

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 178**

21 Número de solicitud: 201730489

51 Int. Cl.:

C11B 1/10 (2006.01)

A22C 25/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.10.2018

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.0%)
Einstein 3, Ciudad Universitaria de Cantoblanco
28049 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**REGLERO RADA, Guillermo;
VÁZQUEZ DE FRUTOS, Luis;
BARROSO MERINERO, Elvira;
ARRANZ MARTÍNEZ, Pablo;
CORZO MARTÍNEZ, Marta y
TORRES OLIVARES, Carlos**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Obtención de fosfolípidos a partir de cefalópodos mediante extracción secuencial con fluidos supercríticos**

57 Resumen:

Obtención de fosfolípidos a partir de cefalópodos mediante extracción secuencial con fluidos supercríticos.

La presente invención se relaciona con un procedimiento para la obtención de una composición que comprende fosfolípidos a partir de productos de cefalópodos mediante la extracción secuencial en dos etapas con fluidos supercríticos y con la composición que comprende fosfolípidos obtenible mediante dicho procedimiento.

ES 2 684 178 A1

DESCRIPCIÓN

Obtención de fosfolípidos a partir de cefalópodos mediante extracción secuencial con fluidos supercríticos

5

Campo de la invención

La presente invención está relacionada con procedimientos de extracción de fosfolípidos de forma secuencial a partir de subproductos de cefalópodos mediante el empleo de fluidos supercríticos, así como con el producto obtenible mediante dichos procedimientos.

10

Antecedentes de la invención

La pesca y el sector transformador de los productos del mar generan un gran volumen de subproductos. Estos subproductos son ampliamente utilizados para la producción de harinas y aceites de pescado y constituyen también una fuente de otros productos de alto valor añadido con aplicaciones para la industria farmacéutica y cosmética, como péptidos de colágeno, gelatina, pigmentos, sustancias antimicrobianas y enzimas. Los aceites de pescado han sido tradicionalmente la principal fuente de ácidos grasos omega-3, de los cuales el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), han sido ampliamente reconocidos por sus numerosos beneficios para la salud [Narayan, B., et al., *Food Reviews International*, 2006, 22(3), 291-307; Riediger, N. D., et al., *Journal of the American Dietetic Association*, 2009, 109(4), 668-67]. Estos ácidos grasos (AGs) son obtenidos fundamentalmente a partir de fuentes marinas.

20
25

Por otro lado, la gestión de los subproductos generados en el sector transformador de productos del mar supone un elevado coste debido a que los procesos actuales de valorización no están optimizados para esta tipología de material.

Entre los componentes de interés dentro de estos subproductos marinos encontramos los fosfolípidos (PLs), cuyo consumo ha aumentado en los últimos años debido a su potencial en la prevención de la obesidad, enfermedades cardiovasculares e hipercolesterolemia [Blokland, A., et al., *Nutrition*, 1999, 15(10), 778-783; Stamler, C.J., et al., *Journal of Lipid Research*, 2000, 41(8), 1214-1221; Pandey, N.R. and D.L. Sparks, *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2008, 9(3), 281-285; Sahebkar, A., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell*

30
35

Biology of Lipids, 2013, 1831(4), 887-893]. Diversos estudios han demostrado la capacidad de ciertos fosfolípidos para disminuir los lípidos en plasma e hígado, y además, también se ha detallado la prevención de enfermedades relacionadas con obesidad, proporcionada por fosfatidilcolina conteniendo ácidos grasos omega 3 de cadena larga [Buang, Y., et al., *Nutrition*, 5 2005, 21(7), 867-873; Buckley, J.D. and P.R.C., Howe, *Obesity Reviews*, 2009, 10(6), p. 648-659]. Además, el consumo de fosfolípidos ha mostrado una mejora de las funciones cognitivas, estrés y depresión [Vakhapova, V., et al., *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2014, 38(1-2), 39-45] y se ha observado su potencial como mediadores de inflamación e inmunidad [Feige, E., et al., *Current Opinion in Lipidology*, 2010, 21(6), 525-529; Schmitz, G. and 10 Ruebsaamen K., *Atherosclerosis*, 2010, 208(1), 10-18; Banskota, A. H., et al., *Phytochemistry*, 2014, 101, 101-108].

Además de su actividad biológica, los fosfolípidos poseen numerosas aplicaciones tecnológicas como estabilizadores, texturizantes, dispersantes, emulsionantes o antioxidantes.

15 Para la producción de mezclas de fosfolípidos de origen marino habitualmente se emplean tanto biomasas secas como húmedas, como por ejemplo krill, usando diferentes procesos de extracción basados principalmente en el uso de disolventes orgánicos tóxicos y contaminantes. Además, la pesca masiva de krill también conlleva un alto impacto ecológico, ya que es fuente 20 fundamental de alimentación de peces y otros organismos marinos.

Los cefalópodos son un alimento tradicional en la dieta española, siendo el segundo mercado consumidor de estas especies a nivel mundial. En el año 2013 el consumo “per cápita” de calamares y potas congelados fue 0,44 Kg/persona y de pulpo congelado 0,13 Kg/persona. 25 Esto hace que, dentro del sector de transformación de productos marinos, el procesado de cefalópodos tenga relevancia.

La piel de cefalópodos y más en particular la piel de pota (*Illex argentinus*), es un subproducto marino con un contenido relativamente alto en fosfolípidos ricos en AGs omega-3 (en particular, 30 EPA y DHA). Sin embargo, el aprovechamiento de dicho subproducto marino plantea dificultades ya que se trata de un material inadecuado para su procesado, tanto en forma de harinas de pescado (salida más habitual e inmediata para los subproductos de origen marino) como para la obtención de lípidos bioactivos, debido al bajo rendimiento de los procesos de decantación habitualmente utilizados. Es por ello que estos subproductos suelen ser 35 eliminados por incineración con una nula recuperación y revalorización [Martínez, J.J.

Secretaría de la Comisión Nacional de Subproductos de origen animal no destinados al consumo humano. *LIBRO blanco subproductos de origen animal no destinados al consumo humano*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Secretaría General Técnica: Centro de Publicaciones, 2007. 392 p.; il. 5 col., graf.; 27 cm.: ISBN 978-84-491-0774-0; Nam, K. A., et al., *Journal of Food Science*, 2008, 73(4), 249-255; Kader, A., et al., *Aquaculture Research*, 2012, 43(10), 1427-1438]. Este hecho supone un coste adicional de gestión para las empresas que generan dichos subproductos, así como el desperdicio de un importante recurso marino ya que, en la transformación de las especies de cefalópodos como por ejemplo pota y sepia, alrededor de un 10% del peso entero 10 está constituido por la piel.

Además, en el campo de la extracción de lípidos, gran parte de los procesos de extracción habitualmente utilizados carecen de la suficiente selectividad y extraen conjuntamente lípidos neutros (glicéridos, ácidos grasos y colesterol) y fosfolípidos, lo que da lugar a productos de 15 baja pureza y menor valor añadido [Sahena, F., et al., *Journal of Food Engineering*, 2010, 99(1), 63-69; Rubio-Rodríguez, N., et al., *Journal of Food Engineering*, 2012, 109(2), 238-248].

En este sentido, el empleo de CO₂ supercrítico para extraer lípidos ha demostrado tener propiedades muy interesantes, especialmente teniendo en cuenta que es una tecnología 20 respetuosa con el medio ambiente, que no deja residuos en el producto final después de la separación, no es inflamable, no es tóxico, es inerte a la mayoría materiales, es barato, y puede ser usado en condiciones operativas relativamente suaves, evitándose oxidaciones y procesos hidrolíticos. Además, la extracción con CO₂ supercrítico es una técnica muy adecuada para el fraccionamiento de materiales de partida de naturaleza lipídica, debido a la 25 baja polaridad del CO₂. Sin embargo, se ha descrito que el CO₂ supercrítico solo es capaz de extraer lípidos neutros y es necesario añadir un cosolvente, como por ejemplo etanol en cantidades superiores al 5% en peso, para la extracción de fosfolípidos [Catchpole, O.J., et al., *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 47, 591-597]. Además, se ha descrito que la extracción de lípidos neutros se ve dificultada según aumenta la fracción de lípidos polares [Catchpole, O.J., 30 et al., *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 47, 591-597] y que la solubilidad de los lípidos polares se reduce cuando los lípidos neutros han sido extraídos [Cocero, M.J., Calvo, L., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1996, 73(11), 1573-1578]. Estos hechos dificultan el aprovechamiento de subproductos marinos, en particular de piel de cefalópodos, ya que en dichos subproductos marinos los lípidos neutros son minoritarios frente a los lípidos 35 polares (fosfolípidos).

