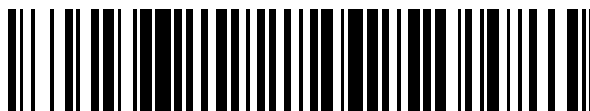


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 134**

51 Int. Cl.:

**C11C 1/08** (2006.01)

**C07C 51/42** (2006.01)

**C07C 57/03** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2011 PCT/IB2011/002593**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12038833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2011 E 11826479 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2619298**

54 Título: **Procedimiento de concentración de ácidos grasos omega-3**

30 Prioridad:

**24.09.2010 US 386096 P**

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

**14.02.2019**

73 Titular/es:

**BASF AS (100.0%)  
P.O. Box 420  
1327 Lysaker, NO**

72 Inventor/es:

**BREIVIK, HARALD;  
THORSTAD, OLAV y  
LIBNAU, FRED OLAV**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 700 134 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

## Procedimiento de concentración de ácidos grasos omega-3

La presente divulgación se refiere de manera general a un procedimiento para concentrar ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácidos grasos omega-3, a partir de una mezcla oleosa de ácidos grasos con una solución acuosa de sales de plata, tal como una solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$ .

Los ácidos grasos omega-3 son útiles en una serie de aplicaciones, incluyendo productos farmacéuticos y/o productos de complemento nutricional. Por ejemplo, los ácidos grasos omega-3 pueden regular los niveles de lípidos en plasma, las funciones cardiovascular e inmunitaria, la acción de la insulina, el desarrollo neuronal y la función visual. Los ácidos grasos omega-3 pueden tener efectos beneficiosos sobre los factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, tales como hipertensión e hipertrigliceridemia, y sobre la actividad del complejo fosfolípido-factor de coagulación VII. Los ácidos grasos omega-3 también pueden reducir los triglicéridos del suero, aumentar el colesterol HDL del suero, reducir la presión arterial sistólica y diastólica y/o la frecuencia del pulso, y puede reducir la actividad del complejo fosfolípido-factor VII de coagulación sanguínea. Además, los ácidos grasos omega-3 generalmente se toleran bien, sin que generen efectos secundarios graves.

Los aceites marinos, también comúnmente denominados aceites de animales marinos, son una fuente de ácidos grasos omega-3, que incluyen ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA), que se ha descubierto que regulan el metabolismo lipídico. Los aceites de origen vegetal, los aceites microbianos, y los aceites de algas también son fuentes de ácidos grasos omega-3. Se han desarrollado varias fórmulas de ácidos grasos omega-3. Por ejemplo, una forma de mezcla oleosa de ácidos grasos omega-3 es un concentrado de ácidos grasos primarios omega-3, de cadena larga, poliinsaturados de aceites de animales marinos que contienen DHA y EPA, tales como los vendidos bajo la marca comercial Omacor® / Lovaza™/ Zodin® / Seacor®. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.502.077, 5.656.667 y 5.698.594. En particular, cada cápsula de 1000 mg de Lovaza™ contiene al menos el 90 % de ésteres etílicos de ácidos grasos omega-3 (EPA/DHA al 84 %); aproximadamente 465 mg de éster etílico de EPA y aproximadamente 375 mg de éster etílico de DHA.

Otros ácidos grasos omega-3 pueden proporcionar actividad. Por ejemplo, Kaur y col. (Prog. Lipid Res. (2011) vol. 50(1), pp. 28-34) atribuyen determinados efectos biológicos a DPA n-3. Existe evidencia de que el DPA n-3 posee una capacidad de migración en células endoteliales 10 veces mayor que el EPA, lo que puede ser importante en procesos de cicatrización. Además, se ha documentado que DPA n-3 es más eficaz que EPA y DHA en la inhibición de la agregación de plaquetas en la sangre. Además, el DPA n-3 puede desempeñar un papel en la atenuación de la disminución relacionada con la edad en el aprendizaje espacial y la potenciación a largo plazo. Sin embargo, el DPA n-3 no se ha estudiado de manera extensiva debido a la limitada disponibilidad del compuesto puro.

Muchas de las fuentes de ácidos grasos omega-3 también son fuentes de ácidos grasos omega-6. En determinados procesos biológicos, sin embargo, los ácidos grasos omega-3 y omega-6 pueden expresar actividades opuestas, de manera que se desean bajas concentraciones de ácidos grasos omega-6, es decir, altas proporciones n-3/n-6. Un producto comercial que cumple con la Monografía de la Farmacopea Europea 1250 normalmente tiene una proporción de n-3/n-6 en el intervalo de 24-40.

Una visión global de los procedimientos para preparar concentrados de ácidos omega-3 se da por Breivik (Long-Chain Omega-3 Specialty Oils, The Oily Press, PJ Barnes y asociados, Bridgwater Reino Unido, pp. 111-140, 2007). Debido a las composiciones complejas de los ácidos grasos de los aceites marinos, es difícil preparar composiciones altamente concentradas de ácidos grasos omega-3 usando solo una técnica de concentración. Normalmente, se usa una combinación de técnicas, la mayoría de las veces, técnicas que combinan la separación de acuerdo con la insaturación (por ejemplo, separación enzimática y/o fraccionamiento con urea) con la separación de acuerdo con la longitud de la cadena de carbonos (por ejemplo, destilación molecular/de vía corta y/o extracción con fluidos supercríticos). Las técnicas convencionales a menudo tienen la desventaja de dar concentrados con bajos rendimientos de ácidos grasos omega-3 en comparación con las cantidades en el aceite de partida. Esto puede ser particularmente problemático cuando se combinan técnicas de bajo rendimiento como el fraccionamiento con urea y la destilación de vía corta.

Además, los procedimientos de separación tales como la destilación de vía corta y otros procedimientos que principalmente separan ésteres de ácidos grasos basándose en la longitud de la cadena normalmente no separan entre ácidos grasos omega-3 y omega-6 con el mismo número de átomos de carbono, tales como  $\text{C}_{20:4n-3}$  y  $\text{C}_{20:4n-6}$ , o  $\text{C}_{22:5n-3}$  y  $\text{C}_{22:5n-6}$ . El fraccionamiento con urea, por ejemplo, puede dar como resultado mayores factores de concentración para los ácidos grasos omega-6 que para los ácidos grasos omega-3 homólogos dado que la tendencia de un derivado de ácido graso a formar complejos sólidos con urea aumenta con la distancia desde el primer enlace doble hasta el grupo carbonilo del éster de ácido graso (comúnmente conocido como el valor  $\Delta$ ). Si un ácido graso omega-6 tiene un valor  $\Delta$  de  $\Delta'$ , el correspondiente ácido graso omega-3 tiene un valor  $\Delta$  de  $(\Delta'+3)$ , dando como resultado un mayor grado de formación de complejo con urea. Esta tendencia llega a ser especialmente pronunciada para altas concentraciones de ácidos grasos omega-3, en las que se utilizan grandes concentraciones relativas de urea.

- Se han hecho estudios usando sales de plata para aislar ácidos grasos poliinsaturados a partir de una mezcla. Véase, por ejemplo, Quinn y col. (pp. 133-169 en Perry y col., Progress in Separation and Purification 4, Wiley-Interscience, Nueva York, 1971); Peers y col. (J. Food Technology (1986) vol. 21 pp. 463-469); Suzuki y col. (Bioseparation (1993) vol. 3, pp. 197-204); Teramoto y col. (Ind. Eng. Chem. Res. (1994), vol. 33 pp. 341-345);
- 5 Teramoto y col. (J. Membrane Sci., (1994) vol. 91, pp. 209-213); Kubota y col. (Sep. Sci. Technol. (1997), vol. 32, pp. 1529-1541); Chen y col. (J. Jiangsu University of Science and Technology (Natural Science) (2000), vol. 21, pp. 18-22); Tao y col. (Chinese J. Marine Drugs, (2004) No. 3, pp. 28-30); Huong (J. Chemistry (2007), vol. 45, pp. 757-762); Li y col. (Sep. Sci. Technol. (2008) vol. 43, pp. 2072-2089); EP 0454430B1; EP 0576191A2; Seike y col. (Journal of Chemical Engineering of Japan (2007), Vol. 40, pp 1076-1084); y Kamio y col. (Ind. Eng. Chem. Res.,
- 10 (2011) vol. 50(11), pp. 6915-24). Sin embargo, los procedimientos anteriormente conocidos no proporcionan un procedimiento de concentración de ácidos grasos omega-3 lo suficientemente selectivo y/o eficaz. El documento EP 0 379 963 A1 describe un procedimiento para separar ésteres metílicos de ácidos grasos altamente insaturados de aceites esterificados de animales marinos. Los ésteres metílicos se pasan a través de una columna de cromatografía recubierta con nitrato de plata y una extracción adicional con fluido supercrítico de CO<sub>2</sub>.
- 15 Por lo tanto, aún permanece una necesidad en la materia de un procedimiento más eficaz para concentrar ácidos grasos omega-3 a partir de una mezcla oleosa de ácidos grasos.

Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son meramente ejemplares y explicativas y no son limitantes de la invención, tal como se reivindica.

- La presente divulgación, como en las reivindicaciones adjuntas, generalmente se refiere a un procedimiento para concentrar al menos un ácido graso omega-3 a partir de una mezcla oleosa de ácidos grasos, comprendiendo el
- 20 procedimiento: (a) combinar la mezcla oleosa de ácidos grasos y una solución acuosa de sal de plata (tal como AgNO<sub>3</sub> o AgBF<sub>4</sub>) para formar una fase acuosa y una fase orgánica, en la que la fase acuosa, la solución acuosa de sal de plata forma un complejo con el al menos un ácido graso omega-3; (b) separar la fase acuosa de la fase orgánica; (c) extraer la fase acuosa con un líquido de desplazamiento, o aumentar la temperatura de la fase acuosa
- 25 hasta al menos 30 °C, o una combinación de extraer con un líquido de desplazamiento y aumentar la temperatura, dando como resultado la formación de al menos un extracto; (d) combinar la fase acuosa con agua o extraer la fase acuosa con CO<sub>2</sub> supercrítico, o una combinación de combinar la fase acuosa con agua y extraer la fase acuosa con CO<sub>2</sub> supercrítico, para disociar el complejo, en el que se forma una fase acuosa que comprende la sal de plata y al menos una solución que comprende un concentrado de ácidos grasos; y (e) separar la al menos una solución que
- 30 comprende el concentrado de ácidos grasos de la fase acuosa que comprende la sal de plata.

### **Breve descripción de los dibujos**

- La Figura 1 es una cromatografía de gases del concentrado de ácidos grasos recuperado mediante calentamiento de la fase acuosa hasta 70 °C, tal como se describe en el Ejemplo 1.
- La Figura 2 es una cromatografía de gases de un concentrado de ácidos grasos obtenido diluyendo la fase
- 35 acuosa en agua tras la retirada del concentrado mostrado en la Figura 1, tal como se describe en el Ejemplo 1.
- La Figura 3 es una cromatografía de gases de una fracción obtenida mediante extracción con hexano como un disolvente de desplazamiento, tal como se describe en el Ejemplo 2A en la Tabla 4A.
- La Figura 4 es un cromatograma de gases del concentrado 4, tal como se describe en el Ejemplo 3 en la Tabla 5.
- La Figura 5 es un gráfico que representa la concentración relativa de ésteres etílicos de ésteres grasos
- 40 específicos seleccionados, tal como se describe en el Ejemplo 2B en la Tabla 4E.

### **Descripción**

- Los aspectos particulares de la divulgación se describen con más detalle a continuación. Los términos y las definiciones tal como se usan en la presente solicitud y tal como se aclaran en el presente documento pretenden representar el significado dentro de la presente divulgación.
- 45 Las formas singulares "un", "una", y "el" y "la" incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique lo contrario.
- Los términos "aproximadamente" y "alrededor de" significan que son casi iguales a un número o valor citado. Tal como se usa en el presente documento, los términos "aproximadamente" y "alrededor de" deberían entenderse de forma general que abarcan ± el 30 % de una cantidad, frecuencia o valor especificado.
- 50 La expresión "ácido(s) graso(s)" incluye, por ejemplo, hidrocarburos saturados e insaturados de cadena corta y de cadena larga (por ejemplo, monoinsaturados y poliinsaturados) que comprenden al menos un grupo de ácido carboxílico.
- La expresión "ácido(s) graso(s) omega-3" incluye ácidos grasos omega-3 naturales y sintéticos, así como ésteres farmacéuticamente aceptables, ácidos libres, triglicéridos, derivados, conjugados (véase, por ejemplo, Zaloga y col., la Publicación de EE.UU. N.º 2004/0254357, y Horrobin y col., Patente de Estados Unidos N.º 6.245.811), precursores, sales y mezclas de los mismos. Los ejemplos de aceites de ácidos grasos omega-3 incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos omega-3 poliinsaturados tales como ácido α-linolénico (ALA, 18:3n-3), ácido
- 55

5 octadecatetraenoico (es decir, ácido estearidónico, STA, 18:4n-3), ácido eicosatrienoico (ETE, 20:3n-3), ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), ácido heneicosapentaenoico (HPA, 21:5n-3), ácido docosapentaenoico (DPA, ácido clupanodónico, 22:5n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3); ésteres de ácidos grasos omega-3 con glicerol tales como monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos; y ésteres de los ácidos grasos omega-3 y un alcohol primario, secundario y/o terciario, tal como, por ejemplo, ésteres metílicos de ácidos grasos y ésteres etílicos de ácidos grasos.

10 La expresión "ácido(s) graso(s) omega-6" incluye ácidos grasos omega-6 naturales y sintéticos, así como ésteres farmacéuticamente aceptables, ácidos libres, triglicéridos, derivados, conjugados, precursores, sales y mezclas de los mismos. Los ejemplos de aceites de ácidos grasos omega-6 incluyen, pero sin limitación, ácidos grasos omega-6 poliinsaturados de cadena larga tales como ácido linoleico (18:2n-6), ácido  $\gamma$ -linolénico (18:3n-6), ácido eicosadienoico (20:2n-6), ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (20:3n-6), ácido araquidónico (20:4n-6), ácido docosadienoico (22:2n-6), ácido adrénico (22:4n-6), y ácido docosapentaenoico (es decir, ácido osbond, 22:5n-6); y ésteres, triglicéridos, derivados, conjugados, precursores, sales y/o mezclas de los mismos.

15 Los ácidos grasos poliinsaturados (por ejemplo, ácidos grasos omega-3 y/o ácidos grasos omega-6), ésteres, triglicéridos, derivados, conjugados, precursores, sales y/o mezclas de los mismos de acuerdo con la presente divulgación se pueden usar en su forma concentrada y/o purificada y/o como un componente de un aceite, por ejemplo, un aceite marino (por ejemplo, aceite de animales marinos), aceites de algas, aceites microbianos y/o aceites de origen vegetal.

