el cambio en la AV promedio que había aumentado en 24 meses. En los grupos de DHA de 4 g (0,05) y 8 g (0,06), los valores de AV eran significativamente mayores que para el grupo de placebo (-0,04) (P=0,03 y P<0,05, respectivamente); en la variable de resultado secundaria (función

visual periférica), hubo un cambio en el campo visual que había aumentado el 2 % y el 5 % en los grupos de DHA de 4 g y 8 g frente a una disminución del 1,2 % en el grupo de placebo (P=0,15 y P=0,23, respectivamente), aunque no significativo.

- 5 Los grupos de DHA mostraron una mejora electrofisiológica (reducción en la amplitud así como reducción de la latencia de PEV). No estaban presentes diferencias clínicas significativas en el grupo de DHA. A continuación del tratamiento todos los pacientes tenían niveles normales de PhA, excepto por 1 paciente en cada grupo de DHA que tenía niveles altos de PhA. Ninguno de los pacientes tenía problemas de tolerabilidad y no se observaron efectos adversos en el grupo de placebo o DHA. No se observaron variaciones de PhA, excepto en los dos pacientes con
- 10 altos niveles que todavía tenían una reducción del 52 % y el 48 % en el grupo de DHA de 4 g y 8 g respectivamente. El DHA no produjo alteraciones significativas en los niveles de AA y otros ácidos grasos omega-6, aumentando significativamente la concentración de EPA en los grupos de DHA. El aumento de DHA en tejidos diana es proporcional a la dosis terapéutica, en donde se observó que los niveles de DHA eran 5,2, 7,3 veces superiores en fosfolípidos en comparación con los niveles basales. Se lograron concentraciones plasmáticas máximas entre 3 h y
- 15 6 h tras la administración oral con alimento de un contenido en grasas normal.

Por tanto, puede concluirse que la composición del DHA de la invención es eficaz para mejorar la función central visual en la distrofia de retina, aunque debido al tamaño de la muestra y la duración del ensayo, no pueden descartarse beneficios en la función visual periférica de pacientes con RP. También puede concluirse que el DHA se tolera bien como terapia para RP; la respuesta es claramente dependiente de la dosis.

20

Ejemplo 8. Determinar la eficacia y seguridad de la composición de la invención en distintas patologías asociadas a distrofias hereditarias de la retina.

- 25 En el estado de la técnica, las distrofias de la retina incluyen un amplio grupo de enfermedades entre las que pueden encontrarse las siguientes: retinitis pigmentaria autosómica dominante (AD), retinitis pigmentaria dominante recesiva (AR), retinitis pigmentaria simple (SP), retinitis pigmentaria ligada al sexo (XL), enfermedad de Stargardt (ST), coroidemia, Leber etc.

- 30 Para llevar a cabo el siguiente estudio se seleccionaron 171 pacientes, 76 hombres y 85 mujeres, con una edad promedio de 45 años (8-72) del Archivo de Afectado Pacientes de RP (AARPE). Se separaron los individuos en dos grupos. El primer grupo de 97 individuos, 41 varones y 56 mujeres (14 AD, 26 AR, 44 SP, 1 XL, 7 ST, 1 Refsum, 1 Kearns, 3 Usher), se trataron con 4 g/día de la composición de la invención. El segundo grupo de 74 individuos, 35 varones y 39 mujeres (9 AD, 24 AR, 34 SP, 4 ST, 1 Leber, 1 Usher, 1 XL), no recibieron tratamiento alguno. Los
- 35 parámetros tenidos en cuenta para determinar la eficacia de la composición de la presente invención en la evaluación de la enfermedad fueron la agudeza visual (AV) y el campo de visión (CV). Tales parámetros se midieron a lo largo de los 8 años que duró el estudio, a razón de una vez al año.

- Se obtuvieron diferencias significativas en la AV y en el CV de los pacientes tratados del grupo 1, mientras que los parámetros del grupo de individuos no tratados permanecieron invariables o empeoraron, como corresponde a la evolución normal de la enfermedad. En el grupo tratado hubo una diferencia de agudeza visual tras dos años, mientras que el campo visual no mostró diferencias significativas hasta los 6 años. La ingesta de 4 g/día de DHA mejora los parámetros visuales en los pacientes de RP y enfermedad de Stargardt.
- 40

45 Ejemplo 8.1 Coroideremia ligada a X

- 3 hermanos de 9, 13 y 16 años de edad con coroideremia ligada a X mostraban alteraciones en el ERG, ceguera nocturna, sin cambios en la AV y el mayor presentaba cambios en el campo visual pero con un CV >60 °C. Iniciaron el tratamiento con 2 g/día de DHA sin PhA. Tras 6 meses de tratamiento no habían normalizado los niveles de DHA en los fosfolípidos de eritrocitos, ni había variaciones en el ERG. Después, se aumentó la dosis a 4 g/día durante 6 meses, apreciándose un aumento de los niveles de DHA de los fosfolípidos y cambios fotópicos en el ERG y una mejora del CV del paciente de 16 años.
- 50

Ejemplo 8.2 Enfermedad de Stargardt

- 55 6 pacientes con enfermedad de Stargardt de edades comprendidas entre 21 y 42 años tomaron parte en un estudio transversal (estudio 3 de RP) anteriormente descrito. Durante 8 años, 4 de ellos no tomaron tratamiento con el producto de la presente invención (DHA), uno de ellos lo tomó durante 8 años y otro tomó el DHA con el cofactor descrito en la formulación durante 3 años de forma irregular. Todos los pacientes que no recibieron el tratamiento
- 60 tuvieron una pérdida progresiva de la AV siguiendo la evolución natural de la enfermedad, manteniendo una $AV \leq 20/200$ en ambos ojos (AO). Los pacientes que tomaron DHA durante 8 años conservaron la AV 2/10 en AO durante tal periodo sin ninguna variación. El paciente que tomó tratamiento con DHA y la formulación durante 6 meses mejoró la AV de 1/10 en AO a 3/10 en AO. Sin embargo, tras la suspensión del tratamiento la AV empeoró, con una AV de 1/10 dos años después de haber recibido el tratamiento. El paciente retomó el tratamiento hasta la

actualidad (2,5 años), aumentando la AV a 2/10.

Ejemplo 8.3 Retinosquiasis hereditaria

5 A dos hermanos de 11 y 13 años se les diagnosticó retinosquiasis mostrando en el momento del diagnóstico una AV de 4/10 en AO y 6/10 en AO, respectivamente. Comenzaron tomando de forma voluntaria 3 g/DHA de la presente invención durante 31 meses, conservando una AV de 5/10 y 8/10 al final del tratamiento.

10 **Ejemplo 9. Uso de la composición de la invención para el tratamiento de distrofias de retina no asociadas con trastornos genéticos**

El DHA aumenta la resistencia neuronal en condiciones de isquemia, reduciendo la atrofia óptica en las neuropatías y en la distrofia de la retina en vasculopatías. Además de los efectos antiapoptóticos del DHA, tiene un efecto inhibidor sobre las prostaglandinas F2. Los fármacos para el glaucoma y para controlar la presión intraocular (PIO) son análogos al DHA, actuando como antagonistas de receptores de prostanooides vasoconstrictores (PGF2). Por lo tanto, se ha probado el tratamiento en pacientes con retinopatía isquémica proliferativa, neoprostano, uropatía óptica isquémica y desmielinizante, microangiopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad tanto húmeda como seca, glaucoma y miopía magna. La descripción de cada caso es larga. Algunos hay que tipificarlos, pero en todos los casos hubo una mejora de la función visual (medida de acuerdo con de AV y CV) y la maculopatía en estudios de fondo de ojo, tomografía de coherencia óptica (OCT) y angiografía. En particular, en este grupo de pacientes la combinación del DHA con la fórmula descrita anteriormente se vuelve más necesaria debido a las graves alteraciones reológicas de la retina y la biodisponibilidad reducida del DHA en ella. Además, la patología vascular es la principal causa.

25 **Ejemplo 9.1 Edema macular secundario en distrofias de retina (es decir, RP) o de origen isquémico: Edema macular cistoide (síndrome de Irvine-Gass). Escotoma de Berlín.**

30 A 6 pacientes con edades variando entre 33 y 75 años se les diagnosticó al menos 12 meses antes edema macular quistoide y síndrome de Irvine-Gass (EMC) y se trataron a lo largo de 12 meses al menos con corticoides sistémicos, triamcinolona e inhibidores de la anhidrasa carbónica (es decir, acetazolamida). Ninguno de ellos sufría de distrofia de retina conocida. Estos pacientes, al menos 24 meses antes del edema macular quistoide, tenían una AV > 8/10. Antes de recibir el tratamiento con 4 g/día de DHA de la presente invención, asociado con la formulación descrita en la invención, la AV era de 1/10 y 3/10. La duración del tratamiento fue de entre 3 y 12 meses.

35 Tras 3 meses de tratamiento, todos los pacientes aumentaron su AV. Al final del tratamiento, todos los pacientes normalizaron sus AV, logrando una AV entre 9/10 y 10/10, que en un caso fue superior a la AV anterior a la aparición del edema macular quistoide, el cual se produjo tras la cirugía de cataratas.

40 3 pacientes a los que se les diagnóstico RP sufrieron EMC. Se trataron con el mismo programa de tratamiento descrito anteriormente. La AV era 1/10, 1/10 y 1,5/10 antes del tratamiento. Tras 6 meses los tres casos aumentaron la AV hasta 3/10, 6/10 y 7/10. La AV antes de sufrir EMC era de 3/10, 5/10, 7/10.

Ejemplo 9.2. Pars planitis hemorrágica

45 A una niña de 8 años y 32 kg de peso se le diagnosticó pars planitis hemorrágica. 3 meses tras el diagnóstico sin cambios positivos en la evolución clínica, se decide intervenir quirúrgicamente. 10 días antes de la intervención recibe el tratamiento con 3 g/día de DHA de la presente invención hasta 24 horas antes de la intervención (9 días). En el estudio previo a la cirugía, la mejora clínica observada por el especialista retrasó la cirugía en 30 días. Después, la niña tomó un tratamiento de 3 g/día de DHA con niveles de PhA inferiores a 5 ug/g durante 30 días, observándose la remisión completa y la normalización de la función visual.

Ejemplo 10. Efecto suprafisiológico de la composición de la invención en la función visual de pacientes sanos

55 El DHA, en personas sanas, aumenta la fototransducción y la regeneración de la rodopsina. 32 individuos sanos sin distrofia de retina entre 18 y 45 años, sin alteraciones emétopes o hiperométopes, recibieron tratamiento con 4 g/día de DHA sin PhA durante 6 semanas y se estudiaron las AV antes y después del tratamiento.

60 Todos los individuos presentaban una AV al inicio del tratamiento de 10/10. Tras 6 meses todos tenían una AV superior a la unidad (20/16). En dos casos había un astigmatismo 0,0 en ambos ojos. En 9 personas la AV excedió 20/12. Todos aumentaron la adaptación nocturna (adaptometría).

También se ha detectado un aumento de la AV en individuos adultos con miopía sin alterar la graduación óptica. En individuos jóvenes con miopía en desarrollo y en individuos con miopía magna, se produce un estacionamiento de la miopía después de 10 años de seguimiento.

5 Ejemplo 11. Uso de la composición en la invención para el tratamiento de la afección alérgica, la superficie ocular y trastornos de ojo seco.

El efecto del DHA en la superficie ocular proporciona un efecto protector mecánico y nutritivo, protección química y un efecto antiséptico. El DHA ejerce un control neurológico, hormonal, inmunitario y antiinflamatorio (prostaglandinas). El DHA desempeña un papel activo en la organización de la película lipídica lagrimal, reduciendo la evaporación de la fase muco-acuosa, reduciendo la tensión superficial de la interfase y como antibacteriano. Inhibe la apoptosis y regula la secreción de las células Goblet. Normaliza la secreción lipídica y la viscosidad de las glándulas de Meibomio. El DHA actúa en todos los tipos de enfermedades del ojo seco: alergias, hormonales (androgénicas), infecciones y metabólico-dietéticas en la composición de los ácidos grasos. El DHA inhibe la formación de dihidrotestosterona en las glándulas lagrimales, aumentando al mismo tiempo los niveles de andrógenos. Esto previene la apoptosis de las glándulas lagrimales, la necrosis e inflamación. El DHA ejerce un control eficaz en la inflamación crónica, alergia y edema corneal, dado que inhibe la síntesis de leucotrienos (76 %), reduce el PAF plaquetario, la prostaglandina E2 (40 %), reducción de la prostaglandina F2 (81 %) y controla el TNF, interleucinas IL-6 e IL-1b.

A 50 pacientes entre 20 y 43 años sin distrofia de retina y miopía < 9 dioptrías, se les proporcionó una dosis de 4g/día de DHA como tratamiento pre-Lasik, un mes antes de operarse de miopía. Se llevó a cabo una paquimetría y se observa antes de la cirugía un aumento promedio del 12,4 %. En algunos casos la paquimetría antes del tratamiento y después de la cirugía era similar o ligeramente mayor.