Por todo ello, existe una necesidad de disponer de procedimientos de extracción selectivos, eficientes y respetuosos con el medioambiente que permitan obtener fosfolípidos a partir de subproductos marinos que comprenden tanto dichos fosfolípidos como lípidos neutros, y así
5 conseguir un mejor aprovechamiento y valorización de dichos subproductos marinos.

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado un procedimiento de extracción
10 secuencial de lípidos a partir de subproductos marinos, en particular de piel de cefalópodos, selectivo, eficiente y respetuoso con el medioambiente mediante el empleo de fluidos supercríticos. En particular, los autores de la presente invención han encontrado que la extracción de lípidos a partir de subproductos marinos, en particular de piel de cefalópodos, utilizando fluidos supercríticos no modificados (por ejemplo CO₂ supercrítico) y una celda de
15 extracción con agitación, sorprendentemente logra una extracción prácticamente cuantitativa de lípidos neutros a tiempos reducidos en presencia de concentraciones elevadas de fosfolípidos. En una segunda etapa de extracción utilizando como disolvente de extracción un fluido supercrítico (por ejemplo CO₂ supercrítico) modificado con pequeñas cantidades de alcohol (por ejemplo etanol), se logran extraer los fosfolípidos de forma cuantitativa y con alta
20 pureza, donde además, dichos fosfolípidos pueden llegar a comprender un porcentaje importante de ácidos grasos omega-3, en particular, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA).

El procedimiento de la presente invención es, por tanto, selectivo y eficaz en la extracción de
25 lípidos neutros y fosfolípidos a partir de subproductos marinos, en particular de piel de cefalópodos. De este modo, se convierte un subproducto de origen marino con reducido valor industrial en una fuente de productos de alto valor añadido, orientados hacia mercados emergentes, planteando estrategias que implican el uso de tecnologías limpias y respetuosas con el medio ambiente. Con ello se incrementa el potencial de valorización de estos
30 subproductos del sector transformador de productos del mar para su posible uso en alimentación humana.

Por ello, el primer aspecto de la invención está relacionado con un procedimiento para la obtención de una composición que comprende fosfolípidos a partir de un producto de

cefalópodos que comprende fosfolípidos y lípidos neutros, donde dicho procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un producto de cefalópodos seco y particulado que comprende lípidos neutros y fosfolípidos;
- 5 (b) someter el producto de la etapa (a) a extracción con un fluido supercrítico aplicando agitación para obtener un residuo que comprende menos de un 30% en peso de lípidos neutros respecto al peso total de lípidos neutros y fosfolípidos en dicho residuo; y
- (c) someter el residuo de la etapa (b) a extracción con disolvente, donde dicho disolvente comprende un fluido supercrítico y del 1% al 10% en volumen con respecto al volumen
10 total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄, para obtener un extracto que comprende al menos el 80% en peso de fosfolípidos respecto al peso de fosfolípidos presente en el producto de la etapa (a).

En una realización particular, el procedimiento para la obtención de una composición que
15 comprende fosfolípidos a partir de un producto de cefalópodos que comprende fosfolípidos y lípidos neutros, comprende:

- (a) proporcionar un producto de cefalópodos seco y particulado que comprende lípidos neutros y fosfolípidos;
- (b) poner en contacto el producto de cefalópodos de la etapa (a) con un fluido supercrítico
20 mediante agitación;
- (c) separar el fluido supercrítico que contiene los componentes solubles de los componentes insolubles;
- (d) poner en contacto los componentes insolubles de la etapa (c) con un disolvente que comprende un fluido supercrítico y del 1% al 10% en volumen con respecto al volumen
25 total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄ mediante agitación;
- (e) separar el disolvente que contiene los componentes solubles de los componentes insolubles; y
- (f) aislar los componentes solubles de la mezcla de componentes solubles y disolvente obtenida en la etapa (e).

30 Otro aspecto de la invención está relacionado con una composición que comprende fosfolípidos obtenible mediante el procedimiento definido en el primer aspecto.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la cantidad de lípidos extraídos respecto al tiempo de extracción para la piel de *Illex argentinus* liofilizada y molida, mediante CO₂ supercrítico a 350 bares de presión, caudal de CO₂ de 16 g/min y temperatura de 40°C.

La Figura 2 muestra la cantidad de lípidos extraídos respecto al tiempo de extracción para la piel de *Illex argentinus* parcialmente desgrasada, mediante CO₂ supercrítico usando 5% de etanol como modificador, y 350 bares de presión, caudal de CO₂ de 25 g/min y temperatura de 40°C.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Por “fosfolípido” se entiende un lípido anfipático compuesto por una molécula de glicerol o de esfingosina a la que se encuentran unidos dos ácidos grasos y un grupo fosfato unido mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo como por ejemplo colina, etanolamina. Ejemplos de fosfolípidos son fostatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (PLC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM).

Por “lípido neutro” se entiende un lípido apolar, sin carga, principalmente hidrofóbico. Ejemplos de estos lípidos incluyen ácidos grasos, acilglicéridos como mono, di y triglicéridos, céridos, colesterol y ésteres de colesterol.

Por “cefalópodo” se entiende una clase de invertebrados marinos que comprende, entre otros sepias (por ejemplo *Sepia pharaonis* y *Sepia officinalis*), calamares (por ejemplo *Illex argentinus*), pulpos y nautilus.

Por “producto de cefalópodo” se entiende una o más partes de uno o varios cefalópodos, como por ejemplo, la piel, las vísceras, mezclas de piel y vísceras, o el cefalópodo en su totalidad.

Por “seco” se entiende que comprende menos del 15% en peso de agua respecto al peso total del producto de cefalópodo, preferiblemente menos del 10%, más preferiblemente menos del 5%, aún más preferiblemente menos del 1%.

Por "particulado" se entiende un producto sólido en forma de partículas en donde el 90% en peso de las partículas presentan un tamaño de partícula inferior a 5 mm, preferiblemente inferior a 3 mm. De forma preferida, el 95% en peso de las partículas presentan un tamaño de partícula inferior a 5 mm, preferiblemente inferior a 3 mm. De forma aún más preferida, el 99% en peso de las partículas presentan un tamaño de partícula inferior a 5 mm, preferiblemente inferior a 3 mm. Para determinar el porcentaje de partículas con un tamaño de partícula inferior a un valor concreto, por ejemplo 5 mm o 3 mm se puede someter al material a caracterización granulométrica mediante el uso de una serie de tamices mecánicos de tamaños de partícula concretos, como por ejemplo de 5 mm o 3 mm y determinar el peso de partículas que pasan dicho tamiz.

Por "fluido supercrítico" se entiende cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico. Por encima, pero próximo a dicho punto, la sustancia se encuentra en estado fluido pero comparte las propiedades de un líquido y un gas. Así, el fluido tiene una densidad similar a la de un líquido, mientras que su viscosidad y difusividad son similares a las de un gas. Un ejemplo de fluido supercrítico es CO₂ supercrítico.

Por alcohol C₁-C₄ se entiende un radical alquilo lineal o ramificado de entre 1 a 4 átomos de carbono unido a un grupo hidroxilo. Ejemplos de alcoholes C₁-C₄ son metanol, etanol, n-propanol, iso-propanol, n-butanol, iso-butanol, sec-butanol y terc-butanol.

Procedimiento de la invención

El primer aspecto de la invención está relacionado con un procedimiento para la obtención de una composición que comprende fosfolípidos a partir de un producto de cefalópodos que comprende fosfolípidos y lípidos neutros, donde dicho procedimiento comprende:

- (a) proporcionar un producto de cefalópodos seco y particulado que comprende lípidos neutros y fosfolípidos;
- (b) someter el producto de la etapa (a) a extracción con un fluido supercrítico aplicando agitación para obtener un residuo que comprende menos de un 30% en peso de lípidos neutros respecto al peso total de lípidos neutros y fosfolípidos presentes en dicho residuo; y
- (c) someter el residuo de la etapa (b) a extracción con disolvente, donde dicho disolvente comprende un fluido supercrítico y del 1% al 10% en volumen con respecto al volumen

total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄ para obtener un extracto que comprende al menos el 80% en peso de fosfolípidos respecto al peso de fosfolípidos presente en el producto de la etapa (a).

