

COMPOSICIONES DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS ENRIQUECIDOS CON DHA

CAMPO DE LA INVENCION

Las formas de realización descritas en la presente se refieren a nuevas composiciones lipídicas que están enriquecidas con ácido docosahexaenoico. Las composiciones comprenden una mezcla de ácidos grasos poliinsaturados que ofrecen varios beneficios para la salud. Las composiciones pueden proporcionar beneficios nutricionales y pueden obtenerse de una sola fuente que sea tanto escalable como sostenible. También tienen una mayor estabilidad a la oxidación.

ANTECEDENTES

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) omega-3 son ampliamente reconocidos como compuestos importantes para la salud humana y animal. Estos ácidos grasos se pueden obtener a partir de fuentes nutricionales o, en menor medida, por conversión de los ácidos grasos linoleico (LA, 18:2 ω -6) o α -linolénico (ALA, 18:3 ω -3), los cuales se consideran ácidos grasos esenciales en la dieta humana.

Desde un punto de vista nutricional, los ácidos grasos omega-3 más importantes son probablemente el ácido α -linolénico, el ácido eicosapentaenoico ("EPA"; 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico ("DHA"; 22:6n-3). DHA es un LC-PUFA, que es importante para el desarrollo del cerebro y de los ojos. La ingestión de PUFA omega-3 también puede ayudar a prevenir enfermedades coronarias. Los estudios médicos indican claramente que estos ácidos grasos tienen aspectos beneficiosos para la salud, como la mejora de las funciones cardiovasculares e inmunitarias y la reducción del cáncer, la diabetes y la presión arterial alta. Los resultados clínicos han demostrado que una ingesta nutricional de 5,5 g de PUFA omega-3 por semana se puede vincular a una reducción del 50 % en el riesgo de paro cardíaco primario. En consecuencia, el aceite que contiene PUFA omega-3 tiene una gran demanda para fines farmacéuticos y dietéticos.

En general, la estabilidad oxidativa de un ácido graso disminuye notablemente a medida que aumenta el número de enlaces dobles carbono-carbono o el grado de insaturación. Desafortunadamente, ALA, EPA y DHA son todas grasas poliinsaturadas que tienden a oxidarse fácilmente. EPA (con 5 enlaces dobles carbono-carbono) es significativamente más propenso a la oxidación que ALA; DHA (con 6 enlaces dobles carbono-carbono) es incluso más propenso a la oxidación que EPA. Como

consecuencia, aumentar el contenido de omega-3 tiende a reducir la vida útil de muchos productos. Estos problemas se vuelven particularmente agudos con aceites que incluyen cantidades significativas de EPA o DHA.

El documento US 2015/223483 describe mezclas a base de aceite de canola que tienen una estabilidad oxidativa mejorada. La estabilidad se logra mediante la adición de uno o más aditivos.

El documento US 2011/0027443 describe composiciones de grasa y aceite que contienen mezclas particulares de ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa linolénico y LC-PUFA con un perfil de sabor mejorado. El documento US 2004/209953 describe productos nutricionales que contienen predominantemente monoglicéridos y diglicéridos de LC-PUFA. El documento US 5.130.061 describe el uso de procesos de transesterificación y destilación para extraer DHA de aceites crudos. El documento US 9.040.730 describe la purificación de mezclas de lípidos que contienen PUFA para reducir la cantidad de esteroides no deseados en la composición. En cada uno de estos casos, se utilizan aceites de pescado o microbianos como el material de origen a partir del cual se obtienen mezclas específicas.

La solicitud de patente internacional n.º WO 2013/185184 describe procesos para producir ésteres etílicos de ácidos grasos poliinsaturados.

La solicitud de patente internacional n.º WO 2015/089587 y la solicitud de patente estadounidense n.º US 2015/0166928 describe composiciones lipídicas vegetales que comprenden una mezcla de ácidos grasos omega-3 y omega-6. La canola modificada genéticamente se describe en los documentos WO 2017/218969 y WO 2017/219006.

La solicitud de patente internacional n.º WO2011039776 divulga composiciones que contienen DHA altamente puro. La solicitud de patente estadounidense n.º US 2011/0033595 describe productos que contienen DHA y EPA en una alta proporción combinada.

La inclusión o análisis de un documento publicado aparentemente de forma previa en esta memoria descriptiva no deben tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición lipídica de base vegetal que comprende:

- (i) ácido docosahexaenoico (22:6n-3) en una cantidad de al menos

alrededor de 86 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición; y

(ii) un segundo ácido graso poliinsaturado en una cantidad de al menos alrededor de 3 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición, en donde el segundo ácido graso poliinsaturado es el segundo ácido graso poliinsaturado más abundante en la composición;

en donde el ácido docosahexaenoico y el segundo ácido graso poliinsaturado se proporcionan cada uno independientemente en forma de un ácido graso, una sal de ácido graso, un éster de ácido graso o una sal de un éster de ácido graso.

Dichas composiciones lipídicas se denominan en la presente "composiciones de la invención".

La presente invención se refiere a composiciones lipídicas que contienen niveles altos de ácido docosahexaenoico (DHA), ya sea en forma de un ácido graso libre, una sal, un éster o una sal de un éster. Se ha descubierto que estas composiciones se pueden obtener de fuentes sustentables, por ejemplo, fuentes vegetales. También se ha descubierto que tienen un perfil de estabilidad de almacenamiento mejorado que se observa en una reducción en la degradación por oxidación durante el almacenamiento. El DHA, en particular, es reconocido como un compuesto importante para la salud humana y animal. Estas composiciones se pueden usar en alimentos, nutracéuticos, cosméticos y otras composiciones químicas, y pueden ser útiles como intermediarios e ingredientes farmacéuticos activos.

Los niveles de ácidos grasos en las composiciones de la invención se pueden determinar usando métodos de rutina conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Tales métodos incluyen cromatografía de gases (GC) junto con estándares de referencia, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en los ejemplos. En un método particular, los ácidos grasos se convierten en ésteres metílicos o etílicos antes del análisis mediante GC. Tales técnicas se describen en los ejemplos. La posición del pico en el cromatograma se puede usar para identificar cada ácido graso en particular, y el área debajo de cada pico se integra para determinar la cantidad. Como se usa la presente, a menos que se indique lo contrario, el porcentaje de ácido graso particular en una muestra se determina calculando el área bajo la curva en el cromatograma para ese ácido graso como un porcentaje del área total de ácidos grasos en el cromatograma. Esto corresponde esencialmente a un porcentaje en peso (p/p). La identidad de los ácidos grasos se puede confirmar mediante GC-MS.