25 Ejemplo 12. Tratamiento con la composición de la invención como un coadyuvante en neurología y psiquiatría

Además de la patología genética con los trastornos neurológicos descritos anteriormente, el DHA es deficiente en las enfermedades con trastornos de la alimentación, teniendo un papel determinante en su evolución clínica así como en la remisión, tal como la anorexia y la bulimia, así como en los trastornos mentales esquizotípicos, trastornos de personalidad, trastornos de atención primarios. A través de numerosos estudios observacionales y de intervención se ha observado que el DHA reduce la depresión, agresividad, déficit de atención primario, aumenta la memoria, mejora las capacidades de aprendizaje y reduce el riesgo de padecer Alzheimer. El DHA se acumula en el cerebro y en el tejido neural, siendo la corteza cerebral el área del organismo donde más se conserva. Su papel en el aumento de la sinapsis, en la inhibición de la apoptosis en afecciones isquémicas está ampliamente estudiado.

Se ha estudiado un total 30 casos individuales para el tratamiento de la espasticidad con 4 g/día, 8 g/día, 15 g/día de DHA sin PhA en la esclerosis múltiple y trastornos de la médula espinal: isquemia medular, tumor medular, mielitis transversa, espondilosis cervical, parálisis cerebral o mielopatía degenerativa.

En todos los casos estudiados se obtuvo una reducción significativa con remisiones de la espasticidad, de la rigidez muscular, mejora de la movilidad y reducción de los dolores debidos a espasticidad. Todos los pacientes tenían un largo historial, seguimiento clínico y estaban tratados farmacológicamente (es decir, baclofen, interferón, etc.) durante un periodo no inferior a 2 años, presentando al inicio del tratamiento una mala situación clínica de la espasticidad y movilidad. Los resultados muestran que el tratamiento es dependiente de la dosis, es decir, los pacientes que recibían dosis más elevadas (15 g/día) tenían una respuesta clínica más rápida (antes de 7 días), movilidad aumentada y remisión de la espasticidad de forma más rápida o eficaz que los pacientes tratados con dosis inferiores (4 g/día). Las 3 dosis estudiadas dieron como resultado mejoras de la espasticidad.

50 Ejemplo 13. Tratamiento con la composición de la invención como coadyuvante en terapia oncológica:

El apoyo que ofrece el DHA sin ácido fitánico como coadyuvante en oncología es muy significativo, considerando que el PhA es un factor de riesgo tumoral en los tumores con mayor prevalencia. El PhA aumenta la actividad tumoral, presenta interacciones farmacológicas y posiblemente una mayor mortalidad cardiovascular. Actualmente, el DHA ya está incluido como tratamiento antitumoral (es decir, cáncer de próstata con paclitaxel) debido a los numerosos beneficios que brinda, tal como la inhibición de la angiogénesis, la inducción de la apoptosis en numerosas líneas tumorales, reducción de las recidivas de líneas tumorales, etc. El DHA sin PhA es un cofactor en oncología dado que:

a) Inhibe la angiogénesis de forma muy eficaz a través de distintos mecanismos: control del metabolismo de las prostaglandinas en los tumores e inhibidor potente del VEGF, reducción de la intensidad de los dolores, mejora del efecto antiinflamatorio de los antiinflamatorios y analgésicos, permitiendo dosis inferiores y reduciendo sus efectos secundarios.

65

b) Induce la apoptosis en numerosas células tumorales, aumentando la citotoxicidad de otros tratamientos citostáticos y antitumorales a dosis inferiores. Reducción de la citotoxicidad del tratamiento antitumoral, aumentando su eficacia y permitiendo ciclos de tratamientos más largos.

5 c) Mientras induce la apoptosis en las líneas tumorales en adenocarcinoma de pulmón, próstata, colorrectal, etc. también mejora la función de tejidos sanos en pulmones, corazón, próstata, etc. mejorando significativamente la calidad de vida de los pacientes.

10 d) El DHA sin PhA reduce directamente la cardiotoxicidad, neurotoxicidad y la hepatotoxicidad. También se le ha relacionado con menor toxicidad hematopoyética o medular.

e) El DHA reduce la recidivas en las líneas tumorales con mayor prevalencia (cáncer colorrectal, próstata, mama, pulmón, ovario, gástrico, esofágico, etc.)

15 El DHA sin PhA usado con retinoides son coadyuvantes en tratamientos de adenocarcinoma de pulmón, en particular debido a que la ausencia de PhA no induciría toxicidad añadida a los retinoides. Los retinoides y el DHA tienen actividad sinérgica en determinados cánceres de pulmón, cánceres mieloproliferativos y colorrectales, entre otros. El DHA se ha establecido como un quimiopreventivo en pulmón (Serini *et al.*, 2008), cáncer de colon, etc. En particular las estatinas también son un agente quimiopreventivo y también la presente invención utiliza su asociación. En particular debido a que el PhA induce interacción con las estatinas. El DHA y las estatinas tienen un potencial efecto como tratamiento quimiopreventivo en numerosos y principales tumores, con un gran valor epidemiológico. Su valor epidemiológico, todavía por valorar, conduce a pensar que en la actualidad son importantes agentes en la reducción del número de casos, gravedad y pronóstico, reducción de la metastásis, un aumento de las posibilidades terapéuticas, retraso en la evolución y en la prevención de recidivas. En particular el DHA, dado que no induce efectos secundarios o riesgo añadido en la población, tiene otros importantes efectos preventivos de gran valor epidemiológico con la edad (enfermedades que dan como resultado ceguera y demencia) y en particular dado que es el único nutriente que deficitario en la población general.

30 A modo de ejemplo ilustrativo, pero no limitante, se proporciona una descripción del caso de un paciente con adenocarcinoma de pulmón con más de 20 metástasis en pulmón de menos de 1 cm, así como en huesos e hígado. Los 2 años de historial de tratamiento antitumoral antes de tomar un tratamiento de DHA sin PhA, mostró un empeoramiento con un aumento en el número de metástasis. Después del fracaso de los 3 primeros ciclos de quimioterapia de rescate, se introdujeron 12 g/día de DHA sin PhA en el 4º ciclo de quimioterapia de rescate. En el siguiente control, a las 6 semanas, a través de TAC pélvico-abdominal se informa que hay una remisión de las lesiones. Se terminan los 7 ciclos de protocolo de rescate utilizando como adyuvante el compuesto de la presente invención. En los controles de los últimos 3 años, la actividad antitumoral del paciente permanece en remisión.

35 El uso de DHA sin PhA como coadyuvante para la terapia oncológica mejora el cuadro clínico de los pacientes durante un periodo más prolongado y aumenta la estadística de esperanza de vida.

40

Ejemplo 14. Uso de la composición de la invención en nefrología y urología

45 El tratamiento con DHA de la nefropatía asociada a IgA y en la nefropatía asociada a lupus eritematoso sistémico (LES) está descrita hace más de una década. El DHA inhibe la apoptosis de la nefrona, reduce las lesiones renales isquémicas y es una potente sustancia antiinflamatoria renal en las enfermedades inflamatorias renales (nefritis, glomerulonefritis). El DHA es un coadyuvante ideal para el tratamiento multifármaco inmunosupresor en el trasplante renal. Las células dendríticas, en el caso de tolerancia o rechazo, son las encargadas de presentar los antígenos y "las que deciden si hay rechazo o tolerancia". La modulación de las células dendríticas por el DHA es bien conocida en la prevención del rechazo, del Alzheimer, de enfermedades autoinmunitarias, etc.

50

55 El DHA sin PhA reduce en particular el riesgo de infecciones de orina. Como resultado de su función de control sobre las prostaglandinas, del efecto inhibitor sobre la síntesis de DHT y en particular por no contener PhA, que es el mayor factor de riesgo para el cáncer de próstata, hipertrofia prostática benigna y alteraciones de la función prostática, es eficaz en particular en el tratamiento y la prevención de la hipertrofia prostática benigna y en la prevención de la disfunción eréctil. A continuación se describen 5 casos en los que se demuestra la eficacia frente a distintas nefropatías del DHA sin PhA.

Ejemplo 14.1 Síndrome nefrótico.

60 Niño de 12 años al que se le diagnosticó síndrome nefrótico a los 5 años, controlado con corticoides (15 mg/cada dos días). En varios intentos de suspensión del tratamiento, el síndrome nefrótico se manifestaba niveles graves proteinuria antes de las 3 semanas. Se suspendió el tratamiento y se introdujo 4 g/día de DHA sin PhA y se hizo un seguimiento clínico. Tras 3 meses de tratamiento, no había signos de proteinuria. Tras suspender el tratamiento durante 3 semanas, aparecieron síntomas del síndrome nefrótico, decidiéndose por lo tanto aplicar la composición

de la presente invención durante otros 2 años a una dosis de 4 g/día, permaneciendo durante ese tiempo sin signos de actividad nefrótica.

Ejemplo 14.2 Insuficiencia renal asociada a hipertensión maligna.

5 Paciente masculino de 38 años, consumidor habitual de cocaína que padece un episodio de hipertensión maligna. Se controla la tensión arterial y se elimina el consumo de estupefacientes. El paciente padece atrofia óptica en el ojo izquierdo y neuritis óptica en el ojo derecho, con una agudeza visual de 4/10 e insuficiencia renal con un valor de creatinina de 6,9 mg/dl. Después de 6 meses de seguimiento en el que hay un aumento de la creatinina desde 4,5 mg/dl hasta 6,9 mg/dl, se decide iniciar la diálisis. Antes de iniciar la diálisis, se introduce el tratamiento con 10 8 g/día de DHA sin PhA. Dos semanas tras iniciar el tratamiento, el valor de creatinina se redujo hasta 4,8 mg/dl y se decide posponer la diálisis. Tras 6 meses de tratamiento con la misma pauta de DHA sin PhA, los niveles de creatinina eran de 1,8 mg/dl y la agudeza visual del ojo derecho de 10/10.

Ejemplo 14.3 Insuficiencia renal crónica asociada a nefritis lúpica.

15 Mujer de 24 años con antecedentes de nefritis lúpica desde los 9 años y con tratamiento permanente con corticoides y 6 tratamientos completos de aproximadamente 6 meses con miofenolato y ciclofosfamida a lo largo de 18 años. Se inicia tratamiento con 8 g/día de DHA sin PhA cuando la creatinina era de 4,6 mg/dl. Tras 30 días, el valor de creatinina se redujo hasta 3,1 mg/dl. En el seguimiento de un año, los niveles de creatinina se redujeron hasta 20 1,3 mg/dl. Después se toma de tratamiento durante los siguientes dos años, permaneciendo estables los valores de creatinina. Se suspende el tratamiento y tras 90 días se observa una creatinina de 3,4 mg/dl, por lo que se decide restablecer el tratamiento con 8 mg/día de DHA sin PhA asociado de forma permanente a 1 mg de prednisolona.

Ejemplo 14.4: Trasplante renal en paciente con nefritis lúpica.

25 Paciente de 33 años de edad mujer que tuvo un trasplante renal 6 años antes, con tratamiento estable con un valor de creatinina de 1,8 mg/dl, siguiendo tratamiento de mantenimiento con micofenolato (1 g/día) y Prograf (7 mg/día), que padece un rechazo diagnosticado a través de biopsia renal y con un aumento de la creatinina hasta 2,9 mg/dl. Se aumenta el tratamiento de Prograf y se introduce tratamiento con corticoterapia durante 6 meses, sin resultados 30 en la biopsia y con un valor de creatinina promedio de 2,4 mg/dl. Se introduce el tratamiento con 12 g/día de DHA sin PhA, verificando tras 7 días una reducción de la creatinina hasta 1,7 mg/dl y reduciendo los niveles de creatinina hasta un mínimo de 0,9 mg/dl y un promedio de 1,1 mg/dl durante un año. Se lleva a cabo una biopsia renal que es negativa a rechazo y se introduce un tratamiento de mantenimiento con Prograf (7 mg/día), micofenolato (500 mg/día) y 4 g/día de DHA sin PhA. En el seguimiento de los siguientes 4 años se mantienen los niveles de 35 creatinina a un valor promedio de 1,17 mg/dl, sin evidencias de alteración de la función renal.

Ejemplo 14.5: Trasplante renal no asociado a enfermedad sistémica.

40 Paciente de 70 años mujer, sometida a trasplante de riñón a los 62 años. Dos años después del trasplante padece dos episodios de rechazo con valores de creatinina entre 2,1 y 2,5 mg/dl. Se trata con corticoterapia. Durante los 4 años posteriores, el valor de la creatinina se estabiliza en 1,3 mg/dl. El 6º año desde el trasplante, inicia la toma de DHA libre de PhA a una dosis de 4 g/día, mostrando durante ese periodo valores de creatinina entre 1,1 y 1,2 mg/dl. Tras dos años tomando este tratamiento de forma regular, se observa en los 6 meses posteriores una reducción en los niveles de creatinina de entre 0,97 y 1 mg/dl. El equipo médico determina que la paciente no muestra síntomas 45 rechazo al órgano trasplantado.

Ejemplo 15. Uso de la composición de DHA sin PhA en enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias crónicas y osteoesqueléticas.