- 5 El producto de cefalópodos preferiblemente es un producto de sepia (por ejemplo *Sepia pharaonis* y *Sepia officinalis*), de calamar (por ejemplo *Illex argentinus*), o mezcla de los mismos; más preferiblemente de calamar, aún más preferiblemente de *Illex argentinus*. El producto de cefalópodos, preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en vísceras, pieles y mezclas de vísceras y pieles. De forma preferida, el producto de cefalópodos se
10 selecciona del grupo que consiste en vísceras, pieles y mezcla de vísceras y pieles de *Illex argentinus*; más preferiblemente es piel de *Illex argentinus*.

El producto de cefalópodos de la etapa (a) está seco y particulado.

- 15 El contenido en agua del producto de cefalópodos seco y particulado de la etapa (a) es inferior al 15% en peso, más preferiblemente inferior al 10% en peso, aún más preferiblemente inferior al 10% en peso, aún más preferiblemente inferior al 5% en peso, lo más preferido con un contenido en agua inferior al 1% en peso.
- 20 El 90% en peso de las partículas de la partícula del producto de cefalópodos seco y particulado de la etapa (a) presentan un tamaño de partícula inferior a 5 mm, preferiblemente inferior a 3 mm. Preferiblemente el 95% en peso de las partículas presentan un tamaño de partícula inferior a 5 mm, preferiblemente inferior a 3 mm. De forma aún más preferida, el 99% en peso de las partículas presentan un tamaño de partícula inferior a 5 mm, preferiblemente
25 inferior a 3 mm.

- Si el producto de cefalópodos presenta un contenido en agua o un tamaño de partícula superior a los valores requeridos en la etapa (a), dicho producto de cefalópodos se somete a una(s) etapa(s) previa de acondicionamiento en donde se reduce el contenido en agua y/o se
30 disminuye el tamaño de partícula. De forma ventajosa, el contenido en agua se puede reducir mediante liofilización ya que dicha técnica evita el deterioro del producto. Para reducir el tamaño de partícula el producto de cefalópodos se puede trocear y/o moler hasta obtener el tamaño deseado.

En una realización particular, el producto de cefalópodos seco y particulado de la etapa (a) se homogeneiza antes de someterlo a la extracción de la etapa (b), por ejemplo mediante mezcla o agitación del producto.

5 El producto de cefalópodos comprende fosfolípidos y lípidos neutros. Preferiblemente, los lípidos neutros se seleccionan del grupo que consiste en triglicéridos, ácidos grasos, colesterol, ésteres de colesterol y mezclas de los mismos. Preferiblemente, los fosfolípidos se seleccionan del grupo que consiste en fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y mezcla de los mismos. Una parte de los fosfolípidos presentes en los
10 cefalópodos contienen ácidos grasos omega-3 como ácidos grasos. Dichos ácidos grasos omega-3 son preferiblemente ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). El contenido más alto en dichos ácidos grasos se encuentra en las pieles de calamar, en particular de *Illex argentinus*, y de sepia. Por ello, dichos productos de cefalópodos son especialmente ventajosos como material de partida del procedimiento de la
15 presente invención.

En la etapa (b) del procedimiento de la invención, se somete el producto de cefalópodos de la etapa (a) a extracción con un fluido supercrítico aplicando agitación. Para ello, el producto de cefalópodos se pone en contacto con dicho fluido supercrítico a la vez que se aplica agitación.

20 De esta manera se obtiene una fracción soluble (extracto) que comprende fundamentalmente lípidos neutros y una fracción insoluble (residuo), donde dicha fracción insoluble o residuo comprende menos de un 30% en peso de lípidos neutros respecto al peso total de lípidos neutros y fosfolípidos presentes en dicho residuo.

25 En una realización preferente, dicho residuo comprende menos de un 15% en peso de lípidos neutros con respecto al peso total de lípidos neutros y fosfolípidos presentes en dicho residuo.

Por su parte, la fracción soluble o extracto contiene menos del 5% en peso de fosfolípidos respecto al peso de lípidos neutros, preferiblemente menos del 1%, más preferiblemente
30 menos del 0,5%, aún más preferiblemente menos del 0,1%, aún más preferiblemente menos del 0,05%, lo más preferido un 0%, es decir, los fosfolípidos están ausentes del extracto obtenido tras esta primera extracción o etapa (b) del procedimiento de la invención.

El experto en la materia puede determinar la cantidad de fosfolípidos y lípidos neutros mediante
35 técnicas habituales, como por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC), neutralización de la acidez libre o cromatografía de gases utilizando patrones puros de cada una de las clases de lípidos y la cuantificación mediante rectas de calibrado de cada uno de los lípidos detectados. La cantidad de lípidos neutros se pueden determinar mediante HPLC acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz según el método previamente
5 descrito por Torres et al. [Journal of Chromatography A, 2005, 1078(1), 28-34]. La cantidad de lípidos polares se pueden determinar mediante HPLC acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz según la metodología descrita por Casado et al. [Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 99, 14-19].

10 Esta etapa permite, por tanto, la extracción selectiva de lípidos neutros respecto a los fosfolípidos. Este hecho resulta sorprendente ya que se conoce que la extracción de lípidos neutros se ve dificultada según se aumenta la fracción de lípidos polares. En el producto de cefalópodos generalmente los lípidos neutros son minoritarios frente a los lípidos polares, y sin embargo, mediante el procedimiento de la presente invención, los lípidos neutros son extraídos
15 casi cuantitativamente en la etapa (b) del procedimiento.

La etapa (b) del procedimiento de la invención preferiblemente se lleva a cabo en una celda de extracción dotada de un sistema de agitación, preferiblemente un agitador mecánico. La extracción con agitación es ventajosa ya que permite reducir los tiempos de extracción y evita
20 la formación de caminos preferenciales del fluido supercrítico durante la extracción. De este modo también se evita tener que dispersar el producto de cefalópodos en un material inerte (por ejemplo arena de mar) que dificultaría su posterior recuperación y utilización en posteriores procesos. Además, dicha agitación permite homogeneizar el tamaño de partícula del residuo obtenido que posteriormente se someterá a la segunda extracción (etapa (c) del
25 procedimiento de la invención). Así, el residuo de la etapa (b) se recupera y se utiliza directamente en la siguiente etapa de extracción sin someterlo a un cribado adicional.

En una realización particular, el producto de cefalópodos de la etapa (a) se introduce en la celda de extracción dotada del sistema de agitación y se pone en contacto con el fluido
30 supercrítico. Preferiblemente el fluido supercrítico pasa de forma continua a través de la celda de extracción. En una realización particular, el caudal de dicho fluido supercrítico es de 10 a 30 g/minuto, preferiblemente de 10 a 20 g/min, más preferiblemente de 13 a 19 g/min, aún más preferiblemente de 15 a 17 g/min, lo más preferido aproximadamente 16 g/min. Preferiblemente, la extracción de la etapa (b) se realiza a una presión de entre 150 y 400
35 bares, más preferiblemente de entre 300 y 400 bares, aún más preferiblemente entre 325 y 375

bares, aún más preferiblemente entre 340 y 360 bares, lo más preferido aproximadamente 350 bares. Preferiblemente, la extracción de la etapa (b) se realiza a una temperatura de entre 30 y 50 °C, más preferiblemente de entre 35 y 45 °C, lo más preferido de aproximadamente 40 °C.

5 De forma preferida, el fluido supercrítico utilizado en la etapa (b) es CO₂ supercrítico.

Como ventaja adicional, y derivado fundamentalmente de la aplicación de agitación durante el proceso de extracción, esta extracción selectiva puede realizarse en tiempos reducidos, por ejemplo entre 20 y 120 minutos, entre 30 y 120 minutos, entre 40 y 120 minutos, entre 50 y 120 minutos, entre 60 y 120 minutos, entre 70 y 120 minutos, entre 80 y 120 minutos, entre 20 y 90 minutos, entre 30 y 90 minutos, entre 40 y 90 minutos, entre 50 y 90 minutos, entre 60 y 90 minutos, entre 70 y 90 minutos, entre 80 y 90 minutos, preferiblemente entre 60 y 120 minutos, más preferiblemente entre 70 y 90 minutos, aún más preferiblemente en aproximadamente 80 minutos.

