

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 923**

51 Int. Cl.:

A23K 10/22 (2006.01)

A23K 10/26 (2006.01)

A23K 30/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2008 PCT/NO2008/000339**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2009 WO09038477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2008 E 08831981 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2209388**

54 Título: **Antioxidante protector**

30 Prioridad:

19.09.2007 NO 20074776

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

19.05.2017

73 Titular/es:

**BORREGAARD AS (100.0%)
Hjalmar Wessels vei 6
1721 Sarpsborg, NO**

72 Inventor/es:

**FREDHEIM, GURO ELISE;
GRETLAND, KRISTIN SANDERSEN;
STYLO, TOM;
BUVARP, RUNE;
KLAUSEN, BENTE SELJEBAKKEN;
MYRVOLD, BERNT O.;
NILVEBRANT, NILS-OLOF y
IVERSBY, SIDSEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 612 923 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antioxidante protector

5 La presente invención se relaciona con el uso de lignosulfonatos como estabilizadores para antioxidantes orgánicos. Específicamente, la invención se relaciona con el uso de lignosulfonatos como estabilizadores para antioxidantes orgánicos en materiales orgánicos y/o materiales biológicos en el que la mezcla antioxidante incluye un ácido. En razón a que muchos antioxidantes no están aprobados para el consumo en grandes cantidades, la presente invención ofrece una oportunidad para reducir la cantidad agregada de antioxidante debido al efecto sinérgico con los lignosulfonatos. Uno de dichos ejemplos es la adición de etoxiquina que se puede agregar en cantidades reducidas para proporcionar un efecto antioxidante igual que si se agrega junto con lignosulfonato.

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que una mezcla de lignosulfonato y etoxiquina, ácido rosmarínico u otro antioxidante funcionan mejor que los antioxidantes puros solos. El antioxidante seleccionado parece ser más estable en el disolvente cuando están presentes los lignosulfonatos. Adicionalmente los lignosulfonatos mejoran el tiempo de vida de los antioxidantes cuando se agregan a materiales orgánicos o materiales biológicos. De esta manera la presente invención también relaciona las realizaciones de una composición que incluyen un antioxidante en combinación con lignosulfonatos o ligninas sulfonatadas que se van a utilizar como una sustancia antioxidante mejorada para materiales orgánicos o materiales biológicos y el uso de lignosulfonatos como un aditivo y mejorador para la acción antioxidante de los antioxidantes.

ANTECEDENTES:

25 La materia orgánica tiene una fuerte tendencia a reaccionar con el oxígeno y oxidarse. Esto es cierto para la mayoría de materiales orgánicos comunes, por ejemplo, plásticos, pesticidas, cosméticos, elastómeros, fibras, combustibles, lubricantes, ensilajes, piensos y alimentos. La oxidación de materiales orgánicos tiene lugar mediante una serie de procesos: autooxidación, biooxidación, combustión, fotooxidación. Antioxidantes, inhibidores (de oxidación) o secuestrantes de oxidación son compuestos orgánicos o inorgánicos que se agregan a materiales biológicos u orgánicos oxidables para retardar dicha oxidación, y en general prologar el tiempo de vida de los sustratos.

30 Los antioxidantes se clasifican como radicales que capturan (ruptura de cadenas) o reducen peróxidos, que describen los mecanismos mediante los cuales funcionan. Los antioxidantes que capturan radicales funcionan mediante reacción con la propagación de radicales libres de oxígeno en oxidación. El antioxidante así compite con el sustrato orgánico como una fuente de hidrógeno para radicales peroxi en la secuencia de oxidación. El nuevo compuesto formado debe ser estable y funcionar como un terminador de cadena. Antioxidantes que descomponen el peróxido reducen los productos peroxídicos e hidroperoxídicos de oxidación para la mayoría de compuestos inocuos, usualmente alcoholes o éteres.

ANTIOXIDANTES EN ALIMENTOS Y PIENSOS

40 Los antioxidantes retardan la oxidación atmosférica y sus efectos de degradación, extendiendo de esta manera la vida útil de los alimentos y piensos. Ejemplos de degradación oxidativa de alimentos incluyen productos que contienen grasas y aceites en los que la oxidación produciría sabores y olores rancios, alguno de los cuales incluso pueden ser perjudiciales. Los antioxidantes también se utilizan para secuestrar oxígeno y evitar la decoloración de frutos y vegetales cortados o magullados. Los antioxidantes de alimentos son efectivos en concentraciones muy bajas y no solo retardan la rancidez, sino que también protegen el valor nutritivo de los alimentos al minimizar la descomposición de las vitaminas y esencialmente de los ácidos grasos. En la Tabla 1 se enumeran ejemplos de antioxidantes naturales y sintéticos.

50 Tabla1. Antioxidantes alimenticios y sus procesos de fabricación [1]

Compuesto Antioxidante	Fabricado mediante
Antioxidantes solubles en aceite	
Hidroxianisol Butilado (BHA)	Síntesis
Hidroxitolueno Butilado (BHT)	Síntesis
Tert-butil-Hidroxiquinona (TBHQ)	Síntesis
Propilo Galato (PG)	Síntesis

Compuesto Antioxidante	Fabricado mediante
Tocoferoles	Extracción/ Síntesis
Ácido Tiodipropiónico	Síntesis
Tiodipropionato de dilaurilo	Síntesis
Palmitato de ascorbilo	Síntesis
Etoxiquina	Síntesis
Antioxidantes solubles en agua	
Ácido Ascórbico	Fermentación
Ascorbato de Sodio	Fermentación
Ácido Eritórbico	Fermentación
Eritorbato de Sodio	Fermentación
Enzimas oxidasa/catalasa glucosa	Fermentación
goma de guayacán	Extracción
Sulfitos	Síntesis
Extracto de romero	Extracción

La mayoría de antioxidantes comúnmente utilizados que estabilizan los alimentos incluyen hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), propil galato (PG) y tert-butilhidroquinona (TBHQ). En Europa, también se utilizan otros ésteres de galato, tal como octil galato y dodecil galato. Tanto el BHA y BHT son solubles en grasa, efectivos en proteger la grasa animal de la oxidación, y se agregan frecuentemente durante el proceso de fusión de grasas. Se ha cuestionado el uso de BHT y BHA como aditivos alimenticios directos como resultado del aumento de la incidencia del cáncer en estudios en animales. El propil galato también es efectivo, pero tiene limitada solubilidad en grasa, y se torna negro azul en presencia de hierro. El TBHQ es más efectivo contra la oxidación en aceites vegetales poliinsaturados, y se utiliza frecuentemente en aceite de soya. [1]

Los antioxidantes naturales más frecuentemente utilizados son el ácido ascórbico (vitamina C), su estereoisómero ácido eritórbico las sales de sodio del mismo (ascorbato de sodio, eritorbato de sodio), en adición a los delta y gamma tocoferoles mezclados. Los tocoferoles no son tan efectivos en grasas y aceites vegetales como lo son en las grasas animales. El ácido cítrico y ácido tartárico también son antioxidantes naturales (y sinergistas antioxidantes), pero se agregan predominantemente a los alimentos como acidulantes [1].