### **Mezcla oleosa de ácidos grasos**

20 La mezcla oleosa de ácidos grasos según la presente divulgación puede provenir de aceite(s) animal(es) y/o de aceite(s) no animal(es). En algunas realizaciones de la presente divulgación, la mezcla oleosa de ácidos grasos proviene de al menos un aceite elegido de aceite marino, aceites unicelulares, aceite de algas, aceite de origen vegetal, aceite microbiano y combinaciones de los mismos. Los aceites marinos incluyen, por ejemplo, aceite de animal marino, aceite de kril y composición de lípidos que deriva de animales marinos. Los aceites de origen vegetal incluyen, por ejemplo, aceite de lino, aceite de colza, aceite de semilla de mostaza y aceite de soja. Los aceites unicelulares/microbianos incluyen, por ejemplo, productos por Martek, Nutrinova y Nagase & Co. Los aceites unicelulares a menudo se definen como aceites derivados de células microbianas y que se destinan para consumo humano. Véase, por ejemplo, Wynn y Rattledge, "Microbial oils: production, processing and markets for specialty long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids," pp. 43-76 en Breivik (Ed.), Long-Chain Omega-3 Specialty Oils, The Oily Press, P.J. Barnes y asociados, Bridgewater, Reino Unido, 2007.

35 Los aceites adicionales incluyen aceites vegetales de triglicéridos, comúnmente conocidos como triglicéridos de cadena larga tales como aceite de ricino, aceite de grano de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de soja hidrogenado y aceites vegetales hidrogenados; triglicéridos de cadena media tales como los derivados de aceite de coco o aceite de semilla de palma, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. Además de los glicéridos mixtos, hay otros aceites tales como ésteres de propilenglicol tales como diésteres mixtos de ácidos caprílicos/cápricos de propilenglicol, ésteres de ácidos grasos caprílicos, linoleicos, succínicos o cápricos derivados del aceite de almendra y coco saturados de palma y propilenglicol.

40 Los ácidos grasos de la mezcla oleosa de ácidos grasos se puede esterificar, tales como ésteres alquílicos, por ejemplo, ésteres etílicos. En algunas realizaciones, los ácidos grasos están en forma de glicéridos, tales como los elegidos de mono, di y triglicéridos. En otras realizaciones, los ácidos grasos están en forma de ácidos libres.

45 Los ácidos grasos insaturados de la mezcla oleosa de ácidos grasos pueden estar en configuración *cis* y/o *trans*. Los ejemplos de ácidos grasos omega-3 en configuración de todo *cis* incluyen, pero sin limitación, ácido (todo Z)-9,12,15-octadecatrienoico (ALA), ácido (todo Z)-6,9,12,15-octadecatetraenoico (STA), ácido (todo Z)-11,14,17-eicosatrienoico (ETE), ácido (todo Z)-8,11,14,17-eicosatetraenoico (ETA), ácido (todo Z)-7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA), ácido (todo Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA), ácido (todo Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA) y ácido (todo Z)-6,9,12,15,18-heneicosapentaenoico (HPA). Los ejemplos de ácidos grasos omega-6 en configuración de todo *cis* incluyen, pero sin limitación, ácido (todo Z)-4,7,10,13,16-docosapentaenoico (ácido osbond), ácido (todo Z)-9,12-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido (todo Z)-5,8,11,14-eicosatetraenoico (AA), y ácido (todo Z)-6,9,12-octadecatrienoico (GLA). Los ejemplos de ácidos grasos monoinsaturados en configuración *cis* incluyen, pero sin limitación, ácido (Z)-9-hexadecenoico (ácido palmitoleico), ácido (Z)-9-octadecenoico (ácido oleico), ácido (Z)-11-octadecenoico (ácido vaccénico), ácido (Z)-9-eicosenoico (ácido gadoleico), ácido (Z)-11-eicosenoico (ácido gondoico), ácido (Z)-11-eicoesenoico, ácido (Z)-11-docosenoico (ácido cetoleico), ácido Z-13-docosenoico (ácido erúico), y (ácido R-(Z))-12-hidroxi-9-octadecenoico (ácido ricinoleico).

55 Los ejemplos de mezclas oleosas de ácidos grasos de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, los ácidos grasos definidos en la Farmacopea Europea de ésteres etílicos de ácidos omega-3 60, la monografía de la Farmacopea Europea de ácidos omega-3 ricos en aceite de animales marinos, la monografía de la FEU de aceites de animales marinos, la Farmacopea Europea de triglicéridos de ácidos omega-3, la Farmacopea

Europea de ésteres etílicos de ácidos omega-3 90, y la monografía de la FEU de ésteres etílicos de ácidos omega-3.

Los ejemplos comerciales de mezclas oleosas de ácidos grasos que comprenden diferentes ácidos grasos incluyen, pero sin limitación: concentrados de aceites marinos con omega-3 de Incromega™ tales como Incromega™ TG7010 SR, Incromega™ E7010 SR, Incromega™ TG6015, Incromega™ EPA500TG SR, Incromega™ E400200 SR, Incromega™ E4010, Incromega™ DHA700TG SR, Incromega™ DHA700E SR, Incromega™ DHA500TG SR, Incromega™ TG3322 SR, Incromega™ E3322 SR, Incromega™ TG3322, Incromega™ E3322, Incromega™ Trio TG/EE (Croda International PLC, Yorkshire, Inglaterra); EPAX6000FA, EPAX5000TG, EPAX4510TG, EPAX2050TG, EPAX5500EE, EPAX5500TG, EPAX5000EE, EPAX5000TG, EPAX6000EE, EPAX6000TG, EPAX6500EE, EPAX6500TG, EPAX1050TG, EPAX2050TG, EPAX6015TG/EE, EPAX4020TG y EPAX4020EE (EPAX es una subsidiaria de propiedad absoluta de Trygg Pharma AS; el producto farmacéutico acabado de Omacor®/Lovaza™/Zodin®/Seacor®, K85EE, AGP 103, K30EE, K50EE y K70EE (Pronova BioPharma Norge AS); los concentrados de aceites de animales marinos de EPA/DHA de MEG-3® (Ocean Nutrition Canadá); FNO (del inglés *Functional Nutritional Oil*, aceite nutricional funcional) de DHA y CL (del inglés *Clear Liquid*, líquido claro) de DHA (Lonza); aceite de kril Superba™ (Aker Biomarine); productos de omega-3 que comprenden DHA producidos por Martek; aceite de kril Neptune (Neptune); productos de aceite de hígado de bacalao y concentrado de aceite de animales marinos antiirreflujo (TG) producido por Møllers; aceites de animales marinos de omega-3 de Lysi; mezcla de aceite de hígado de bacalao Triomega® de Seven Seas (Seven Seas); Fri Flyt Omega-3 (Vesterålens); y Epadel (Mochida). Aquellas realizaciones comerciales proporcionan diversos ácidos grasos omega-3, combinaciones y otros componentes como resultado del proceso de transesterificación o del procedimiento de preparación con el fin de obtener el(los) ácido(s) graso(s) omega-3 de diversas fuentes, tales como marina, de algas, microbiano (unicelular) y/o de origen vegetal.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la mezcla oleosa de ácidos grasos comprende al menos un ácido graso omega-3, tal como EPA y/o DHA. En al menos una realización, la mezcla oleosa de ácidos grasos comprende EPA y DHA. La mezcla oleosa de ácidos grasos puede comprender adicionalmente al menos un otro ácido graso, por ejemplo ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, del inglés *polyunsaturated fatty acid*) que no sean EPA ni DHA. Los ejemplos de tales PUFA incluyen, pero sin limitación, otros ácidos grasos omega-3, tales como ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> que no sean EPA ni DHA y ácidos grasos omega-6.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el procedimiento produce concentrados de C22:5n-3 (DPA n-3).

#### **Procedimiento para concentrar ácido(s) graso(s) omega-3**

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para concentrar al menos un ácido graso omega-3 a partir de una mezcla oleosa de ácidos grasos.

Según una realización, el procedimiento comprende combinar una mezcla oleosa de ácidos grasos con una solución acuosa de sales de plata, tales como una solución de nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>). Aunque la presente discusión se centra en AgNO<sub>3</sub>, un experto en la materia reconocería que se pueden usar otras sales de plata adecuadas, tales como tetrafluoroborato de plata (AgBF<sub>4</sub>). Los iones de plata pueden formar un complejo con ácidos grasos poliinsaturados en la mezcla oleosa de ácidos grasos, tales como ácidos grasos omega-3, por ejemplo, EPA y/o DHA. El(los) complejo(s) de plata formado(s) de este modo puede(n) permanecer en fase acuosa mientras que otros ácidos grasos presentes en la mezcla oleosa de ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos saturados, ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos monoinsaturados y/u otros ácidos grasos insaturados tales como ácidos grasos con menos enlaces dobles que los PUFA complejados), pueden permanecer en la fase orgánica como ácidos grasos no disueltos.

La concentración de la solución de sal de plata, por ejemplo, la solución de AgNO<sub>3</sub>, puede variar desde aproximadamente el 10 % en peso a aproximadamente el 90 % en peso, tal como desde aproximadamente el 60 % en peso hasta aproximadamente el 80 % en peso. En algunas realizaciones, por ejemplo, la concentración de la solución acuosa de AgNO<sub>3</sub> es de aproximadamente el 60 % en peso, de aproximadamente el 70 % en peso, de aproximadamente el 75 % en peso, o de aproximadamente el 80 % en peso. En algunas realizaciones, la proporción en peso de la mezcla oleosa de ácidos grasos frente a AgNO<sub>3</sub>(s) es de al menos 0,4. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proporción en peso de la mezcla oleosa de ácidos grasos frente a AgNO<sub>3</sub> varía desde aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,6. La mezcla oleosa de ácidos grasos y la solución de AgNO<sub>3</sub> se puede combinar a temperatura ambiente (por ejemplo, desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 25 °C) o a una temperatura por debajo de la temperatura ambiente enfriando, por ejemplo desde aproximadamente -25 °C hasta 20 °C, o a una temperatura por encima de la temperatura ambiente, por ejemplo, desde aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 90 °C.

Al menos un disolvente orgánico, tal como un disolvente orgánico polar, se puede añadir a la solución de AgNO<sub>3</sub> antes y/o después de mezclar con la mezcla oleosa de ácidos grasos. Los ejemplos de disolventes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, alcoholes tales como etanol y metanol. La adición de un disolvente orgánico polar puede, por ejemplo, mejorar la solubilidad de los ácidos grasos de la mezcla oleosa de ácidos grasos en la solución acuosa de AgNO<sub>3</sub>.

La mezcla oleosa de ácidos grasos y la solución de  $\text{AgNO}_3$  generalmente se mezclan en el orden de minutos a varias horas, por ejemplo, desde aproximadamente 15 minutos a aproximadamente dos horas, dando como resultado una fase orgánica y una fase acuosa, tal como una emulsión de aceite-agua. El experto en la materia se dará cuenta de que el tiempo de mezclado requerido dependerá de los volúmenes implicados y de la eficacia del mezclado. Por ejemplo, en un flujo slug preparado mediante un microrreactor, se pueden requerir menos de 20 s para alcanzar el equilibrio cuando se extrae el éster etílico de DHA y el éster etílico de EPA con solución acuosa de nitrato de plata (Seike y col. (2007) Journal of Chemical Engineering o Japan, Vol. 40, pp 1076-1084). Para mayores volúmenes que se juntan con un mezclado menos eficaz, la transferencia y complejación de los ácidos grasos con la solución acuosa de iones de plata llevará un tiempo sustancialmente mayor para alcanzar el equilibrio, por ejemplo, 2 o más horas.

Tras la decantación, la fase orgánica y la fase acuosa se pueden separar de acuerdo con los procedimientos conocidos en la materia. La separación de fases puede, por ejemplo, tener lugar dejando que repose la mezcla durante una cantidad de tiempo suficiente para obtener dos fases sustancialmente transparentes, mediante centrifugación, mediante tecnología de membrana o mediante otro medio adecuado.

Tras retirar la fase orgánica, la fase acuosa se extrae con un líquido de desplazamiento elegido de un disolvente orgánico seleccionado de disolventes halogenados, alcanos, alquenos, cicloalcanos y cicloalquenos, dando como resultado la formación de al menos un extracto. El líquido de desplazamiento puede, por ejemplo, proporcionar una selectividad mejorada retirando de manera preferente determinados ácidos grasos tales como ácidos grasos omega-6 y/o ácidos grasos omega-3 que no sean EPA y DHA. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, el líquido de desplazamiento puede proporcionar selectividad afectando a la solubilidad relativa de ácidos grasos en la fase acuosa y/o a través de interacciones con los complejos de plata. En algunos casos, el líquido de desplazamiento se puede seleccionar de manera que no forme un complejo con iones de plata, o de manera que forme un complejo más débil con iones de plata que el ácido graso omega-3 a concentrar. Los ejemplos de líquidos de desplazamiento adecuados incluyen diclorometano y otros disolventes que contienen uno o más átomos de cloro y/o uno o más de otros haluros, hexano, hexeno, heptano, hepteno, ciclohexano, ciclohexeno, 1,7-octadieno, 1,5-ciclooctadieno, así como otros alquenos que comprenden uno o más enlaces dobles, tales como alquenos que comprenden uno, dos o incluso tres enlaces dobles. La fase acuosa se puede extraer más de una vez, es decir, al menos dos extracciones sucesivas. La cantidad de líquido de desplazamiento para cada extracción puede variar desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 5 veces en peso la cantidad de mezcla oleosa de ácidos grasos que se disuelve en la fase acuosa de iones de plata.

Los diferentes líquidos de desplazamiento y/o combinaciones de líquidos de desplazamiento se pueden usar de acuerdo con la selectividad deseada en la concentración de uno o más ácidos grasos omega-3 específicos.

La fase acuosa y la fase orgánica se pueden calentar antes de que se separen. En tales casos, se puede considerar el punto de ebullición de la fase orgánica en la determinación de la temperatura apropiada. En términos generales, la mezcla de fase acuosa/fase orgánica se puede calentar hasta una temperatura que varía desde aproximadamente 30 °C hasta aproximadamente 90 °C.

En algunas realizaciones, la fase acuosa se calienta después de retirar la fase orgánica, dando como resultado la formación de al menos un extracto. Por ejemplo, la fase acuosa se puede calentar hasta una temperatura de al menos 30 °C, tal como una temperatura que varía desde aproximadamente 30 °C hasta aproximadamente 90 °C. En tales casos, el calentamiento puede provocar la liberación de una mezcla oleosa de ácidos grasos concentrada en ácidos grasos omega-6 y/o ácidos grasos omega-3, tales como ácidos grasos omega-3  $\text{C}_{20}$ - $\text{C}_{22}$  que no sean EPA ni DHA, de la fase acuosa. El calentamiento se debe hacer cuidadosamente en ausencia de oxígeno y en condiciones lo suficientemente suaves como para evitar la oxidación, la isomerización y/o la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados.