15 Una vez finalizada la extracción de la etapa (b) se obtiene un extracto con los lípidos neutros y un residuo. Los lípidos neutros se pueden separar del fluido supercrítico utilizado en la extracción mediante despresurización, lo que provoca su precipitación y facilita su recuperación. Dichos lípidos neutros se pueden utilizar en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, en particular como precursores de hormonas esteroideas en la industria farmacéutica y también en la elaboración de liposomas para su estabilización. Dichos lípidos neutros son ricos en colesterol.

25 De forma ventajosa, el residuo de la etapa (b) se puede utilizar directamente en la siguiente etapa de extracción, etapa (c) del procedimiento de la invención, ya que no es necesario utilizar ningún material inerte para dispersar el material de partida de la etapa (b) (es decir, el producto de cefalópodos provisto en la etapa (a)) y, por tanto, no es necesario separar dicho material inerte del residuo de la etapa (b) antes de realizar la extracción de la etapa (c). Además, dado que la agitación aplicada durante la primera extracción (etapa (b)) permite homogeneizar el tamaño de partícula, tampoco es necesario moler o triturar dicho residuo antes de realizar la extracción de la etapa (c).

El residuo obtenido tras la etapa (b) del procedimiento de la invención contiene un porcentaje en peso de materia grasa que oscila entre el 5 y 20% en peso con respecto al peso total del

residuo, más preferiblemente entre 10 y 15% en peso de materia grasa. Por materia grasa se entiende la suma de lípidos neutros y fosfolípidos.

5 La siguiente etapa del procedimiento de la invención es la etapa (c). En dicha etapa del procedimiento se somete el residuo de la etapa (b) a extracción con disolvente. Para ello, dicho residuo se pone en contacto con un disolvente, donde dicho disolvente comprende un fluido supercrítico y del 1% al 10% en volumen con respecto al volumen total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄. Mediante esta etapa se obtiene un extracto que comprende al menos un 80% en peso de fosfolípidos respecto al peso total de fosfolípidos presentes en el producto de la
10 etapa (a), preferiblemente al menos el 90% en peso de los fosfolípidos respecto al peso total de fosfolípidos presentes en el producto de la etapa (a). El experto en la materia puede determinar la cantidad de fosfolípidos mediante técnicas habituales, como por ejemplo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tal como se ha descrito anteriormente.

15 Resulta sorprendente que con el procedimiento de la presente invención se logre extraer de forma casi cuantitativa los lípidos polares (fosfolípidos) utilizando cantidades bajas de alcohol C₁-C₄ ya que es conocido que la solubilidad de lípidos polares (por ejemplo fosfolípidos) se reduce cuando los lípidos neutros han sido extraídos.

20 La etapa (c) del procedimiento de la invención preferiblemente se lleva a cabo en una celda de extracción dotada de un sistema de agitación, preferiblemente un agitador mecánico. La extracción con agitación es ventajosa ya que permite reducir los tiempos de extracción y evita la formación de caminos preferenciales del disolvente durante la extracción. De este modo también se evita tener que dispersar el residuo de la etapa (b) en un material inerte (por
25 ejemplo arena de mar) que dificultaría su posterior recuperación y utilización en posteriores procesos.

Para la extracción de la etapa (c), el residuo de la etapa (b) se introduce en la celda de extracción dotada del sistema de agitación, preferiblemente agitación mecánica, y se pone en
30 contacto con el disolvente. De forma ventajosa, en la presente invención no es necesario realizar ningún cribado adicional tras la extracción de la etapa (b) para separar, por ejemplo, materiales inertes de dispersión que en la presente invención no se han tenido que añadir para lograr una extracción selectiva y eficiente de lípidos neutros. Preferiblemente el disolvente pasa de forma continua a través de la celda de extracción. En una realización particular, el caudal de
35 dicho fluido supercrítico es de 10 a 40 g/minuto, preferiblemente de 15 a 35 g/min, más

preferiblemente de 20 a 30 g/min, aún más preferiblemente de 23 a 27 g/min, lo más preferido aproximadamente 25 g/min. Preferiblemente, la extracción de la etapa (c) se realiza a una presión de entre 150 y 400 bares, más preferiblemente de entre 200 y 300 bares, aún más preferiblemente entre 225 y 275 bares, aún más preferiblemente entre 240 y 260 bares, lo más
5 preferido aproximadamente 250 bares. Preferiblemente, la extracción de la etapa (c) se realiza a una temperatura de entre 30 y 50 °C, más preferiblemente de entre 35 y 45 °C, lo más preferido de aproximadamente 40 °C.

En una realización, el disolvente de la etapa (c) comprende del 1% al 8% en volumen con
10 respecto al volumen total del fluido supercrítico de un alcohol, preferiblemente del 1% al 5%, más preferiblemente del 2% al 5%, aún más preferiblemente del 2,5% al 5%, lo más preferiblemente aproximadamente el 5%. De forma preferida, el fluido supercrítico utilizado en la etapa (c) es CO₂ supercrítico. De forma preferida el alcohol C₁-C₄ utilizado en la etapa (c) es etanol. De forma particularmente preferida el disolvente de la etapa (c) es CO₂ supercrítico y
15 del 1% al 10% en volumen con respecto al volumen total del CO₂ supercrítico de etanol, preferiblemente CO₂ supercrítico y del 1% al 8% en volumen con respecto al volumen total del CO₂ supercrítico de etanol, más preferiblemente CO₂ supercrítico y del 1% al 5% en volumen con respecto al volumen total del CO₂ supercrítico de etanol, más preferiblemente CO₂ supercrítico y del 2% al 5% en volumen con respecto al volumen total del CO₂ supercrítico de
20 etanol, aún más preferiblemente CO₂ supercrítico y del 2,5% al 5% en volumen con respecto al volumen total del CO₂ supercrítico de etanol, lo más preferido CO₂ supercrítico y aproximadamente el 5% en volumen con respecto al volumen total del CO₂ supercrítico de etanol.

25 Como ventaja adicional, y derivado fundamentalmente de la aplicación de agitación durante el proceso de extracción, esta extracción prácticamente cuantitativa puede realizarse en tiempos reducidos, por ejemplo entre 20 y 120 minutos, entre 30 y 120 minutos, entre 40 y 120 minutos, entre 50 y 120 minutos, entre 60 y 120 minutos, entre 70 y 120 minutos, entre 80 y 120 minutos, entre 20 y 90 minutos, entre 30 y 90 minutos, entre 40 y 90 minutos, entre 50 y 90
30 minutos, entre 60 y 90 minutos, entre 70 y 90 minutos, entre 80 y 90 minutos, preferiblemente entre 60 y 120 minutos, más preferiblemente entre 70 y 90 minutos, aún más preferiblemente en aproximadamente 80 minutos.

Una vez finalizada la extracción de la etapa (c) se obtiene un extracto con los fosfolípidos y un
35 residuo. Los fosfolípidos se pueden separar o aislar del fluido supercrítico utilizado en la

extracción mediante despresurización y evaporación del alcohol C₁-C₄, preferiblemente mediante evaporación a presión reducida (por ejemplo inferior a 10 mbar) y temperatura no superior a 40 °C, obteniéndose así una composición que comprende fosfolípidos.

- 5 Dicha composición comprende preferiblemente al menos un 70% en peso de fosfolípidos respecto al peso total de la composición, más preferiblemente al menos un 75% en peso, aún más preferiblemente al menos un 80% en peso. Los fosfolípidos de la composición de la invención, preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiolina y mezcla de los mismos.
- 10 Preferiblemente, la composición comprende de 55% a 75% en peso de fosfatidilcolina, de 3% a 10% en peso de lisofosfatidilcolina, de 3% a 10% en peso de fosfatidiletanolamina y de 5% a 12% en peso de esfingomiolina, en donde los porcentajes en peso se expresan respecto al peso total de la composición. Dicha composición que comprende fosfolípidos se puede utilizar en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. El residuo de la etapa (c) se puede utilizar
- 15 en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética, en particular para la obtención de colágeno e hidrolizados proteicos.