Adicionalmente, se recomiendan diversos extractos de plantas como antioxidantes naturales, que incluyen extractos de romero (*Rosmarinus Officinalis*), y la goma de guayacán, una secreción resinosa de un árbol de hoja perenne tropical, *Guaiacum officinalis*. Esta resina contiene compuestos fenólicos complejos relacionados químicamente con guayacán, ácido guaiarético, y ácido guaiacónico. Como otros compuestos fenólicos, la goma guayacán es más efectiva en las grasas animales que en los aceites vegetales [1].

La actividad de los antioxidantes en un sistema alimenticio no sólo depende de la reactividad química del antioxidante (por ejemplo, secuestro de radicales libres, estructura 3D y quelación), sino también factores tales como ubicación física, interacción con otros componentes alimenticios y condiciones medioambientales (por ejemplo, pH). Uno de los principales factores que afectan la actividad de los antioxidantes que secuestran radicales libres en los alimentos es su comportamiento de particiones en los lípidos y el agua. Por ejemplo, Los antioxidantes hidrófilos frecuentemente son menos efectivos en emulsiones aceite en agua que los antioxidantes lipófilos, mientras que los antioxidantes lipófilos son menos efectivos en los aceites a granel que los antioxidantes hidrófilos [2]. Se ha comprobado que las ligninas macromoleculares modificadas tienen partes hidrófilas y lipófilas.

ESTABILIZACIÓN DE COMBUSTIBLES, LUBRICANTES Y POLÍMEROS

Los combustibles de hidrocarburos, gasolina, combustible para aviones, aceite combustible, todos están sujetos a autooxidación. Los principales antioxidantes fenólicos para combustibles son BHT, 2,4-dimetil-6-tert-butilfenol y 2,6-ditert-butilfenol. La N,N'-di-sec-butil-p-fenilendiamina ha sido de gran importancia entre los antioxidantes amínicos. La cantidad agregada de antioxidante está en una relación de 0.5-1.0 kg por 1000 barriles de combustible (1 barril de US = 159 l). [3]

Los antioxidantes minimizan el deterioro de los lubricantes al retardar el aumento de viscosidad, corrosión metálica y formación de ácidos, lodos, resinas y lacas. Los polímeros orgánicos comerciales, que incluyen termoplásticos, elastómeros, fibras sintéticas, y adhesivos, todos son susceptibles a degradación oxidativa durante el procesamiento y uso final. Para los lubricantes, elastómeros y termoplásticos, se utilizan antioxidantes fenólicos obstaculizados tales como BHT.

15 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ANTIOXIDANTES

En las figuras 1 a 6 adelante, se enumeran estructuras moleculares de algunos antioxidantes comunes. La captura de los radicales intermedios en moléculas como BTA y BHT (Tabla 1) tiene una propiedad que también se incorpora en las ligninas. La estructura de las ligninas contiene grupos funcionales fenólicos y no fenólicos junto con sustituyentes que protegen las posiciones reactivas, como en las moléculas mencionadas anteriormente. La estructura tridimensional de los lignosulfonatos las hace adecuadas para estabilizar radicales. Los grupos de ácido sulfónico introducidos en lignosulfonatos convierten las macromoléculas de lignina lipófilas originalmente en antioxidantes solubles en agua. La autooxidación en mezclas que contienen material hidrófilo e hidrófobo, se encuentran en interface más propensa para la actividad. Las propiedades lipófilas e hidrófilas combinadas hacen que los lignosulfonatos sean especialmente útiles en las áreas de interface. Las ligninas también poseen propiedades de absorción de luz.

ETOXIQUINA

Existen diversos productos de oxidación de etoxiquina formada. Solo uno de ellos se muestra en la figura 7. La etoxiquina es particularmente efectiva en la protección de ensilaje de pescado y también se puede utilizar para proteger otros tipos de ensilaje. La molécula es soluble en agua y aceite. Sin embargo, la etoxiquina no es muy estable. Es inestable en ácido, hacia agentes de oxidación y hacia la luz. De acuerdo con un aspecto de la presente invención se ha encontrado sorprendentemente que el lignosulfonato contribuye a una de estabilidad de la etoxiquina.

ÁCIDO ROSMARÍNICO

El ácido rosmarínico, $C_{18}H_{16}O_8$, es un ácido carboxílico antioxidante de polifenol natural encontrado en muchas hierbas *lamiaceae* utilizadas comúnmente como hierbas culinarias tal como romero, orégano, salvia, tomillo y menta. Químicamente, el ácido rosmarínico es un dímero de ácido cafeico. Es un polvo de color rojo y naranja que es ligeramente soluble en agua, pero también es muy soluble en la mayoría de disolventes orgánicos. [4]

BHT

El hidroxitolueno butilado (BHT) es un compuesto orgánico lipófilo (soluble en grasas) que se utiliza principalmente como un aditivo alimenticio antioxidante (número E E321) así como en productos cosméticos, farmacéuticos, combustibles de aviones, caucho, productos de petróleo, y fluido embalsamador. Las especies se comportan como un análogo sintético de vitamina E, que actúa principalmente como un agente terminador que suprime la oxidación, un proceso mediante el cual los compuestos orgánicos (usualmente) insaturados son atacados por el oxígeno atmosférico. El BHT detiene esta reacción autocatalítica al convertir los radicales peroxi en hidroperóxidos. [5]

ENSILAJE

En la industria pesquera y en la pesca, así como en la preparación de productos piscícolas, existen cantidades importantes producidas de material de residuos. El residuo de pescado se somete a autodegradación de enzimas liberadas durante los procesos de preparación. Adicionalmente el aditivo de conservación ayuda a preservar los residuos que constituyen un ensilaje de materia prima estable valiosa. Como aditivo de concentración se utilizan frecuentemente diferentes tipos de ácidos, normalmente ácido fórmico. Bajo las condiciones correctas es decir temperatura por encima de 5°C, y pH entre 3.5 y 4.5, la masa de pescado empezará a descomponerse. El bajo valor de pH evitará que crezcan bacterias, al mismo tiempo que la masa de pescado experimentará autólisis (descomposición), y se obtiene una masa flotante fácil de manipular. El proceso de autólisis es más rápido a temperaturas de aproximadamente 40°C lo mismo es cierto para otros materiales biológicos, por ejemplo, mataderos, industrias alimenticias y de piensos.