Además, de acuerdo con el procedimiento, la fase acuosa se puede diluir con agua con el fin de disociar el(los) complejo(s) de  $\text{AgNO}_3$ , liberando de este modo un concentrado de ácidos grasos, es decir, una mezcla oleosa de ácidos grasos concentrada en al menos un ácido graso omega-3. En algunas realizaciones, la fase acuosa se diluye más de una vez, es decir, al menos dos diluciones sucesivas. La cantidad de agua usada en la dilución puede variar desde aproximadamente 1 a aproximadamente 20 veces el peso de nitrato de plata sólido ( $\text{AgNO}_3(\text{s})$ ) usado. Las cantidades usadas dependen de una serie de factores, que incluyen la concentración de iones de plata y la naturaleza de la mezcla oleosa de ácidos grasos. El concentrado de ácidos grasos se puede separar entonces de la fase acuosa para formar al menos una solución. En algunas realizaciones, los iones de plata se pueden recuperar para la reutilización en un procedimiento posterior. Por ejemplo, los iones de plata se pueden recuperar para la reutilización mediante regeneración (que incluye, por ejemplo, regeneración mediante electrolisis), filtración, centrifugación y/o purificación.

Además, de acuerdo con el procedimiento, la fase acuosa se puede extraer con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) bajo presión supercrítica con el fin de disociar el(los) complejo(s) de  $\text{Ag}^+$ , liberando de este modo todo o una parte del concentrado de ácidos grasos. El dióxido de carbono puede contener al menos un modificador polar tal como agua o un alcohol, por ejemplo, etanol. Los beneficios de la extracción con dióxido de carbono pueden incluir la eliminación de la necesidad de grandes cantidades de agua para la ruptura del complejo. El  $\text{CO}_2$  se retira fácilmente de los

ésteres etílicos mediante la liberación de presión. El CO<sub>2</sub> no es tóxico y puede proporcionar la atmósfera inerte necesaria para proteger la Ag<sup>+</sup> de la formación de Ag<sub>2</sub>O inactivo.

5 El procedimiento de acuerdo con la presente divulgación puede concentrar al menos un ácido graso omega-3 a la vez que reduce la concentración de al menos un ácido graso omega-6 en la mezcla oleosa de ácidos grasos. El procedimiento puede, por ejemplo, aumentar la proporción de ácidos grasos omega-3 frente a omega-6 en el concentrado de ácidos grasos en relación con la mezcla oleosa de ácidos grasos. En algunas realizaciones, la proporción de ácidos grasos omega-3 frente a ácidos grasos omega-6 (n-3/n-6) en la mezcla de concentrado de ácidos es mayor de aproximadamente 40, tal como mayor de aproximadamente 80, mayor de aproximadamente 100, mayor de aproximadamente 150 o mayor de aproximadamente 200. En algunas realizaciones, la concentración total de ácidos grasos omega-6 en el concentrado de ácidos grasos puede ser menor de aproximadamente el 3 % en peso, tal como menos de aproximadamente el 2 % en peso, o menos de aproximadamente el 1 % en peso.

15 El procedimiento desvelado actualmente también puede concentrar uno o más ácidos grasos omega-3 mientras que reduce la concentración de otros ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, por ejemplo, el procedimiento concentra EPA y DHA mientras que reduce la concentración de ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> que no sean EPA ni DHA. En algunas realizaciones, la concentración total de ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> que no sean EPA ni DHA en el concentrado de ácidos grasos es menor del 3 % en peso, tal como menos del 2,5 % en peso, tal como menos del 0,5 % en peso.

20 El procedimiento desvelado actualmente proporciona además el ajuste de la proporción EPA/DHA en una mezcla oleosa de ácidos grasos concentrando un ácido graso omega-3 relativamente más o menos en comparación con el otro ácido graso omega-3. Por ejemplo, la proporción EPA/DHA se puede ajustar variando la temperatura, el líquido de desplazamiento y/o la proporción de dilución de agua y mediante la extracción con CO<sub>2</sub> con o sin un modificador polar, tal como agua o un alcohol, por ejemplo, etanol. En algunas realizaciones, la proporción EPA/DHA en al menos uno del concentrado de ácidos grasos, al menos un extracto y al menos una solución varía desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 en peso.

25 El concentrado de ácidos grasos, al menos un extracto y/o al menos una solución se puede purificar usando al menos un procedimiento de purificación. El procedimiento de purificación puede retirar, por ejemplo, compuestos de plata residuales, líquido de desplazamiento residual, ácidos grasos de cadena más corta (por ejemplo, ácidos grasos 16:4n-1), compuestos de menor peso molecular enriquecidos mediante complejación con iones de plata, contaminantes ambientales, colesterol y/o vitaminas. Tales procedimientos de purificación incluyen, pero sin limitación, la destilación de vía corta, la destilación molecular, la extracción con fluidos supercríticos, los procesos de separación enzimática, el fraccionamiento por yodolactonización y la cromatografía preparativa.

35 El procedimiento actualmente desvelado se puede repetir para concentrar adicionalmente el al menos un ácido graso omega-3 y/o para concentrar uno u otros más ácidos grasos omega-3. El procedimiento también se puede usar para concentrar al menos un ácido graso omega-6. Por ejemplo, el concentrado de ácidos grasos, al menos un extracto y/o al menos una solución puede comprender la mezcla oleosa de ácidos grasos en uno o más procedimientos posteriores tal como se describe anteriormente. El concentrado de ácidos grasos obtenido a partir de uno o más procedimientos de concentración de acuerdo con la presente divulgación puede comprender al menos el 80 % de al menos un ácido graso omega-3, tal como al menos un 90 %, al menos el 95 % o incluso al menos el 98 % de al menos un ácido graso omega-3.

40 El concentrado de ácidos grasos, al menos un extracto y/o al menos una solución obtenida del procedimiento actualmente desvelado también se pueden tratar mediante al menos un procedimiento de fraccionamiento convencional tal como la destilación de vía corta, la destilación molecular, el fraccionamiento por yodolactonización, los procedimientos de fraccionamiento enzimático, la extracción y/o la cromatografía. El concentrado de ácidos grasos obtenido de este modo puede comprender al menos el 80 % de al menos un ácido graso omega-3, tal como al menos un 90 %, al menos el 95 % o incluso al menos el 98 % de al menos un ácido graso omega-3. En una realización, por ejemplo, el al menos un procedimiento de fraccionamiento produce un concentrado de ácido graso que comprende al menos ácido (todo Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA) al 90 %, tal como al menos DHA al 95 % o, por ejemplo, al menos DHA al 98 %. En otra realización, el al menos un procedimiento de fraccionamiento produce un concentrado de ácido graso que comprende al menos ácido (todo Z)-7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA) al 80 %, tal como al menos DPA al 90 %, tal como al menos DPA al 95 % o, por ejemplo, al menos DPA al 98 %.

50 Un experto en la materia reconocerá que el tratamiento de los concentrados obtenidos de acuerdo con la presente divulgación mediante al menos un procedimiento de fraccionamiento convencional puede producir composiciones que cumplen con, por ejemplo, la Monografía de la Farmacopea Europea 1250, la monografía de ésteres etílicos de ácido omega-3 90, y/o la monografía de la FEU de ésteres etílicos de ácido omega-3.

55 El procedimiento actualmente desvelado puede reducir la concentración de al menos un contaminante ambiental en la mezcla oleosa de ácidos grasos, de manera que el concentrado oleoso de ácidos grasos, el al menos un extracto y/o al menos una solución comprende una menor concentración del al menos un contaminante ambiental que la mezcla oleosa de ácidos grasos. Los contaminantes ambientales incluyen, pero sin limitación, compuestos de bifenilo policlorados (PCB), compuestos de dibenzodioxina policlorados (PCDD), compuestos de dibenzofurano policlorados (PCDF), retardantes de llama bromados como éteres de difenilo polibromados (PBDE),

5 tetrabromobisfenol A (TBBP-A) y hexabromociclododecano (HBCD) y pesticidas como DDT (2,2 bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano) y metabolitos de DDT. El procedimiento desvelado actualmente también puede reducir la concentración de colesterol total (es decir, el colesterol libre y/o unido) en la mezcla oleosa de ácidos grasos, de manera que el concentrado de ácidos grasos comprende una menor concentración de colesterol total que la mezcla oleosa de ácidos grasos. En algunas realizaciones de la presente divulgación, la mezcla oleosa de ácidos grasos se elimina en al menos una etapa de eliminación del procesamiento, por ejemplo, destilación, antes de la combinación con la solución acuosa de AgNO<sub>3</sub>, en la que la etapa de eliminación del procesamiento reduce la cantidad de al menos un contaminante ambiental y/o el colesterol total en la mezcla oleosa de ácidos grasos.

10 Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente divulgación. Se entiende que el experto en la materia visualizará realizaciones adicionales consistentes con la divulgación proporcionada en el presente documento. Los valores de la composición dados en las siguientes tablas se basan en porcentajes de área de cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*). Un experto en la materia entenderá que los porcentajes de área de GC difieren de los porcentajes de masa de GC, por ejemplo, pueden ser mayores que los correspondientes porcentajes de masa de GC. Un procedimiento para analizar los porcentajes de masas de GC se proporciona en la monografía de la Farmacopea Europea 2.4.29, Composición de ácidos grasos en aceites ricos en ácidos omega-3.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Temperatura**

20 Antes de la separación de fases. Se mezcló K50EE con solución de AgNO<sub>3</sub> al 70 % en peso (K50EE:AgNO<sub>3</sub> = 3:5) durante aproximadamente 1,5 horas y se llevó a la temperatura deseada (véase la Tabla 1, es decir, 8 °C, 21 °C, 50 °C, 60 °C o 70 °C). La mezcla aceite/agua se dejó reposar durante aproximadamente 2 horas para que se separase en una fase acuosa y en una fase orgánica, y se retiró la fase orgánica. La fase acuosa se diluyó en agua (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 7,5:1 en peso) provocando la liberación de material orgánico, es decir, un concentrado de ácido graso. El concentrado se recolectó y se determinó su composición mediante análisis de GC (% de área de GC) tal como se muestra en la Tabla 1. Los resultados muestran que las temperaturas más altas redujeron la concentración relativa de ácido graso n-6 y/o de ácidos grasos n-3 específicos (por ejemplo, ácidos grasos de cadena larga (LC, del inglés *long-chain*) que no sean EPA y DHA).

Tabla 1: Composición de concentrados de ácidos grasos; K50EE:AgNO<sub>3</sub> = 3:5 mezclado a diversas temperaturas (% de área de GC).

Éster etílico de ácido graso	K50EE	8 °C	21 °C	50 °C (I)	50 °C (II)	60 °C	70 °C
18:2n-6	1,14	0,27	0,26	0,08	**	0,03	0,05
18:3n-3	0,62	0,26	0,21	0,11	0,07	0,07	0,05
18:4n-3	1,78	2,08	1,92	1,76	1,80	1,71	1,48
20:4n-6	1,66	1,01	0,84	0,48	0,45	0,40	0,30
20:4n-3	1,19	1,08	0,90	0,62	0,59	0,54	0,43
EPA	32,80	44,53	44,31	45,87	46,57	46,08	44,61
21:5n-3	1,32	1,96	1,77	1,72	1,74	1,68	1,55
22:5n-6	0,62	0,65	0,54	0,40	0,37	0,33	0,25
22:5n-3	4,64	6,64	5,71	5,07	4,98	4,67	4,08
DHA	25,48	34,72	36,69	41,31	41,66	42,50	44,80
EPA+DHA	58,28	79,25	81,00	87,18	88,23	88,58	89,41
Σn-3	70,83	91,27	91,51	96,46	97,41	97,25	97,00
Σn-6	3,42	1,93	1,64	0,96	0,82	0,76	0,60
Σn-3/Σn-6	20,7	47,2	55,8	100	119	128	162

\*\*Área de GC del 0,02 % o menor.

30 Después de la separación de fases. Se agitó K30EE con solución de AgNO<sub>3</sub> al 70 % en peso (K30EE:AgNO<sub>3</sub> = 1,2:1) a temperatura ambiente y se dejó que se separase en la fase acuosa y en la fase orgánica. Se retiró la fase orgánica. La fase acuosa se calentó después hasta 70 °C, provocando la liberación de un concentrado de ácidos grasos ("Concentrado 1") enriquecido en ácidos grasos n-6 y en ácidos grasos n-3 específicos, en comparación con un concentrado preparado usando el mismo procedimiento que en este ejemplo, pero sin calentar ("Concentrado



ambiente"). La fase acuosa se diluyó en agua (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 7,5:1 en peso) para obtener un segundo concentrado ("Concentrado 2") con una elevada proporción n-3/n-6 y una menor concentración de ácidos grasos n-3 que no sean EPA y DHA en comparación con el primer concentrado. Véase la Tabla 2.

Tabla 2: Composición de concentrados de ácidos grasos; fase acuosa calentada hasta 70 °C.

Ester etílico de ácido graso	K30EE	Concentrado ambiente	Concentrado 1	Concentrado 2
16:4n-1	1,24	5,07	3,57	6,74
18:1n-9	11,94	0,73	3,20	-
18:3n-3	0,59	0,07	0,37	-
18:4n-3	2,15	3,31	5,75	2,81
20:4n-6	1,03	0,33	1,29	0,13
20:4n-3	0,50	0,37	1,66	0,20
EPA	18,51	45,36	42,68	45,67
21:5n-3	0,71	1,57	1,96	1,44
22:5n-6	0,3*	0,35	1,01	0,21
22:5n-3	2,29	3,69	6,58	2,94
DHA	12,21	34,81	15,75	38,51
EPA+DHA	30,72	80,17	58,43	84,18
Σn-3	36,96	89,18	74,75	91,57
Σn-6	1,3	0,68	2,30	0,34
Σn-3/Σn-6	28	131	32,5	269

\*Estimado a partir del tamaño de pico

5 Las Figuras 1 y 2 muestran las cromatografías de gases para el Concentrado 1 y el Concentrado 2, respectivamente. La comparación de las Figuras 1 y 2 indica que el procedimiento desvelado actualmente retira de manera selectiva compuestos de ácidos grasos para dar un concentrado (por ejemplo, Figura 2) con menores cantidades de ácidos grasos específicos en comparación con la mezcla de partida.

10 La alta concentración de sal de la fase acuosa reduce el punto de fusión, de modo que se pueden realizar procedimientos de separación similares a los descritos anteriormente a temperaturas muy por debajo de 0 °C. Posiblemente también el contenido de ácidos grasos poliinsaturados/derivados de ácidos grasos en la fase acuosa dará como resultado una reducción aún mayor del punto de fusión. Cuando se trabaja con el procedimiento desvelado en el presente documento, los experimentos se han realizado, por ejemplo, con solución acuosa de nitrato de plata al 70 % a -20 °C sin que se produzca ninguna solidificación ni solidificación parcial de la fase acuosa.

15 Probablemente, las temperaturas podrían reducirse incluso más. El experto en la materia se dará cuenta de que tales reducciones de temperatura pueden aumentar el valor técnico de los procedimientos de modulación de temperatura tal como se trata anteriormente.