Las referencias al ácido docosahexaenoico y "DHA" en este contexto son, a menos se especifique lo contrario, referencias a la forma ω 3 de ácido

docosahexaenoico, que es el ácido docosahexaenoico que tiene una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el tercer enlace carbono-carbono desde el extremo metilo del ácido graso. Las formas abreviadas que se pueden usar indistintamente incluyen "22:6n-3" y "22:6ω-3".

Más generalmente, los términos "ácido graso poliinsaturado" y "PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende al menos dos enlaces dobles carbono-carbono. Los términos "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" y "LC-PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende al menos 20 átomos de carbono y al menos dos enlaces dobles carbono-carbono en su cadena de carbono, y, por lo tanto, incluyen VLC-PUFA. Como se usa en la presente, los términos "ácido graso poliinsaturado de cadena muy larga" y "VLC-PUFA" se refieren a un ácido graso que comprende al menos 22 átomos de carbono y al menos tres enlaces dobles carbono-carbono en su cadena de carbono. Normalmente, el número de átomos de carbono en la cadena de carbono del ácido graso se refiere a una cadena de carbono no ramificada. Si la cadena de carbono es ramificada, el número de átomos de carbono excluye a los de los grupos laterales.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga pueden ser ácidos grasos ω3 ("omega-3"), es decir, ácidos grasos que tienen una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el tercer enlace carbono-carbono del extremo metilo del ácido graso. De manera alternativa, pueden ser ácidos grasos ω6 ("omega-6"), es decir, ácidos grasos que tienen una desaturación (enlace doble carbono-carbono) en el sexto enlace carbono-carbono del extremo metilo del ácido graso. Mientras que otros patrones de insaturación pueden estar presentes, las formas ω6 y particularmente ω3 son particularmente relevantes en el contexto de la presente invención.

Las composiciones de la invención comprenden al menos dos ácidos grasos poliinsaturados diferentes, incluidos DHA y al menos otro ácido graso poliinsaturado. El DHA es el ácido graso más abundante presente en la composición (en peso con respecto al contenido total de ácidos grasos de la composición). El segundo ácido graso más abundante en la composición (en peso con respecto al contenido total de ácidos grasos de la composición) se denomina en la presente como "segundo ácido graso poliinsaturado" o "segundo PUFA".

El DHA y el segundo PUFA pueden estar presentes cada uno en forma de un ácido graso, una sal de ácido graso, un éster de ácido graso o una sal de un éster de ácido graso.

Como se usa en la presente, el término "ácido graso" se refiere a un ácido

carboxílico (o ácido orgánico), a menudo con una cola alifática larga, saturada o insaturada. Típicamente, los ácidos grasos tienen una cadena unida carbono-carbono de al menos 8 átomos de carbono de longitud, más particularmente al menos 12 carbonos de longitud. La mayoría de los ácidos grasos naturales tienen un número par de átomos de carbono porque su biosíntesis incluye acetato que tiene dos átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden estar en un estado libre (no esterificado), denominado en la presente como un "ácido graso libre", o en una forma esterificada tal como un éster alquílico, parte de un triglicérido, parte de un diacilglicérido, parte de un monoacilglicérido, unido a acil-CoA (tioéster) u otra forma unida, o una mezcla de estos. El ácido graso se puede esterificar como un fosfolípido tal como una fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol, aunque preferiblemente se esterifica como un éster alquílico, especialmente como un éster etílico. Para evitar dudas, a menos que se indique lo contrario, el término "ácido graso" abarca ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos y sales de cualquiera de estos. A menos que se indique lo contrario, los valores cuantitativos asociados con ácidos grasos particulares se refieren a la cantidad (calculada en función del peso) de ese ácido graso presente, independientemente de la forma (por ejemplo, ácido libre o éster) en la que está presente.

Cada ácido graso en la composición también se puede proporcionar independientemente en forma de una sal de un ácido graso, por ejemplo, una sal alcalina o una sal alcalinotérrea. Las sales particulares que se pueden mencionar incluyen sales de litio y sales de calcio. Tales sales tienen potenciales beneficios medicinales adicionales u ofrecen mejoras de procesabilidad. De forma similar, se puede proporcionar un éster de ácido graso en forma de una sal de un éster de ácido graso. Cualquier composición de ácidos grasos en forma de ácidos grasos libres, sales, ésteres o sales de ésteres puede estar presente en las composiciones de la invención. Con esto, se quiere decir que, por ejemplo, el DHA puede estar presente predominantemente como un éster etílico, el ALA (si está presente) puede estar presente predominantemente como una sal de calcio de un éster metílico, y el segundo PUFA puede estar presente predominantemente como un ácido graso libre.

Los "ácidos grasos saturados" no contienen enlaces dobles u otros grupos funcionales a lo largo de la cadena. El término "saturado" se refiere a hidrógeno, ya que todos los carbonos (aparte del grupo ácido carboxílico [-COOH]) contienen la mayor cantidad posible de hidrógenos. En otras palabras, el extremo omega (ω) está unido a tres átomos de hidrógeno (CH_3 -) y cada carbono dentro de la cadena está unido a dos

átomos de hidrógeno (-CH₂-). El término "ácido graso total" incluye ácidos grasos en todas las formas, ya sean saturados o insaturados, ácidos libres, ésteres y/o sales.

El término "alrededor de", como se usa en la presente cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto, peso, tiempo, temperatura y similares, se refiere a variaciones del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 % o incluso 0,1 % de la cantidad especificada.