Subproductos de pescaderías y mataderos se destinan al consumo como aplicaciones de mayor calidad. Con la ayuda de la biotecnología uno puede esperar una gran cantidad de subproductos valiosos nuevos a partir de la cría de peces y de animales. Por ejemplo:

- 5 • Aceite de hígado de bacalao y aceites omega 3 de alta calidad
- Gelatina de piel de pescado, cabezas y huesos, uso tecnológico en la industria farmacéutica y alimenticia.
- 10 • Lípidos que contienen fósforo (fosfolípidos) de lecha utilizados para nutrición infantil, así como nutrición intravenosa.
- ADN de lecha, utilizado en la industria farmacéutica y cosmética.
- 15 • Sustancias orgánicas a partir de entrañas de peces y animales (enzimas) para procesos industriales.
- Salsa de pescado fermentado como mejorador del sabor.

También el ensilaje de materiales de desperdicios animales (por ejemplo de mataderos) o materiales de desperdicio de la industria alimenticia (exceso de materiales de producción) se pueden tratar de forma similar con el ensilaje de pescado indicado anteriormente. Aunque la composición de diferentes tipos de materiales puede diferir (diferentes relaciones de grasa, aceite, proteína, sacáridos, tejidos conjuntivos, etc.) el proceso para producir ensilaje a partir de estos tipos de materiales será igual (ver adelante). Como materia prima para ensilaje de pescado así como ensilaje de animales se pueden utilizar casi todos los tipos de desperdicios de la industria pesquera y/o animal.

25 ADITIVO DE ENSILAJE

Uno de los ácidos preferidos para tratar materia prima de pescado así como la materia prima animal para producir el ensilaje es el ácido fórmico. El ácido fórmico da menor sabor residual al ensilaje, así como es un acidulante efectivo. En la Tabla 2 se enumeran algunas propiedades físicas y químicas para los ácidos orgánicos.

30

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de los ácidos orgánicos. [6]

Ácido	Fórmula	Pm [g/mol]	Densidad [g/ml]	pKa
Fórmico	HCOOH	46.03	1.220	3.75
Acético	CH ₃ COOH	60.05	1.049	4.76
Propiónico	CH ₃ CH ₂ COOH	74.08	0.993	4.88
Láctico	CH ₃ CH(OH)COOH	90.08	1.206	3.83

35 También se prefiere que los antioxidantes se utilicen cuando se produce ensilaje de pescado y/o animal. Los lípidos marinos de pescado contienen altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Los PUFA se oxidan fácilmente mediante oxígeno molecular. Esta oxidación significa una corrosión de los compuestos insaturados, lo que resulta como rancidez de las grasas y una calidad reducida del producto después del procesamiento. La harina de pescado y el aceite de pescado contienen concentraciones relativamente altas de PUFA y por lo tanto son especialmente propensos a la oxidación [7]. Los métodos más comunes para analizar la oxidación primaria de lípidos son el valor de peróxido o dienos conjugados, y el valor de anisida como una serie para productos de oxidación secundarios.

40 Para evitar la oxidación especialmente de la harina de pescado y del aceite, así como de la carne y los productos de desperdicio de la industria cárnica y/o alimenticia, la industria utiliza actualmente antioxidantes sintéticos como: etoxiquina (E324), BHA (hidroxil anisol butilado, E 320) y BHT (hidroxil tolueno butilado, E321). Los antioxidantes previenen la oxidación de los ácidos grasos mediante reacción preferencialmente con oxígeno. Los antioxidantes sintéticos son los más utilizados comúnmente en los sistemas alimentarios debido a su estabilidad química, bajo costo y disponibilidad.

50 TÉCNICA ANTERIOR:

En la bibliografía se han reportado el efecto antioxidante de la lignina en alimentos, polipropileno, plásticos y caucho, estireno y aceites de araquís [7-12].

55 Solo hay una patente sobre una formulación de ensilaje de pescado de ácido carboxílico en combinación con antioxidantes, es decir, la Patente No. 309796 B1 otorgado a Kemira y los inventores K. Aasbø, H. Breivik. Esta patente se refiere a por lo menos un antioxidante entre: 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT), 3-tert-butil-4-hidroxianisol

(BHA), tert-butilhidroquinon (TBHQ), tocoferol y galatos, combinado con por lo menos un ácido carboxílico de cadena corta, o por lo menos una sal del mismo.

5 Una combinación de ácido fórmico y antioxidante es el líder del mercado de Noruega como medio de conservación en ensilaje de pescado. Se agrega ácido fórmico para ajustar el pH a 3.7-4 y reduce el crecimiento de bacterias en el ensilaje. Se agrega antioxidante para reducir el proceso de rancidez del aceite de pescado. El antioxidante utilizado frecuentemente es etoxiquina visto en la figura 4 (1,2-dihidro-6-etoxi-2,2,4-trimetilquinoleína (CAS-Nr 91-53-2). La etoxiquina, una amina cíclica, es soluble en ácidos a un bajo pH (<3) en razón a que el grupo amino se protona y se forma una sal hidrófila. Un aumento en el pH, 4-5, da la desprotonación y la etoxiquina es soluble en aceite. La etoxiquina es particularmente efectiva en la protección del ensilaje de pescado, aunque se puede utilizar en otras áreas de aplicación como, por ejemplo, el ensilaje de mataderos como se mencionó, la molécula es soluble en aceite y en agua, sin embargo, la etoxiquina no es muy estable, es inestable en ácido, hacia agentes de oxidación y hacia la luz. De esta manera, en un aspecto la presente invención se relaciona con estabilización de etoxiquina mientras que proporciona simultáneamente un efecto mejorado y sinérgico para sus propiedades secuestrantes al utilizar lignosulfonatos.

El documento US 4228159 describe sulfonatos de lignina utilizados para recubrir oligoelementos. Los minerales recubiertos se mezclan luego con vitamina A. La vitamina se protege así de esta manera del efecto perjudicial de los minerales.

20 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION:

La invención se refiere al uso de lignosulfonatos como un estabilizador para antioxidantes orgánicos en materiales orgánicos y/o materiales biológicos en el que la mezcla de antioxidantes incluye un ácido. En la bibliografía se ha reportado el efecto antioxidante de la lignina en alimentos, polipropileno, plásticos y caucho, estireno y aceites de araquís [6-11]. De acuerdo con la presente invención, se encontró sorprendentemente que los lignosulfonatos también ejercen un efecto sinérgico en combinación con antioxidantes, etoxiquina, ácido rosmarínico, etc.

30 Para evaluar y verificar el efecto del lignosulfonato como antioxidante se han probado diversas muestras lignosulfónicas en diferentes cribados antioxidantes [13, 14]. Las muestras probadas dieron buen puntaje antioxidante, y los resultados se muestran en la Tabla 3 adelante.