50 El papel del DHA en las inflamaciones crónicas es ampliamente conocido y se ha descrito brevemente a lo largo de las distintas secciones de las aplicaciones. Pero el papel más destacado en estos problemas es la regulación de las células dendríticas. En este sentido, el producto de la presente invención es un coadyuvante que reduce la dosis y el tiempo de uso de los inmunosupresores de manera significativa, estudiado en particular en la presente invención para el LES, la artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica y gotosa ; y distrofia muscular. También se 55 conoce bastante bien el papel del producto de la presente invención en la prevención y en el tratamiento de la artrosis y la osteoporosis.

En una paciente de 26 años con diagnóstico de LES y con antecedentes de LES y esclerodermia sistémica con 8 años de seguimiento y tratamiento con 4 g/día de DHA de la presente invención, los signos clínicos desaparecieron 60 incluyendo la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA).

Ejemplo 16. Uso de la composición de DHA sin PhA en dermatología: alopecia androgénica, acné rosácea y acné vulgaris, dermatitis atópica, ictiosis, eritrodermia, esclerodermia, lupus discoide, dermatomiositis, psoriasis.

En la alopecia androgénica (masculina y femenina) está aumentada la actividad de la enzima 5-alfa reductasa, responsable de la producción de dihidrotestosterona (DHT) a partir de testosterona. Un aumento de la DHT da como resultado la caída del pelo. El DHA es un inhibidor de la enzima "5-alfa reductasa" tipo 1 y 2, preservando la actividad androgénica (testosterona). Para inhibir esta enzima se necesita una dosis mínima de 2 g/día de DHA sin PhA, siendo la dosis óptima 4 g/día; pueden observarse cambios en la caída de pelo e inflamación del cuero cabelludo en el plazo de 4 semanas de tratamiento. La supresión de la expresión debería ser continua para evitar la alopecia, pudiendo usarse dosis de mantenimiento menores (1-4 g/día). Este tratamiento tiene la ventaja frente a otros inhibidores (es decir, finasterida) de no reducir los niveles de testosterona necesarios para la salud general y la función de la superficie ocular, próstata, tejido muscular y neural; siendo también útil para el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna.

36 varones entre 18 años y 44 años y 4 mujeres con alopecia androgénica tomaron durante 5 años un tratamiento de 4 g/día de DHA sin PhA. Se estabilizó la caída del pelo en el plazo de 4 semanas en un 92,4 % y un 95 % a las 6 semanas. En varones la densidad capilar aumentó el 52,8 % y el 75 % en mujeres. Se llevó a cabo un seguimiento durante 2 años, durante los cuales no hubo signos de alopecia.

En los casos de dermatitis atópica, psoriasis y alopecia areata, el importante efecto antiinflamatorio del DHA, debido a su control del ciclo celular y sobre el sistema inmunitario (citocinas, células dendríticas, etc.) está detrás de su efecto preventivo y su uso como coadyuvante en estas afecciones.

Uno de los elementos que contribuyen a los problemas de acné es una mayor aumentada de DHT a partir de la testosterona a través de la enzima 5-alfa reductasa. Por lo tanto, la ingesta de DHA, a base del mismo mecanismo explicado anteriormente para la alopecia, contribuye a mejorar el acné. El tratamiento con DHA sin PhA, en su uso oral y su uso tópico sobre la piel, es muy eficaz en el tratamiento del acné debido a sus propiedades antibacterianas y antiinflamatorias, así como a su capacidad para normalizar la secreción de líquido de las glándulas sebáceas de la piel que está controlada por andrógenos, los principales agentes implicados en el acné. Por lo tanto, el uso tópico sobre la piel de 200 mg/cm² durante 20 minutos de 2-5 veces a la semana es particularmente eficaz frente al acné quístico.

Un caso de una mujer de 23 años con un historial de acné quístico complicado y permanente durante 7 años, resistente a tratamientos con antibióticos y ácido cis-retinoico. Se la trató con 4 g/día de DHA sin PhA y dos sesiones a la semana en donde el mismo aceite desodorizado y saborizado con aceite de limón se aplicó de forma directa sobre la piel durante 20 minutos, tras lo cual se retiró. Se detectaron signos de remisión dentro de la primera semana y tras las 8 semanas solo había un acné residual. Se mantuvo el tratamiento oral durante 9 meses hasta la remisión total del acné y que no pudiera detectarse nueva actividad de acné durante al menos un año de seguimiento.

Cada vez se sabe más sobre el papel del DHA como tratamiento en las alteraciones del sistema inmunitario. En particular, en la dermatitis atópica se han llevado a cabo ensayos clínicos en donde los ácidos grasos, tales como el DHA, reducen la respuesta inmunitaria a través de las citocinas (IL-5, IL-13, IL-10 e IFN-gamma) en respuesta a todos los alérgenos, reduciendo la actividad de la dermatitis atópica. En particular, la dermatitis atópica y las aeroalergias están asociadas con la IL-10, en donde el DHA es particularmente eficaz en la reducción de la IL-10 y de la reacción alérgica (Dunstan *et al.* 2003 y 2005).

El DHA de la presente invención muestra una menor actividad alérgica dado que es posible obtener un DHA sin PhA a partir de fuentes distintas al pescado (casos de alergia) y de alta pureza, desodorizado y altamente reducido en péptidos y derivados.

En particular, la composición de la invención es aconsejable para el tratamiento de la ictiosis (es decir, ictiosis arlequin, vulgaris, eritrodermia ictiosiforme congénita), dado que el producto está libre de PhA, un inductor de la ictiosis, y al efecto antiinfeccioso, inmunomodulador y antiapoptosis del DHA, presentando también algunos tipos de ictiosis manifestaciones oculares en la superficie del ojo y la córnea.

Ejemplo 17: Uso de la composición de DHA sin PhA en neumología y asma

En los tejidos diana en donde el DHA se concentra especialmente o en los tejidos en donde hay una elevada actividad mitocondrial, el DHA aumenta la actividad funcional de tales tejidos (es decir, fotorreceptores, neuronas, alveolos pulmonares, células de Purkinje, nefronas, células dendríticas, miocitos lisos y estriados, hepatocitos, espermatozoides, óvulos). Mientras que el DHA mejora la función de tales tipos celulares, el PhA reduce su actividad y función normal a través de la reducción de su actividad mitocondrial.

En este sentido, se sabe que el DHA reduce la respuesta inmunitaria de hipersensibilidad a aeroalérgenos que es responsable no sólo de la dermatitis atópica sino también de enfermedades de las vías respiratorias inferiores y

asma. Además, el DHA tiene un efecto particular en la prevención de enfermedades infecciosas a través la actividad sobre células dendríticas, reduciendo las infecciones y el asma bronquial. Así como el DHA mejora la función de las células dendríticas (actividad antiviral, bactericida, evitar rechazos, antitumoral), también mejora la función respiratoria, siendo particularmente eficaz en el asma y en enfermedades respiratorias crónicas (EPOC). El tratamiento con DHA mejora la capacidad ventilatoria en enfermedades respiratorias crónicas y en el asma (Kompauer *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el uso de la composición de la invención para el tratamiento de la fibrosis quística es muy recomendado, dado que esta patología tiene una deficiencia en DHA así como infecciones crónicas frecuentes. Puesto que la composición de la invención es sin PhA, esto resulta en una actividad antiinfecciosa más fuerte. El DHA tiene funciones específicas en los distintos tipos celulares descritos en la presente invención. Sin embargo, la modulación de las células dendríticas mediante DHA es el mecanismo de acción común más relevante de los tratamientos con DHA como coadyuvante y como medida preventiva en patologías humanas, en particular sin PhA, dado que este último modifica la función de las células dendríticas y aumenta la sensibilidad a infecciones.

15 **Ejemplo 18: Uso de la composición de DHA sin PhA en el aparato digestivo y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII)**

El efecto terapéutico del DHA en la regulación de las prostaglandinas, citocinas y en la homeostasis como fibrinolítico y antiagregante plaquetario en las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (EII) han sido probablemente las primeras aplicaciones conocidas en la bibliografía médica. El DHA ofrece la ventaja sobre otros PUFA que aumenta la actividad de las prostaglandinas de la serie 3 a partir de la síntesis de EPA, en particular a dosis altas de DHA (>4 g/día), inhibe también las prostaglandinas de la serie 2 y tiene una actividad propia a partir de sus propios derivados, los docosanoideos. El DHA también controla la actividad secretora de las células de Globet intestinales y de enterocitos. En estas enfermedades, es necesario un tratamiento preventivo durante largos periodos. En este sentido el tratamiento con DHA es muy adecuado, dado que éste no reduce la síntesis de otros ácidos grasos esenciales tales como el ácido gamma-linolénico (omega 6), necesario para la síntesis de la mayoría de prostaglandinas antiinflamatorias de la serie 1, en donde otros ácidos grasos omega 3 tales como EPA inhiben su síntesis.

El DHA sin PhA muestra una actividad antiinfecciosa aumentada: frente a bacterias, virus, hongos y parásitos, que se aprecia en particular a dosis más allá de 4 g/día. Muchas enfermedades inflamatorias intestinales están asociadas con infecciones crónicas (es decir, *H. pylori*, *Clostridium* sp., etc.). En la presente invención se han llevado a cabo estudios con colitis ulcerosa del adulto e infantil, colitis pseudomembranosa, enfermedad de Crohn, colitis colagenosa, síndrome de intestino irritable, gastritis y esofagitis.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron dosis orales de DHA de 4 g/día de DHA sin PhA y dosis superiores hasta 8 g/día para el tratamiento de los casos agudos. Su uso rectal (en particular en las rectitis) combinado con dosis bajas de corticoides (es decir 5-10 mg/día) da como resultado el tratamiento eficaz de las EII.

Mujer de 32 años con colitis ulcerosa, con un historial de 6 años de enfermedad sin remisión, que se trató durante 6 años con corticoterapia sistémica y propuesta para cirugía. Se la trató con 12 g/día de DHA sin PhA durante 8 semanas junto con corticoides, comenzando con 10 mg de dacortin y una reducción hasta 2,5 mg/15 días. Dentro de las primeras 48 horas de tratamiento hubo una reducción significativa del sangrado y del dolor abdominal y a los 20 días hubo una remisión completa del sangrado. Tras 8 semanas se llevó a cabo una biopsia en donde se observó una reducción significativa de la actividad inflamatoria. Ya sin tratamiento con corticoterapia se redujo la dosis inicial de 12 g/día en 1 g de DHA a la semana durante las 8 semanas posteriores, hasta alcanzar una dosis de mantenimiento de 4 g/día, que se mantuvo durante 2 años durante los cuales la colitis ulcerosa permaneció inactiva.

El uso del DHA como coadyuvante en el tratamiento de la EII con corticoides y estatinas permite reducir la dosis de las últimas y sus efectos secundarios como la lipodistrofia. El DHA sin PhA no interacciona con las estatinas, además, reduce particularmente el riesgo de rabdomiólisis y la hepatopatía asociada a las simvastatinas, reduciendo por lo tanto la necesidad de emplear estatinas, los que están contraindicadas en la lipodistrofia asociada a tratamientos retrovirales. El DHA reduce la hipertrigliceridemia y mejora el perfil lipoproteico, sin reducir la fracción de colesterol LDL, salvo a dosis muy elevadas (>8 g/día) o cuando se combina con el deporte (Yates-A *et al.*, 2009).

Una alternativa al uso de dosis elevadas de DHA (superiores a 8 g/día) podría ser el uso de 1-4 g/día o más, junto con una dosis baja de estatinas (es decir, 5 mg de simvastatina), siendo una dosis eficaz para el tratamiento de la lipodistrofia (es decir, tratamientos con antirretrovirales y corticoides).

El tratamiento de 7 pacientes con una dosis de 4 g/día de DHA sin PhA y corticoides durante más de 3 meses, redujo la formación de lipodistrofia habitual.

Ejemplo 19: Uso de la composición de DHA sin PhA en medicina del deporte:

Existe un creciente interés en el papel del DHA en la medicina del deporte, puesto que éste mejora el perfil

lipoproteico, reduce el colesterol, juega su papel en el control de las células de Purkinje en la regulación de la frecuencia cardíaca y mejora la función ventilatoria y el metabolismo aeróbico en los miocitos. Los estudios llevados a cabo con el DHA en deportistas profesionales, muestran que es el ácido graso con más actividad hipolipemiante y que mejora la capacidad aeróbica, de acuerdo con las investigaciones sobre el papel del DHA en la fisiología y fisiopatología. El DHA tomado de forma crónica en dosificaciones bajas (0,5 g/día) y en forma de un lípido estructurado, puede ser un complemento importante en la reposición de la homeostasis durante el esfuerzo físico moderado e incluso intenso (Lopez-Roman *et al.*, 2008).