Las composiciones de la invención que se pueden mencionar incluyen aquellas que contienen una alta concentración de ácidos grasos omega-3, muchos de los cuales se denominan "grasas esenciales" y se consideran particularmente importantes para la salud humana. Los ácidos grasos omega-3 pueden tener efectos beneficiosos sobre los niveles de colesterol HDL, respaldar el desarrollo cerebral en los jóvenes, y se ha demostrado que son beneficiosos para la salud mental. Estos ácidos grasos generalmente se consideran precursores de eicosanoides con propiedades antiinflamatorias. Las composiciones particulares de la invención que se pueden mencionar incluyen aquellas en las que la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en la composición lipídica es de al menos alrededor de 90 %, tal como de al menos alrededor de 95 %, en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Los ácidos grasos omega-6 también se consideran importantes para la salud humana. En particular, ciertos ácidos grasos omega-6 son "grasas esenciales" necesarias para una buena salud, pero el cuerpo no puede sintetizarlos. Sin embargo, se ha demostrado que las grasas omega-6 son precursoras de los eicosanoides con más propiedades proinflamatorias, por lo que cuando se producen demasiados de estos eicosanoides, pueden aumentar la inflamación y la enfermedad inflamatoria. Por lo tanto, puede ser deseable minimizar la cantidad de tales ácidos grasos en composiciones lipídicas. En general, se acepta que la proporción de ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la dieta debe ser de 4:1 o menos. Sin embargo, la dieta occidental normal suele contener una mayor proporción de ácidos grasos omega-6. Las composiciones lipídicas de la presente invención contienen ventajosamente bajas cantidades de ácidos grasos omega-6, mientras que simultáneamente contienen altas cantidades de los ácidos grasos omega-3 más beneficiosos. En una forma de realización, la cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 en la composición es, como máximo, de alrededor de 5 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. En otra forma de realización, la relación del peso total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y el peso total de ácidos grasos

poliinsaturados omega-6 en la composición es de al menos alrededor de 10:1. En una forma de realización adicional, la relación del peso total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y el peso total de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 en la composición es de al menos alrededor de 20:1.

Las composiciones lipídicas que contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga se obtienen típicamente de fuentes marinas (por ejemplo, peces, crustáceos), fuentes de algas o fuentes vegetales (por ejemplo, lino o echium). La materia orgánica de partida se procesa primero para extraer el aceite (generalmente denominado aceite "crudo") que contiene. En el caso de las semillas de plantas, por ejemplo, las semillas se trituran para liberar el aceite que luego se separa de la materia sólida por filtración y/o decantación. Los aceites crudos a menudo contienen niveles de ácidos grasos poliinsaturados que son demasiado bajos para ser útiles (por ejemplo, como productos nutricionales), por lo que se requiere enriquecimiento. Cuando el aceite crudo carece de uno o más componentes esenciales, a menudo es común mezclar aceites crudos o enriquecidos de múltiples fuentes (por ejemplo, de peces y algas) para obtener la composición deseada. De manera alternativa, el enriquecimiento se puede lograr procesando el aceite crudo para eliminar componentes no deseados (por ejemplo, componentes que afectan negativamente el color, el olor o la estabilidad del producto, o ácidos grasos no deseados), mientras se maximizan los niveles de los componentes de ácido graso deseados.

Las composiciones de la presente invención se pueden obtener ventajosamente a partir de una única fuente. El uso de una sola fuente facilita el procesamiento eficiente y económico del aceite crudo y la fabricación de las composiciones lipídicas de la invención. Con la frase "se puede obtener de una sola fuente" (u "obtenida de una única fuente"), se indica que la composición lipídica se puede obtener de uno o más organismos de una sola clase taxonómica. En una forma de realización particular, la composición lipídica no se deriva de múltiples organismos de diferentes clases taxonómicas. Por ejemplo, las composiciones lipídicas pueden no ser mezclas de aceites obtenidos de una combinación de peces y algas, o una combinación de peces y plantas. En cambio, las composiciones lipídicas de la invención (o los aceites "crudos" a partir de los cuales se pueden obtener mediante técnicas de enriquecimiento, como la transesterificación, la destilación y la cromatografía) se pueden obtener de una sola población de organismos, por ejemplo, una sola fuente de materia vegetal o vegetación. Para evitar dudas, la frase "obtenible de una sola fuente" no excluye el uso de múltiples organismos de la misma especie como fuente de la composición lipídica o aceite

"crudo", es decir, el uso de múltiples peces, reservas de algas, plantas, o semillas de plantas que son de la misma especie. Dichos múltiples organismos son preferentemente de la misma especie, o de la misma línea de reproducción, o de la misma variedad vegetal, o de la misma reserva o lote de producción.

En particular, en las composiciones lipídicas de la invención, el DHA está presente en una cantidad de al menos alrededor de 87 % (tal como al menos alrededor de 88 %) en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. Otras composiciones particulares que pueden mencionarse incluyen aquellas que contienen DHA en una cantidad de al menos alrededor de 90 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. En otras formas de realización adicionales de la invención, el DHA está presente en una cantidad de hasta alrededor de 96 % (tal como hasta alrededor de 95 %) en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Se ha descubierto ventajosamente que las composiciones lipídicas de la invención contienen un alto nivel de DHA en relación con la cantidad de EPA presente. Por lo tanto, en una forma de realización, la relación en peso de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico en las composiciones lipídicas es de al menos alrededor de 50:1. En formas de realización adicionales, la relación en peso de ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico en las composiciones lipídicas puede ser superior a alrededor de 100:1, tal como mayor que alrededor de 300:1, y, más particularmente, mayor que alrededor de 500:1.

Favorablemente, la cantidad de EPA en las composiciones puede ser muy baja. En formas de realización particulares, las composiciones lipídicas contienen hasta alrededor de un 1 %, más particularmente hasta alrededor de un 0,5 %, de EPA en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Las composiciones de la invención contienen un segundo ácido graso poliinsaturado en una cantidad de al menos alrededor de 3 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. Dicho segundo ácido graso poliinsaturado es identificable como el segundo ácido graso poliinsaturado más abundante en la composición. El segundo PUFA puede ser cualquier PUFA (o sal, éster o sal de un éster de este), tal como un PUFA omega-3 (por ejemplo, ETA, EPA, SDA o DPA). En formas de realización particulares, dicho segundo PUFA es un ácido graso poliinsaturado omega-3 C:20-24 que contiene al menos 4 insaturaciones. Se prefiere particularmente que el segundo PUFA sea ácido eicosatetraenoico (ETA; 20:4n-3) (o una sal, éster o sal de un éster de este).