- El peso (en gramos) de producto de cefalópodos que se introduce en la celda de extracción en la etapa (b) como en la etapa (c) puede ser igual o diferente, preferiblemente es de entre 0,05 y
- 20 0,5 veces el volumen (en mililitros) de la celda de extracción, más preferiblemente entre 0,05 y 0,2 veces, más preferiblemente entre 0,05 y 0,1 veces, aún más preferiblemente entre 0,05 y 0,2 veces, lo más preferido entre 0,05 y 0,1 veces.

Extracto y composición de la invención

- 25 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un extracto obtenible según el procedimiento definido en el primer aspecto. Dicho extracto contiene al menos un 80% en peso de fosfolípidos respecto al peso total de fosfolípidos presentes en el producto de la etapa (a), preferiblemente al menos el 90% en peso de los fosfolípidos respecto al peso total de
- 30 fosfolípidos presentes en el producto de la etapa (a)

- En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende fosfolípidos, siendo dicha composición obtenible mediante el procedimiento de la invención que además comprende la etapa de aislar o separar los componentes solubles del extracto del disolvente
- 35 empleado en la segunda extracción.

Esta composición, preferiblemente comprende al menos un 70% en peso de fosfolípidos respecto al peso total de la composición, más preferiblemente al menos un 75% en peso, aún más preferiblemente al menos un 80% en peso. La composición también puede comprender una parte minoritaria de lípidos neutros, preferiblemente inferior al 15% en peso respecto al peso total de la composición, más preferiblemente inferior al 10% en peso, aún más preferiblemente inferior al 5% en peso. Dicha composición también puede contener otros componentes, como por ejemplo agua y opcionalmente xantomatina [Williams, T. L. et al., 2016, Langmuir, 2016, 32(15), 3754-3759].

10

Los fosfolípidos de la composición de la invención, preferiblemente se seleccionan del grupo que consiste en fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y mezcla de los mismos. Preferiblemente, la composición comprende de 55% a 75% en peso de fosfatidilcolina, de 3% a 10% en peso de lisofosfatidilcolina, de 3% a 10% en peso de fosfatidiletanolamina y de 5% a 12% en peso de esfingomielina, en donde los porcentajes en peso se expresan respecto al peso total de la composición.

15

Los fosfolípidos de la composición de la invención preferiblemente contienen ácidos grasos omega-3 como ácidos grasos que se encuentran unidos al glicerol o esfingosina de dichos fosfolípidos. Preferiblemente, los grasos omega-3 son ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA) o mezcla de los mismos.

20

Dicha composición se pueden utilizar en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.

25 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se aportan a efectos ilustrativos, y no suponen una limitación de la presente invención.

30 Materiales y métodos

Los productos de cefalópodos fueron cedidos por la empresa CEFRICO S.L consistieron en pieles de pota de la especie *Illex argentinus* procedente de Argentina.

El CO₂ fue adquirido y suministrado por la empresa Carburos Metálicos en forma líquida y formato de botella con sifón o espadín y pureza del 99,98%.

Las extracciones con fluidos supercríticos se realizaron en el equipo TharSFC (Thar SFC, a
5 Waters company). La celda de extracción posee una capacidad en volumen de 104 mL, y en su parte superior alberga un eje de agitación que puede ser opcionalmente activado o no. El CO₂ es vehiculizado hacia el interior de la celda a través de varios orificios. La presión de trabajo del CO₂ oscila entre 73 bar y 400 Bar y está controlada mediante un regulador de presión (Automated Back Pressure Regulator TharSFC) y el caudal de trabajo definido es mantenido
10 por acción de una bomba hidráulica (High pressure P-series pump TharSFC) estando establecido en un rango entre 10 y 50 g/min. La temperatura del proceso se controla mediante una resistencia eléctrica. El CO₂ es pre-enfriado para licuarlo previamente a su bombeo mediante un criostato (Huber CC508) y posteriormente calentado a la temperatura del proceso mediante un intercambiador de calor (Heat exchanger TharSFC).

15 El etanol absoluto utilizado como co-solvente o modificador se obtuvo de AppliChem Panreac (Barcelona, Spain), con una pureza del 99,5%.

La concentración de ácidos grasos libres se determinó mediante su neutralización con
20 hidróxido potásico en presencia de fenolftaleína.

El análisis de lípidos neutros mediante cromatografía de gases se realizó usando un cromatógrafo de gases Agilent (6890N Network GC System) acoplado a un detector de triple eje (5975C) y a un muestreador automático (Agilent 7683B). Para ello se utilizó el método
25 previamente descrito por Torres et al [Chromatographia, 2009, 69(7-8), 729-734].

El análisis de lípidos neutros también se realizó mediante HPLC usando un cromatógrafo Agilent Technologies Serie 1200 (Santa Clara, CA, EE.UU.) acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) (Agilent 1260 Infinity) según el método previamente descrito por
30 Torres et al. [Journal of Chromatography A, 2005, 1078(1), 28-34].

El análisis de lípidos polares mediante HPLC Agilent Technologies Serie 1200 (Santa Clara, CA, EE.UU.) acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) (Agilent 1260 Infinity) según la metodología descrita por Casado et al. [Journal of Molecular Catalysis B:
35 Enzymatic, 2014, 99, 14-19].

Acondicionamiento del producto de cefalópodos

5 Para el acondicionamiento del producto, las pieles *Illex argentinus* fueron inicialmente congeladas y almacenadas en una cámara congeladora a -20°C hasta su posterior liofilización. El producto congelado se colocó en bandejas de acero inoxidable y se introdujo en un liofilizador durante 4 días. Se partió de 6 kg de pieles *Illex argentinus* y se obtuvo un peso de liofilizado de 720 g.

10 A continuación, el material liofilizado se troceó y molió utilizando un molino de martillos con tamiz de 3 mm. El material molido se sometió a caracterización física por granulometría mediante el uso de una serie de 4 tamices mecánicos de tamaños de partícula de 3 mm, 1 mm, 500 µm y 250 µm.

15 El material molido se homogeneizó y conservó protegido de la luz, envasado al vacío y a temperatura de refrigeración de 4°C para su posterior extracción con fluidos supercríticos dividida en dos etapas.

EJEMPLO 1. Estudio de los tiempos de extracción de la etapa (b)

20 Se extrajo el producto de *Illex argentinus* acondicionado (10 g) con CO₂ supercrítico a 350 bar de presión, caudal de CO₂ de 16 g/min y temperatura de 40°C a distintos tiempos con el fin de definir el tiempo necesario para la extracción completa de los lípidos neutros. Los resultados se muestran en la Figura 1.

25 Ese primer extracto de lípidos neutros se cuantificó y caracterizó químicamente mediante neutralización de la acidez libre, cromatografía de gases y cromatografía líquida alta eficacia (HPLC acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz). La identificación se realizó utilizando patrones puros de cada una de las clases de lípidos y la cuantificación mediante
30 rectas de calibrado de cada uno de los lípidos detectados, dando como resultado la composición que se muestra en la Tabla 3. Es posible observar la total ausencia de lípidos polares en estos primeros extractos, lo cual indica la selectividad del método secuencial de extracción de la invención.

35 *Tabla 3: Porcentaje en peso de lípidos neutros*

<i>Lípidos neutros</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
Ácidos grasos libres	16,2	0,79
Colesterol	78,4	4,96
Triglicéridos y ésteres de colesterol	14,8	0,57

DE = desviación estándar

EJEMPLO 2. Estudio de los tiempos de extracción de la etapa (c)

5 Se extrajo el producto de *Illex argentinus* parcialmente desgrasado procedente del ejemplo 1 (7,5 g) con CO₂ supercrítico usando 5% de etanol como modificador a 350 bar de presión, caudal de CO₂ de 25 g/min y temperatura de 40°C a distintos tiempos con el fin de definir el tiempo necesario para la extracción completa de los lípidos polares. Los resultados se muestran en la Figura 2.