La base de estos estudios está en relación a mecanismos de acción donde el PhA es un antagonista particular descrito en la presente invención. Así, desde un punto de vista teórico, se espera que el DHA de la presente invención tenga una mayor actividad en la fisiología del deporte. Como se describe en la invención, el PhA tiene una potente toxicidad y provoca daños irreversibles en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, produciendo una grave reducción de la fosforilación oxidativa, siendo un punto crítico en el rendimiento deportivo y el metabolismo aerobio, muscular y cardiovascular en la medicina del deporte. El PhA está asociado con retraso de conducción y muerte súbita cardíaca (Mönning *et al.*, 2004)

Ejemplo 20: Uso de la composición de DHA sin PhA en patologías de la tiroides

En la actualidad, existe un aumento significativo de casos de tiroiditis, la cual induce hipertiroidismo e hipotiroidismo con presencia de anticuerpos anti tiroides en la población eutiroides con y sin síntomas. En la presente invención se ha descrito en pacientes de RP una relación entre la presencia de anticuerpos anti TPO (anticuerpos anti peroxidasa de la tiroides) y un déficit de DHA. Esta relación también se determinó en pacientes de RP con patología tiroidea y presencia de niveles anómalos de anticuerpos anti tiroide. EL DHA mejora problemas de obesidad en casos de hipotiroidismo, es cardioprotector y mejora el perfil lipoproteico de los pacientes con enfermedad tiroidea.

Se estableció el tratamiento con 4 g/día de DHA sin PhA en 11 pacientes asintomáticos con tratamiento hipertiroideo e hipotiroideo (según el caso, es decir Tirodril y Tiroxina) entre 17 y 49 años, con deficiencia y sin deficiencia de DHA y niveles anómalos de anticuerpos anti tiroides. Tras 6 de meses de tratamiento todos los pacientes mostraron una reducción significativa de los anticuerpos anti tiroides y una reducción significativa de los síntomas de ritmo cardíaco, en pacientes hipertiroideos así como en pacientes hipotiroideos (inducidos por yodo radiactivo), debidos al tratamiento con tiroxina.

Ejemplo 21: Uso de la composición de DHA sin PhA en enfermedades cardiovasculares

Mientras que el DHA tiene un efecto como cofactor en la prevención de factores de riesgo cardiovascular, diabetes, etc., no ha probado tener un efecto clínico significativo en el tratamiento de estos signos. Sin embargo, ha reducido la mortalidad y la morbilidad de los pacientes con enfermedades cardiovasculares. El DHA reduce el efecto ateroesclerótico asociados con tales factores de riesgo. En particular en la diabetes debido a su efecto antiangiogénico y factor neurotrófico en la retina (retinopatía diabética) y neuroprotector (neuropatía diabética).

La composición de la presente invención tiene un potente efecto antiarrítmico, en particular porque está libre de PhA, puesto que el PhA induce retraso de la conducción y muerte súbita cardíaca, siendo más eficaz que el DHA comercial en varios tipos de arritmia. El compuesto de la invención, DHA sin PhA, es útil en la prevención de arritmias y de trombosis, así como en el tratamiento de algunas patologías vasculares tales como el síndrome de Raynaud y para el tratamiento de la hipertrigliceridemia. Además, el DHA reduce el número de muertes debidas a la insuficiencia cardíaca asociada a patologías ateroescleróticas, hiperglucemia, arterosclerosis asociada a hipertensión, diabetes y otros factores metabólicos e infecciosos relacionados con arteriosclerosis tales como altos niveles de homocisteína y apoproteína (a). Redujo particularmente los niveles de apo (a) en 2 pacientes con altos niveles (> 30 mg/dl) que tenían arteriosclerosis cerebrovascular y alteraciones neurológicas de origen isquémico. El tratamiento con 4 g/día redujo en un 50 % los niveles de apo (a) y normalizó la función cognitiva asociada a los infartos cerebrales recurrentes que padecían.

Ejemplo 22: Uso de la composición de DHA sin en enfermedades parasitarias e infecciosas

El principal mecanismo de acción del DHA como agente antiparasitario y antiinfeccioso (parásitos, bacterias, virus y hongos) está relacionado con su potente efecto antiinflamatorio (Tiesset *et al.*, 2009) mediado por citocinas, fagocitosis de leucocitos, como se describió anteriormente en la presente innovación. El PhA reduce la actividad de GTPasas de la subfamilia Rho en células epiteliales y membranas mucosas, que favorecen infecciones bacterianas, fúngicas y parasitarias, un mecanismo que usan numerosas toxinas bacterianas como su principal mecanismo infeccioso (*Pseudomonas*, *Clostridium*, etc.) (Engel y Balachandran, 2009; Genth *et al.*, 2006). El PhA también interacciona con antimitóticos. Por lo tanto, la actividad del PhA es antagónica a la del DHA, muy específica en infecciones, y, por lo tanto, el DHA sin PhA es más eficaz para combatir infecciones.

De modo opuesto al PhA, el DHA reduce las infecciones bacterianas tales como las de *Pseudomonas aeruginosa* en

- infecciones pulmonares mediadas por la respuesta inflamatoria (Tiesset *et al.*, 2009) e infecciones fúngicas (Bajpal *et al.*, 2009) mediadas por docosanoídes específicos de DHA (Haas-Stapleton *et al.*, 2007). En infecciones bacterianas por *Helicobacter pylori*, el DHA ha probado ser, a través de estudios *in vivo* usando el método de Kirby Bauer, una sustancia bactericida activa (Drago *et al.*, 1999). Estudios *in vitro* e *in vivo* determinan la capacidad antiinfecciosa (virus, hongos y bacterias) y antiparasitaria del DHA. El DHA está gravemente reducido en infecciones por *Plasmodium falciparum* (Hsiao *et al.*, 1991), y se sabe que reducciones adicionales (25 %) están asociadas con degeneración de la retina, demencia y un aumento de la aterosclerosis asociado a otros factores de riesgo. También se han asociado infecciones virales (rubéola) con altos niveles de ácido fitánico (Pike *et al.*, 1990).
- El DHA sin PhA puede utilizarse como un compuesto preventivo y potenciador de los efectos de los antibióticos, reduciendo los casos de infecciones y reinfecciones, en particular en infecciones virales y fúngicas. De esta manera se reduce el uso de antibióticos, mejorando su actividad epidemiológica y evitando infecciones virales y fúngicas secundarias al consumo de antibióticos. El efecto antiinfeccioso del producto de la presente invención reduce las complicaciones y la evolución de infecciones de gran relevancia extraintestinal y epidemiológica, tales como la patología digestiva asociada a *H. pylori* y la caries.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamich-M, Towle-A, Lunan-KD. Ficoll density gradient separation of extracellular DDT from *Chlorella*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1974; 12(5):562-6.
- Adler-R. Regulation of neurite growth in purified retina cultures: effects of PNPf, a substratum-bound neurite-promoting factor. J Neurosci Res. 1982; 8: 165-177.
- Allen-NE, Grace-PB, Ginn-A, Travis-RC, Roaddam-AW, Appleby-PN, Key-T. Phytanic acid: measurement of plasma concentrations by gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis and associations with diet and other plasma fatty acids. Br J Nutr. 2008 Mar; 99(3):653-9.
- Anderson-RE, Maude-MB, McClellan-M, Matthes-MT, Yasumura-D, LaVail-MM. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334terhodopsin mutations. Mol Vis. 2002 Sep; 8:351-8.
- Andreola-F, Giandomenico-V, Spero-R, De Luca-LM Expression of a smaller lecithin:retinol acyl transferase transcript and reduced retinol esterification in MCF-7 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Dec; 279(3):920-4.
- Arnhold-T, Elmazar-M, Nau-H. Prevention of Vitamin A Teratogenesis by Phytol or Phytanic Acid Results from Reduced Metabolism of Retinol to the Teratogenic Metabolite, All-transretinoic Acid. Toxicol Sciences. 2002; 66: 274-282.
- Ayranci-E, Akgul-G. Apparent molar volumes and viscosities of lauric, palmitic, and stearic acids in 2-butanol at (20, 30, 40, and 60) °C. Journal of chemical and engineering data. 2003; 48(1): 56-60.
- Bajpai-VK, Kim-HR, Hou-CT, Kang-SC. Microbial conversion and in vitro and in vivo antifungal assessment of bioconverted docosahexaenoic acid (bDHA) used against agricultural plant pathogenic fungi. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009 Mar.
- Barragan-I, Marcos-I, Borrego-S, Antinolo-G. Molecular analysis of RIM1 in autosomal recessive Retinitis pigmentaria. Ophthalmic Res. 2005 Mar-Apr; 37(2):89-93.
- Bazan-NG; Scott-BL; Reddy-TS; Pelias-MZ. Decreased Content of Docosahexaenoate and Arachidonate in Plasma Phospholipids in Usher's Syndrome. Biochem-Biophys-ResCommun. 1986; 141(2): 600-4.
- Bellet-R, Carducci-M, Petrylak-D, Kasimis-B, Irwin-D, Modiano-M, Mansour-R, Axelrod-R, Doukas-M. Phase II study of DHA-paclitaxel (TXP) as first line chemotherapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC). Journal of Clinical Oncology, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 4657
- Boorjian-S, Tickoo-SK, Mongan-NP, Yu-H, Bok-D, Rando-RR, Nanus-DM, Scherr-OS, Gudas-LJ Reduced lecithin: retinol acyltransferase expression correlates with increased pathologic tumor stage in bladder cancer. Clin Cancer Res. 2004 May; 15(10):3429-37.
- Bottino-NR, Vanderburg-GA, Reiser-R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis, Lipids. 1967; 2(6): 489-93.

- Britton-TC; Gibberd-FB; Clemens-ME; Billimoria-JD; Sidey-MC. The Significance of Plasma Phytanic Acid Levels in Adults. *J-Neurol-Neurosurg-Psychiatry*. 1989; 52(7): 891-4.
- 5 • Brown-PJ, Mei-G, Gibberd-FB, Burston-D, Mayne-PO, McClinchy-JE, Margaret-S. Diet and Refsum's disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease. *Journal of Human Nutrition and Diabetics*. 1993; 6 (4): 295-305.
- 10 • Canas-BJ, Yurawecz-MP. Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999; 76(4): 537.
- 15 • Carr-SA; Biemann-K; Shoji-S; Parmelee-DC; Titani-K. N-Tetradecanoyl is the NH₂-Terminal Blocking Group of the Catalytic Subunit of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase from Bovine Cardiac Muscle. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA*. 1982; 79(20): 6128-31.
- 20 • Chau-KY, Sivaprasad-S, Patel-N, Donaldson-TA, Luthert-PJ, Chong-NY. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye*. 2008 Jun;22(6):855-9.
- 25 • Chucair-AJ, Rotstein-NP, Sangiovanni-JP, During-A, Chew-EY, Politi-LE. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Nov; 48(11):5168-77.
- Connor-WE; Weleber-RG; DeFrancesco-C; Lin-OS; Wolf-DP. Sperm Abnormalities in Retinitis pigmentaria. *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci*. 1997; 38(12): 2619-28.
- 30 • Dizhoor-AM; Chen-CK; Olshevskaya-E; Sinelnikova-W; Phillipov-P; Hurley-JB. Role of the Acylated Amino Terminus of Recoverin in Ca(2+)-Dependent Membrane Interaction. *Science*. 1993; 259(5096): 829-32.
- 35 • Dizhoor-AM; Ericsson-LH; Johnson-RS; Kumar-S; Olshevskaya-E; Zozulya-S; Neubert-TA; Stryer-L; Hurley-JB; Walsh-KA. The NH₂ Terminus of Retinal Recoverin is Acylated by a Small Family of Fatty Acids. *J-Biol-Chem*. 1992; 267(23): 16033-6.
- DOCE. Decision de la Comisión, de 26 de septiembre de 1990, por la que se establecen los métodos de referencia para la investigación de residuos de metales pesados y de arsénico (DOUE de 18/10/1990).
- Dorsey-NE. Viscosity of water taken from "Properties of Ordinary Water-Substance. Hafner Publishing Co. New York. 1940. p 184.
- 40 • Drago-L, MombeUi-B, Ciardo-G, De-Vecchi-E, Gismondo-MR. Effects of three different fish oil formulations on *Helicobacter pylori* growth and viability: in vitro study. *J Chemother*. 1999 Jun; 11 (3):207-1 o.
- 45 • Dunstan-JA, Hale-J, Breckler-L, Lehmann-H, Weston-S, Richmond-P, Prescott-SL. Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-1 0 and interferon-gamma responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. *Clin Exp Allergy*. 2005 Oct; 35(10):1309-17.
- 50 • Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy: a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Dec; 112(6):1178-84.
- 55 • Elmazar-MM, Nau-H. Potentiation of the teratogenic effects induced by coadministration of retinoic acid or phytanic acid/phytol with synthetic retinoid receptor ligands. *Arch Toxicol*. 2004 Nov; 78(11): 660-8.
- Elmazar-MM, Rühl-R, Nau-H. Synergistic teratogenic effects induced by retinoids in mice by coadministration of a RARalpha- or RARgamma-selective agonist with a RXR-selective agonist. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001 Jan; 170(1): 2-9.
- 60 • Engel-J, Balachandran-P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *30 Curr Opin Microbiol*. 2009 Feb;12(1):61-6.
- Eter-N, Alex-AF, Spitznas-M, Tittel-AP, Holz-FG, Kurts-C. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate (EGCG), resveratrol and curcumin on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Symposium der International Society of Ocular Trauma*. Wurzburg, Dusseldorf 2008. German Medical Science GMS Publishing House.