En composiciones lipídicas particulares de la invención, el segundo PUFA (por ejemplo, ETA) está presente en una cantidad de alrededor de 3 % a alrededor de 12 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. Otras composiciones particulares que pueden mencionarse incluyen aquellas que contienen el segundo PUFA (por ejemplo, ETA) en una cantidad de alrededor de 4 % a alrededor de 10 % (de alrededor de 5 % a alrededor de 8 %) en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

En una forma de realización, la composición de la invención contiene además ácido α -linolénico (ALA) en una cantidad de alrededor de 0,1 % a alrededor de 4 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. El ALA es una grasa esencial que es importante para la salud humana o animal adecuada. En tales formas de realización adicionales, la composición contiene ALA en una cantidad de alrededor de 0,3 % a alrededor de 4 %, más particularmente de alrededor de 0,5 % a alrededor de 2 %, en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Por lo tanto, una composición lipídica de base vegetal particular de la invención que se puede mencionar es una que comprende:

(i) ácido docosahexaenoico (22:6n-3) en una cantidad de al menos alrededor de 86 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición;

(ii) un segundo ácido graso poliinsaturado en una cantidad de al menos alrededor de 3 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición, en donde el segundo ácido graso poliinsaturado es el segundo ácido graso poliinsaturado más abundante en la composición; y

(iii) ácido α -linolénico (18:3n-3) en una cantidad de alrededor de 0,1 % a alrededor de 4 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición;

en donde el ácido docosahexaenoico, el segundo ácido graso poliinsaturado y el ácido α -linolénico se proporcionan cada uno independientemente en forma de un ácido graso, una sal de ácido graso, un éster de ácido graso o una sal de un éster de ácido graso.

Las composiciones de la invención contienen hasta alrededor de un 0,5 % de ácido palmítico (16:0) en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. En formas de realización particulares, las composiciones contienen hasta alrededor de 0,1 %, más particularmente hasta alrededor de 0,05 %, de ácido palmítico en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Las composiciones de la invención también pueden contener otros ácidos grasos omega-3 (además del DHA y el segundo PUFA) como el ácido docosapentaenoico

(DPA; 22:5n-3) y/o el ácido estearidónico (SDA; 18:4n-3). En una forma de realización particular, las composiciones contienen DPA en una cantidad de al menos alrededor de 0,1 %, particularmente de al menos alrededor de 0,2 %, en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición. En tales formas de realización, el DPA puede estar presente en una cantidad de hasta alrededor de 1 %, más particularmente de hasta alrededor de 0,5 %, en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Las preferencias y opciones para un aspecto, característica o forma de realización de la invención determinada, a menos que el contexto indique lo contrario, deben considerarse divulgadas en combinación con todas y cada una de las preferencias y opciones para todos los demás aspectos, características y formas de realización de la invención. Por ejemplo, las cantidades particulares de DHA, el segundo PUFA y el ALA (si está presente) indicados en los pasajes anteriores se describen en todas las combinaciones.

Una composición lipídica particular que, por lo tanto, se puede mencionar es una que comprende:

(i) ácido docosahexaenoico (22:6n-3) en una cantidad de al menos alrededor de 86 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición;

(ii) ácido eicosatetraenoico (20:4n-3) en una cantidad de al menos alrededor de 3 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición, en donde dicho ácido eicosatetraenoico es el segundo ácido graso poliinsaturado más abundante en la composición; y

(iii) ácido α -linolénico (18:3n-3) en una cantidad de alrededor de 0,1 % a alrededor de 4 % en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición;

en donde el ácido docosahexaenoico, el ácido eicosatetraenoico y el ácido α -linolénico se proporcionan cada uno independientemente en forma de un ácido graso, una sal de ácido graso, un éster de ácido graso o una sal de un éster de ácido graso.

En las composiciones de la invención, el DHA, el ALA (si está presente) y el segundo PUFA pueden estar presentes independientemente en forma de un ácido graso, una sal de ácido graso, un éster de ácido graso o una sal de un éster de ácido graso. En una forma de realización particular, estos componentes toman cada uno la misma forma, por ejemplo, pueden estar todos en forma de un ácido graso, todos en forma de una sal de ácido graso, todos en forma de un éster de ácido graso o todos en forma de una sal de éster de ácido graso. Cuando los componentes están en forma de una sal de ácido graso, éster o sal de un éster, entonces los componentes pueden estar en forma de la misma sal, éster o sal del éster. Por ejemplo, el DHA, el ALA (si está

presente) y el segundo PUFA se pueden proporcionar en forma de un éster etílico del ácido graso.

En una forma de realización particular, el DHA, el ALA (si está presente) y el segundo PUFA se proporcionan independientemente en forma de una sal de un éster de ácido graso o, más particularmente, en la forma de un éster de ácido graso. Las formas adecuadas de ésteres de ácidos grasos son conocidas por las personas del oficio de nivel medio. Por ejemplo, las formas de ésteres de ácidos grasos que son aceptables desde el punto de vista farmacéutico y/o nutricional incluyen ésteres etílicos, ésteres metílicos, fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden requerir diferentes formas de éster según el uso previsto de la composición lipídica. Por ejemplo, los triglicéridos son particularmente adecuados para su uso en alimentos destinados al consumo humano, especialmente el consumo infantil, debido en parte al sabor y la estabilidad de estas formas de éster en el tratamiento térmico (que puede ser necesario para tales productos alimenticios). Los ésteres etílicos son particularmente adecuados para su uso en suplementos dietéticos, ya que estas formas de éster se pueden fabricar de manera eficiente y fácil, y no es necesaria la conversión a una forma de triglicéridos. Por lo tanto, en una forma de realización adicional, el DHA, el ALA (si está presente) y el segundo PUFA se proporcionan cada uno independientemente en forma de un éster etílico de ácido graso o como parte de un triglicérido.

Los triglicéridos son ésteres derivados de glicerol y tres ácidos grasos. Como la presente invención se refiere a mezclas de ácidos grasos, los componentes de ácidos grasos en tales triglicéridos se pueden mezclar en las proporciones correspondientes. Es decir, si bien una mezcla de diferentes moléculas de triglicéridos puede estar presente en una composición, el perfil general de ácidos grasos en la composición es como se define en las reivindicaciones.