Tabla3. Muestras probadas por efecto antioxidante [14].

Muestra	Prueba de Peroxinitrito (= Efecto antioxidante total)	Prueba de radical de Hidroxilo (=para Muestras solubles/hidrófilas agua)	Prueba de oxidantes Halogenados (= para Muestras lipófilas solubles en aceite)
Lignosulfonato de sodio	18750	3300	
Lignosulfonato oxidado desulfonatado.	82300	9100	
Lignosulfonato de sodio, fracción de bajo peso molecular *	23600	4100	
Lignosulfonato de sodio, Fracción de medio peso molecular*	24900	7600	
Lignosulfonato de sodio, Fracción de alto peso molecular*	95700	1300	
Etoxiquina	118000		5640
Tocoferoles mezclados	3200		670
BHT	550		220

* Muestras fraccionadas con un determinado peso molecular promedio.

Nota: Los números en las columnas se corrigen para determinar contenido de material seco.

35 Se investigaron cinco tipos de lignosulfonatos; lignosulfonato de sodio, un lignosulfonato oxidado desulfonado y tres fracciones de un lignosulfonato de sodio; peso molecular alto, medio y bajo como se puede ver a partir de la Tabla 3 anterior, es evidente que todos ellos muestran un buen efecto antioxidante. El lignosulfonato oxidado desulfonado tiene el mejor efecto antioxidante en comparación con las muestras de lignosulfonato de sodio. Adicionalmente, la fracción de alto peso molecular del lignosulfonato tiene superior capacidad antioxidante que la fracción de bajo peso molecular. Como una comparación el antioxidante sintético etoxiquina, tuvo la más alta calificación en la prueba. El

antioxidante BHT tuvo la más baja calificación en la prueba mostrando que los lignosulfonatos poseen buenas propiedades antioxidantes. En toda la tabla anterior se muestra que los lignosulfonatos en general poseen capacidad antioxidante.

5 La presente invención proporciona una opción para reducir la cantidad de antioxidantes agregados en el ensilaje de pescado y/o en el ensilaje de animales y/o alimentos. En razón a que muchos antioxidantes no están aprobados para consumo en grandes cantidades por ejemplo etoxiquina. La presente invención ofrece una oportunidad para reducir la cantidad agregada de antioxidante debido al efecto sinérgico con lignosulfonatos. Uno de dichos ejemplos es la adición de etoxiquina que se puede agregar en cantidades reducidas para proporcionar un efecto antioxidante igual que si se agrega junto con lignosulfonato. En comparación, la toxicidad del lignosulfonato casi no existe. (LD₅₀> 10 g/kg). [16]

15 También se ha encontrado sorprendentemente que una mezcla de lignosulfonato y etoxiquina funciona mejor como un antioxidante que solo etoxiquina, o que un efecto aditivo de lignosulfonato y etoxiquina (sinergismo). La etoxiquina es más estable en una solución cuando también se presentan lignosulfonatos. El lignosulfonato tiene solubilidad limitada en una fase aceitosa. Sin desear estar limitado por la teoría, el lignosulfonato puede actuar así como un agente protector en una fase acuosa. Si el lignosulfonato se oxida primero, entonces se protegerá la etoxiquina. Cabe entender que la concentración de lignosulfonato es mucho mayor que la concentración de etoxiquina. Incluso así, si los lignosulfonatos son mucho menos efectivos en la base de peso por peso, el efecto total puede ser mayor. El lignosulfonato (y la adición de sulfato de sodio como parte de la solución de lignosulfonato) también puede sacar la sal de etoxiquina y forzarla más en la fase oleosa. Los lignosulfonatos tienen un fuerte color oscuro y absorben fuertemente la parte ultravioleta del espectro. El color oscuro puede así proteger la etoxiquina de la degradación debido al efecto de la luz. La etoxiquina parece tener un máximo en la adsorción de UV a 280 nm (al igual que los lignosulfonatos).

25 Diferentes aspectos de la presente invención (entre otros) se pueden resumir mediante los siguientes elementos:

- Una composición para convertir material animal tal como material alimenticio pescado y/o carne en ensilaje, dicha composición comprende lignosulfonato y un ácido orgánico junto con un antioxidante adicional o una composición para convertir material alimenticio pescado y/o carne en ensilaje, dicha composición comprende lignosulfonato y un ácido orgánico seleccionado de uno o más de los grupos que consisten de ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico y ácido butírico.

- Una composición para convertir material animal tal como material alimenticio pescado y/o carne en ensilaje, dicha composición comprende lignosulfonato y un ácido orgánico con un antioxidante adicional o una composición para convertir material alimenticio y/o pescado y/o carne en ensilaje, dicha composición, donde el lignosulfonato es del tipo lignosulfonatos de calcio, sodio, magnesio y amonio.

- Una composición para convertir material alimenticio tal como material alimenticio y/o pescado y/o carne en ensilaje, dicha composición comprende lignosulfonato y un ácido orgánico junto con un antioxidante adicional o una composición para convertir material alimenticio y/o pescado y/o carne en ensilaje, dicha composición, en donde el lignosulfonato es del tipo lignosulfonatos de sodio, en el promedio de peso molecular que varía P_m = 25-40 kDa.

45 La composición del producto de ensilaje como un ejemplo comprendería 10-90 % de ácido orgánico, 0.2-3.0% de etoxiquina y 5-50% de lignosulfonato (dependiendo del contenido de materia seca de la solución de lignosulfonato utilizada). Otros ejemplos de soluciones comprenden etoxiquina, lignosulfonato y ácido de acuerdo con la presente invención e incluyen: Ácido en el rango de 40-90%, más preferido de 50-80%; etoxiquina en el rango de 0.2-1.5%, más preferido 0.2-1.5%; y lignosulfonato en el rango de 5-30% (todos los porcentajes se denominan p/p en función del contenido de materia seca de la solución de lignosulfonato utilizada).

50 Para ilustrar la presente invención se han proporcionado las siguientes figuras:

Figura 1- Estructura de BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol).

55 Figura 2 - Estructura de BHA (3-tert-butil-4-hidroxianisol).

Figura 3 - Estructura de tocoferoles (ácido 7-Oxabiciclo[4.1.0]heptano-3-carboxílico, éster 1,4-butanodiilo, homopolímero (9CI)).

60 Figura 4 - Estructura de ácido rosmarínico

Figura 5 - Estructura de etoxiquina

Figura 6 - Estructura de ácido gálico

65

Figura 7 - Producto de oxidación de etoxiquina

Figura 8 - Auto oxidación de ácido rosmarínico con oxígeno a temperatura elevada sin y en la presencia de dos lignosulfonatos diferentes.