10 El extracto obtenido en esta segunda etapa se cuantificó y caracterizó químicamente mediante HPLC acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz. La identificación de los lípidos polares se realizó utilizando patrones comerciales de distintos fosfolípidos, como fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (PLC), fosfatidiletanolamina (PE) y esfingomielina (SM). La
15 cuantificación de los mismos se realizó mediante rectas de calibrado de cada uno de los lípidos detectados, dando como resultado la composición que se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Porcentaje en peso de fosfolípidos

<i>Fosfolípidos</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>
PC	63,8	3,18
PLC	5,8	0,63
PE	6,2	0,6
SM	7,7	0,39

DE = desviación estándar

20 El balance de materia se cerró con una pequeña fracción (10% aprox.) correspondiente principalmente a lípidos neutros que no fueron extraídos en la primera etapa de extracción.

El extracto obtenido presentó elevada coloración, que podría ser debido a la presencia de xantomatina (omocromo) residual, un pigmento presente en la piel de algunos cefalópodos,
25 como el *Illex argentinus*. Además esta sustancia podría proteger al propio extracto de su oxidación tras el proceso de extracción con CO₂ supercrítico.

El estado de oxidación de estos extractos fue determinado mediante la medida del índice de peróxidos utilizando el equipo de medida rápida "Food-Lab Fat". Los resultados del índice de peróxidos determinados muestran un bajo estado de oxidación en estos extractos, siendo de media aproximadamente $1,3 \pm 0,21$ mEq/Kg.

5

EJEMPLO 3. Desgrasado de piel de *Illex argentinus* molida mediante CO₂ supercrítico en celda con agitación

Se partió de 10 g de la piel de *Illex argentinus* acondicionada previamente. La granulometría obtenida para este material fue del 7,9% de partícula menor de 250 µm, un 7,8% entre 500 y 250 µm, un 18,2% entre 500 µm y 1 mm y un 66% entre 1 y 3 mm. Este material se introdujo en la celda de extracción del equipo TharSFC y se extrajo con agitación mecánica. La presión del CO₂ aplicada fue de 350 bar, caudal de CO₂ circulado 16 g/min y temperatura del proceso 40°C. El tiempo de la extracción fue de 80 min. En estas condiciones se obtuvo un residuo de 15 416,9±15,50 mg, que representa el 4,17% del material deshidratado de partida.

EJEMPLO 4. Desgrasado de piel de *Illex argentinus* molida mediante CO₂ supercrítico en celda sin agitación (ejemplo comparativo)

20 Se partió de 10 g de la piel de pota molida acondicionada previamente. La granulometría obtenida para este material fue del 7,9% de partícula menor de 250 µm, un 7,8% entre 500 y 250 µm, un 18,2% entre 500 µm y 1 mm y un 66% entre 1 y 3 mm. Este material se introdujo en la celda de extracción del equipo TharSFC sin aplicar agitación mecánica. Se extrajo en unas condiciones de presión de CO₂ de 350 bar, caudal de CO₂ circulado 16 g/min, temperatura de 25 40°C y tiempo de extracción de 80 min. Se obtuvo un residuo de aproximadamente 354 mg, que representa el 3,54% del material deshidratado de partida.

EJEMPLO 5. Extracción de la fracción de fosfolípidos presentes en la piel de *Illex argentinus* molida y desgrasada mediante la aplicación de CO₂ supercrítico y 5% de etanol como 30 modificador

Se partió de 7,5 g de piel de *Illex argentinus* molida parcialmente desgrasada obtenida en el ejemplo 3, que se introdujo en la celda de extracción con agitación del equipo TharSCF. La granulometría obtenida para este material fue del 8,8% de partícula menor de 250 µm, un 35 19,1% entre 500 y 250 µm, un 37,9% entre 500 µm y 1 mm y un 33,6% entre 1 y 3 mm. El

proceso de extracción se realizó del mismo modo que el definido en el Ejemplo 3, con la diferencia de que en esta ocasión se bombeó junto con el CO₂ una cantidad de etanol correspondiente al 5% del volumen de CO₂ utilizado, usando una bomba hidráulica Dosapro Milton Roy, para que mediante la mezcla de estos dos solventes en una cámara de premezcla sea posible la extracción de los fosfolípidos presentes en el material de partida. Los parámetros de trabajo fueron: presión 350 bar, caudal de CO₂ 25 g/min, caudal de etanol 1,58 mL/min, y 40°C. El tiempo de la extracción fue de 80 min. El etanol presente en el extracto obtenido se evaporó en condiciones de vacío (menor a 10 mbar) y temperatura máxima de 40°C, para evitar la oxidación del mismo. Se obtuvo en estas condiciones un peso de extracto de 826,6±8,13 mg, que representa el 11,02% de la piel de *Illex argentinus* molida desgrasada.

EJEMPLO 6. Extracción de la fracción de fosfolípidos presentes en la piel de *Illex argentinus* molida desgrasada mediante la aplicación de CO₂ supercrítico y 2,5% de etanol como modificador

Se partió de 7,5 g de piel de *Illex argentinus* molida parcialmente desgrasada obtenida en el ejemplo 3, que se introdujo en la celda de extracción con agitación del equipo TharSCF. El proceso de extracción se realizó durante 80 min, del mismo modo que el definido en el Ejemplo 5, utilizando esta vez 2,5% de etanol. Los parámetros de trabajo fueron: presión del CO₂ 350 bar, caudal de CO₂ 25 g/min, caudal de etanol 0,79 mL/min, y 40°C. El peso del extracto obtenido fue de aproximadamente 605,56 mg, que representa el 8,06% de la piel de *Illex argentinus* molida desgrasada.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la obtención de una composición que comprende fosfolípidos a partir de un producto de cefalópodos que comprende fosfolípidos y lípidos neutros, donde dicho
5 procedimiento comprende:
- (a) proporcionar un producto de cefalópodos seco y particulado que comprende lípidos neutros y fosfolípidos;
 - (b) someter el producto de la etapa (a) a extracción con un fluido supercrítico aplicando
10 agitación para obtener un residuo que comprende menos de un 30% en peso de lípidos neutros respecto al peso total de lípidos neutros y fosfolípidos en dicho residuo; y
 - (c) someter el residuo de la etapa (b) a extracción con disolvente, donde dicho disolvente comprende un fluido supercrítico y del 1% al 10% en volumen con respecto al volumen total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄ para obtener una composición que
15 comprende al menos el 80% en peso de fosfolípidos respecto al peso de fosfolípidos presente en el producto de la etapa (a).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los lípidos neutros se seleccionan del grupo que consiste en triglicéridos, ácidos grasos, colesterol, ésteres de colesterol y mezclas de los mismos.
20
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que los fosfolípidos se seleccionan del grupo que consiste en fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielinea y mezcla de los mismos.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de cefalópodos se selecciona de entre piel y vísceras de cefalópodos.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el producto de cefalópodos es piel de cefalópodos.
30
6. Procedimiento según la cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cefalópodo se selecciona de entre sepia y calamar.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el cefalópodo es *Illex argentinus*.
35

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de cefalópodos seco y particulado de la etapa (a) definida en la reivindicación 1 comprende un 90% de partículas con un tamaño de partícula inferior a 3 mm.
- 5 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fluido supercrítico es CO₂ supercrítico.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el disolvente de la etapa (c) comprende del 1% al 8% en volumen con respecto al volumen total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄.
- 10 11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que el disolvente de la etapa (c) comprende del 1% al 8% en volumen con respecto al volumen total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄.
- 15 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el disolvente de la etapa (c) comprende del 2% al 5% en volumen con respecto al volumen total del fluido supercrítico de un alcohol C₁-C₄.
- 20 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el alcohol C₁-C₄ es etanol.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que tras la etapa (b) definida en la reivindicación 1 se obtiene un residuo con menos de un 15% en peso de 25 lípidos neutros respecto al peso total de lípidos neutros y fosfolípidos en dicho residuo.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) definida en la reivindicación 1 se lleva a cabo durante al menos 60 minutos.
- 30 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (b) definida en la reivindicación 1 se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de entre 60 minutos y 120 minutos.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que el periodo de tiempo es de entre 70 35 minutos y 90 minutos.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la extracción de la etapa (b) definida en la reivindicación 1 se realiza a una presión de entre 150 y 400 bares.