- Faber-K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin (2004).
- 5 • Feng-S, Lock-AL, Garnsworthy-PC. Technical Note: A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk. *J Dairy Sci.* 2004; 87:3785-8.
- Ferdinandusse-S, Denis-S, Clayton-PT, Graham-A, Rees-JE, Allen-JT, McLean-BN, BrownAY, Vreken-P, Waterham-HR, Wanders-RJ. Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet* 2000; 24: 188-91
- 10 • Ferdinandusse-S, Zomer-AW, Komen-JC, van-der-Brink-CE, Thanos-M, Hamers-FP, Wanders-RJ, van der Saag-PT, Poll-The-BT, Brites-P. Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Nov 18;105(46):17712-7
- 15 • Finderhut-R, Schmitz-W, Garavaglia-B, Reichmann-H, Conzelmann-E. Impaired degradation of phytanic acid in cells from patients with mitochondrialopathies: evidence for the involvement of ETF and the respiratory chain in phytanic acid alpha-oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 1994; 17(5):527-32.
- Fleury-C, Mignotte-B, Vayssière-JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002 Feb-Mar; 84(2-3):131-41
- 20 • Fuentes-Arderiu-X, Castineiras-Lacambra-MJ, Queralto Compano-JM. *Bioquímica Clínica y Patología Molecular.* 1998 (ed. II); Reverté. 148-9.
- Genth-H, Johannes-H, Hartmanna-B, Hofmanna-F, Justa-I, Gerharda-R. Cellular stability of Rho-GTPases glucosylated by *Clostridium difficile* toxin B. *FEBS letters.* 2006 Jun; 580 (14): 3565-9.
- 25 • Guenzi-E, Topolt-K, Lubeseder-Martellato-C, Jorg-A, Naschberger-E, Benelli-R, Albini-A, Stürzl-M. The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.*2003 Aug;22(15): 3772-82
- 30 • Guo-X, Knudsen-SS, Peehl-DM, Ruiz-A, Bok-D, Rando-D, Rando-RR, Rhim-JS, Nanus-DM, Gudas-LJ. Retinol metabolism and lecithin:retinol acyltransferase levels are reduced in cultured human prostate cancer cells and tissue specimens. *Cancer Res.* 2002 Mar; 62(6): 1654-61.
- 35 • Guo-X, Nanus-DM, Ruiz-A, Rando-RR, Bok-D, Gudas-LJ. Reduced levels of retinyl esters and vitamin A in human renal cancers. *Cancer Res.* 2001 Mar; 61(6): 2774-81.
- Guo-X, Ruiz-A, Rando-RR, Bok-D, Gudas-LJ. Esterification of all-trans-retinol in normal human epithelial cell strains and carcinoma lines from oral cavity, skin and breast: reduced expression of lecithin:retinol acyltransferase in carcinoma lines. *Carcinogenesis.* 2000 Nov; 21(11):1925-33.
- 40 • Gutierrez-Torre-SM. *Retinitis pigmentaria; Estudio Comparativo de la Metodica y Resultados del Tratamiento en España y la Unión Soviética. "Tesis Doctoral". Universidad-Oviedo.* 1994.
- 45 • Gutknecht-J. Proton/hydroxide conductance through phospholipid bilayer membranes: effects of phytanic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Apr; 898(2): 97-108.
- Haas-Stapleton-EJ, Lu-Y, Hong-S, Arita-M, Favoreto-S, Nigam-S, Serhan-CN, Agabian-N. *Candida albicans* modulates host defense by biosynthesizing the pro-resolving mediator resolvin E1. *PLoS ONE.* 2007 Dec; 2(12):13-16.
- 50 • Haim-M. Prevalence of Retinitis pigmentaria and Allied Disorders in Denmark. II. Systemic Involvement and Age at Onset. *Acta-Ophthalmol-Copenh.* 1992; 70(4): 417-26.
- 55 • Hansen-RP. 3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic acid: its occurrence in the tissues of humans afflicted with Refsum's syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 1965 Oct; 106(2):304-10.
- Harrison-RO, Carlson-RE. Simplified sample preparation methods for rapid immunoassay analysis of pcds/fs in foods. 2000; 20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. August 13-17, 2000 Monterey, California.
- 60 • Hashimoto-T, Shimizu-N, Kimura-T, Takahashi-Y, Ide-T. Polyunsaturated Fats Attenuate the Dietary Phytol-Induced Increase in Hepatic Fatty Acid Oxidation in Mice. *J. Nutr.* 2006 April; 136:882-6.

- Hoffman-DR; Birch-DG. Docosahexaenoic Acid in Red Blood Cells of Patients with X-Linked Retinitis pigmentaria. *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci.* 1995; 36(6): 1009-18.
- 5 • Horii-N, Arato-S, Narayan-B, Hosokawa-M, Sashima-T, Miyashita-K. Occurrence of conjugated cyclopropanoid acid in purified fish oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2007; 84 (8): 749- 54.
- Hsiao-LL, Howard-RJ, Aikawa-M, Taraschi-TF. Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J.* 1991 Feb 15; 274 (Pt 1):121-32.
- 10 • Hsing-AW, Comstock-GW, Abbey-H, Polk-BF. Serologic Precursors of Cancer. Retinol, Carotenoids, and Tocopherol and Risk of Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82:941-6.
- Idel-S, Ellinghaus-P, Wolfrum-C, Nofer-JR, Gloerich-J, Assmann-G, Spener-F, Seedorf-U. Branch Chain Fatty Acids Induce Nitric Oxide-dependent Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Bioi Chem.* 2002 December; 15 277(51): 49319-25.
- Jones-RJ, Hawkins-RE, Eatock-MM, Ferry-DR, Eskens-FA, Wilke-H, Evans-TR. A phase II open-label study of DHA-paclitaxel (Taxoprexin) by 2-h intravenous infusion in previously untreated patients with locally advanced or metastatic gastric or oesophageal adenocarcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Mar; 61(3):435-41.
- 20 • Jurukovski-V, Simon-M. Reduced lecithin:retinol acyl transferase activity in cultured squamous cell carcinoma lines results in increased substrate-driven retinoic acid synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan; 1436(3):479-90.
- Kahler-S, Schönfeld-P, Reiser-G. The Refsum disease marker phytanic acid, a branch chain fatty acid, affects Ca²⁺ homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. *Neurobiol Dis.* 2005 Feb; 18(1):110-8.
- 25 • Ko-CH, Shen-SC, Hsu-CS, Chen-YC. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade. *Biochem Pharmacol.* 2005 Mar; 30 69(6):913-27.
- Ko-CH, Shen-SC, Lee-TJF, Chen-YC. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4:281- 30 90
- 35 • Kokame-K; Fukada-Y; Yoshizawa-T; Takao-T; Shimonishi-Y. Lipid Modification at the N Terminus of Photoreceptor G-protein α -Subunit [Comentarios]. *Nature.* 1992; 359(6397): 749-52.
- Komen-JC, Distelmaier-F, Koopman-WJ, Wanders-RJ, Smeitink-J, Willems-PH. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Dec; 64(24):3271-81.
- 40 • Kompauer-I, Demmelmair-H, Koletzko-B, Bolte-G, Linseisen-J, Heinrich-J. Association of fatty acids in serum phospholipids with lung function and bronchial hyperresponsiveness in adults. *Eur J Epidemiol.* 2008; 23(3): 175-90.
- 45 • Kroemer-G, Galluzzi-L, BrennerC. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol.* 2007; 87: 99-163.
- Laabich-A, Manmoto-CC, Kuksa-V, Leung-OW, Vissvesvaran-GP, Karliga-I, Kamat-M, Scott-IL, Fawzi-A, Kubota-R. Protective effects of myricetin and related flavonols against A2E and light mediated-cell death in bovine retinal primary cell culture. *Exp Eye Res.* 2007 15 Jul; 85(1):154-65.
- 50 • Lide-DR, Milne-GWA. *Handbook of Data on Organic Compounds.* Edición: 3, ilustrada, revisada, publicada por CRC Press, 1994; 6560 páginas. ISBN 0849304458.
- 55 • Liu-L, Gudas-LJ. Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency. *J Bioi Chem.* 2005 Dec; 280(48): 40226-34.
- Lloyd-MD, Darley-DJ, Wierzbiki-AS, Threadgill-MD. Alpha-methylacyl-CoA racemase-an 'obscure' metabolic enzyme takes centre stage. *FEBS J.* 2008 Mar; 275(6):1089-102.
- 60 • López-Roman-J, Luque-A, Martínez-A, Villegas-JA. Modifications in oxidative damage in sportsmen after docosahexaenoic acid (DHA) ingestion. *J Int Sports Nut.* 2008 Jun.
- Martínez-M. Severe Changes in Polyunsaturated Fatty Acids in the Brain, Liver, Kidney, and Retina in Patients

- with Peroxisomal Disorders. *Adv-Exp-Med-Biol.* 1992; 318: 347-59. • Matsuura-T, Hasumura-S; Nagamori-S, Murakami-K. Retinol esterification activity contributes to retinol transport in stellate cells. *Cell Struct Funct.* 1999 Jun; 24(3): 111-6.
- 5 • McColl-AJ; Converse-CA. Lipid Studies in Retinitis pigmentaria. *Prog-Lipid-Res.* 1995; 34(1): 1-16.
- Mobley-JA, Leav-I, Zielie-P, Wotkowitz-C, Evans-J, Lam-YW, L'Esperance-BS, Jiang-Z, Ho-SM. Branch Fatty Acids in Dairy and Beef Products Markedly Enhance α -Methylacyl-CoA Racemase Expression in Prostate Cancer Cells in Vitro. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2004 August; 12: 775-83.
- 10 • Mönning-G, Wiekowski-J, Kirchhof-P, Stypmann-J, Plenz-G, Fabritz-L, Bruns-HJ, Eckardt-L, Assmann-G, Haverkamp-W, Breithard-G, Seedorf-U. Phytanic acid accumulation is associated with conduction delay and sudden cardiac death in sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x deficient mice. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2004 Nov; 15(11): 131 0-6.
- 15 • Moriguchi-K; Yoshizawa-K; Shikata-N; Yuri-T; Takada-H; Hada-T; Tsubura-A. Suppression of N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in rats by docosahexaenoic acid. *Ophthalmic Res.* 2004 Mar-Apr;36(2):98-105.
- 20 • Moriguchi-K; Yuri-T; Yoshizawa-K; Kiuchi-K; Takada-H; Inoue-Y; Hada-T; Matsumura-M; Tsubura-A. Dietary docosahexaenoic acid protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *Exp Eye Res.* 2003 Aug; 77(2):167-73.
- Neubert-TA; Johnson-RS; Hurley-JB; Walsh-KA. The Rod Transducin Alfa Subunit Amino Terminus is Heterogeneously Fatty Acylated. *J-Biol-Chem.* 1992 Sep; 267(26): 18274-7.
- 25 • Nourooz-Zadeh-J, Pereira-P. Age-related accumulation of free polyunsaturated fatty acids in human retina. *Ophthalmic Res.* 1999; 31 (4):273-9.
- 30 • Nus-M, Sanchez-Muniz-FJ, Sanchez-Montero-JM. Methodological Aspects and Relevance of the Study of Vegetable Oil, Fat and Lipoprotein Oxidation Using Pancreatic Lipase and Arylesterase Food Technol. Biotechnol. 2006; 44 (1): 1-15.
- O'Brien-PJ; St Jules-RS; Reedy-TS; Bazan-NG; Zatz-M. Acylation of Disc Membrane Rhodopsin may be Nonenzymatic. *J-Biol-Chem.* 1987; 262: 5210-5.
- 35 • O'Brien-PJ; Zatz-M; Acylation of Bovine Rhodopsin by [H3] Palmitic Acid. *J-Biol-Chem.* 1984; 259: 5054-7.
- Pahan-K, Khan-M, Smith-BT, Singh-I. Ketoconazole and other imidazole derivatives are potent inhibitors of peroxisomal phytanic acid alpha-oxidation. *FEBS lett.* 1995 Dec; 377(2):213-6.
- 40 • Pasquali-D, C Thaller-C, Eichele-G. Abnormal level of retinoic acid in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinology & Metabolism.* 1996; 81: 2186-91.
- 45 • Pike-MG, Applegarth-DA, Dunn-HG, Bamforth-SJ, Tingle-AJ, Wood-BJ, Dimmick-JE, Harris-H, Chantler-JK, Hall-JG. Congenital rubella syndrome associated with calcific epiphyseal stippling and peroxisomal dysfunction. *J Pediatr.* 1990 Jan;116(1):88-94. Erratum in: *J Pediatr* 1990 Feb; 116(2):320.
- 50 • Politi-LE, Bouzat-C, De los Santos-EB, Barrantes-FJ. Heterologous retinal cultured neurons and cell adhesion molecules induce clustering of acetylcholine receptors and polynucleation in mouse muscle BC3H-1 clonal cell line. *J Neurosci Res.* 1996; 43:639-651.
- Powers-JM *et al.* Cerebellar atrophy in chronic rhizomelic chondrodysplasia punctata: a potential role for phytanic acid and calcium in the death of its Purkinje cells. *Acta Neuropathol (Berl).* 1999 Aug; 98(2):129-34.
- 55 • Pullarkat-RK; Reha-H; Patel-VK; Goedel-HH. "Ceroid-Lipofuscinosis: Batten's Disease". (Armstrong-D, Koppang-N; Rider-JA. Eds.). Amsterdam. Elsevier-Biomedical-Press. 1982; 335..43.
- 60 • Ratnayake-WMN, Olsson-B, Ackman-RG. Novel branched-chain fatty acids in certain fish oils. *Lipids.* 1989; 24(7): 630-7.
- Reiser-G, Schönfeld-P, Kahlert-S. Mechanism of toxicity of the branch-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment. *Int J Dev Neurosci.* 2006 Apr-May; 24(2-3): 113-22.