Figura 9 - Valores de peróxido con una función del tiempo. Composición de productos: EQ: % de etoxiquina NAac: % LS, FA: % de ácido fórmico (85%).

EJEMPLOS:

Ejemplo 1

Se ha realizado un estudio de estabilidad de etoxiquina en ácido fórmico comparado con etoxiquina en solución de ácido fórmico/lignosulfonato.

Experimental

Se ha presentado un método de análisis para la determinación de etoxiquina reportado por He y Ackman [15]. Se realizaron análisis en un sistema de cromatografía líquida Agilent 1100 equipado con una columna de HPLC Macherey-Nagel, CC 125/3 Nucleodur C18 Pyramid columna 3 µm y un detector UV se mide la absorbancia en 280 nm. La temperatura de columna fue de 27°C y el flujo de la fase móvil fue 1 ml/min. Las soluciones que se investigaron contienen 50:49:1 de ácido fórmico:lignosulfonato de sodio:EQ (%p/p) y se comparó con un control 50:49:1 de ácido fórmico:agua:EQ (%p/p), no fue tenido en cuenta porque el ácido fórmico fue de 85%, la muestra EQ fue de 75% y la solución de lignosulfonato fue del 35% de materia seca.

Se preparó 100 g de cada muestra y se dividió en dos muestras que se almacenaron respectivamente en un vaso y un recipiente metálico. Esto se hizo para observar el efecto de la luz sobre las muestras.

Se realizó análisis de la cantidad de etoxiquina en las muestras durante 10 semanas.

Resultados

En la tabla 4 se muestran los resultados del estudio de estabilidad de etoxiquina.

Después de 2 semanas de almacenamiento 94% de la etoxiquina agregada permanece en la muestra que contiene lignosulfonato mientras que en la muestra que no contiene lignosulfonato permanece solo 70%. Después de 10 semanas de almacenamiento permanece 70% de etoxiquina agregada en la muestra que contiene lignosulfonato, mientras queda 1% de la muestra sin lignosulfonato.

Tabla 4. Etoxiquina (%) en muestras luego de almacenamiento

Tiempo [semanas]	EQ/Ácido fórmico/lignosulfonato		EQ/Ácido fórmico/Agua Milli-Q	
	Contenedor de vidrio	Contenedor de Metal	Contenedor de vidrio	Contenedor de Metal
Comienzo	100	100	100	100
1	94	95	86	84
2	87	94	72	70
4	79	88	52	42
6	71	82	35	22
8	61	74	21	8
10	52	70	10	1

Ejemplo 2

El ensayo en el ejemplo 1 se repite con un grupo de nuevas muestras, muestra 1: 0.35 g de etoxiquina, 80.00 g de ácido fórmico (85%) y 19.65 g de solución de lignosulfonato, muestra 2: 0.35 g de etoxiquina, 80.00 g de ácido fórmico (85%) y 19.65 g de agua MQ. Las muestras se almacenaron en recipiente de vidrio y de metal durante 5

semanas. Se realizó análisis de la cantidad de etoxiquina en las muestras cada semana de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Resultados

5

En la Tabla 5 se muestran los resultados del estudio de estabilidad de etoxiquina.

Tabla 5. Etoxiquina (%) en muestras luego de almacenamiento

Tiempo [semanas]	EQ/Ácido fórmico/lignosulfonato		EQ/Ácido fórmico/Agua Milli-Q	
	Contenedor de vidrio	Contenedor de Metal	Contenedor de vidrio	Contenedor de Metal
Comienzo	100	100	100	100
1	84	85	80	69
3	71	77	37	15
4	61	72	20	2
5	50	66	9	0

10

Después de 5 semanas de almacenamiento no se encontró etoxiquina en la muestra almacenada en un recipiente metálico, mientras que solo quedan 9% de la muestra almacenada en el recipiente de vidrio cuando no se agrega lignosulfonato. En las muestras donde se agrega lignosulfonato 66 y 50% respectivamente de etoxiquina aún está disponible después de 5 semanas de almacenamiento. La adición de lignosulfonato aumenta significativamente la estabilidad de la etoxiquina

15

Ejemplo 3

20

Se muestra el efecto combinado del lignosulfonato en adición en experimento de auto oxidación utilizando dos lignosulfonatos diferentes y ácido rosmarínico como un representante para un antioxidante diferente. El ácido rosmarínico antioxidante se degrada completamente en una atmósfera de oxígeno a 65°C durante un periodo de cuatro días con saturación intermitente con oxígeno dos veces al día. En paralelo la misma concentración de antioxidante, ácido rosmarínico al 1% se complementó con lignosulfonato. Las ligninas ensayadas fueron lignosulfonato de sodio (LS1) y lignosulfonato de calcio (LS2), ambos agregados en las mismas cantidades en función del contenido seco (17%). Las muestras se extraen diariamente y la cantidad restante de antioxidantes se cuantificó cromatográficamente. El HPLC de fase inversa con detección UV en 280 nm fue el método de elección para monitorizar el efecto positivo de LS.

25

Resultados

30

Se obtuvo un ahorro de casi la mitad del antioxidante reactivo y más costoso cuando se utilizó el lignosulfonato más eficiente probado (Tabla 6, figura 8).

Tabla 6. Autooxidación de ácido rosmarínico.

35

	Referencia sin LS	Efecto combinado con LS	
	Ácido Rosmarínico	LS 1	LS 2
Día 0	100	100	100
Día 1	72	68	79
Día 2	45	54	71
Día 3	11	40	58
Día 4	2	33	48

Ejemplo 4

40

Se han realizado ensayos de laboratorio que preparan ensilaje de pescado a partir de salmón picado con adición de ácido fórmico y etoxiquina, con y sin lignosulfonato. Se compara una mezcla de 0.65 (%p/p) de etoxiquina, 19.4

(%p/p) de lignosulfonato y 80 (%p/p) de ácido fórmico con un producto competidor que contiene 0.5-1.0 (%p/p) de etoxiquina en una solución de ácido fórmico al 85%. Se ha aislado aceite de pescado con respecto a los valores de peróxido.

5 Experimental

El día 1 se picó en piezas y se molió salmón fresco en un procesador de alimentos. Se colocó 1500 g de pescado picado en botellas plásticas y se agregó 45g %p/p de muestra el primer día. Las botellas se agitaron para conseguir una buena mezcla con el pescado. El día dos se agregó más ácido para lograr un pH entre 3.3 y 3.4. Las muestras de ensilaje se colocaron en un baño de agua durante el experimento completo con el fin de retener una temperatura estable de 23 grados.

El día 1 (0) 4, 7 y 14 se transfirió 100 g de pescado en ensilaje de cada botella a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. Se separó el aceite de pescado del ensilaje y se congeló (-20°C). Se analizó la fase oleosa para determinar los valores de peróxido.