Se ha reconocido en la materia que las bajas temperaturas facilitarán la absorción de ésteres etílicos de EPA y DHA (Seike y col. (2007) Journal of Chemical Engineering of Japan, Vol. 40, pp 1076-1084). Sin embargo, no se ha apreciado en la materia que la modulación de la temperatura se pueda utilizar para separar derivados de ácidos grasos tal como se ilustra mediante la Tabla 2, por ejemplo, para alterar la proporción n3/n6, para preparar intermediarios adecuados como materiales de partida para el aislamiento de otros ácidos grasos que EPA y DHA (por ejemplo, 22:5n-3), y para preparar concentrados de EPA y DHA que contienen menores cantidades de otros ácidos grasos omega-3 de cadena larga.

#### 25 **Ejemplo 2A: Extracción con líquido de desplazamiento**

Se agitó K30EE con solución de AgNO<sub>3</sub> al 70 % en peso (K30EE:AgNO<sub>3</sub>(s) = 1,2:1) a temperatura ambiente. Se dejó que se asentase la mezcla y se retiró la fase orgánica. Se retiró la fase acuosa con 1-hexeno (hexeno:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 0,54:1 en peso), después, se diluyó en agua (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 7,5:1 en peso). El concentrado de ácidos grasos liberado mediante la dilución se recolectó y se analizó mediante GC. Véase la

30 Tabla 3.

Tabla 3: Composición de concentrado de ácidos grasos; extracción con hexeno.

Éster etílico de ácido graso	Concentración (% de área de GC)
16:4n-1	5,21
18:3n-3	**
18:4n-3	0,22
20:4n-6	**
20:4n-3	0,02
EPA	40,14
21:5n-3	1,04
22:5n-6	**
22:5n-3	1,37
DHA	50,16
EPA+DHA	90,30
$\Sigma$ n-3	92,95
$\Sigma$ n-6	**
$\Sigma$ n-3/ $\Sigma$ n-6	$\infty$ ‡
$\Sigma$ "Otro n-3 C20-C22"	2,43
**Área de GC del 0,02 % o menor.	
‡Solo se incluyen picos con área por encima del 0,05 %.	

La Tabla 4A muestra una comparación de diferentes líquidos de desplazamiento: los disolventes orgánicos hexano, 1-hexeno y ciclohexeno. Se siguió el siguiente procedimiento para los tres disolventes. Se disolvieron aproximadamente 30,2 g de AgNO<sub>3</sub> en 12,9 g de agua para preparar una solución de AgNO<sub>3</sub> al 70 % en peso. La solución se agitó con aproximadamente 24,1 g de K30EE a 70 °C. Se permitió que tuviese lugar la separación de fases a 70 °C, y se retiró la fase orgánica (aproximadamente 17,1 g a 17,7 g). Después se extrajo la fase acuosa con cuatro volúmenes de disolvente (4 x 15,8 ml de hexano, 4 x 16,1 ml de hexeno, 4 x 19,5 ml de ciclohexeno, respectivamente). La combinación de los cuatro extractos representa el "extracto" para cada disolvente mostrado en la Tabla 4A. La fase acuosa restante se diluyó con 225 ml de agua y se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. El concentrado de ácidos grasos recuperado a partir de la fase acuosa se separó, y representa el "concentrado" para cada disolvente mostrado en la Tabla 4A. Las composiciones se documentan en el % de área de GC.

Un cromatograma de GC del extracto producido por hexano se muestra en la Figura 3. Tal como se puede ver a partir de las áreas de GC tal como se da en la Tabla 4A, por ejemplo, la proporción de DPAn-3/DHA es de aproximadamente 3,3:1 y la proporción DPAn-3/DPAn-6 es aproximadamente 3,0:1 para el extracto producido por hexano. En este caso, la denominada "reacción de yodolactonización" (véase Breivik 2007) se puede usar para separar ácidos grasos poliinsaturados. Añadiendo cantidades adecuadas de reactivos, se formarán las yodo- $\gamma$ -lactonas de cinco anillos de DHA y DPAn-6 más estables, mientras que el DPAn-3 permanecerá sustancialmente sin afectar. Las yodolactonas de DHA y DPAn-6 se pueden retirar de los ácidos grasos sin reaccionar. En una composición de ácidos grasos similar a la de la Figura 3, la reacción de yodolactonización se puede utilizar para fabricar una composición de ácidos grasos que sustancialmente contiene DPAn-3 (22:5n-3) como el único ácido graso con longitud de cadena de 22 átomos de carbono. El experto en la materia se dará cuenta de que tal producto será especialmente adecuado para la producción de DPAn-3 puro.

Tabla 4A: Composición de concentrados de ácidos grasos; líquidos de desplazamiento hexano, 1-hexeno, ciclohexeno. El K30EE fue del mismo lote que en la Tabla 2.

K30EE	Hexano		1-hexeno		Ciclohexeno	
	Extracto	Concentrado	Extracto	Concentrado	Extracto	Concentrado
16:4n-1	1,398	4,393	4,636	4,679	4,886	5,167
18:3n-3	1,019	**	0,297	**	0,167	**

(continuación)

K30EE Éster etílico de ácido graso	Hexano		1-hexeno		Ciclohexeno	
	Extracto	Concentrado	Extracto	Concentrado	Extracto	Concentrado
18:4n-3	7,608	1,905	9,824	1,792	6,584	0,936
20:4n-6	3,242	**	1,782	**	0,735	**
20:4n-3	2,801	**	1,813	**	0,854	**
20:5n-3 (EPA)	13,43	47,316	42,263	46,44	53,469	40,536
21:5n-3	0,857	1,547	2,12	1,522	2,327	1,117
22:5n-6	1,734	0,136	1,435	0,174	0,841	
22:5n-3	5,288	2,961	8,818	2,979	7,069	1,583
22:6n-3 (DHA)	1,603	40,755	6,82	41,51	14,595	50,441
EPA+DHA	15,033	88,071	49,083	87,95	68,064	90,977
Σn-3	32,606	94,484	71,955	94,243	85,065	94,613
Σn-6	4,976	0,136	3,217	0,174	1,576	0
Σn-3/n-6	6,6	694	22	541	53	∞‡
Otro n-3	17,573	6,413	22,872	6,293	17,001	3,636
Otro n-3 de LC	8,946	4,508	12,751	4,501	10,25	2,7
(EPA+DHA)/ Otro n-3 de LC	1,7	20	3,8	20	6,6	34

\*\*Área de GC del 0,02 % o menor.  
‡Solo se incluyen picos con área por encima del 0,05 %.

La Tabla 4A muestra que los tres concentrados comprendieron más del 94 % de ácidos grasos n-3, pero las concentraciones relativas de diferentes ácidos grasos n-3 y n-6 variaron de manera significativa. El hexano fue el disolvente más eficaz en la retirada relativa de ácidos grasos n-6, así como en la retirada de ácidos grasos n-3 que no sean DHA sin pérdida sustancial de EPA o DHA en el producto final (pérdida de aproximadamente el 15 %). La alta proporción de DPA(n-3):DHA = 3,3:1 sugiere que el extracto de hexano puede ser adecuado para la purificación de DPA(n-3). De forma similar, el bajo valor de 1,7 para la proporción (EPA+DHA):(otro n-3 de LC) indica que el extracto de hexano puede ser adecuado para la producción de concentrados con altos contenidos relativos de otros ácidos grasos omega-3 de LC. El extracto de hexeno contenía una concentración total más alta de ácidos grasos n-3 que el extracto de hexano, con una proporción DPA(n-3):DHA de aproximadamente 1:1. El extracto de hexeno también puede ser una materia prima adecuada para la producción de tales concentrados y de ésteres de ácidos grasos puros individuales. El ciclohexeno dio un concentrado menor en ácidos grasos n-6 que los otros disolventes (los ácidos grasos n-6 estaban prácticamente ausentes) y bajo en ácidos grasos n-3 que no fuesen EPA y DHA, pero también proporcionó un rendimiento más bajo de EPA y DHA en el producto final (pérdida de alrededor del 68 %). La suma de EPA+DHA en el concentrado fue de aproximadamente un 91,0 %, mientras que la suma de otros ácidos grasos n-3 de C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> ("otros n-3 de LC) fue solo del 2,7 %.

Los resultados en las Tablas 3 y 4A indican que la variación de la temperatura y el uso de diferentes cantidades de mezcla de ácidos grasos de partida y disolventes afectan a la composición del concentrado obtenido. Por ejemplo, los resultados mostrados en la Tabla 3 se obtuvieron usando los mismos volúmenes de K30EE y de 1-hexeno que los de la Tabla 4A, pero con solo 2/3 del volumen de solución de AgNO<sub>3</sub> al 70 % en peso. Las temperaturas usadas también fueron diferentes (temperatura ambiente frente a 70 °C).

También se realizaron estudios con 1,7-octadieno; sin embargo, este disolvente dio como resultado una reacción muy exotérmica. La reacción exotérmica indica una alta afinidad de ciclooctadienos y otros dienos/polienos con iones de plata, que podrían hacer que estos compuestos sean útiles como líquidos de desplazamiento, siempre que se aplicasen medidas de seguridad adecuadas. Véase también el Ejemplo 2B en la Tabla 4B.

#### 25 **Ejemplo 2B: Ejemplo adicional del uso de los líquidos de desplazamiento**

Se realizó una serie de experimentos con los disolventes orgánicos enumerados en la Tabla 4B. Para cada experimento se usaron las siguientes cantidades aproximadas de reactivos y materiales de partida de ésteres etílicos: 60 g de nitrato de plata, disuelto en agua para dar una concentración del 70 % (25,7 g de agua) y 48 g de éster etílico K30EE (lote 2101071). Las cantidades exactas, así como las cantidades de extractos recuperados, se

dan en la Tabla 4C.

- 5 Tras la agitación con un agitador magnético a temperatura ambiente durante 1,5 horas, cada mezcla de solución acuosa de nitrato de plata y K30EE se transfirió a un embudo de decantación, y se dejó que se asentara en la oscuridad hasta que tuvo lugar la separación de fases. Se retiró la capa orgánica superior ("ésteres no disueltos"). Se recolectó una muestra para el análisis para el primer experimento de la serie.

- 10 Con la excepción del primer experimento en la serie, se extrajo la fase acuosa con tres partes de disolvente. Cada parte contenía aproximadamente 0,36 moles de disolvente. Se estima que aproximadamente 20 g de ésteres etílicos permanecieron en fase acuosa tras la retirada de los ésteres no disueltos. Asumiendo que el peso molecular promedio de los ésteres etílicos es de 330 g/mol, 20 g de ésteres etílicos se corresponden con 0,06 moles. Esto significaría que cada extracción se llevó a cabo con un exceso molar estimado de disolvente de 6 veces en comparación con los ésteres etílicos disueltos originalmente en la fase acuosa. Véase la Tabla 4B.

Después de que se completase la extracción, se añadieron 600 ml de agua a la fase acuosa, y tras una agitación vigorosa, se dejó la mezcla en la oscuridad durante toda la noche para que se completase una nueva separación de fases.

- 15 Todos los extractos que implican disolventes se evaporaron al vacío usando un evaporador rotatorio. Después de pesar los extractos, se tomaron muestras para el análisis.

Los resultados analíticos de ésteres etílicos de ácidos grasos se dan en la Tabla 4C.

Tabla 4B. Cantidades de disolventes

Disolvente de extracción	Densidad (g/ml)	Peso molecular (g/mol)	Peso aproximado de disolvente para cada una de las tres extracciones (g)	Volumen aproximado de disolvente para cada una de las tres extracciones (ml)	Número de moles para cada extracción y para el total
1. Sin disolvente	-	-	-	-	-
2. Hexano	0,66	86,2	31,3	47,3	0,36 (1,09)
3. 1-hexeno	0,673	84,2	30,6	45,5	
4. Ciclohexeno	0,811	82,1	29,8	36,7	
5. Diclorometano	1,335	84,9	30,8	23,1	
6. 1,5-ciclooctadieno	0,882	108,2	39,3	1	
7. Acetona	0,788	58,1	21,1	2	

<sup>1</sup>La adición de 1,5-ciclooctadieno a la fase acuosa de nitrato de plata dio como resultado una reacción exotérmica y, por razones de seguridad, se abandonó el experimento. Sin embargo, esta reacción exotérmica indica una alta afinidad de ciclooctadienos y otros dienos/polienos con iones de plata, que podrían hacer que estos compuestos sean útiles como líquidos de desplazamiento, siempre que se aplicasen medidas de seguridad adecuadas.

<sup>2</sup>La adición de acetona no dio como resultado la separación de fases. Se podrían realizar experimentos adicionales, por ejemplo, combinar acetona con otros disolventes o usar otras cetonas en vez de acetona.

Tabla 4C. Pesos de reactivos, material de partida y extractos (g)<sup>1</sup>

Disolvente	AgNO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	K30EE	Éster no disuelto	Extractos			Concentrado	Suma de material recuperado	Rendimiento total (%)
					A	B	C			
Ninguno	60,6	26,0	48,7	28,2			18,5	46,7	96	
Hexano	60,1	25,4	48,1	29,2	1,17	0,96	0,72	45,9	95	
1-hexeno	60,5	25,3	48,1	32,0	1,41	0,87	0,68	45,9	96	
Ciclohexeno	60,2	25,1	49,1	29,0	4,55	3,50	1,59	48,1	98	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60,1	25,3	48,1	26,3	8,40	3,00	1,92	45,8	95	

<sup>1</sup>Es difícil obtener los pesos exactos tras la separación de volúmenes pequeños. Inevitablemente se perderá algo de material sobre la superficie del equipo de vidrio, y es difícil evitar alguna combinación de la fase acuosa. El experto en la materia se dará cuenta de que existe cierta incertidumbre con respecto al peso de los diversos extractos, así como con respecto al rendimiento total.