- Rotstein-NP, Politi-LE, German-OL, Girotti-R. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 May; 44(5):2252-9.
- 5 • Rotstein-NP; Aveldano-MI; Barrantes-FJ; Roccamo-AM; Politi-IE. Apoptosis to Retinal Photoreceptors During Development In Vitro: Protective Effect of Docosahexaenoic Acid. *J Neurochem.* 1997; 69(2): 504-13.
- Schaefer-EJ; Robins-SJ; Patton-GM; Sandberg-MA; Weigel-DiFranco-CA; Rosner-B; Berson-EL. Red Blood Cell Membrane Phosphatidylethanolamine Fatty Acid Content in Various Forms of Retinitis pigmentaria. *J-Lipid-Res.* 1995; 36(7): 1427-33.
- 10 • Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G. A study of the cytotoxicity of branched-chain phytanic acid with mitochondria and rat brain astrocytes. *Exp Gerontol.* 2006 Jul; 41 (7):688-96.
- 15 • Schönfeld P, Reiser G. Rotenon-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Bioi Chem.* 2006 Mar 17; 281(11):7136-42.
- Schönfeld-P, Kahlert-S, Reiser-G. In brain mitochondria the branch-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. *Biochem J.* 2004; 383(Pt 1):121-8.
- 20 • Schönfeld-P, Woitczak-L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug; 1767(8): 1 032-40.
- Serini S, Trombino S, Oliva F, Piccioni E, Monego G, Resci F, Boninsegna A, Picci N, Ranelletti FO, Calviello G. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MKP-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression. *Apoptosis.* 2008 Sep;13(9):1172-83.
- 25 • Serkov IV, Grigor'ev W, Ivanova TA, Gretskeya NM, Bezuglov W, Bachurin SO. Effect of derivatives of docosahexaenoic acid on AMPA receptors in Purkinje neurons. *Dokl Biol Sci.* 2006 Nov-Dec; 411 :434-5.
- 30 • Sheren-Manoff-M, Shin-SJ, Su-D, Bok-D, Rando-RR, Gudas-LJ. Reduced lecithin:retinol acyltransferase expression in human breast cancer. *Int J Oncol.* 2006 Nov; 29(5):1193-9.
- Shucheng-L, Chaohua-Z, Pengzhi-H, Hongwu-J. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. *J Food Engineering.* 2006; 73(3) 203-9.
- 35 • Simmons-DP. Andreola-F, De Luca-LM. Human melanomas of fibroblast and epithelial morphology differ widely in their ability to synthesize retinyl esters. *Carcinogenesis.* 2002 Nov; 23(11):1821-30.
- 40 • Steinberg-D. Refsum disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. 2.* (Scriver-CR, Beaudet-AL, Sly-WS, Valle-D. Eds.) New York. McGraw-Hill. 1995; 2351-69.
- Thornburg-T, Turner-AR, Chen-YQ, Vitolins-M, Chang-B, Xu-J. Phytanic acid, AMACR and prostate cancer risk. *Future Oncol.* 2006 Apr; 2(2):213-23.
- 45 • Tucker-B, Klassen-H, Yang-L, Chen-DF, Young-MJ. Elevated MMP Expression in the MRL Mouse Retina Creates a Permissive Environment for Retinal Regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Apr; 49(4):1686-95.
- Voss-A; Reinhart-M; Sprecher-H. Differences in the Interconversion between 20- and 22- Carbon (n - 3) and (n - 6) Polyunsaturated Fatty Acids in Rat Liver. *Biochim-Biophys-Acta*, 1992; 1127(1): 3340.
- 50 • Wallström-P, Bjartell-A, Gullberg-B, Olsson-H, Wirfalt-E. A prospective study on dietary fat and incidence of prostate cancer (Malmö, Sweden). *Cancer Causes Control.* 2007 Dec; 18(10):1107-21.
- 55 • Walsh-PC. Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk. *J Urol.* 2005 Nov; 174 (5):1824.
- Weleber-RG; Tongue-AC; Kennaway-NG; Budden-SS; Baist-NRM; Ophthalmic Manifestations of Infantile Phytanic Acid Storage Disease. *Arch-Ophthalmol.* 1984; 102: 1317-21.
- 60 • Wieloch-T, Mattiasson-G, Hansson-MJ, Elmer-E. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Brain Energetics.* Int Mol Cel Processes. Springer US. 2007; 667- 702.
- Wong-F. Investigating Retinitis pigmentaria: A Laboratory Scientists Perspective. *Prog-Retinal-Eye-Res.* 1997; 16

(3): 353-73.

- 5 • Xu-J, Thornburg-T, Turner-AR, Vitolins-M, Case-D, Shadle-J, Hinson-L, Sun-J, Liu-W, Chang-B, Adams-TS, Zheng-SL, Torti-FM. Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk. *Prostate*. 2005 May; (15) 63: 209-214.
- Yates-A. Study Shows Fish Oils Dramatically Improve Cholesterol Levels in Professional Football Players. 2009. *Sport Health*.
- 10 • Yoshizawa-K, Tsubura-A. [Characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals and application for the therapy of human retinitis pigmentaria]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2005 Jun; 109(6):327-37.
- 15 • Yue-J, Thewalt-JL, Cushley-RJ. Deuterium nuclear magnetic resonance study of the interaction of branched chain compounds (phytanic acid, phytol) with a phospholipid model membrane. *Chem Phys Lipids*. 1988 Dec; 49(3):205-13.
- 20 • Zhan-HC, Gudas-LJ, Bok-D, Rando-R, Nanus-DM, Tickoo-SK. Differential expression of the enzyme that esterifies retinol, lecithin:retinol acyltransferase, in subtypes of human renal cancer and normal kidney. *Clin Cancer Res*. 2003 Oct; 9(13):4897-905.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de una composición rica en ácidos grasos omega 3 a partir de un aceite de origen marino, con un contenido de ácido fitánico (PhA) de menos de 90 µg/g en el que tal procedimiento incluye las siguientes etapas:
- a) un aceite de origen marino se saponifica para obtener sales de ácidos grasos.
 - b) las sales de ácido graso de la etapa a) se acidifican para obtener aceite acidificado.
 - c) el aceite acidificado de la etapa b) se somete a ultracentrifugación en un gradiente de glicerol a una temperatura de 10 °C en vacío a 27 Pa.
 - d) el gradiente de glicerol de la etapa c) se somete a cristalización en un intervalo de temperatura entre 0 y -57 °C, obteniendo una fase sólida y una fase líquida, en donde la fase sólida contiene ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y PhA y la fase líquida contiene ácidos grasos omega 3 poliinsaturados con un contenido de PhA por debajo de 90 µg/g
 - e) la fase líquida de la etapa d) se separa de la fase sólida para su recuperación a través de decantación.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que adicionalmente, incluye una etapa adicional en la cual los ácidos grasos omega 3 se esterifican para la obtención de triglicéridos omega 3 con un contenido de PhA por debajo de 90 µg/g.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en la que la saponificación de la etapa a) se lleva a cabo con KOH, agua y etanol, agitando la mezcla a una temperatura de 40 °C a 300 rpm durante 1 hora en una atmósfera inerte.
4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 en el que la etapa de acidificación b) se lleva a cabo mezclando las sales de ácidos grasos obtenidas en la etapa a), con ácido acético al 70 % en una atmósfera inerte a 200 rpm.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la ultracentrifugación de la etapa de c) es isopícnica y se lleva a cabo a 100000 g durante 42 horas.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la ultracentrifugación de la etapa c) es en un gradiente de densidad sin equilibrio y se lleva a cabo a 100000 g durante 24 horas.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la etapa de cristalización d) se lleva a cabo a 0 °C.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la etapa de cristalización d) se lleva a cabo a -30 °C.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la etapa de cristalización d) se lleva a cabo a -30 °C.
10. Composición **caracterizada por** comprender ácidos grasos omega 3 en un intervalo del 65 % al 99 % en peso y un contenido en PhA por debajo de 90 µg/g.
11. Composición de acuerdo con la reivindicación 10 en la que el contenido de PhA está por debajo de 5 µg/g.
12. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10-11, en la que el intervalo de ácidos grasos omega 3 es del 75 % al 99 % en peso.
13. Composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el intervalo de ácidos grasos omega 3 es del 90-99 % en peso.
14. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en la que los ácidos grasos omega 3 comprenden ácido docosahexaenoico (DHA) en un intervalo entre el 65 % y el 95 % en peso.
15. Composición de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el intervalo de DHA es del 75 % al 95 % en peso.
16. Composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el intervalo de DHA es del 80-95 % en peso.
17. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-16 en la que los ácidos grasos omega 3 adicionalmente incluyen ácido eicosapentaenoico (EPA) en un intervalo del 5 al 35 % peso.
18. Composición de acuerdo con la reivindicación 11 en la que el contenido total de ácido graso es el 91,75 % en peso, del que el 80,65 % son DHA, el 13,38 % son EPA, el 5,07 % son otros ácidos grasos omega 3, el 0,69 % son otros ácidos grasos poliinsaturados, el 0,08 % son otros ácidos grasos saturados y el 0,08 % son ácidos grasos

monoinsaturados.

- 5 19. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-18 que comprende adicionalmente excipientes y/o adyuvantes destinados al uso farmacéutico y alimentario.
20. Complemento nutricional que comprende las composiciones de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-19 en la forma de una bebida, geles blandos o duros, emulsión acuosa o polvo.
- 10 21. Producto alimenticio que comprende la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-19 en la forma de una bebida, geles blandos o duros, emulsión acuosa o polvo.
22. Una composición farmacéutica que comprende una composición rica en ácidos grasos omega 3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 y un diluyente o transportador farmacéutico.
- 15 23. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la afección alérgica en el ojo, la superficie ocular y/o el ojo seco.
- 20 24. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 23 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en blefaritis, blefaroconjuntivitis, conjuntivitis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, enfermedades de la córnea, tratamiento frente al rechazo del trasplante de córnea, aumento de la densidad celular promedio de la córnea a través de paquimetría antes y después de cirugía Lasik.
- 25 25. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades degenerativas de la retina no asociadas con distrofias genéticas.
- 30 26. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 25 en la que la enfermedad se selecciona en el grupo que consiste en degeneración macular asociada con la edad húmeda y seca, retinopatía asociada con diabetes, glaucoma, alteraciones de la presión intraocular, retinopatía asociada con miopía, desprendimiento de retina, desprendimiento de retina regmatógeno en ojos miopes después de LASIK, edema macular secundario de origen isquémico, Edema macular quistoide, Síndrome de Irvine-Gass, Escotoma de Berlín, Coroidosis, coriorretinitis, Neurorretinitis Sifilítica, Rubeola, Citomegalovirus, Melanoma maligno de coroides, venenos de mercurio (enfermedad de Minamata, Acrodinia, síndrome de Hunter-Russell), Vasculitis de retina (enfermedad de Eales), o retinosquias traumática hemorrágica.
- 35 27. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de distrofias de la retina hereditarias que no son retinitis pigmentaria.
- 40 28. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 27 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Stargardt, amaurosis congénita de Leber, Coroideremia ligada a X, retinosquias ligada a X, distrofia vitreoretiniana de Goldman-Favre, distrofia vitreoretiniana de Wagner y síndrome de Stickler, Pars Planitis Familiar.
- 45 29. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la Retinitis pigmentaria (RP).
- 50 30. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de síndromes relacionados con la Retinitis Pigmentaria.
- 55 31. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 30 en la que en la enfermedad se selecciona del grupo que consiste, en RP no sindrómica como resultado de mutaciones específicas y/o insuficiencia en la síntesis hepática o transporte de DHA o como consecuencia de estrés metabólico, tipos Mendelianos de RP no sistémica típica, RP no sistémica sectorial, RP no sistémica bilateral, RP no sistémica unilateral, RP no sistémica bilateral, RP no sistémica inversa, RP autosómica dominante, RP autosómica recesiva, RP ligada a X, RP simple o esporádica, RP vitreoretiniana, RP puntacta albescens, RP sin pigmento, atrofia de coroides, atrofia girata de coroides y/o de retina, RP con distrofia de conos y bastones, síndrome de Usher tipo I, síndrome de Usher tipo II, síndrome de Usher tipo III, síndrome de Usher tipo IV, RP iatrogénica tal como NP 207, Tioridazina, cloroquina, hidroxicloroquina y clorpromazina, Síndromes genéticos con defectos peroxisómicos con RP y/o deficiencias en el DHA y aumentos en PhA y PA que presentan alteraciones neurológicas, cardiovasculares, osteomusculares y/o dermatológicas variables, síndrome de Zellweger, enfermedad de Refsum Infantil, adrenoleucodistrofia neonatal, trastorno de biogénesis peroxisómica, condrodiplosia punctata rizomélica (CDPR), deficiencias de la acil-CoA oxidasa, deficiencias enzimáticas bifuncionales, enfermedad de Refsum, deficiencia de la β -oxidación, queratodermia ictiosiforme Familiar, síndrome de Sjogren-Larsson, enfermedades con mitocondriopatías, deficiencia de COX y/o síndrome de Leigh, síndromes genéticos con defectos peroxisómicos, mitocondriales y/o relacionados con RP y alteraciones de retina relacionadas, síndrome de Bassen-kornzweig, síndrome de Batten o de lipofuscinosis,