Resultados

La figura 9 muestra valores de peróxido para aceite de pescado extraído de ensilaje de pescado preparado con un aditivo de etoxiquina/ácido fórmico en comparación con un aditivo de etoxiquina/lignosulfonato/ácido fórmico. El ensilaje conservado con aditivo que contiene lignosulfonato contiene menos productos de oxidación primarios, es decir tiene menores números de peróxido.

Ejemplo 5

Se realizó un ensayo de ensilaje con salmón noruego en colaboración con un gran productor noruego de subproductos marinos. El desempeño de un producto contiene 0.35 (%p/p) de etoxiquina (EQ), 19.6 (%p/p) de lignosulfonato (LS) y 80 (%p/p) de ácido fórmico fue comparado con ácido fórmico en función del competidor que contiene 1% (%p/p) de etoxiquina. La calidad de los productos producidos partir de ensilaje de pescado fue conservado y analizado con métodos estándar.

Se utilizó una dosificación de 2.5% durante la producción de 280 toneladas de ensilaje. Esta dosificación dió un pH de 3.6 en el ensilaje. Normalmente el pH en el ensilaje se ajustó por debajo de 4.

35 Resultados

En la Tabla 7 se muestran los resultados del análisis de ensilaje de pescado estabilizado con un producto de etoxiquina, lignosulfonato, ácido fórmico (0.35% etoxiquina, 19.6% lignosulfonato y 80% ácido fórmico) comparado con ensilaje estabilizado con ácido fórmico basado en competidor que contiene 1% de etoxiquina.

Valores de pH, total de nitrógeno volátil (TVN), contenido de materia seca, de proteína, grasa, todas estuvieron en el mismo rango que el competidor. Para valores de peróxido, valores anisida, aminos biogénicas y análisis en flora microbiana, el producto de etoxiquina, lignosulfonato, ácido fórmico dió resultados superiores.

45 Tabla 7. Ensayo de ensilaje a gran escala

Muestra	Ensilaje de pescado con EQ/LS/Ácido fórmico	Ensilaje de pescado con producto de competidor, ácido fórmico/EQ
Materia prima:		
Grasa (%)	11.5	
Proteína N*6.25 (%)	11.6	13.3
Materia seca (%)	34.5	33.6
pH	3.4	3.4
Fase de grasa:		
TVN (% de muestra)	<0.01	0.08
Números de peróxido meqv/kg)	5.5	63
Números de anisida	42	125
Aminas biogénicas:		

Muestra	Ensilaje de pescado con EQ/LS/Ácido fórmico	Ensilaje de pescado con producto de competidor, ácido fórmico/EQ
Cadaverina (mg/kg)	<1	185
Histamina (mg/kg)	<1	<100
Putrescina (mg/kg)	37	105
Microbiología:		
Perferíngenos de Clostridium (números/g(mL)):	<10	Moho (números/g(mL))
Moho (números/g(mL))	<100*	
Levadura (números/g(mL))	<100*	
* < 100 significa por debajo del límite de detección.		

Además de las propiedades sinérgicas de los lignosulfonatos en antioxidantes de acuerdo con la presente invención, la adición de lignosulfonatos al ensilaje de pescado acidificado no tiene ningún efecto perjudicial con respecto al crecimiento microbiano en el ensilaje, como se evidencia por los resultados mostrados en la Tabla 7 anterior en la que todos los valores para la flora microbiana, moho o levadura están por debajo del límite de detección (menos de 100/g (ml)).

La presente invención también se refiere a un equipo para la preservación de materiales orgánicos o biológicos que incluyen una composición que comprende lignosulfonatos y/o ligninas modificadas y un ácido como se describió anteriormente en un recipiente separado, y en el que el equipo adicional comprende el antioxidante adicional en un recipiente separado. Tal equipo también incluirá instrucciones de uso y opcionalmente instrucciones para almacenamiento en el equipo. Para mejorar la vida útil del segundo antioxidante (a pesar de los lignosulfonatos y/o lignina modificada) se puede almacenar en un recipiente sellado (opcionalmente bajo una atmósfera inerte tal como N₂ o CO₂) o en un recipiente evacuado. El recipiente para almacenar el antioxidante también incluye un material impenetrable a la luz para proteger el antioxidante de la fotodegradación. El ácido en el recipiente incluye el lignosulfonato y/o la lignina modificada que puede ser un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, fosforoso, sulfúrico y/o un ácido orgánico tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido butírico. El antioxidante en el segundo recipiente del equipo de acuerdo con la presente invención puede ser etoxiquina, ácido rosmarínico, BHT, tocoferoles, vitamina C, catequinas, galatos, y especialmente preferida etoxiquina, o el antioxidante adicional puede ser una sustancia inorgánica, por ejemplo sulfitos o yoduro. El lignosulfonato y/o lignina modificada incluidos en el primer recipiente en el equipo de acuerdo con la invención puede como por ejemplo ser seleccionado del grupo de lignosulfonatos de calcio, sodio, magnesio o amoniaco, más preferido lignosulfonato de sodio o calcio. En una realización especial el lignosulfonato incluido en el equipo de acuerdo con la presente invención es del tipo de lignosulfonato de sodio, en un peso molecular promedio que varía Pm = 25-40 kDa.

Además de los efectos sinérgicos descubiertos anteriormente de los lignosulfonatos y/o ligninas modificadas, dichos compuestos también poseen las propiedades de ser anticorrosivos protegiendo por lo tanto los componentes metálicos del equipo utilizado para mezclar y/o procesar el ensilaje o material biológico [17].

REFERENCIAS

- [1] Somogyi, L.P. (2004) Food, additives; Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- [2] Decker, E.A., Warner, K., Richards, M.P., Shahidi, F. (2005) Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. J. Agri. Food Chem. 53(10), 4303-4310.
- [3] Klemchuk, P. (2000) Antioxidants; Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry, John Wiley & Sons, Inc.
- [4] Rosma Clifford, M.N. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food. Agric. (79) 362-37.
- [5] Burton, G. W.; Ingold, K. U. (1981) "Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro", Journal of the American Chemical Society, volume 103, pp 6472-6477.
- [6] Foegeding PM and Busta FF (1991) Chemical food preservatives. In Disinfection, Sterilisation and Preservation, pp 802-932 [SS Block, editor]. Philadelphia, PA: Lea and Febiger.
- [7] Murata, Kiyoshi, Kondo and Yoshikazu (2003) Extraction of lignins using cellulase complex enzyme and their uses as antioxidant. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, patent JP2003169690.