5 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la extracción de la etapa (b) definida en la reivindicación 1 se realiza a una presión de entre 300 y 400 bares.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la extracción de la etapa (b) definida en la reivindicación 1 se realiza a una temperatura de entre 30 y 50 °C.

10

21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que tras la etapa (c) definida en la reivindicación 1 se obtiene una composición que comprende al menos el 90% en peso de los fosfolípidos respecto al peso total de fosfolípidos presentes en el producto de la etapa (a).

15

22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (c) definida en la reivindicación 1 se lleva a cabo durante al menos 60 minutos.

20 23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (c) definida en la reivindicación 1 se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de entre 60 minutos y 120 minutos.

24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que el periodo de tiempo es de entre 70 minutos y 90 minutos.

25

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la extracción de la etapa (c) definida en la reivindicación 1 se realiza a una presión de entre 150 y 400 bares.

30 26. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que la extracción de la etapa (c) definida en la reivindicación 1 se realiza a una presión de entre 200 y 300 bares.

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la extracción de la etapa (c) definida en la reivindicación 1 se realiza a una temperatura de entre 30 y 50 °C.

28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende tras la etapa (c), aislar los componentes solubles del extracto del disolvente empleado en la etapa (c).

5 29. Un extracto que comprende fosfolípidos obtenible mediante el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.

30. Extracto según la reivindicación 29, donde los fosfolípidos comprenden ácidos grasos omega-3.

10 31. Extracto según la reivindicación 30, donde los ácidos grasos omega-3 se seleccionan entre ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y mezcla de los mismos.

15 32. Una composición que comprende fosfolípidos obtenible mediante el procedimiento definido en la reivindicación 28.

33. Composición según la reivindicación 32, que comprende al menos un 80% en peso de fosfolípidos.

20 34. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 32 o 33, donde los fosfolípidos comprenden ácidos grasos omega-3.

25 35. Composición según la reivindicación 34, donde los ácidos grasos omega-3 se seleccionan entre ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y mezcla de los mismos.

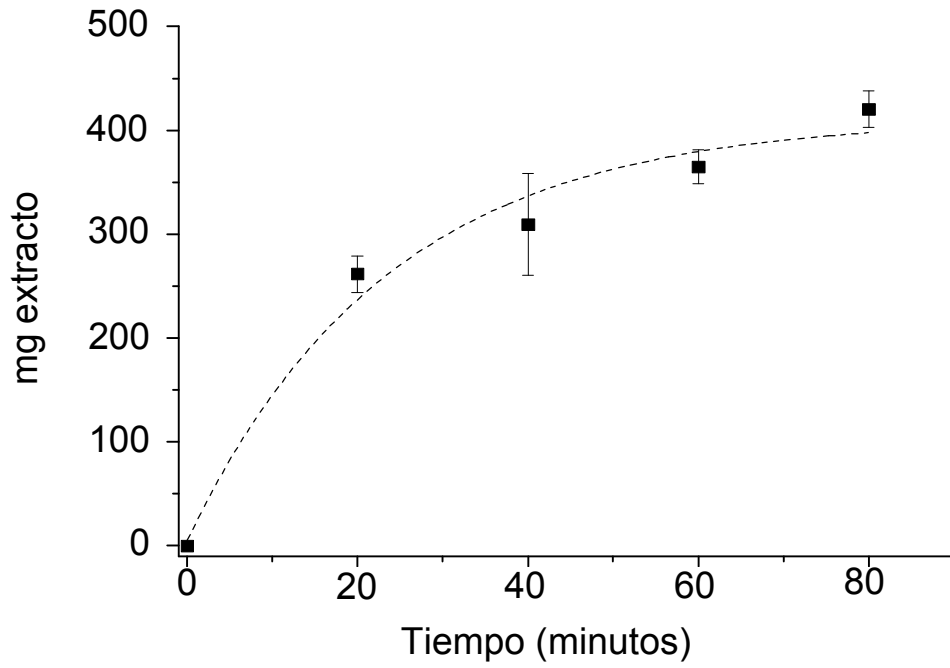


FIGURA 1

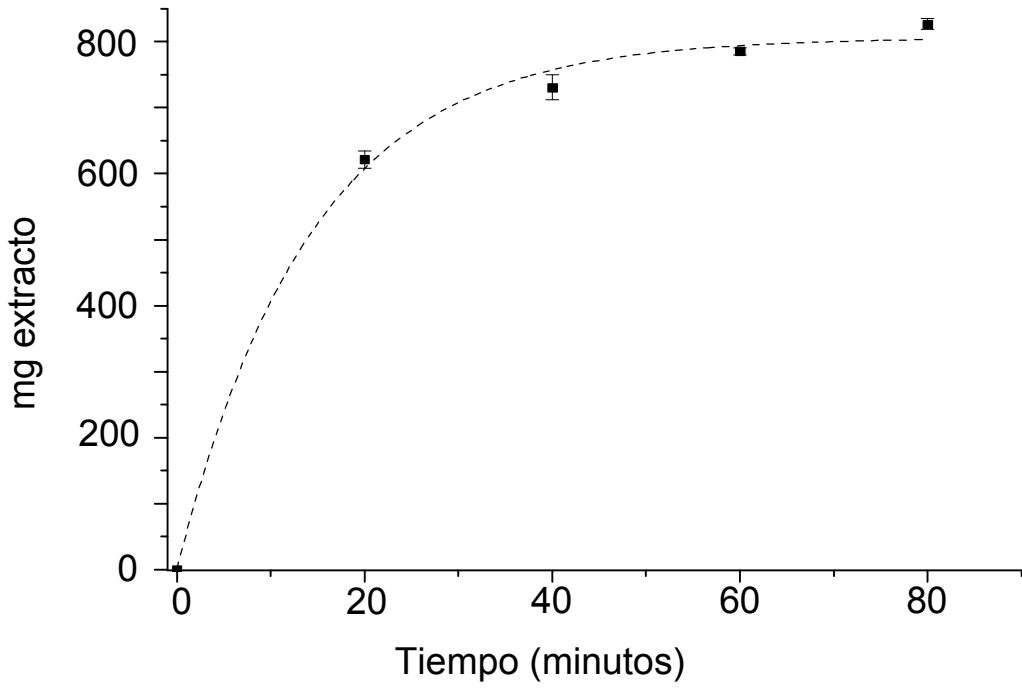


FIGURA 2



- ②¹ N.º solicitud: 201730489
②² Fecha de presentación de la solicitud: 30.03.2017
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **C11B1/10** (2006.01)
A22C25/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 2010143571 A1 (BREIVIK HARALD) 10/06/2010, El documento completo	1-9, 13-20, 22, 25-35
Y	JP H028298 A (AGENCY IND SCIENCE TECHN) 11/01/1990, (Resumen) Recuperado de base de datos EPODOC, AN 1990-054984	1-9, 13-20, 22, 25-35
A	TANAKA Y <i>et al.</i> EXTRACTION OF PHOSPHOLIPIDS FROM SALMON ROE WITH SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AND AN ENTRAINER. 01/01/2004, Vol. 53, Páginas 417 -424 [en línea][Recuperado el 27/04/2017]. ISSN 1345-8957. El documento completo	1-35
A	SUBRA-PATERNAULT PASCALE <i>et al.</i> EXTRACTION OF PHOSPHOLIPIDS FROM SCALLOP BY-PRODUCT USING SUPERCRITICAL CO ₂ /ALCOHOL MIXTURES. 28/02/2015, Vol. 60, Nº 2 Parte 1 Páginas 990-998 [en línea][recuperado el 27/04/2017]. ISSN 0023-6438 (print)ISSN 1096-1127 (electronic), <DOI: doi:10.1016/j.lwt.2014.09.057>. El documento completo	1-35
A	KR 20100037066 A (U MAX CO LTD) 08/04/2010, (Resumen) Recuperado de base de datos WPI, [en línea][recuperado el 27/04/2017]. AN - 2010-E00958	1-35

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la
misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación
de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha
de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
04.05.2017