Los componentes de ácidos grasos pueden estar presentes, de manera alternativa, en forma de ácidos grasos "libres", es decir, la forma -COOH del ácido graso. Sin embargo, en composiciones particulares de la invención, las composiciones contienen niveles relativamente bajos de ácidos grasos en esta forma porque están asociados con un sabor desagradable (a menudo, "jabonoso"), y son menos estables que los ácidos grasos que están en una forma esterificada. Los ácidos grasos libres se eliminan típicamente de los aceites y composiciones lipídicas mediante refinación física o alcalina, por ejemplo, de acuerdo con los procesos descritos en otra parte de la presente. Por lo tanto, en una forma de realización, el contenido total de ácidos grasos

libres en las composiciones lipídicas es inferior al 5 % (por ejemplo, inferior al 3 %, particularmente inferior al 2 %) en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Los ácidos grasos en las composiciones lipídicas de la invención son típicamente ácidos grasos de cadena lineal (es decir, no ramificada). Las composiciones de la invención que se pueden mencionar incluyen aquellas que contienen niveles muy bajos de ácidos grasos de cadena ramificada y sus ésteres, de modo que la composición está esencialmente libre de ácidos grasos de cadena ramificada y ésteres de ácidos grasos de cadena ramificada. Por "niveles bajos" se debe entender que la composición contiene ácidos grasos de cadena ramificada y ésteres de ácidos grasos en una cantidad de, como máximo, alrededor de 0,1 % en peso del total de ácidos grasos de la composición.

Las composiciones lipídicas de la invención también pueden contener otros componentes (por ejemplo, distintos de los ácidos grasos) que se originan a partir del material de origen y que no se eliminan completamente durante el proceso de extracción y enriquecimiento. Las identidades precisas de esos otros componentes variarán enormemente según el material de origen. Los ejemplos de tales otros componentes incluyen fitoesteroles (es decir, esteroides vegetales y estanoles vegetales) presentes como esteroide libre o como éster de esteroide (como β -sitosterol, β -sitostanol, Δ^5 -avenasterol, campesterol, Δ^5 -stigmasterol, Δ^7 -stigmasterol y Δ^7 -avenasterol, colesterol, brassicasterol, chalinasterol, campesterol, campestanol y eburicol). Otros ejemplos incluyen antioxidantes, tales como tocoferoles y tocotrienoles. Por lo tanto, las composiciones lipídicas particulares de la invención que pueden mencionarse incluyen aquellas que contienen cantidades detectables de uno o más fitoesteroides (tales como β -sitosterol). Dichos esteroides pueden estar presentes en al menos alrededor de 0,01 %, pero típicamente en no más de alrededor de 1 % en peso de la composición lipídica.

Las composiciones de la presente invención pueden obtenerse ventajosamente a partir de fuentes vegetales (fuentes "de plantas"). Por el término "de base vegetal", se debe entender que al menos el 70 % en peso de los lípidos que están presentes en las composiciones de la invención se obtienen de fuentes vegetales. Las fuentes vegetales incluyen plantas, particularmente cultivos tales como los cereales. En al menos una forma de realización, los lípidos se obtienen de un cultivo de oleaginosas tal como *Brassica*, por ejemplo, *Brassica napus* o *Brassica juncea*. Para evitar dudas, sin embargo, no es esencial que las composiciones se obtengan únicamente de dichas fuentes, es decir, una proporción (por ejemplo, como máximo, del 30 % en peso) de los lípidos en las composiciones de la invención se puede obtener de otras fuentes,

incluidos los aceites marinos (por ejemplo, pescado o crustáceos), aceites de algas y combinaciones de estos. En un ejemplo, al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 90 %, en peso de los lípidos que están presentes se obtienen de fuentes vegetales. En composiciones particulares de la invención, esencialmente todos los lípidos (es decir, al menos el 95 %, al menos el 99 %, o alrededor de 100 %) se obtienen de fuentes vegetales.

En una forma de realización, las composiciones de la invención (y los alimentos y composiciones farmacéuticas definidas a continuación) no son de origen animal (por ejemplo, animal marino). Es decir, en tales formas de realización, las composiciones lipídicas no contienen ningún componente que se obtenga de animales, tales como peces y crustáceos. Se cree que las composiciones lipídicas en las que no se obtienen componentes de un animal son ventajosas en términos de contenido de lípidos, y un perfil de estabilidad que se puede lograr siguiendo los procedimientos estándar de refinación y/o enriquecimiento.

El uso de plantas como fuente de lípidos o ácidos grasos ofrece una serie de ventajas. Por ejemplo, se sabe que las fuentes marinas de aceites contienen niveles relativamente altos de contaminantes (como mercurio, PCB y alérgenos de pescado [por ejemplo, parvalbúminas]) que no se encuentran en los materiales vegetales. La sobrepesca histórica también ha agotado las poblaciones de peces y crustáceos (por ejemplo, el krill), por lo que ya no son sustentables. Por lo tanto, la presente invención ofrece una composición de aceite de ácidos grasos poliinsaturados de origen sustentable que contiene niveles relativamente bajos de contaminantes no deseados.

En una forma de realización particular, la composición de la invención se deriva de una planta. Las plantas de las que se obtienen los aceites son típicamente cultivos de semillas oleaginosas, tales como copra, semilla de algodón, linaza, semilla de palma, maní, colza, semilla de soja y girasol. Por lo tanto, las composiciones obtenidas exclusivamente de plantas se pueden denominar aceites "vegetales" o "composiciones lipídicas vegetales". Las plantas adecuadas a partir de las cuales se pueden obtener las composiciones lipídicas de la invención son conocidas por las personas del oficio de nivel medio e incluyen *Brassica sp.*, *Gossypium hirsutum*, *Linum usitatissimum*, *Helianthus sp.*, *Carthamus tinctorius*, *Glycine max*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*, *Avena sativa*, *Trifolium sp.*, *Elaeagnus guineensis*, *Nicotiana benthamiana*, *Hordeum vulgare*, *Lupinus angustifolius*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Camelina sativa*, o *Crambe abyssinica*. Una fuente vegetal particular que puede mencionarse a este respecto es *Brassica sp.*

Las fuentes adecuadas (incluidas las fuentes marinas, de algas y vegetales) pueden ser naturales, o pueden ser modificadas genéticamente para mejorar su habilidad de producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los expertos en la técnica conocen ejemplos de fuentes vegetales que se han modificado genéticamente para este propósito, es decir, que se originan a partir de células vegetales recombinantes, y se describen en las solicitudes de patente internacional n.º PCT/AU2013/000639 (publicada como WO 2013/185184), PCT/AU2014/050433 (publicada como WO 2015/089587) y PCT/AU2015/050340 (publicada como WO 2015/196250). La canola modificada genéticamente se describe en los documentos WO 2017/218969 y WO 2017/219006. Las descripciones en todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan como referencia en su totalidad.