Tabla 4D. Resultados de GC (porcentaje de área normalizado) para ésteres etílicos de ácidos grasos seleccionados. CF = "factor de concentración", es decir, área relativa de GC en el concentrado dividido entre el área relativa de GC en K30EE

Disolvente (fracción)	Fracción	16:4n-1	18:3n-3	18:4n-3	19:5	20:4n-6	20:4n-3	EPA	21:5n-3	22:5n-6	22:5n-3	DHA
-	K30EE	2,0	0,6	2,4	nd	1,0	0,8	18,7	0,7	0,4*	2,2	12,6
Ninguno	Éster no disuelto	0,2	0,7	1,0	0,3	1,0	0,6	1,7	0,1	0,3	0,5	0,6
	Concentrado	3,6	0,2	4,2	0,2	0,7	0,7	39,4	1,5	0,6	4,3	27,2
	CF	1,8	0,3	1,8	-	0,7	0,9	2,1	2,1	1,5	2,0	2,2
Hexano	A	7,5	0,4	13,8	0,2	4,8	4,9	30,3	1,8	2,8	10,0	3,7
	B	4,5	0,4	14,5	0,1	2,1	2,8	39,0	2,4	2,2	11,4	4,7
	C	4,9	0,3	13,4	0,0	1,4	1,9	42,8	2,5	1,7	11,3	5,2
	Concentrado	4,6	0,0	2,3	0,2	0,1	0,1	42,7	1,4	0,2	2,9	34,1
	CF	2,3	0	1,0	-	0,1	0,1	2,3	2,0	0,5	1,3	2,7
	A	4,5	0,3	12,0	0,1	2,6	2,9	39,1	2,1	1,8	8,6	6,5
1-hexeno	B	2,5	0,3	12,1	0,2	1,6	2,1	46,4	2,4	1,6	9,2	7,9
	C	5,3	0,2	11,0	0,2	0,7	1,3	49,6	2,5	1,2	8,9	8,5
	Concentrado	5,2	0,0	2,2	0,2	0,0	0,0	46,5	1,5	0,2	3,0	40,4
	CF	2,6	0	0,9	-	0	0	2,5	2,1	0,5	1,4	3,2
	A	2,3	0,3	6,5	0,2	1,8	1,8	27,6	1,4	1,2	5,7	6,5
	B	3,3	0,3	6,8	0,1	1,0	1,2	37,3	1,8	0,9	6,2	9,7
Ciclohexeno	C	4,9	0,1	7,3	0,2	0,5	0,8	52,1	2,3	0,8	7,1	14,5
	Concentrado	5,5	0,0	1,9	0,2	0,0	0,1	43,9	1,4	0,1	2,3	43,9
	CF	3,3	0	0,8	-	0	0,1	2,3	2,0	0,3	1,0	3,5
	A	2,5	0,2	6,0	0,2	1,5	1,4	22,2	1,2	1,0	4,7	3,7
	B	6,7	0,2	7,8	0,2	0,5	0,9	55,9	2,7	0,9	8,4	10,2
	Diclorometano											

(continuación)

Disolvente (fracción)	Fracción	16:4n-1	18:3n-3	18:4n-3	19:5	20:4n-6	20:4n-3	EPA	21:5n-3	22:5n-6	22:5n-3	DHA
	C	7,8	0,0	4,3	0,2	0,1	0,2	63,4	2,7	0,4	6,0	13,0
	Concentrado	3,5	0,0	0,4	0,2	0,0	0,0	39,1	0,9	0,0	0,9	54,8
	CF	1,8	0	0,2	-	0	0	2,1	1,3	0	0,4	4,3

\*Estimado basado en el tamaño del pico  
nd: no detectado

Tabla 4E. Experimento con diclorometano como líquido de desplazamiento. Resultados de GC (porcentaje de área normalizado) para ésteres etílicos de ácidos grasos seleccionados. CF = "factor de concentración", es decir, área relativa de GC en el concentrado dividido entre el área relativa de GC en K30EE.

Fracción (masa, g)	Volumen de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (ml)	16:4n-1	18:3n-3	18:4n-3	19:5	20:4n-6	20:4n-3	EPA	21:5n-3	22:5n-6	22:5n-3	DHA
K30EE	-	2,0	0,6	2,4	nd	1,0	0,8	18,7	0,7	0,4*	2,2	12,6
A (6,75)	8,0	1,0	0,8	3,5	nd	1,6	1,2	8,0	0,3	0,6	2,2	1,2
B(1,88)	8,0	4,3	0,5	10,9	nd	2,0	2,2	37,0	1,9	1,5	7,5	6,2
C (1,72)	8,0	6,1	0,2	11,5	0,2	1,1	1,6	50,8	2,6	1,4	9,4	8,6
D (2,73)	23,1	7,6	0,1	7,6	0,2	0,2	0,5	59,0	2,8	0,7	8,3	10,4
E (1,77)	23,1	8,4	0,0	4,0	0,2	0,1	0,2	63,4	2,6	0,3	5,8	12,7
Concentrado (6,34)		3,7	0,0	0,4	0,2	0,1	0,0	39,0	0,9	0,1	0,9	53,8
CF		1,9	0	1,7	-	0,1	0	2,1	1,3	0,3	0,4	4,3

\*Estimado basado en el tamaño del pico nd: no detectado

- 5 Tal como se puede ver a partir de la Tabla 4D, los diversos disolventes funcionaron como líquidos de desplazamiento en diferentes modos. La siguiente discusión se centra en solo unas pocas de las muchas posibilidades diferentes que existen para hacer uso de estos disolventes para la producción de materias primas para concentrados de diversos ésteres etílicos de ácidos grasos (o combinaciones de ésteres etílicos). El experto en la materia se dará cuenta de que los resultados mostraron posibilidades para preparar materias primas para una serie de ésteres etílicos de ácidos grasos adicionales o combinaciones de ésteres etílicos de ácidos grasos.
- 10 Aunque se descubrió que el hexano tiene la propiedad útil de permitir la producción de fracciones ricas en DPA (22:5n-3) en comparación con DHA y, por lo tanto, se consideró útil para la producción de concentrados de DHA (y a partir de los valores tabulados también para la producción de concentrados enriquecidos en 20:4n-3), el diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) por ejemplo, se puede adaptar bien para la producción de concentrados de EPA y DHA que contienen bajas cantidades de otros ácidos grasos n-3 así como bajos valores de ácidos grasos n-6. Además, en
- 15 comparación con los otros líquidos de desplazamiento, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> también tuvo el efecto de reducir la cantidad relativa de los ácidos grasos 16:4n-1 altamente insaturados. Por lo tanto, el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, o los líquidos de desplazamiento con efectos similares, pueden ser útiles para la producción de altos concentrados de EPA y de DHA, porque pueden eliminar la necesidad de reducción del 16:4n-1 con técnicas de separación complementarias que funcionan de acuerdo con la longitud de la cadena. La destilación molecular/destilación de vía corta es una técnica de separación
- 20 comúnmente usada de acuerdo con la longitud de la cadena. Sin embargo, como el poder de separación de esta técnica puede ser modesto, la retirada de ácidos grasos 16:4n-1 mediante destilación molecular/destilación de vía corta, también puede dar como resultado alguna pérdida de los ácidos grasos deseados. Por lo tanto, lo útil es usar un líquido de desplazamiento como CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para reducir el contenido de 16:4n-1 n comparación con otros líquidos de desplazamiento.
- 25 La Tabla 4C muestra que cuando se usó diclorometano como un líquido de desplazamiento, se extrajo de la primera fracción (fracción A) una cantidad relativamente grande de éster etílico. La Tabla 4E muestra los resultados de un experimento adicional con diclorometano como agente de desplazamiento. El procedimiento fue idéntico al dado en las Tablas 4B y 4C, salvo en que la primera extracción con 23,1 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se sustituyó con tres extracciones, cada una con 8 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- 30 La cantidad final de concentrado (6,34 g) estuvo cerca de la obtenida en el primer ejemplo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las concentraciones de EPA y DHA, así como las concentraciones de otros ácidos grasos también estuvieron muy cerca de las obtenidas en el primer ejemplo (véase la Tabla 4D). La composición del extracto A presentó bajas cantidades de EPA y de DHA y altas cantidades relativas de otros ácidos grasos omega-3 de cadena larga y también de ácidos grasos omega-6 de cadena larga. Por lo tanto, por ejemplo, se descubrió que los pequeños volúmenes de
- 35 diclorometano se podrían utilizar para mejorar el contenido de EPA y de DHA, y para reducir el contenido de otros ácidos grasos n-3 de cadena larga y de ácidos grasos n-6 de cadena larga. Variando la(s) cantidad(es) de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se obtendrán diferentes composiciones, bien como extracto o como concentrados. A partir de la información de este ejemplo, mediante la utilización de proporciones específicas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en comparación con la cantidad y la concentración de material de partida, se pueden adaptar las composiciones con contenidos específicos de ácidos
- 40 grasos. Tal como se puede ver a partir de la Tabla 4E y de la Tabla 4D, la extracción adicional con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> eliminó en gran medida los otros ácidos grasos n-3 de cadena larga y los ácidos grasos n-6 de cadena larga, dando un concentrado tras la dilución en agua que contenía más del 90 % de los ésteres etílicos de EPA más DHA (% de área de GC). Los extractos intermediarios, por lo tanto, representaron materiales de partida útiles para la producción de fracciones enriquecidas de tales ácidos grasos n-3 y n-6 de cadena larga. Asimismo, los productos intermediarios



estaban enriquecidos en EPA, haciéndolos útiles como intermediarios para la producción de productos que contienen altas concentraciones de EPA, como por ejemplo, el producto Epadel.

5 La Figura 5 representa los mismos datos que la Tabla 4E, con columnas que representan la concentración relativa de ésteres etílicos de los mismos ésteres grasos seleccionados. De la figura y de las tablas, se puede inferir un "orden jerárquico" para la facilidad de retirada de ésteres etílicos de ácidos grasos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como líquido de desplazamiento, basándose en cuándo se obtiene la máxima extracción de un componente específico, y en comparación con la proporción de la concentración relativa en K30EE y extracto A, así como la proporción entre la concentración relativa en extracto E y el concentrado final.

Este "orden jerárquico" parece ser:

10 18:3n-3 > 20:4 n-6 > 22:5n-6 > 20:4n-3 > 18:4n-3 > 22:5n-3 > 21:5n-3 > 16:4n-1 > EPA > DHA

El ácido graso 19:5 está presente en cantidades tan bajas que no es posible hallar su lugar en este "orden jerárquico".

15 El análisis mediante la cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HPSEC) mostró que los glicéridos parciales, que son constituyentes menores típicos en aceites etilados, estaban enriquecidos en los concentrados cuando se usó CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como un líquido de desplazamiento. Para los otros disolventes utilizados, la concentración de glicéridos parciales en los concentrados no pareció estar afectada hasta un grado significativo en comparación con el K30EE de partida. Esto se ilustra con los resultados analíticos dados en la Tabla 4F:

Tabla 4F. Glicéridos parciales. Analizados de acuerdo con el procedimiento de la Monografía de la Farmacopea Europea 1250 y la Monografía de la FEU para ésteres etílicos de ácidos Omega-3

Disolvente	Fracción	Diglicéridos	Monoglicéridos	Ésteres etílicos
	K30EE	2,9	4,0	93,1
Ninguno	Concentrado	2,5	3,0	94,5
Hexano	Concentrado	2,2	2,7	95,1
1-hexeno	Concentrado	2,4	3,4	94,2
Ciclohexeno	Concentrado	2,6	3,7	93,7
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	Concentrado	3,5	6,0	90,5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> <sup>2</sup>	A	4,0	1,8	94,2
	B	2,1	0,9	97,0
	C	1,9	0,8	97,3
	D	1,9	0,8	97,3
	E	1,3	0,9	97,8
	Concentrado	3,4	7,2	89,4
<sup>1</sup> Concentrado de la Tabla 4D				
<sup>2</sup> Extracto y concentrados de la Tabla 4E				

20 Los resultados del área de GC en las Tablas 4D y 4E se obtuvieron mediante inyección directa de las muestras de ésteres etílicos tal como se describe mediante la monografía de la Farmacopea Europea 2.4.29 y la Monografía de la FEU de ésteres etílicos de ácidos Omega-3. Si los glicéridos parciales en las muestras se asemejan a la composición del K30EE de partida, el experto en la materia se dará cuenta de que la inclusión de los glicéridos parciales en el análisis lleva a una reducción del contenido de EPA y DHA medido. La razón para esto es que los

25 glicéridos parciales no se observarán en el cromatograma de GC y, por este motivo, el porcentaje de área relativa de los picos de ésteres etílicos serán mayores que si se observasen todos los componentes en el cromatograma. El experto en la materia se dará cuenta de que un procedimiento para incluir los glicéridos parciales en el análisis sería metilar las muestras, transformando de este modo los ésteres etílicos y los glicéridos parciales a ésteres metílicos. Por lo tanto, parecería probable que cuando se realice tal procedimiento para los concentrados obtenidos mediante

30 el uso de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como un líquido de desplazamiento, el contenido de EPA y DHA se reduciría en comparación con los resultados dados en las Tablas 4D y 4E.

35 Sin embargo, cuando se metilaron los concentrados obtenidos usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como un líquido de desplazamiento, los ésteres metílicos resultantes no tuvieron un contenido reducido de EPA y de DHA. Por el contrario, mientras que la concentración de EPA pareció estar más o menos sin afectar, la concentración de DHA pareció haber aumentado (Tabla 4G). Al mismo tiempo, la concentración relativa de 16:4n-1 pareció no haber aumentado, sino más bien haberse reducido ligeramente. Por lo tanto, parece que cuando se usó un líquido de desplazamiento como CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,

- la concentración de glicéridos parciales, por ejemplo, aumentó en el concentrado final y aquellos glicéridos parciales tuvieron una concentración altamente elevada de, por ejemplo, EPA y DHA en comparación con el K30EE de partida. Por lo tanto, los ácidos grasos de valor que se pierden con las fracciones de glicéridos parciales en los procedimientos de concentración tradicionales como la destilación molecular y el fraccionamiento con urea se mantienen y se concentran de acuerdo con el procedimiento desvelado en el presente documento.

Tabla 4G. Concentrados obtenidos usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como líquido de desplazamiento. La metilación se realizó de acuerdo con el procedimiento de derivatización de triglicéridos, Monografía de Farmacopea Europea 2.4.29, y de derivatización cuando se analizan glicéridos parciales en la Monografía de la FEU de los ésteres etílicos de ácidos Omega-3.

		16:4n-1	EPA	DHA
De la Tabla 4D	Analizado como éster etílico	3,5	39,1	54,8
	Analizado tras la metilación	3,4	38,9	55,2
De la Tabla 4E	Analizado como éster etílico	3,7	39,0	53,8
	Analizado tras la metilación	3,4	39,2	54,9

- En este ejemplo,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  tuvo, por ejemplo, efectos mejorados como un líquido de desplazamiento en comparación con los hidrocarburos que contienen solo carbono e hidrógeno. El experto en la materia se dará cuenta de que se pueden obtener efectos mejorados similares mediante otros disolventes halogenados, así como disolventes que contienen otros grupos polares funcionales, como oxígeno o nitrógeno.

**Ejemplo 2C. Enriquecimiento de EPA y DHA usando triglicéridos como material de partida**

- Se añadieron 60,3 g de aceite de hígado de bacalao (Møller's Tran) a una mezcla de 23 g de  $\text{H}_2\text{O}$  y 59 g de  $\text{AgNO}_3$  a 70 °C. La mezcla se agitó durante una hora y después se dejó reposar hasta que se dio la separación de las fases. La fase acuosa inferior se separó de la fase oleosa superior y se añadieron 400 g de agua con el fin de disociar el complejo de  $\text{Ag}^+$  y liberar los triglicéridos enriquecidos en EPA y DHA. Los perfiles de ácidos grasos del material de partida y el aceite resultante se dan en la Tabla 4H. El EPA y el DHA mostraron un aumento de más de dos veces. El ejemplo muestra que la complejación también tiene lugar con triglicéridos. Con el fin de lograr un enriquecimiento de EPA y de DHA, la distribución de los ácidos grasos no puede ser totalmente aleatoria entre los triglicéridos. Algunos de los triglicéridos deben tener ácidos grasos predominantemente saturados o insaturados conectados a la estructura principal. La distribución de los ácidos grasos en el triglicérido puede variar dependiendo de la especie.