- [8] Pouteau C, Dole P, Cathala B, Averous L and Boquillon N (2003) Antioxidant properties of lignin in polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* 81 (1), 9-18.
- [9] Reinoso O, Can B T and Richard J L (1998) Lignin yield and antioxidant activity obtained at different pH. *Sociedad Chilena de Quimica* 43 (4) 367-373.
- 5 [10] Barclay L R C, Xi F and Norris J Q (1997) Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *Journal of wood chemistry and technology* 17, 73-90.
- [11] Furlan L T, Rodrigues M and De Paoli M A (1985) Sugarcane bagasse lignin as stabilizer for rubbers. *Polymer Degradation and Stability* 13 (4), 337-350.
- 10 [12] Guttman T and Odzeniak D (1994) Antioxidant properties of lignin and its fractions. *Thermochimica Acta* 231, 161-168.
- [13] Gundersen SA (2006) Screening of antioxidant properties of LS. Internal report Borregaard LignoTech.
- [14] Knight Scientific report (2007) Determination of total antioxidant capacity of samples from Borregaard and derived ABEL-RAC mg scores.
- [15] He, P. and Ackman, R. G., (2000) *J. Sci. Food Agric.*, 80:10-16.
- 15 [16] LD₅₀-values; Norwegian School of Veterinary Medicine, (1976).
- [17] Evju, H. (1999) Growth enhancers, patent WO 00/27220.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de lignosulfonato como un estabilizador para antioxidantes orgánicos en materiales orgánicos y/o materiales biológicos en el que la mezcla de antioxidantes incluye un ácido.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 del lignosulfonato como un mejorador sinérgico para el antioxidante.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1-2 en el que el antioxidante es etoxiquina, ácido rosmarínico, BHT, tocoferoles, vitamina C, catequinas, galatos, preferiblemente etoxiquina.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la conversión de material biológico en ensilaje.
- 15 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el material es material de pescado y/o material de carne y/o material alimenticio y/o material de pienso preferiblemente material de pescado más preferiblemente material de desperdicio de pescado.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido es un ácido orgánico.
- 20 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido es un ácido inorgánico.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el ácido orgánico es ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido butírico.
- 25 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el ácido inorgánico es ácido clorhídrico, ácido fosforoso, ácido sulfúrico.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el lignosulfonato se selecciona de lignosulfonatos de calcio, sodio, magnesio o amoníaco.
- 30 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el lignosulfonato es lignosulfonato de sodio o calcio.
12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el lignosulfonato es lignosulfonato de sodio de peso molecular promedio que varía $P_m = 25-40$ kDa.
- 35 13. Composición para convertir material orgánico o biológico en ensilaje, caracterizado porque la composición comprende lignosulfonato y un segundo antioxidante en el que la composición comprende adicionalmente un ácido inorgánico, o un ácido orgánico seleccionado de uno o más del grupo que consiste de ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, ácido propiónico, ácido butírico.
- 40 14. Composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el segundo antioxidante se selecciona de uno o más de los antioxidantes incluidos en el grupo que consiste de etoxiquina, ácido rosmarínico, BHT, tocoferoles, vitamina C, catequinas, galatos, preferiblemente etoxiquina.
- 45 15. Composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el ácido inorgánico es uno o más ácidos seleccionados del grupo que consiste de ácido clorhídrico, ácido fosforoso, ácido sulfúrico.
- 50 16. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-14 en la que el lignosulfonato se selecciona de uno o más del grupo que consiste de lignosulfonatos de calcio, sodio, magnesio o amoníaco.
17. Composición de acuerdo con la reivindicación 13-14, en la que el lignosulfonato es lignosulfonato de sodio o calcio.
- 55 18. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-14 en la que el lignosulfonato es del tipo lignosulfonato de sodio, con peso molecular promedio que varía $P_m = 25-40$ kDa.
19. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-18 en la que la composición contiene 10-90 (p/p) % de ácido, 0.2-3.0 (p/p) % de etoxiquina y 5-50 (p/p) % de lignosulfonato.
- 60 20. Composición de acuerdo con la reivindicación 19, en la que la composición contiene 40-90 (p/p%) de ácido, 0.2-1.5 (p/p%) de etoxiquina y 5-30 (p/p%) de lignosulfonato.
- 65 21. Composición de acuerdo con las reivindicaciones 19 o 20, en la que la composición contiene 50-80 (p/p%) de ácido, 0.3-1.0 (p/p%) de etoxiquina y 5-30 (p/p%) de lignosulfonato.

22. Equipo para conservación de materiales orgánicos o biológicos que incluyen una composición que comprende lignosulfonatos y un ácido en un recipiente separado con el antioxidante adicional en un recipiente separado en el que el antioxidante adicional puede ser etoxiquina, ácido rosmarínico, BHT, tocoferoles, vitamina C, catequinas, galatos, preferiblemente etoxiquina
- 5
23. Equipo de acuerdo con la reivindicación 22 en el que el ácido es un ácido inorgánico por ejemplo tal como ácido clorhídrico, fosforoso, sulfúrico.
- 10
24. Equipo de acuerdo con la reivindicación 22 en el que el ácido es un ácido orgánico como por ejemplo ácido fórmico, acético, láctico, propiónico, butírico.
- 15
25. Equipo de acuerdo con la reivindicación 22 en el que el lignosulfonato es lignosulfonatos de calcio, sodio, magnesio o amoniaco.
- 20
26. Equipo de acuerdo con la reivindicación 22 en el que el lignosulfonato es lignosulfonato de sodio o calcio.
27. Equipo de acuerdo con la reivindicación 22 en el que el lignosulfonato es del tipo lignosulfonato de sodio en peso molecular promedio que varía $P_m = 25-40$ kDa.
28. Uso de lignosulfonato para estabilizar etoxiquina en una solución.

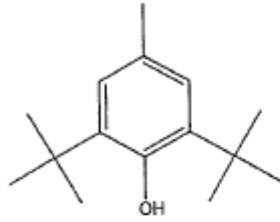


Figura 1. Estructura de BHT (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol)

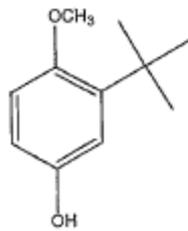


Figura 2. Estructura de BHA (3-tert-butil-4-hidroxianisol)

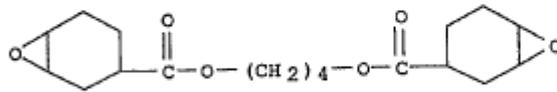


Figura 3. Estructura de Tocoferoles (ácido 7-oxabicyclo [4.1.0] heptano -3-carboxílico, ester de 1,4-butadienilo, homopolímero (9CI))