Examinador
N. Urquía Fernández

Página
1/5

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

C11B, A22C

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

INVENES, EPODOC, WPIAP, TXPEA TXPEB TXPEC TXPEE TXPEF TXPEH TXPEI TXPEP TXPEPEA TXPES TXPUSE0A TXPUSE1A TXPUSEA TXPUSEB TXPW0EA BIOSIS COMPDX EMBASE INSPEC MEDLINE NPL XPESP INTERNET.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.05.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-35	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 10-12, 21, 23, 24	SI
	Reivindicaciones 1-9, 13-20, 22, 25-35	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2010143571 A1 (BREIVIK HARALD)	10.06.2010
D02	JP H028298 A (AGENCY IND SCIENCE TECHN)	11.01.1990
D03	TANAKA Y et al. EXTRACTION OF PHOSPHOLIPIDS FROM SALMON ROE WITH SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AND AN ENTRAINER. JOURNAL OF OLEO SCIENCE, 20040101 JAPAN OIL CHEMISTS SOCIETY, TOKYO, JP. Vol. 53, Nº 9, Páginas 417 - 424 [en línea][recuperado el 27/04/2017]. ISSN 1345-8957	01.01.2004
D04	SUBRA-PATERNAULT PASCALE et al. EXTRACTION OF PHOSPHOLIPIDS FROM SCALLOP BY-PRODUCT USING SUPERCRITICAL CO2/ALCOHOL MIXTURES. LWT - Food Science and Technology MAR 2015. Vol. 60, Nº 2, Parte 1, Páginas 990-998 [en línea][recuperado el 27/04/2017]. ISSN 0023-6438 (print) ISSN 1096-1127(electronic), <DOI:doi:10.1016/j.lwt.2014.09.057>	28.02.2015
D05	KR 20100037066 A (U MAX CO LTD)	08.04.2010

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

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa los procedimientos, extractos y la mezclas obtenidos por dicho procedimientos objeto de la solicitud tal y como están reivindicados, por lo que las reivindicaciones 1 a 35 de la solicitud son nuevas según el artículo 6 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Se han encontrado documentos que divulgan procedimientos similares a los de la invención y que afectan la actividad inventiva las reivindicaciones 1 a 9, 13 a 20, 22, y 25 a 35 de la solicitud según el artículo 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, como se detalla a continuación.

Reivindicaciones 1 a 9

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe un procedimiento muy similar de extracción de lípidos y fosfolípidos en dos fases, una primera con CO2 supercrítico y una segunda con CO2 supercrítico adicionado con 10% de etanol, con un resultado final de extracción del 80% de los fosfolípidos presentes, a 300 bares de presión y 50°C. Los fosfolípidos extraídos contienen un 33.5% de EPA y DHA, según se describe en el ejemplo 1. Considerando que el Krill contiene un 50% de fosfolípidos, y que en la extracción no es posible separar el EPA y DHA de otros fosfolípidos presentes, la eficiencia en la extracción de fosfolípidos alcanza el 80%, tal como se indica en la tabla 4. La fracción lipídica contiene mayoritariamente triglicéridos junto con ésteres (tabla 1). El procedimiento D01 se diferencia del procedimiento descrito en la solicitud en el material de partida, que en el D01 es Krill seco liofilizado que puede estar en polvo (párrafo 31) y en la solicitud es material de vísceras de cefalópodo liofilizado y particulado.

El D02 describe un procedimiento de extracción de fosfolípidos en cefalópodos, y en particular en vísceras de sepia liofilizada. El D02 describe un proceso en dos fases en el que la primera fase es idéntica a la invención tal y como se describe. La segunda fase difiere de la solicitud en que no se realiza una segunda extracción con fluido supercrítico y etanol. La eficiencia de este proceso es inferior al proceso descrito en la solicitud.

En el D01 también se indica que este procedimiento es válido para la extracción de fosfolípidos a partir de otros materiales marinos como las gónadas de pescado o las especies de Calanus. De hecho, en los documentos D03 y D04 se encuentran además métodos análogos de extracción de fosfolípidos ricos en omega-3 con fluido supercrítico de CO₂ y etanol a partir de otras especies de pescado como salmón, o desechos (incluyendo piel y vísceras) de las vieiras respectivamente. Conociendo el alto contenido de fosfolípidos en vísceras de cefalópodo tal y como describe el D02, un técnico experto en la materia probaría el método de extracción los lípidos y fosfolípidos del documento D01 para obtener el mayor contenido posible de fosfolípidos en el extracto final.

El procedimiento descrito en el ejemplo 1 del D01 produce un extracto que comprende el 80% de los fosfolípidos contenidos en la muestra inicial. Siendo la muestra inicial Krill liofilizado, los fosfolípidos presentes contendrán fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, y esfingomielina, tal y como está descrito en el estado de la técnica. (Ver D02 y D03).

Reivindicaciones 13 a 20, 22, y 25 a 35

El etanol más utilizado en los procedimientos de extracción de lípidos con fluidos supercríticos es el etanol. El porcentaje de lípidos neutros en el residuo es el esperado y se encuentra descrito en el estado de la técnica. Los tiempos del procedimiento reivindicado en las reivindicaciones 16 y 17 son inferiores a los descritos en el estado de la técnica en general, sin embargo, los tiempos más cortos en esta fase no se consideran suficientemente inventivos por carecer de relevancia suficiente, ya que el objeto de la invención es la extracción de fosfolípidos de la segunda fase. Por otro lado los rangos de presión establecidos en las reivindicaciones 18 y 19 y la temperatura de la reivindicación 20, se encuentran descritas en el D02 para la misma fase a partir de cefalópodos, así como en el D01 para el Krill. El tiempo de reacción de más de 60 minutos es el esperable para este tipo de procesos.

Igualmente los rangos de presión para la segunda fase de extracción también están descritos en el ejemplo 1 del D01, así como la temperatura. El aislamiento de los componentes solubles resulta evidente como parte del proceso de extracción de fosfolípidos.

Por tanto, conforme al artículo 8 de la Ley 11/1986 de patentes:

Las reivindicaciones 13 a 20, solo poseen actividad inventiva cuando dependen exclusivamente de las reivindicaciones 10 a 12.

La reivindicación 22 carece de actividad inventiva cuando se hace depender de las reivindicaciones 1 a 9 y 13 a 20.

Las reivindicaciones 25 a 28 solo poseen actividad inventiva cuando se hacen depender de las reivindicaciones 10 a 12, 21, 23 y 24.

Reivindicaciones 29 a 35

Los extractos de las reivindicaciones 29 a 35 han sido producidos por cualquiera de las reivindicaciones anteriores, por tanto carecen de actividad inventiva cuando se hacen depender de las reivindicaciones 1 a 9, 13 a 20, 22 y 25 a 28, conforme al artículo 8 de la Ley 11/1986 de patentes.

Reivindicaciones 10 a 12

Ninguno de los documentos encontrados describe el procedimiento de extracción de la reivindicación 1 con un porcentaje de etanol inferior al 10% en la segunda fase, alcanzando el nivel de extracción del 80% de los fosfolípidos totales, con las mismas condiciones u otras de presión y temperatura. De hecho, en el D01 indica que concentraciones del 5% no consiguen extraer más que trazas de la fase fosfolípídica y que es necesario aumentarlo al 10% para conseguir extraer el porcentaje buscado del 80%. En el D03 se indica un procedimiento de dos fases en el que en la primera fase se incluye un 5% de etanol a la corriente de CO₂ supercrítico para obtener los lípidos neutros, con una pequeña extracción de 15% de fosfolípidos, y que se requiere una segunda fase con un 20% de etanol con respecto al CO₂ supercrítico para obtener el 80% de los fosfolípidos totales. En el D04 se requiere un 15% de etanol y en el D05 un 50% de etanol.

Las reivindicaciones 10 a 12 poseen actividad inventiva conforme al artículo 8 de la Ley 11/1986 de patentes.

Reivindicaciones 21, 23 y 24

En el estado de la técnica no se han encontrado documentos que describan el procedimiento descrito en la solicitud con una eficiencia del 90% de extracción de fosfolípidos. Considerando que una ganancia en eficiencia del 10% en el proceso tiene suficiente carácter inventivo, se considera que la reivindicación 21 posee actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley 11/86 de Patentes.

Los tiempos de reacción reivindicados en las reivindicaciones 23 y 24 no están descritos en el estado de la técnica, y de hecho acortar los tiempos mejorando la eficiencia tiene carácter inventivo. Las reivindicaciones 23 y 24 tienen carácter inventivo según el artículo 8 de la Ley 11/86 de Patentes.