Las composiciones lipídicas de la invención se pueden obtener directamente de una fuente natural (por ejemplo, un animal, algas y/o una planta). Sin embargo, normalmente es necesario procesar los aceites obtenidos de fuentes naturales para enriquecerlos. Los procesos de enriquecimiento adecuados se ejemplifican en los Ejemplos.

Las fuentes adecuadas de composiciones lipídicas de la invención, o aceites "crudos" que se pueden mezclar o enriquecer para producir esas composiciones, incluyen especies marinas, algas y plantas. Los procesos para obtener aceites de fuentes marinas son bien conocidos en el estado de la técnica.

Las fuentes vegetales (como las fuentes de semillas oleaginosas) son particularmente adecuadas debido a los bajos niveles de ciertos contaminantes y la sustentabilidad superior, como se analizó anteriormente. Las plantas como *Brassica sp.* (por ejemplo, canola) producen semillas que se pueden procesar para obtener aceite.

Extracción de aceites/lípidos.

Las técnicas que se practican habitualmente en el estado de la técnica pueden utilizarse para extraer, procesar y analizar aceites producidos por plantas y semillas. Por lo general, las semillas de plantas se cocinan, se prensan, y se extrae el aceite para producir aceite crudo. Ese aceite puede, a su vez, ser desgomado, refinado, blanqueado y/o desodorizado. Se ha descubierto que una combinación de desgomado, refinado, blanqueamiento y desodorizado es particularmente eficaz para preparar mezclas de lípidos enriquecidas con DHA. Así, en una forma de realización, la composición lipídica se obtiene de un aceite de semilla que se ha desgomado, refinado, blanqueado y/o desodorizado. Sin embargo, no es necesario que los aceites se procesen de esta manera y se puede lograr una purificación y un enriquecimiento adecuados sin estos

métodos.

En general, las técnicas para triturar semillas son conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, las semillas oleaginosas se pueden atemperar rociándolas con agua para elevar el contenido de humedad, por ejemplo, un 8,5 %, y se descascaran utilizando un rodillo liso con un espacio de separación de 0,23 mm a 0,27 mm. Según el tipo de semilla, es posible que no se agregue agua antes de la trituración. La extracción también se puede lograr mediante un proceso de extrusión. El proceso de extrusión puede o no usarse en lugar del descascaramiento, y algunas veces se usa como un proceso adicional antes o después del prensado de tornillos.

En una forma de realización, la mayoría del aceite de semilla se libera mediante trituración utilizando una prensa de tornillo. El material sólido expulsado de la prensa de tornillo se extrae luego con un solvente, por ejemplo, hexano, utilizando una columna de trazado térmico, después de lo cual el solvente se elimina del aceite extraído. De manera alternativa, el aceite crudo producido por la operación de prensado puede hacerse pasar a través de un tanque de sedimentación con una parte superior de drenaje de alambre ranurado para eliminar los sólidos que se expresan con el aceite durante la operación de prensado. El aceite clarificado se puede hacer pasar a través de un filtro de placa y marco para eliminar las partículas sólidas finas restantes. Si se desea, el aceite recuperado del proceso de extracción se puede combinar con el aceite clarificado para producir un aceite crudo mezclado. Una vez que el solvente se elimina del aceite crudo, las porciones prensadas y extraídas se combinan y se someten a los procedimientos normales de procesamiento de aceite.

Refinamiento y purificación

Como se usa en la presente, el término "purificado" cuando se usa en relación con el lípido o aceite de la invención significa típicamente que el lípido o aceite extraído se ha sometido a una o más etapas de procesamiento para aumentar la pureza del componente de lípido/aceite. Por ejemplo, las etapas de purificación pueden comprender uno o más de: desgomado, desodorización, decoloración o secado del aceite extraído. Sin embargo, como se usa en la presente, el término "purificado" no incluye un proceso de transesterificación u otro proceso que altere la composición de ácidos grasos del lípido o aceite de la invención para aumentar el contenido de DHA como porcentaje del contenido total de ácidos grasos. Expresado en otras palabras, la composición de ácidos grasos del lípido o aceite purificado es esencialmente la misma que la del lípido o aceite no purificado.

Los aceites vegetales pueden ser refinados (purificados) una vez extraídos de la

fuente vegetal, utilizando uno o más de los siguientes procesos, y particularmente utilizando una combinación de desgomado, refinación alcalina, blanqueamiento y desodorización. Las personas del oficio de nivel medio conocen métodos adecuados (por ejemplo, los descritos en el documento WO 2013/185184).

El desgomado es una etapa temprana en la refinación de aceites y su propósito principal es la eliminación de la mayoría de los fosfolípidos del aceite. La adición de alrededor de 2 % de agua, que típicamente contiene ácido fosfórico, a una temperatura de 70 a 80 °C, al aceite crudo resulta en la separación de la mayoría de los fosfolípidos acompañados por trazas metálicas y pigmentos. El material insoluble que se elimina es principalmente una mezcla de fosfolípidos y triacilglicerolos. El desgomado se puede realizar mediante la adición de ácido fosfórico concentrado al aceite de semilla crudo para convertir los fosfátidos no hidratables en una forma hidratable y para quelar los metales menores que están presentes. La goma se separa del aceite de semilla mediante centrifugación.

La refinación alcalina es uno de los procesos de refinación para el tratamiento de aceite crudo, a veces también conocido como neutralización. Suele seguir el desgomado y precede al blanqueamiento. Después del desgomado, el aceite de semilla se puede tratar mediante la adición de una cantidad suficiente de una solución alcalina para titular todos los ácidos grasos libres y ácido fosfórico, y eliminar los jabones así formados. Los materiales alcalinos adecuados incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio e hidróxido de amonio. La refinación alcalina se realiza normalmente a temperatura ambiente y elimina la fracción de ácidos grasos libres. El jabón se elimina mediante centrifugación o mediante extracción en un solvente para el jabón, y el aceite neutralizado se lava con agua. Si es necesario, cualquier exceso de alcalino en el aceite se puede neutralizar con un ácido adecuado, como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

El blanqueamiento es un proceso de refinación en el que los aceites se calientan entre 90 y 120 °C durante 10 a 30 minutos en presencia de una tierra blanqueadora (0,2 a 2,0 %) y en ausencia de oxígeno mediante la operación con nitrógeno o vapor o al vacío. El blanqueamiento está diseñado para eliminar pigmentos no deseados (carotenoides, clorofila, etc.) y el proceso también elimina productos de oxidación, trazas metálicas, compuestos de azufre y trazas de jabón.