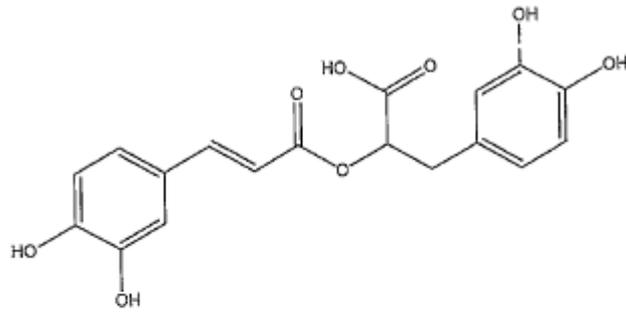


Figura 4. Ácido rosmarínico

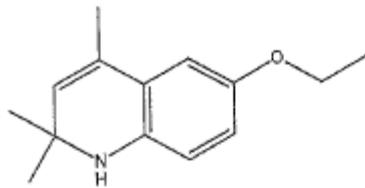


Figura 5. Estructura de Etoxiquina

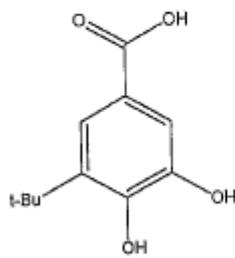


Figura 6. Estructura de Ácido gálico

Etoxiquina

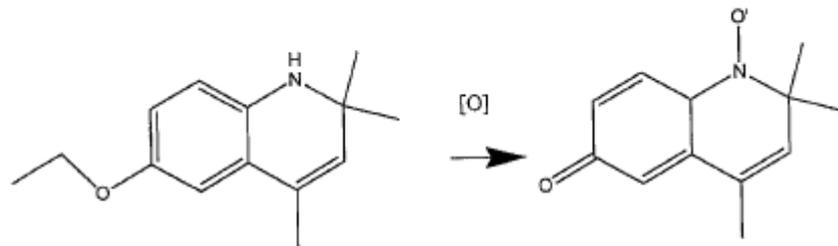


Figura 7. Producto de oxidación de Etoxiquina

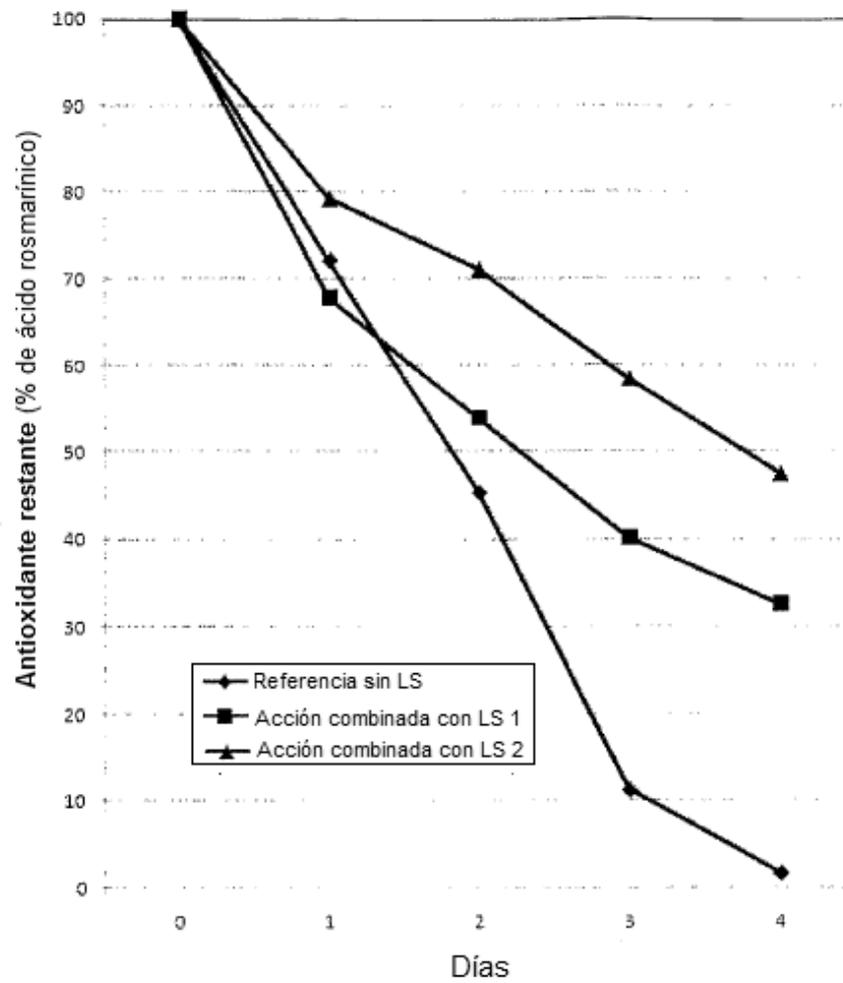


Figura 8. Autooxidación de ácido rosmarínico con oxígeno a temperatura elevada sin y en la presencia de dos lignosulfonatos diferentes.

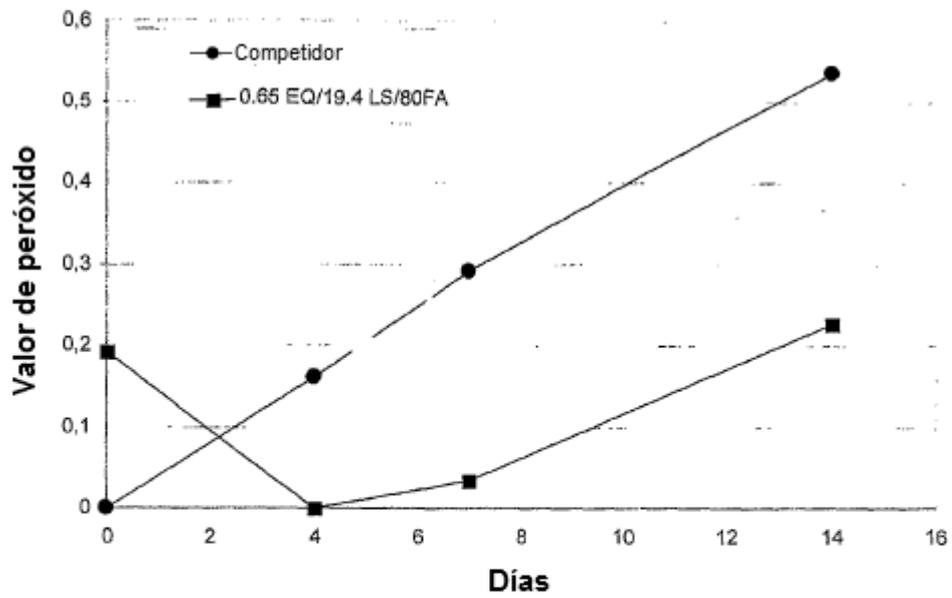


Figura 9. Valores de peróxido como una función del tiempo.
Composición de productos: EQ: % de etoxiquina, NAac: % LS, FA:
% de Ácido fórmico (85 %).