Tabla 4H. Ejemplo de EPA y DHA usando aceite de hígado de bacalao como material de partida

Ácido graso	Aceite de hígado de bacalao (TG)	Concentrado	Cambio
C14:0	3,0	1,4	-53 %
C16:0	9,7	5,0	-49 %
C16:1	8,2	3,8	-54 %
C18:0	2,1	1,5	-29 %
C18:1n-9	17,8	9,6	-46%
C18:1n-7	4,9	3,1	-37%
C18:2	1,8	1,0	-45%
C18:3n-3	0,8	0,6	-18%
C8:4n-3	2,5	3,7	51%
C20:1	13,3	6,5	-51%
C20:4 n-3	0,8	0,9	11%
C20:5 n-3	9,4	19,8	110%
C22:1	7,2	2,9	-60%
C22:5 n-3	1,3	2,0	51%
C22:6 n-3	13,0	33,7	160%

**Ejemplo de extracción en 2D con CO<sub>2</sub> supercrítico**

Utilizando una proporción de AgNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O/EE de 45 %/19 %/36 % (en peso) a 50 °C, el 68 % de los ésteres etílicos permaneció en la capa orgánica. La capa acuosa se transfirió a la columna de SFE (del inglés *Supercritical Fluid Extraction*, extracción con fluidos supercríticos) para la extracción. No todos los ésteres etílicos del complejo pudieron extraerse, al contrario de lo que descubrió Suzuki (Suzuki y col. (1993), *Bioseparation* 3, pp 197-204). Después de que se hubiese extraído aproximadamente el 70 % de los ésteres etílicos, la mezcla restante se había vuelto un sólido de tipo gel. La temperatura y la presión de la extracción se pueden utilizar para variar la proporción de EPA/DHA. El aumento de la temperatura de extracción desde 60 hasta 70 °C a 280 bar cambió la EPA/DHA de 53/15 a 55/23 en los ésteres etílicos extraídos. Con el fin de extraer todos los ésteres etílicos, fue necesario añadir agua durante la extracción. La adición de H<sub>2</sub>O al 0,5 % al flujo de CO<sub>2</sub> fue suficiente como para permitir la extracción completa de los ésteres etílicos. Los resultados del Ejemplo 6 a continuación sugieren que la adición de etanol también puede ser útil a este respecto.

**Ejemplo 3: Dilución en agua**

Se ha descubierto que una dilución parcial de la fase acuosa con agua liberará una fracción orgánica enriquecida en ácidos grasos n-6 y/o en ácidos grasos n-3 específicos (por ejemplo, ácidos grasos n-3 de cadena larga que no sean EPA ni DHA).

Se agitó el K85EE con una solución de AgNO<sub>3</sub> al 60 % en peso (K85EE:AgNO<sub>3</sub> = aproximadamente 7:10 en peso). La fase acuosa se separó de la fase orgánica y se diluyó con agua de forma gradual. El "concentrado 1" se obtuvo tras una dilución de agua (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 1,2:1 en peso). Se obtuvo un segundo concentrado de ácidos grasos mediante dilución adicional de la fase acuosa (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 2,8 : 1 en peso) (no analizado). El "concentrado 4" se obtuvo mediante dilución adicional (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 20:1 en peso). La Tabla 5 compara la composición (% de área de GC) de la mezcla de partida de K85EE, la fase orgánica separada ("ésteres no disueltos"), el concentrado 1 y el concentrado 4. Los rendimientos comparados con el peso de la mezcla de partida de K85EE se dan entre paréntesis. El cromatograma de gas para el concentrado 4 aparece en la Figura 4.

Tabla 5: Composición de concentrados de ácidos grasos; dilución gradual en agua.

Éster etílico de ácido graso	Concentración (% de área de GC)			
	K85EE	Ésteres no disueltos (45 %)	Concentrado 1 (22 %)	Concentrado 4 (4 %)
Ácido fitánico	0,11	0,29	0,02	**
16:3n-4	0,11	0,22	0,07	**
16:4n-1	0,19	0,14	0,15	0,45
18:2n-6	0,04	0,10	**	**
18:3n-4	0,11	0,26	0,03	**
18:3n-3	0,06	0,13	0,03	**
18:4n-3	1,68	2,62	1,65	0,18
18:4n-1	0,11	0,17	0,15	**
Ácido furano 5	0,15	0,37	**	**
19:5	0,07	0,07	0,07	0,13
20:3n-6	0,06	0,14	**	**
20:4n-6	1,71	3,86	0,61	**
Ácido furano 7	0,15	0,29	0,04	0,06
20:4n-3	0,45	0,95	0,24	**
Ácido furano 8	0,45	1,11	0,05	**
20:5n-3 (EPA)	48,65	52,76	54,39	27,39
Ácido furano 9	0,07	0,16	**	**
21:5n-3	1,74	2,38	2,14	0,25

(continuación)

Éster etílico de ácido graso	Concentración (% de área de GC)			
	K85EE	Ésteres no disueltos (45 %)	Concentrado 1 (22 %)	Concentrado 4 (4 %)
Ácido furano 10	0,28	0,68	**	**
22:5n-6	0,90	1,87	0,53	**
Ácido furano 11	0,04	0,12	**	**
22:5n-3	2,87	5,08	3,08	0,19
22:6n-3 (DHA)	39,55	25,15	36,16	70,14
24:1	0,02	**	**	**
EPA+DHA	88,20	77,91	90,53	97,54
Σ n-3	95,00	89,02	97,69	98,15
Σ n-6	2,65	5,83	1,14	**
Σn-3/Σn-6	35,8	15,3	85,7	∞‡
Σ"Otro n-3 C20-C22"	5,06	8,41	5,46	0,44

\*\*Área de GC del 0,02 % o menor.  
‡Solo se incluyen picos por encima del 0,05 %.

Los resultados en la Tabla 5 muestran que la fase orgánica se enriqueció en ésteres grasos n-6 en comparación con la mezcla de partida de K85EE. Se observaron resultados similares para otros ácidos grasos n.-3 que no sean DHA. El concentrado 4 contiene DHA al 70 % (% de área de GC) y muy poco DPA, haciendo tales fracciones y similares adecuados como intermediarios para la producción de DHA puro.

#### 5 Ejemplo 4: concentración de $\text{AgNO}_3$

Se agitó K85EE bien con solución de  $\text{AgNO}_3$  al 60 % en peso o al 70 % en peso con  $\text{K85EE}:\text{AgNO}_3 = 2:1$  (20,0 g a 10,1 g). Se permitió que mezcla de aceite/agua se separase y se retiró la fase orgánica. La fase acuosa se diluyó con 100 ml de agua, y se recolectó el concentrado de ácidos grasos ("concentrado 1") liberado por la dilución. Se añadieron 50 ml adicionales de agua a la fase acuosa para obtener un segundo concentrado ("concentrado 2"). La composición de la mezcla de partida de K85EE, la fase orgánica separada ("ésteres no disueltos") y los concentrados 1 y 2 se determinaron mediante análisis de GC (% de área de GC) tal como se muestra en las Tablas 6 y 7. Los rendimientos comparados con el peso de la mezcla de partida de K85EE se dan entre paréntesis.

Tabla 6: Composición de concentrados de ácidos grasos; solución de  $\text{AgNO}_3$  al 60 %.

Éster etílico de ácido graso	Concentración (% de área de GC)			
	K85EE	Ésteres no disueltos (22 %)	Concentrado 1 (64 %)	Concentrado 2 (8 %)
18:2n-6	0,04	0,05	**	**
18:3n-4	0,11	0,21	**	**
18:3n-3	0,06	0,08	**	**
18:4n-3	1,68	3,01	1,10	0,58
20:4n-6	1,71	6,75	0,46	0,10
20:4n-3	0,45	1,67	0,18	0,03
Ácido furano 8	0,45	1,62	0,03	**
20:5n-3 EPA	48,65	47,84	46,03	39,95
21:5n-3	1,74	2,57	1,77	0,81
22:5n-6	0,90	3,22	0,46	0,07
22:5n-3	2,87	6,56	2,81	0,54

(continuación)

Éster etílico de ácido graso	Concentración (% de área de GC)			
	K85EE	Ésteres no disueltos (22 %)	Concentrado 1 (64 %)	Concentrado 2 (8 %)
24:1	0,02	0,04	**	**
Σ n-3	95,00	81,27	97,91	93,03
Σ n-6	2,65	10,02	0,92	0,17
Σn-3/Σn-6	35,8	8,11	106	547
Σ"otro n-3 C20-C22"	5,06	10,80	4,76	1,38

\*\*Área de GC del 0,02 % o menor.

Tabla 7: Composición de concentrados de ácidos grasos; solución de AgNO<sub>3</sub> al 70%.

Éster etílico de ácido graso	Concentración (% de área de GC)			
	K85EE	No disuelto (15 %)	Concentrado 1 (71 %)	Concentrado 2 (9 %)
18:2n-6	0,04	0,13	0,03	**
18:3n-4	0,11	0,24	**	**
18:3n-3	0,06	0,15	**	**
18:4n-3	1,68	2,70	1,31	0,62
20:4n-6	1,71	9,65	0,80	0,10
20:4n-3	0,45	1,96	0,29	0,03
Ácido furano 8	0,45	1,16	**	**
20:5n-3 (EPA)	48,65	46,43	48,21	40,84
21:5n-3	1,74	2,38	1,94	0,85
22:5n-6	0,90	3,90	0,71	0,07
22:5n-3	2,87	6,43	3,10	0,53
22:6n-3 (DHA)	39,55	17,72	42,66	56,37
24:1	0,02	0,09	**	**
Σ n-3	95,00	77,77	97,51	99,24
Σ n-6	2,65	13,68	1,54	0,17
Σn-3/Σn-6	35,8	5,69	63,3	584
Σ"otro n-3 C20-C22"	5,06	10,77	5,33	1,41

\*\*Área de GC del 0,02 % o menor.

También puede ser posible obtener un concentrado de ácidos grasos con una solución acuosa que comprende una concentración relativamente baja de iones de plata. Sin embargo, la dilución con agua puede ser preferible con el fin de obtener dos tipos de mezclas: un concentrado de ácidos grasos que comprende mayores cantidades de EPA y de DHA (es decir, menores cantidades de ácidos grasos omega-6 y/o de ácidos grasos omega-3 específicos tales como ácidos grasos omega-3 de cadena larga que no sean EPA ni DHA), y otro concentrado (por ejemplo, fase orgánica separada) que comprende mayores cantidades de ácidos grasos omega-6 y/o ácidos grasos omega-3 tales como ácidos grasos omega-3 de cadena larga que no sean EPA ni DHA (es decir, menores cantidades de EPA y de DHA). Esto se ilustra en la Tabla 8 tal como sigue. El K30EE se mezcló con una solución de AgNO<sub>3</sub> (al 60 % en peso, al 70 % en peso o al 80 % en peso) con K30EE:AgNO<sub>3</sub> = 0,8 y las dos fases resultantes se separaron. La fase acuosa se diluyó en agua. Para cada concentración de AgNO<sub>3</sub> en la Tabla 8, la columna marcada (1) da la composición de la fase orgánica separada, mientras que la columna (2) da la composición del concentrado de ácidos grasos recuperado diluyendo la fase acuosa en agua a una temperatura de aproximadamente 70 °C. Tal como se muestra en la Tabla 8, la solución de AgNO<sub>3</sub> al 60 % dio mayores proporciones de n-3/n-6 y una mayor concentración de DHA.

Tabla 8: Composición de concentrados de ácidos grasos; soluciones de AgNO<sub>3</sub> al 60 %, al 70 % y al 80 %.

Éster etílico de ácido graso	K30EE	AgNO <sub>3</sub> al 80 %		AgNO <sub>3</sub> al 70 %		AgNO <sub>3</sub> al 60 %	
		1 (69,1 %)	2 (27,2%)	1 (73,2%)	2 (25,0%)	1 (80,3%)	2 (17,3%)
16:4n-1	2,04	0,42	5,42	0,63	5,54	1,00	6,23
18:2n-6	1,20	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	**
18:3n-3	0,60	0,71	0,09	0,69	0,07	0,64	0,04
18:4n-3	2,15	1,22	3,60	1,64	2,94	2,04	2,08
20:4n-6	1,05	1,09	0,53	1,16	0,27	1,13	0,10
20:4n-3	0,80	0,55	0,56	0,66	0,32	0,68	0,13
Ácido furano 8	-	0,13	0,02	0,14	**	0,13	**
20:5n-3 (EPA)	18,53	3,11	43,15	5,83	42,79	10,33	41,29
21:5n-3	0,73	0,20	1,59	0,31	1,46	0,52	1,18
22:5n-6	0,5	0,31	0,59	0,44	0,36	0,48	0,14
22:5n-3	2,33	0,91	4,37	1,55	3,45	2,16	2,05
22:6n-3 (DHA)	12,87	0,65	31,53	1,32	34,14	3,21	39,88
EPA+DHA	30,87	3,76	74,60	7,15	76,93	13,54	81,17
Σn-3	37,43	7,35	84,81	12,35	85,17	19,58	86,65
Σn-6	1,55	1,42	1,14	1,62	0,65	1,63	0,24
Σn-3/Σn-6	24	5,18	74,4	7,62	131	12,0	361
Σ"Otro n-3 C <sub>20</sub> -C <sub>22</sub> "	3,86	4,77	6,52	2,52	5,23	3,36	3,36

\*\*Porcentaje de área del 0,02 % o menor.

**Ejemplo 5: Proporción de Mezcla de ácidos grasos : AgNO<sub>3</sub>**

El efecto de variar la cantidad de mezcla de ácidos grasos de partida frente a AgNO<sub>3</sub> (s) se estudió variando la proporción de K30EE:AgNO<sub>3</sub> de 0,4 a 1,6. Se usó una solución acuosa de AgNO<sub>3</sub> al 70 % en peso en todos los experimentos. Después de agitar el combinado K30EE-AgNO<sub>3</sub> durante 1,5 horas a 70 °C, se permitió que tuviese lugar la separación de fases a la misma temperatura. En cada experimento, se obtuvieron dos fases visualmente claras tras aproximadamente una hora. Tras retirar la fase orgánica, se diluyeron las soluciones acuosas con agua (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 7,5:1 en peso). Los concentrados obtenidos se muestran en la Tabla 9. Las composiciones se determinaron mediante análisis de GC (% de área de GC). Los resultados en la Tabla 9 indican que el aumento de la cantidad de K30EE por AgNO<sub>3</sub> da mayores proporciones de n-3/n-6, así como mayores proporciones de (EPA+DHA)/Σ(otro n-3 de LC).

Tabla 9: Composición de concentrados de ácidos grasos; proporciones K30EE:AgNO<sub>3</sub> de 0,4-1,6.