La desodorización es un tratamiento de aceites y grasas a alta temperatura (por ejemplo, alrededor de 180 °C) y baja presión (0,1 a 1 mm Hg). Esto se logra típicamente mediante la introducción de vapor en el aceite de semilla a una velocidad de alrededor

de 0,1 ml/minuto/100 ml de aceite de semilla. Después de unos 30 minutos de rocío, se deja enfriar el aceite de semilla al vacío. Este tratamiento mejora el color del aceite de semilla y elimina la mayoría de las sustancias volátiles o compuestos olorosos, incluidos los ácidos grasos libres restantes, monoacilgliceroles y productos de oxidación.

La winterización es un proceso que a veces se usa en la producción comercial de aceites para la separación de aceites y grasas en fracciones sólidas (estearina) y líquidas (oleína) mediante cristalización a temperaturas subambientales. Se aplicó originalmente al aceite de semilla de algodón para producir un producto libre de sólidos. Normalmente se utiliza para disminuir el contenido de ácidos grasos saturados de los aceites.

Transesterificación

Los aceites crudos generalmente contienen los ácidos grasos deseados en forma de triacilgliceroles (TAG). La transesterificación es un proceso que se puede usar para intercambiar los ácidos grasos dentro y entre los TAG o para transferir los ácidos grasos a otro alcohol para formar un éster (como un éster etílico o un éster metílico). En formas de realización de la invención, la transesterificación se logra usando medios químicos, que típicamente incluyen un ácido o una base fuertes como catalizador. El etóxido de sodio (en etanol) es un ejemplo de una base fuerte que se usa para formar ésteres etílicos de ácidos grasos mediante transesterificación. El proceso se puede realizar a temperatura ambiente o a temperatura elevada (por ejemplo, hasta alrededor de 80 °C).

En otras formas de realización de la invención, la transesterificación se logra usando una o más enzimas, particularmente lipasas que se sabe que son útiles para hidrolizar enlaces de éster, por ejemplo, en glicéridos. La enzima puede ser una lipasa que es específica de la posición (específica de *sn*-1/3 o *sn*-2) para el ácido graso en el triacilglicérido, o que tiene una preferencia por algunos ácidos grasos sobre otros. Las enzimas particulares que pueden mencionarse incluyen Lipozyme 435 (disponible de Novozymes A/S). El proceso se realiza, por lo general, a temperatura ambiente. El proceso se realiza, por lo general, en presencia de una cantidad en exceso del alcohol correspondiente a la forma de éster deseada (por ejemplo, usando etanol para formar ésteres etílicos de los ácidos grasos).

Destilación

La destilación molecular es un método eficaz para eliminar cantidades significativas de los componentes más volátiles, como los ácidos grasos saturados, de los aceites crudos. La destilación se realiza típicamente a presión reducida, por ejemplo,

por debajo de alrededor de 1 mbar. La temperatura y el tiempo se pueden elegir para lograr una división de aproximadamente 50:50 entre el destilado y el residuo después de un tiempo de destilación de unas pocas (por ejemplo, 1 a 10) horas. Las temperaturas de destilación típicas utilizadas en la producción de las composiciones lipídicas de la presente invención están en la región de 120 °C a 180 °C, particularmente, entre 145 °C y 160 °C.

Se pueden realizar múltiples destilaciones, y cada destilación se considera completa cuando se logra una división de aproximadamente 50:50 entre el destilado y el residuo. El uso de destilaciones sucesivas reduce el rendimiento general, sin embargo, dos destilaciones pueden producir resultados óptimos.

Cromatografía

La cromatografía es un método eficaz para separar los diversos componentes de las mezclas de LC-PUFA. Puede usarse para aumentar la concentración de uno o más LC-PUFA preferidos dentro de una mezcla. La separación cromatográfica se puede lograr en una variedad de condiciones, pero típicamente implica el uso de un sistema cromatográfico de lecho estacionario o un sistema de lecho móvil simulado.

Un sistema cromatográfico de lecho estacionario se basa en el siguiente concepto: una mezcla cuyos componentes se van a separar (normalmente junto con un eluyente) se hacen percolar a través de una columna que contiene un relleno de un material poroso (la fase estacionaria) que exhibe una alta permeabilidad a los fluidos. La velocidad de percolación de cada componente de la mezcla depende de las propiedades físicas de ese componente para que los componentes salgan de la columna de forma sucesiva y selectiva. Por lo tanto, algunos de los componentes tienden a fijarse fuertemente en la fase estacionaria y, por lo tanto, se retrasarán más, mientras que otros tienden a fijarse débilmente y salir de la columna en poco tiempo.

Un sistema de lecho móvil simulado consiste en una serie de columnas individuales que contienen adsorbente que están conectadas en serie y que se operan cambiando periódicamente la mezcla y los puntos de inyección de eluyente y también los puntos de recolección de componentes separados en el sistema, por lo que el efecto general es simular la operación de una sola columna que contiene un lecho móvil del adsorbente sólido. Por lo tanto, un sistema de lecho móvil simulado consta de columnas que, como en un sistema de lecho estacionario convencional, contienen lechos estacionarios de adsorbente sólido a través de los cuales se hace pasar el eluyente, pero en un sistema de lecho móvil simulado, la operación es tal que simula un lecho en movimiento continuo a contracorriente.

Las columnas utilizadas en estos procesos suelen contener sílice (o una sílice modificada) como base para la fase estacionaria. La fase móvil (eluyente) es típicamente una mezcla de solventes altamente polar, que a menudo contiene uno o más solventes próticos, como agua, metanol, etanol y similares, así como mezclas de estos. La persona del oficio de nivel medio puede ajustar la velocidad de flujo del eluyente para optimizar la eficiencia del proceso de separación con velocidades de flujo más lentas que generalmente mejoran la separación de los componentes y facilitan la obtención de composiciones que contienen niveles muy altos de un solo ácido graso. La separación cromatográfica se puede repetir para lograr un aumento de pureza similar. Las personas del oficio de nivel medio conocen los métodos de detección de los LC-PUFA, e incluyen métodos de absorción UV-vis y métodos de detección del índice de refracción.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona por lo tanto un proceso para producir una composición lipídica de la invención, cuyo proceso comprende proporcionar una mezcla de ésteres etílicos de ácidos grasos y someter dicha mezcla a un proceso cromatográfico de separación. La presente invención también se refiere a composiciones lipídicas que se pueden obtener mediante tales procedimientos. Las condiciones de separación cromatográfica adecuadas incluyen las descritas en la presente.