hipoprebetalipoproteinemia, síndrome de Usher, síndrome de Hallervorden-Spatz, Aceruloplasminemia, síndrome de Kearns-Sayre, distrofia muscular de Duchenne y Becker, síndrome de Lawrence-Moon-Bardet-Biedl, síndrome de Lawrence-Moon, síndrome de Bardet-Biedl, síndrome de Grafe, síndrome de Hallgreen, síndrome de Cokaine, síndrome de Alstrom, síndrome de Pelizaeus-Merzbacher, Ataxia Cerebelosa, Ataxia de Friederich, Lipofuscinosis, 5 maurítico familiar idiopático, síndrome de Tay-Sachs, síndrome de Haltia-Santavuori, Biel-Schowsky-Jansky, síndrome de Vogt-Spielmeyer-Batten-Mayou, síndrome de Kufs, Displasia Osteoneuroendocrina, Mucopolisacaridosis, síndrome de Hurler, síndrome de Hunter, síndrome de Scheire, MPS I-H/S, Sanfilippo, síndrome de Bassen Kornzweig, Displasia Negro-retiniana, Displasia ósea, síndrome renal óculo óseo, síndrome de Edwards, síndrome de Oculocerebrorenal ligado a X recesivo o de Lowe, Síndrome de Lignac-Fanconi (cistinosis), 10 neuropatía Gigante Axonal, y/o Demencia familiar Danesa.

32. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la uveítis o enfermedades relacionadas.

15 33. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 32 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en iritis, Pars planitis, coroiditis, coriorretinitis, uveítis anterior y/o posterior, iridocicloroiditis, uveítis infecciosa, Brucelosis, Herpes simplex, Herpes zoster, Leptospirosis, enfermedad de Lyme, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, sífilis, Toxocariasis, Toxoplasmosis, Tuberculosis, Candidiasis, síndromes de uveítis, 20 epiteliopatía pigmentaria placoide multifocal posterior aguda, retinocoroidopatía de Birdshot, iridociclitis heterocrómica de Fuchs, Coroiditis Multifocal y Síndrome de Panuveítis, síndrome de múltiples puntos blancos evanescentes, coroidopatía punteada interna, coroiditis serpigínosa, trastornos sistémicos asociados con uveítis tales como espondilitis anquilosante, enfermedad de Behcet, enfermedad granulomatosa crónica, entesitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad reumatoide juvenil, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, poliartritis nodosa, artritis psoriática, síndrome de Reiter, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, síndrome de 25 Vogt-Koyanagi-Harada, enfermedad de Whipple, síndromes de mascarada en los segmentos anterior y/o posterior, retinoblastoma, desprendimiento de retina, melanoma maligno, leucemia, xantogranuloma juvenil, cuerpo extraño intraocular, linfoma, esclerosis múltiple y/o sarcoma de células reticulares.

30 34. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad degenerativa de la retina y afecciones oftalmológicas secundarias relacionadas con enfermedades vasculares.

35 35. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 34 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en retinopatía hipersensitiva, neuropatía isquémica óptica hipersensitiva, Coroidopatías Hipersensitivas, esclerosis de coroides, trombosis de la vena ramificada o central, estrías de Elschnig y Slegrist, aterosclerosis, isquemia cerebral y neuro oftálmica, síndrome del arco aórtico, enfermedad de Takayasu, arteritis de Takayasu, Panarteritis, iridociclitis, escleritis, neovascularización prerretiniana producida por isquemia y que puede dar como resultado hemorragias vítreas, edema de la córnea, Tyndall en el humor acuoso, retinopatía diabética proliferativa o glaucoma neurovascular, insuficiencia de carótida o isquemia ocular crónica, obstrucción de la arteria 40 oftálmica, obstrucción de la arteria retiniana central, trastornos de la coagulación, deficiencia de las proteínas S y C, retinitis de Panoftalmia, coroiditis, estasis capilar, hemorragias de retina, manchas de Roth, lesiones debidas a inmunocomplejos, neuropatía óptica, retinopatía isquémica, oftalmoplejía, pseudotumor orbitario, síndrome isquémico ocular, infarto del lóbulo occipital, diplopía, edema palpebral, ptosis palpebral, telangiectasias de párpados, de conjuntiva, de retina, obstrucción aguda de la arteria retiniana central, oftálmica o de sus ramificaciones, obstrucción de las arterias ciliares posteriores, neuropatía óptico isquémica de origen no arterítico, 45 síndrome isquémico ocular crónico producido por hiperperfusión y/o visión borrosa o síndrome de Shy-Drager.

50 36. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la pérdida de agudeza visual no asociada con la retina y otros usos oftálmicos no relacionados con la superficie ocular.

37. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 36 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cataratas, hipermetropía, miopía, presbicia, vitritis, desprendimiento vítreo y/o en endoftalmitis.

55 38. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos neurológicos y/o psiquiátricos.

39. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 38 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en neuropatías sensoriales motoras particularmente hereditarias, demencia, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple y/o ataxia.

60 40. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades oncológicas.

41. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 40 en la que la enfermedad se selecciona del grupo

que consiste en metástasis, las líneas tumorales más prevalentes, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer renal, hepatocarcinoma, cáncer de cerebro, glioblastoma, melanoma, retinoblastoma, vesícula biliar, mieloma múltiple, cánceres endocrinos y/o cánceres relacionados con una resistencia a la insulina.

- 5 42. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de nefropatías.
- 10 43. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 42 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en nefropatía por IgA y/o nefropatía asociada con el lupus eritematoso sistémico, insuficiencia renal, glomerulopatía, tubulopatía, enfermedad vascular intersticial y/o renal.
- 15 44. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares.
- 20 45. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 44 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en, alteraciones isquémicas, arteriosclerosis, hipertrigliceridemia, hiperlipemias, arritmias ventriculares, hipertensión, diabetes y/o enfermedades cardiovasculares en las que están aumentados los niveles de la Apoproteína a (apo (a)).
- 25 46. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades iatrogénicas.
- 30 47. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 46 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en rabdomiolisis, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad, neurotoxicidad, edema, lipodistrofia y/o inmunosupresión, asociada con estatinas, corticoides, anti retrovirales y/o inmunosupresores.
- 35 48. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la fibromialgia y/o síndrome de fatiga crónica.
- 40 49. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la artrosis o la osteoporosis.
- 45 50. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias crónicas y/o enfermedades osteomusculares.
- 50 51. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 50 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis juvenil, enfermedad de Sjogren, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, artrosis y/u osteoporosis.
- 55 52. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades dermatológicas.
- 60 53. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 52 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en alopecia androgénica, acné rosácea, acné vulgaris, eccemas y/o psoriasis.
54. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de afecciones alérgicas, asma y/o enfermedades respiratorias crónicas.
- 55 55. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades del sistema digestivo y/o enfermedades inflamatorias intestinales.
56. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 55 en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en gastritis autoinmunitaria, viral y/o tóxica, esofagitis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis pseudomembranosa, colitis colagenosa, alteraciones de la permeabilidad intestinal, síndromes de malabsorción, intolerancia y alergias alimentarias y/o hemorroides.
- 60 57. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades parasitarias e infecciosas.
58. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención del déficit de DHA.
59. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 58 en la que la enfermedad se selecciona del grupo

que consiste en síndromes de malabsorción gastrointestinal, fibrosis quística, síndrome de malabsorción intestinal, pancreatitis, insuficiencia pancreática, colelitiasis, trastornos alimentarios, anorexia, bulimia.

5 60. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso en el tratamiento o prevención de la deficiencia nutricional común de DHA observada en las sociedades humanas, mujeres embarazadas, mujeres en lactancia y/o la infancia.

10 61. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 19 para su uso para mejorar los estados fisiológicos aumentando la agudeza visual, la memoria y las funciones cognitivas, aumentando el rendimiento deportivo y reduciendo lesiones y/o reduciendo la fatiga neuromuscular normal.

FIG 1

Cultivos celulares	PhA $\mu\text{g/ml}$	% apoptosis/ placa	% Bcl-2 (+)	% Bax (+)	Proporción Bcl-2/Bax
Control DHA (-) Paraquat (-)	0	31,4 \pm 4,2	42,1 \pm 3,6	2,1 \pm 0,3	20,0
Control DHA (-) Paraquat (+)	0	74,4 \pm 8,1	36,8 \pm 6,1	12,4 \pm 1,1	3,0
DHA(+) ₀	0	34,2 \pm 2,3	62,4 \pm 3,5	2,5 \pm 0,6	25,0
DHA(+) ₁	4	35,3 \pm 1,9	60,9 \pm 2,2	2,3 \pm 0,2	26,5
DHA(+) ₂	20	42,2 \pm 4,6	63,6 \pm 1,4	2,6 \pm 0,7	24,5
DHA(+) ₃	100	51,1 \pm 6,4	54,5 \pm 4,1	3,3 \pm 1,0	16,4
DHA(+) ₄	500	61,7 \pm 7,5*	48,3 \pm 3,7	4,5 \pm 0,9	10,7
DHA(+) ₅	2500	73,3 \pm 5,8	42,4 \pm 4,2	6,7 \pm 1,4	6,3
DHA(+) ₆	12500	82,6 \pm 7,7	38,4 \pm 7,1	14,7 \pm 2,7	2,6

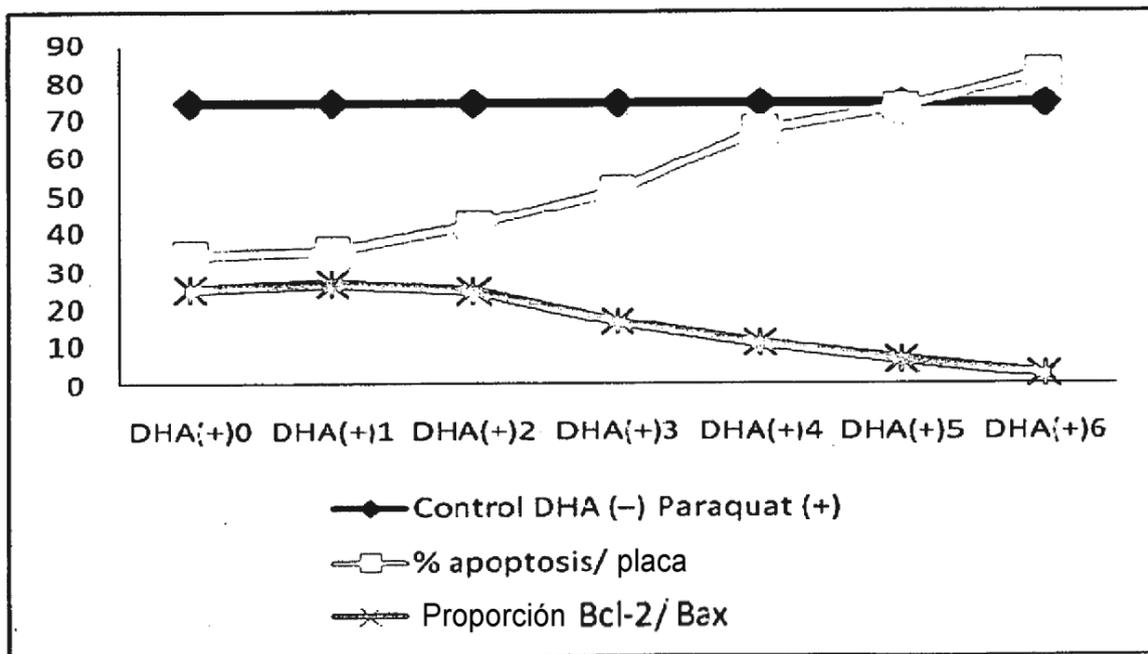


FIG 2.