Éster etílico de ácido graso	K30EE	K30EE : AgNO <sub>3</sub> (s)			
		0,4	0,8	1,2	1,6
16:4n-1	2,04	5,93	6,34	6,69	6,77
18:3n-3	0,6	0,05	ni	ni	0,05
18:4n-3	2,15	3,28	2,33	1,99	1,88
20:4n-6	1,05	0,27	0,19	0,15	0,17
20:4n-3	0,8	0,33	0,21	0,18	0,18
20:5n-3 (EPA)	18,53	46,23	42,5	39,75	37,62
21:5n-3	0,73	1,58	1,28	1,11	1,03

(continuación)

Éster etílico de ácido graso	K30EE	K30EE : AgNO <sub>3</sub> (s)			
		0,4	0,8	1,2	1,6
22:5n-6	0,5	0,36	0,22	0,18	0,17
22:5n-3	2,33	3,54	2,42	1,98	1,83
22:6n-3 (DHA)	12,29	34,66	40,8	44,79	45,21
EPA+DHA	30,82	80,89	83,3	84,54	82,83
Σ n-3	37,43	89,67	89,54	89,8	87,8
Σ n-6	1,55	0,63	0,41	0,33	0,34
Σ n-3/n-6	24	142	218	272	258
Otro n-3	6,61	8,78	6,24	5,26	4,97
Σ(Otro n-3 de LC)	3,86	5,45	3,91	3,27	3,04
(EPA+DHA)/Σ (Otro n-3 de LC)	7	14	21	25	27

ni: No integrado; se asume que los picos están por debajo del 0,05 % de área

**Ejemplo 6: Adición de alcohol**

El K30EE se agitó con una solución de AgNO<sub>3</sub> al 70 % en peso que comprende cantidades relativas en aumento de etanol tal como se muestra en la Tabla 10. Tras retirar la fase orgánica inicial tal como se describe anteriormente, la fase acuosa restante se diluyó con agua (agua:AgNO<sub>3</sub>(s) = aproximadamente 7,5:1 en peso). Las composiciones se determinaron mediante análisis de GC (% de área de GC) tal como se muestra en la Tabla 10.

5

Tabla 10: Composición de concentrados de ácidos grasos; adición de etanol a fase acuosa. El K30EE es del mismo lote que el de la Tabla 9.

Éster etílico de ácido graso	% de etanol (en comparación con AgNO <sub>3</sub> (S))				
	0	15	30	45	60
16:3n-4	1,066	1,937	2,68	2,89	2,908
16:4n-1	3,399	3,366	3,235	3,084	2,926
18:1n-9	1,852	0,738	0,741	1,238	2,175
18:2n-6	0,078	0,058	0,12	0,027	0,029
18:3n-6	0,092	0,157	0,311	0,4	0,447
18:3n-4	0,045	0,092	0,178	0,23	0,243
18:3n-3	0,117	0,146	0,125	0,122	0,111
18:4n-3	4,237	4,893	4,973	4,878	4,61
18:4n-1	0,528	0,61	0,613	0,598	0,57
Ácido furano 5	0,032	-	0,017	0,05	0,08
19:5	0,149	0,159	0,156	0,156	0,144
20:3n-6	0,038	0,052	0,123	0,195	0,242
20:4n-6	0,708	1,398	2,068	2,268	2,26
Ácido furano 7	0,042	0,043	0,051	0,057	0,061
20:4n-3	0,738	1,249	1,534	1,57	1,521
Ácido furano 8	0,024	0,024	0,023	0,022	0,018

(continuación)

Éster etílico de ácido graso	% de etanol (en comparación con AgNO <sub>3</sub> (S))				
	0	15	30	45	60
<i>trans</i> -EPA	0,012	0,016	-	0,015	0,013
20:5n-3 (EPA)	42,63	43,79	42,21	40,46	38,07
Ácido furano 9	0,022	0,086	0,031	0,035	0,034
21:5n-3	1,78	1,894	1,838	1,766	1,663
22:4n-6	0,027	0,075	0,157	0,191	0,204
Ácido furano 10	0,032	-	0,035	-	0,033
22:5n-6	0,732	1,103	1,129	1,13	1,069
Ácido furano 11	0,029	0,055	0,089	0,108	0,108
22:5n-3	5,247	6,019	6,077	5,822	5,492
<i>trans</i> -DHA	0,037	0,025	0,068	0,026	0,031
22:6n-3 (DHA)	26,61	26,72	25,45	24,42	23,02
EPA+DHA	69,233	70,509	67,658	64,88	61,089
EPA/DHA	1,60	1,65	1,66	1,66	1,65
Σ n-3	81,352	84,71	82,205	79,038	74,486
Σ n-6	1,675	2,843	3,908	4,211	4,251
Σ n-3/n-6	48	29	21	18	17
Otro n-3	12,119	14,201	14,547	14,158	13,397
Otro n-3 de LC	7,765	9,162	9,449	9,158	8,676
(EPA+DHA)/otro n-3 de LC	8	7	7	7	7
Rendimiento global (%)	27	27	30	31	33

Los resultados en la Tabla 10 indican que la adición de etanol afecta de manera diferencial a diversos ácidos grasos poliinsaturados. Aumentar la cantidad relativa de etanol puede provocar que entren en la fase acuosa mayores cantidades de ácidos grasos monoinsaturados (por ejemplo, 18:1 n-9). La adición de etanol también parece llevar a elevadas concentraciones de ácidos grasos n-6 en comparación con ácidos grasos n-3. El contenido de "otros ácidos n-3 de LC" también parece aumentar en comparación con la suma de EPA+DHA. Estos efectos pueden ser útiles para producir concentrados con alto contenido de "otros ácidos n-3 de LC" y/o mayor contenido de ácidos grasos n-6.

#### Ejemplo 7: Eliminación de contaminantes

Varios contaminantes orgánicos persistentes (COP) se añadieron al K30EE y el éster etílico resultante concentrado de acuerdo con el procedimiento desvelado actualmente. Se midieron los COP y el colesterol en el aceite resultante (es decir, el concentrado de ácidos grasos). El colesterol se analizó de acuerdo con la Monografía de la Farmacopea Europea 2.4.32, colesterol total en aceites ricos en ácidos omega-3. La concentración de COP fue baja y la concentración de colesterol total (colesterol libre más colesterol esterificado) en el concentrado de ácidos grasos fue de 0,06 mg/g. Los niveles de COP en el material de partida de K30EE y en el concentrado resultante se muestran en la Tabla 11. Dado que se sabe que los iones de plata interactúan con los sistemas de enlaces π (véase la Tabla 4C) se podría anticipar que el nivel de contaminantes orgánicos persistentes que comprenden sistemas de anillos aromáticos aumentaría durante el procedimiento. El benzo(a)pireno mostró una reducción del 74 %. Esto indica una tendencia débil a la complejación con iones de plata y que el benzo(a)pireno no se transfiere completamente a la fase de agua, pero predominantemente permanece en la fase orgánica. Teniendo en mente que el disolvente halogenado mostró una alta capacidad para interactuar con el complejo ion plata/ácido graso poliinsaturado (véase la Tabla 4C), sorprendentemente se transfieren pequeñas cantidades de los aromáticos halogenados a la fase de agua y se encuentran en el concentrado. El 96 % o más de los aromáticos halogenados añadidos al material de partida se eliminan en el procedimiento.



Tabla 11. Niveles de contaminantes orgánicos persistentes en el material de partida (COP añadidos a K30EE) y en el concentrado.

Grupo de COP	Nombre	Material de partida	Concentrado
Dioxinas	2,3,7,8-TCDD	18 pg/g	0,36 pg/g
No otro PCB	3,3',4,4'-TeCB (PCB-77)	249 pg/g	7,0 pg/g
	3,4,4',5'-TeCB (PCB-81)	12 pg/g	0,30 pg/g
	3,3',4,4',5'-PeCB (PCB-126)	6,3 pg/g	0,18 pg/g
DDT	p,p'-DDT	112 ng/g	1,52 ng/g
PAH	Benzo(a)pireno	20 ng/g	5,2 ng/g
PBDE	DecaBDE	4,7 ng/g	0,19 ng/g
PCB	2,2',4,4'-TetCB	1,2 ng/g	0,05 ng/g
	2,2',5,5'-TetCB	3,9 ng/g	0,10 ng/g
	2,3',4,4'-TetCB	2,2 ng/g	0,04 ng/g
	2,4,4',5'-TetCB	1,3 ng/g	0,02 ng/g
	2,2',4,4',5'-PenCB	1,0 ng/g	0,02 ng/g
	2,2',4,5,5'-PenCB	3,7 ng/g	0,08 ng/g
	2,3,3',4,4'-PenCB	1,0 ng/g	0,02 ng/g
	2,3,4,4',5'-PenCB	0,08 ng/g	<0,01 ng/g
	2,3',4,4',5'-PenCB	2,1 ng/g	0,04 ng/g
	2,2',3,3',4,4'-HexCB	0,7 ng/g	<0,01 ng/g
	2,2',3,4,4',5'-HexCB	29 ng/g	0,65 ng/g
	2,2',3,4,5,5'-HexCB	1,3 ng/g	0,02 ng/g
	2,2',3,4',5',6'-HexCB	4,0 ng/g	0,08 ng/g
	2,2',4,4',5,5'-HexCB	4,8 ng/g	0,09 ng/g
	2,3',4,4',5,5'-HexCB	0,12 ng/g	<0,01 ng/g
	2,2',3,3',4,4',5'-HepCB	1,7 ng/g	0,03 ng/g
	2,2',3,4,4',5,5'-HepCB	6,0 ng/g	0,11 ng/g
	2,2',3,4,4',5',6'-HepCB	1,1 ng/g	0,01 ng/g
	2,2',3,4',5,5',6'-HepCB	2,9 ng/g	0,06 ng/g
	2,3,3',4,4',5,5'-HepCB	0,04 ng/g	<0,01 ng/g
2,2',3,3',4,4',5,5'-OctCB	1,3 ng/g	0,02 ng/g	
2,2',3,3',4,4',5,5',6'-NonCB	0,46 ng/g	<0,01 ng/g	
DecaCB	0,04 ng/g	<0,01 ng/g	

A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que enumeran a continuación el amplio ámbito de la divulgación son aproximaciones, salvo que se indique lo contrario los valores numéricos definidos en los ejemplos específicos se han documentado de la forma más precisa posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores que necesariamente son resultado de la desviación estándar hallada en sus respectivas mediciones de prueba.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de concentración de al menos un ácido graso omega-3 a partir de una mezcla oleosa de ácidos grasos mientras se reduce la concentración de al menos un ácido graso omega-6 en la mezcla oleosa de ácidos grasos, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) combinar la mezcla oleosa de ácidos grasos y una solución acuosa de sal de plata para formar una fase acuosa y una fase orgánica, en la que la fase acuosa, la solución acuosa de sal de plata forma un complejo con el al menos un ácido graso omega-3;
- (b) separar la fase acuosa de la fase orgánica;
- 10 (c) extraer la fase acuosa con un líquido de desplazamiento, o aumentar la temperatura de la fase acuosa hasta al menos 30 °C, o una combinación de extraer con un líquido de desplazamiento y aumentar la temperatura, dando como resultado la formación de al menos un extracto;
- (d) combinar la fase acuosa con agua o extraer la fase acuosa con CO<sub>2</sub> supercrítico, o una combinación de combinar la fase acuosa con agua y extraer la fase acuosa con CO<sub>2</sub> supercrítico, para disociar el complejo, en el que se forma una fase acuosa que comprende la sal de plata y al menos una solución que comprende un
- 15 concentrado de ácidos grasos;
- (e) separar la al menos una solución que comprende el concentrado de ácidos grasos de la fase acuosa que comprende la sal de plata; y opcionalmente
- (f) purificar el concentrado de ácidos grasos mediante al menos un procedimiento de purificación,
- en el que el líquido de desplazamiento comprende un disolvente orgánico seleccionado de disolventes halogenados, alcanos, alquenos, cicloalcanos y cicloalquenos.
- 20 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración de sal de plata se selecciona del grupo que consiste en del 10 % en peso en agua al 90 % en peso en agua, del 60 % en peso al 80 % en peso en agua, y el 60 % en peso en agua.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la sal de plata se elige de AgNO<sub>3</sub> y AgBF<sub>4</sub>.
- 25 4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el al menos un ácido graso omega-3 se selecciona de ácido (todo Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA), ácido (todo Z)-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico (DHA), y combinaciones de los mismos.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el procedimiento concentra EPA o DHA, o EPA y DHA, y en el que la proporción de EPA/DHA en al menos uno del concentrado de ácidos grasos, el al menos un extracto y la al menos una solución varía preferentemente desde 0,1 a 10 en peso.
- 30 6. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el concentrado de ácidos grasos comprende al menos el 90 % en peso de ácidos grasos omega-3.
7. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que el concentrado de ácidos grasos comprende al menos el 80% en peso de EPA y de DHA.
- 35 8. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento aumenta la proporción de ácidos grasos omega-3 frente a omega-6 en el concentrado de ácidos grasos en relación con la mezcla oleosa de ácidos grasos, y la dicha proporción es preferentemente mayor de 40, mayor de 80, mayor de 100, mayor de 150 o mayor de 200.
9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la concentración total de ácidos grasos omega-6 en el concentrado de ácidos grasos es menor del 3 % en peso, menor del 2 % en peso, o menor del 1 % en peso.
- 40 10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proporción de mezcla oleosa de ácidos grasos frente a la solución de sal de plata varía de 0,4 a 1,6 en peso.
11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende añadir un alcohol a la fase acuosa.
12. El procedimiento según la reivindicación 11, en el que el alcohol comprende etanol.
- 45 13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el disolvente orgánico se elige de diclorometano, hexano, hexeno, ciclohexano, ciclohexeno y dienos.
14. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la extracción de la fase acuosa con el líquido de desplazamiento comprende al menos dos extracciones sucesivas.
15. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la temperatura de al menos 30 °C varía desde 30 °C hasta 90 °C.
- 50 16. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que combinar la fase acuosa con agua o extraer la fase acuosa con CO<sub>2</sub> supercrítico, o una combinación de combinar la fase acuosa con agua y extraer la fase acuosa con CO<sub>2</sub>

supercrítico, para disociar el complejo se repite al menos una vez.

17. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, tras la separación de la fase orgánica que comprende el concentrado de ácidos grasos, la sal de plata se recupera de la fase acuosa que comprende la sal de plata para su reutilización.
- 5 18. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla oleosa de ácidos grasos deriva de aceites animales tales como un aceite marino o un aceite de animales marinos, aceites vegetales, aceites microbianos, aceites de algas o cualquier combinación de los mismos, en el que el aceite está preferentemente en una forma elegida de glicérido, éster etílico y formas de ácidos grasos libres.
- 10 19. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el concentrado de ácidos grasos comprende una concentración reducida de al menos un contaminante ambiental y/o colesterol en comparación con la mezcla oleosa de ácidos grasos.
20. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el al menos un ácido graso omega-3 está en una forma elegida de éster etílico, ácido libre y glicérido.
- 15 21. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el concentrado de ácidos grasos comprende una concentración reducida de al menos un ácido graso omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> que no sea ácido (todo Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) ni ácido (todo Z)-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico (DHA) en comparación con la mezcla oleosa de ácidos grasos, en el que la concentración total de ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub> que no son EPA ni DHA en el concentrado de ácidos grasos es preferentemente menor del 3 % en peso, menor del 2,5% en peso, o menor del 0,5% en peso.
- 20 22. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el al menos un procedimiento de purificación se elige de destilación de vía corta, destilación molecular, separación mediante yodolactonización, extracción con fluidos supercríticos, fraccionamiento enzimático y cromatografía preparativa, preferentemente destilación de vía corta y destilación molecular.
- 25 23. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento se repite al menos una vez en el que al menos uno del concentrado de ácidos grasos, el al menos un extracto y la al menos una solución comprende la mezcla oleosa de ácidos grasos en el posterior procedimiento, y en el que el procedimiento preferentemente produce un concentrado de ácido graso que comprende al menos el 80 % de al menos un ácido graso omega-3 seleccionado de ácido (todo Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA), ácido (todo Z)-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico (DHA) y ácido (todo Z)-7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA).
- 30 24. El procedimiento según la reivindicación 23, en el que el procedimiento produce un concentrado de ácidos grasos que comprende al menos el 90 % de al menos un ácido graso omega-3 seleccionado de EPA, DHA y DPA; al menos el 95 % de al menos un ácido graso omega-3 elegido de EPA, DHA y DPA; o al menos el 98 % de al menos un ácido graso omega-3 elegido de EPA, DHA y DPA.
- 35 25. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que al menos uno del concentrado de ácidos grasos, el al menos un extracto y la al menos una solución se tratan mediante al menos un procedimiento de fraccionamiento preferentemente elegido de destilación, extracción, yodolactonización y cromatografía, y en el que el al menos un procedimiento de fraccionamiento preferentemente produce un concentrado de ácidos grasos que comprende al menos el 80 % de ácidos grasos omega-3 elegidos de ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub>; al menos el 90 % de al menos un ácido graso omega-3 seleccionado de ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub>; al menos el 95 % de al menos un ácido graso omega-3 seleccionado de ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub>; o al menos el 98 % de al menos un ácido graso omega-3 seleccionado de ácidos grasos omega-3 C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub>.
- 40 26. El procedimiento según la reivindicación 25, en el que el al menos un ácido graso omega-3 se selecciona de ácido (todo Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA) y ácido (todo Z)-7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA).
- 45 27. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla oleosa de ácidos grasos comprende al menos un contaminante orgánico persistente elegido de dioxinas, PCB, DDT y PDPE, y en el que el procedimiento preferentemente reduce el al menos un contaminante orgánico persistente en la mezcla oleosa de ácidos grasos en al menos el 95 % en el concentrado de ácidos grasos.
- 50 28. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla oleosa de ácidos grasos comprende colesterol, y en el que el procedimiento preferentemente reduce el colesterol en la mezcla oleosa de ácidos grasos a menos de 0,1 mg/g en el concentrado de ácidos grasos.
29. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el CO<sub>2</sub> comprende al menos un modificador polar, que se elige preferentemente de agua y un alcohol.

30. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla oleosa de ácidos grasos y la solución acuosa de sal de plata se combinan a una temperatura que varía de -25 °C a 20 °C, de 20 °C a 25 °C, o de 25 °C a 90 °C.

5 31. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que, después de combinar la mezcla oleosa de ácidos graso y la solución acuosa de sal de plata, la fase acuosa se separa de la fase orgánica a una temperatura que varía de -25 °C a 20 °C, de 20 °C a 25 °C, o de 25 °C a 90 °C.

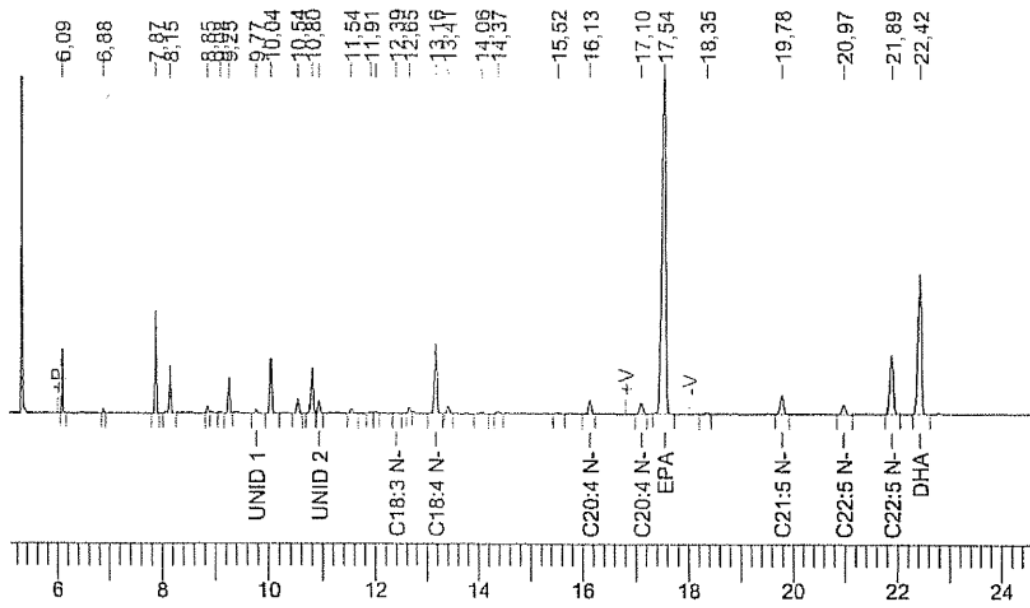


FIG. 1

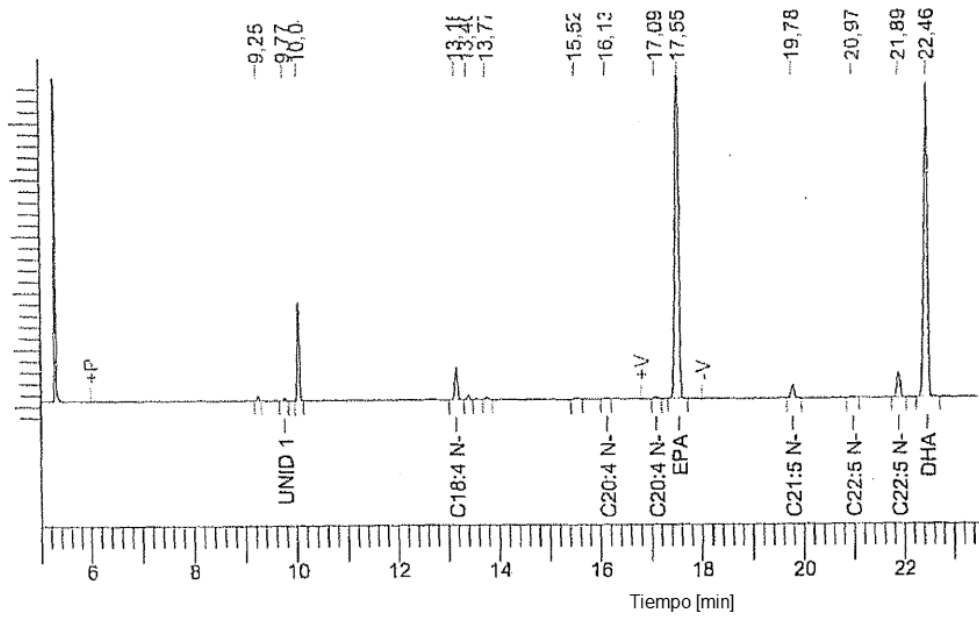


FIG. 2

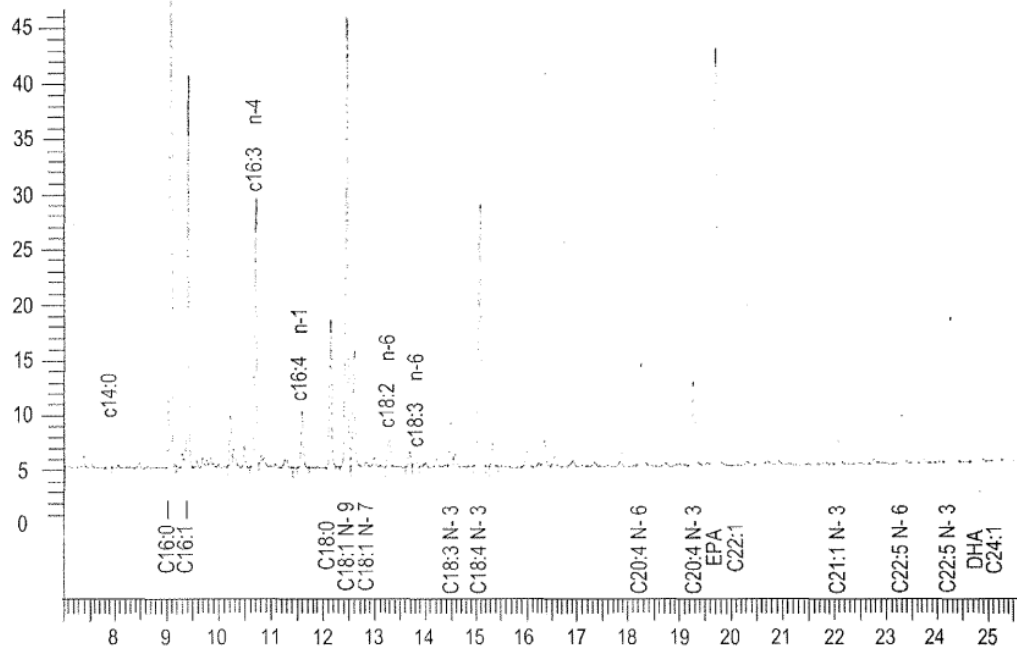
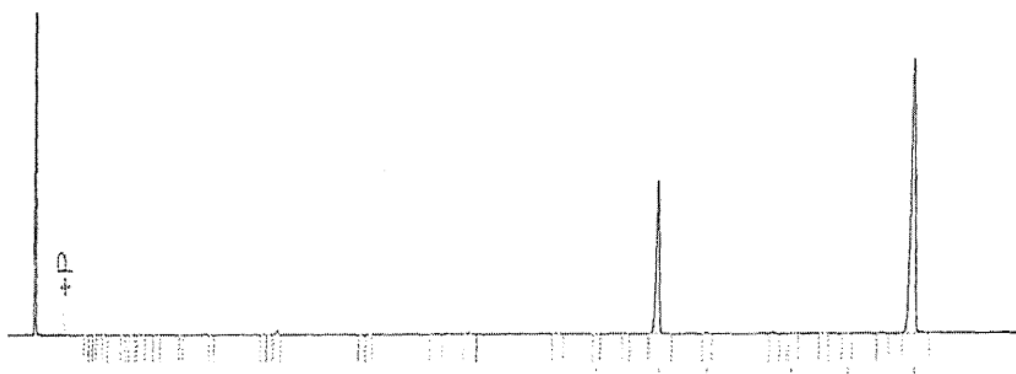


FIG. 3



**FIG. 4**



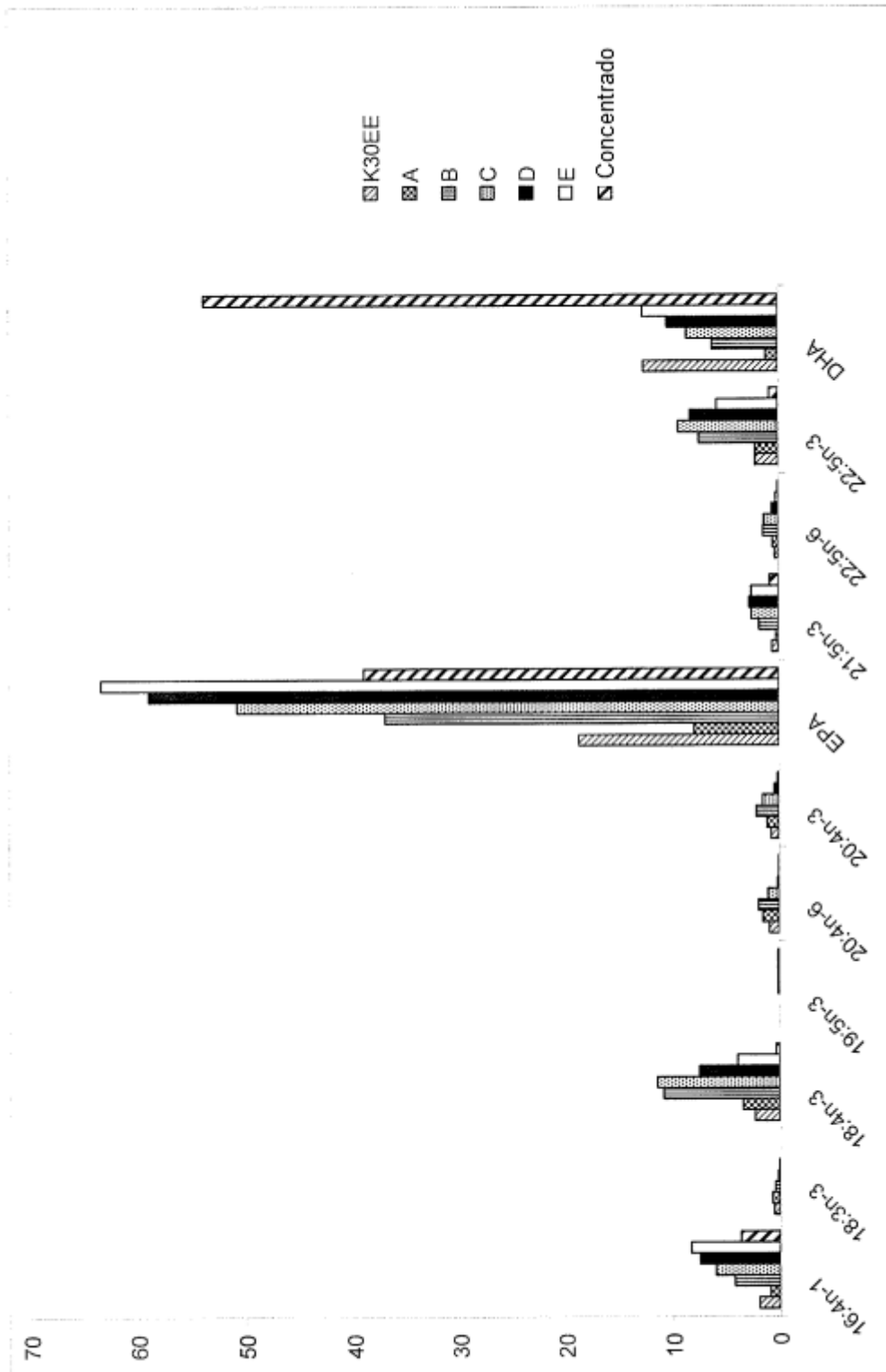


FIG. 5