Retinas de ratones albinos	PhA µg/ml	% apoptosis/ placa	% Bcl-2 (+)	% Bax (+)	Proporción Bcl-2/Bax
Control DHA (-) MNU (+)	0	84,4±5,3	31,3±4,3	17,1±2,7	3,0
DHA(+) ₀	0	31,2±2,3	71,1±6,2	1,9±0,3	37,4
DHA(+) ₁	4	29,8±3,9	70,4±6,3	2,0±0,5	35,2
DHA(+) ₂	20	35,6±2,9	64,2±4,1	2,3±0,2	27,9
DHA(+) ₃	100	43,7±3,4	57,6±5,8	3,1±0,7	18,5
DHA(+) ₄	500	53,1±5,2	46,1±4,9	4,3±1,3	10,7
DHA(+) ₅	2500	62,1±4,6	39,8±3,3	8,3±1,9	4,8
DHA(+) ₆	12500	71,6±5,5	33,2±5,7	13,2±2,5	2,5

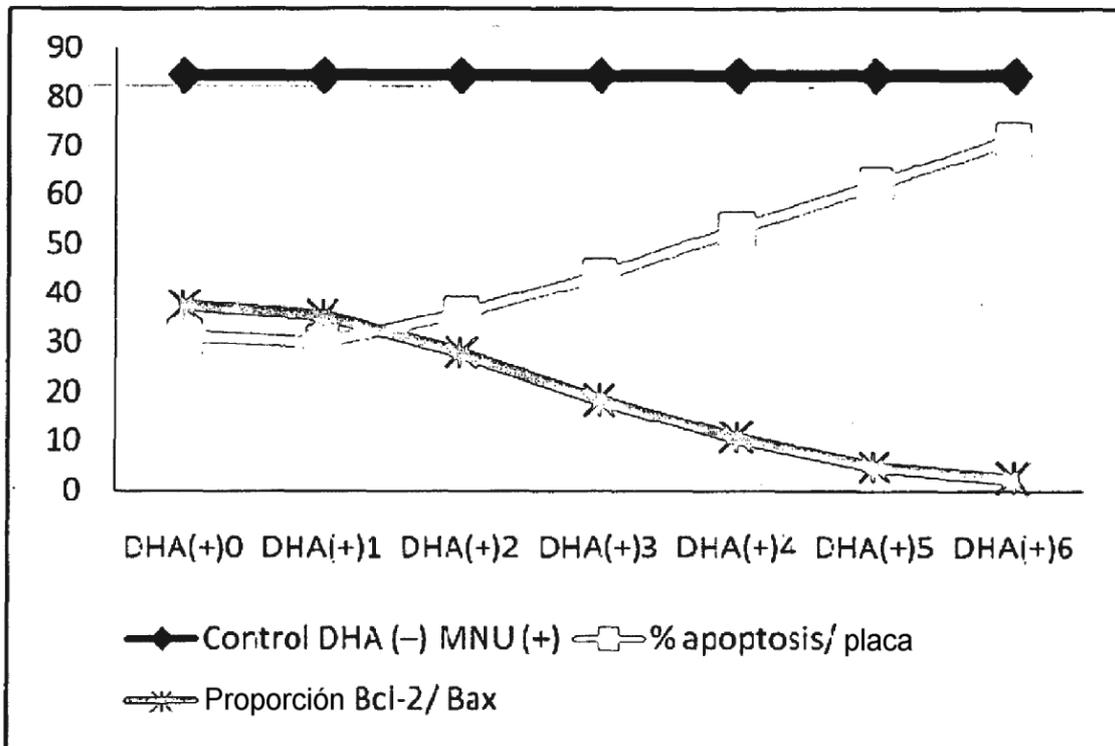


FIG 3.

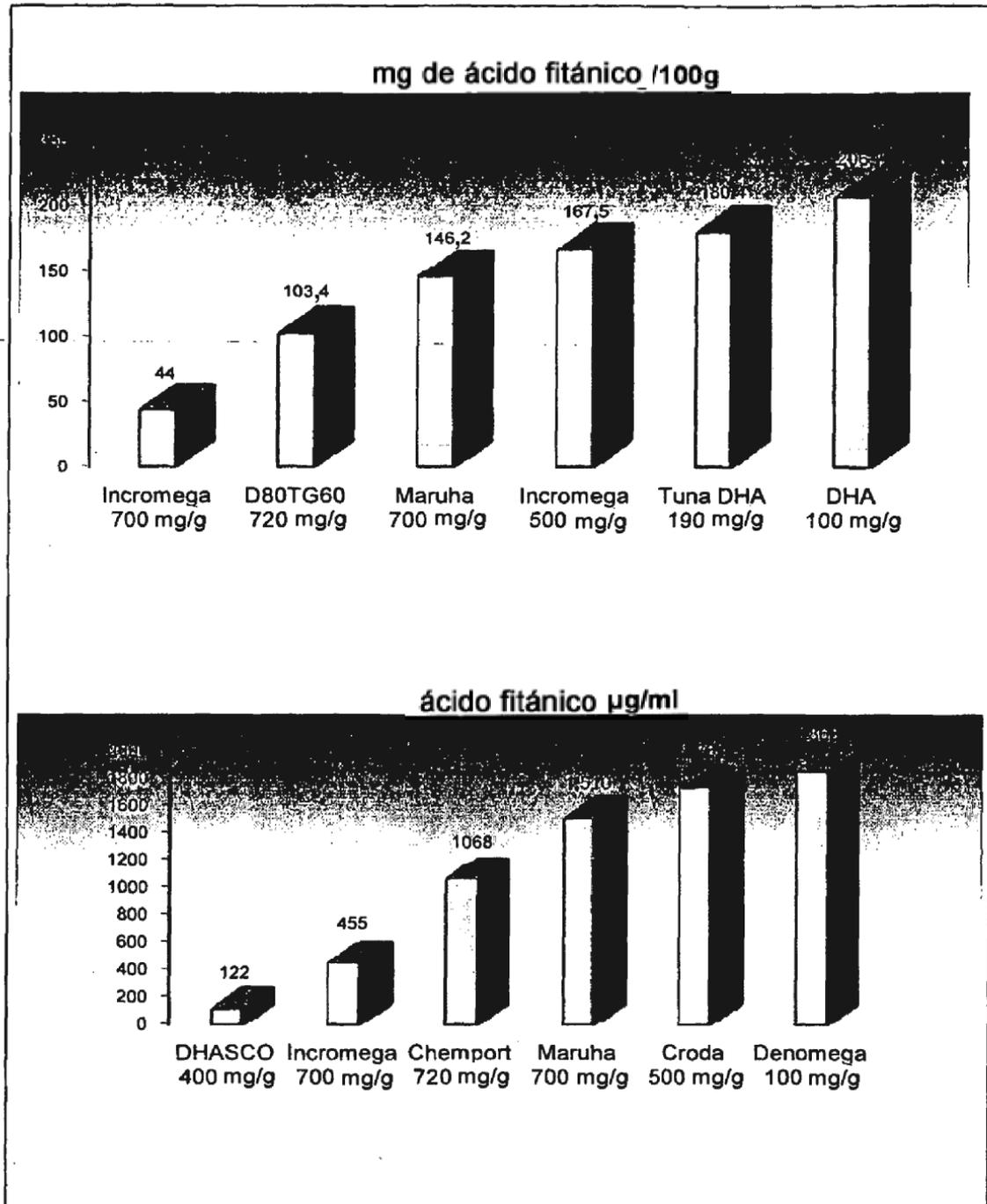


FIG 4.

Fecha	Valores de referencia	Promedio de niveles de PhA en 11 pacientes						
		Resultados µg/ml						
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Ácido fitánico	< 0,20 µg/ml	35,350	4,060	6,610	4,580	2,410	2,820	1,120
Ácido pristánico	< 0,02 µg/ml	31,710	5,650	6,330	4,200	4,130	5,260	1,650
C22:0	20,97 ± 6,270	11,030	11,340	12,670	7,370	15,860	14,230	8,840
C24:0	17,59 ± 5,360	14,180	15,210	19,500	11,560	21,960	19,940	14,170

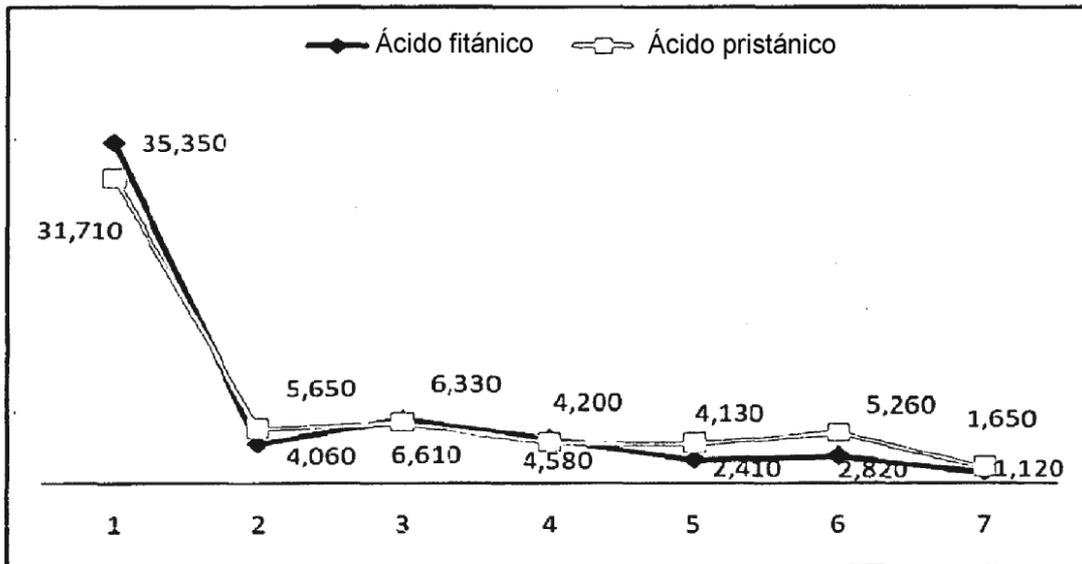


FIG 5.

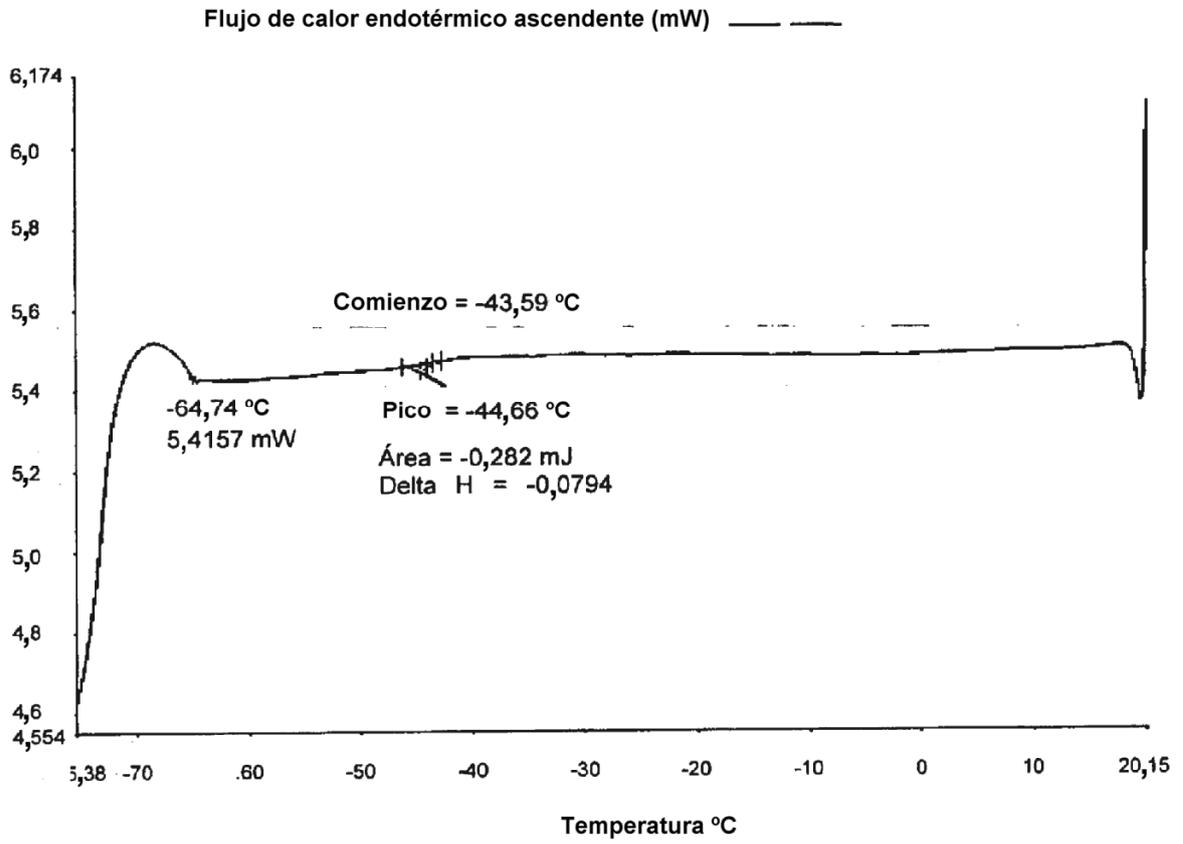


FIG 6.