Por ejemplo, una fase móvil particular que se puede usar en la separación cromatográfica es una mezcla de metanol y agua (por ejemplo, 88 % metanol / agua), aunque esto puede cambiarse (por ejemplo, para aumentar el contenido de metanol) durante el proceso de separación para mejorar la eficiencia. Una fase estacionaria particular que se puede usar es una fase estacionaria a base de sílice, tal como una columna Deltaprep C18. La HPLC analítica, o cualquier otra técnica adecuada conocida por la persona del oficio de nivel medio, se puede realizar en las fracciones obtenidas para identificar aquellas que contienen altas concentraciones de DHA y, por lo tanto, contienen las composiciones lipídicas de la invención.

En una forma de realización del segundo aspecto de la invención, la mezcla de ésteres etílicos de ácidos grasos se obtiene por transesterificación y destilación de un aceite lipídico de base vegetal, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los procesos descritos anteriormente. El aceite lipídico de base vegetal se puede obtener de cualquiera de las plantas, particularmente las semillas oleaginosas, descritas en la presente o conocidas de otro modo en el estado de la técnica. Antes de la transesterificación y la destilación, se puede realizar opcionalmente la refinación del aceite lipídico de origen vegetal utilizando desgomado, refinación alcalina,

blanqueamiento y/o desodorización.

Otros métodos de enriquecimiento

Las composiciones lipídicas de la presente invención son útiles como ingredientes farmacéuticos activos (API) o como precursores (o "intermediarios") de los API que se pueden obtener a partir de estos mediante enriquecimiento adicional. Tales composiciones se enriquecerían aún más en los niveles de PUFA beneficiosos, tales como DHA y/o ALA.

La concentración de ácidos grasos poliinsaturados en un aceite se puede aumentar mediante una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica, como, por ejemplo, la cristalización por congelación, la formación de complejos utilizando urea, la extracción con fluidos supercríticos y la formación de complejos con iones de plata. La formación de complejos con urea es un método simple y eficiente para reducir el nivel de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el aceite. Inicialmente, los TAG del aceite se dividen en sus ácidos grasos constituyentes, a menudo en forma de ésteres de ácidos grasos. Estos ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos, que generalmente no se alteran en composición de ácidos grasos por el tratamiento, se pueden mezclar con una solución etanólica de urea para la formación de complejos. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados forman complejos fácilmente con la urea y se cristalizan al enfriarse, y luego se pueden eliminar mediante filtración. La fracción que no forma complejos con urea se enriquece así con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Productos

Las composiciones lipídicas de la presente invención son aceites a granel. Es decir, la composición lipídica se ha separado de la materia de origen (por ejemplo, semillas de plantas) de la que se obtuvo una parte o la totalidad del lípido.

Las composiciones lipídicas de la presente invención se pueden usar como alimentos. Es decir, las composiciones de la invención pueden proporcionarse en una forma disponible por vía oral. Para los fines de la presente invención, los "alimentos" incluyen cualquier alimento o preparación para el consumo humano que, cuando se ingiere, sirve para nutrir o desarrollar tejidos o suministrar energía; y/o mantiene, restaura o apoya el estado nutricional adecuado o la función metabólica. Los alimentos incluyen composiciones nutricionales para bebés y/o niños pequeños como, por ejemplo, la fórmula infantil. En el caso de los alimentos, los ácidos grasos pueden proporcionarse en forma de triglicéridos para minimizar aún más los sabores desagradables y maximizar la estabilidad.

Los alimentos comprenden una composición lipídica de la invención opcionalmente junto con un vehículo adecuado. El término "vehículo" se utiliza en su sentido más amplio para abarcar cualquier componente que pueda o no tener valor nutricional. Como apreciará la persona del oficio de nivel medio, el vehículo debe ser adecuado para su uso (o usarse en una concentración suficientemente baja) en un alimento tal que no cause un efecto perjudicial sobre un organismo que consume el alimento.

La composición del alimento puede estar en forma sólida o líquida. Además, la composición puede incluir macronutrientes, proteínas, carbohidratos, vitaminas y/o minerales comestibles en cantidades deseadas para un uso particular como son bien conocidos en el estado de la técnica. Las cantidades de estos ingredientes variarán dependiendo de si la composición está pensada para su uso con personas normales o para personas con necesidades especializadas, como personas que sufren trastornos metabólicos y similares.

Los ejemplos de vehículos adecuados con valor nutricional incluyen macronutrientes como las grasas comestibles (por ejemplo, aceite de coco, aceite de borraja, aceite fúngico, aceite de grosella negra, aceite de soja y mono y diglicéridos), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, lactosa comestible y almidón hidrolizado) y proteínas (por ejemplo, proteínas de soja, suero de leche electrodiálizado, leche descremada electrodiálizada, suero de leche o los hidrolizados de estas proteínas).

Las vitaminas y minerales que se pueden agregar al alimento descrito en la presente incluyen, por ejemplo, calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo y vitaminas A, E, D, C, y el complejo B.

Las composiciones lipídicas de la presente invención se pueden usar en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones farmacéuticas comprenden la composición de lípidos de la invención, opcionalmente, junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico, que son conocidos para la persona del oficio de nivel medio. Los excipientes, diluyentes o vehículos adecuados incluyen solución salina amortiguada con fosfato, agua, etanol, polioles, agentes humectantes o emulsiones, tales como una emulsión de agua/aceite. La composición puede estar en forma líquida o sólida, por ejemplo, como una solución, suspensión, emulsión, aceite o polvo. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de comprimido, cápsula, gel encapsulado, polvo o líquido (incluido un aceite o solución) ingeribles, emulsión o pomada o crema tópica. La composición farmacéutica también se puede proporcionar como una preparación intravenosa.

Las formas particulares adecuadas para alimentos y para composiciones farmacéuticas incluyen cápsulas que contienen líquidos y geles encapsulados.

Las composiciones lipídicas de la invención se pueden mezclar con otros lípidos o mezclas de lípidos (particularmente ésteres de ácidos grasos de base vegetal y mezclas de ésteres de ácidos grasos) antes de su uso. Las composiciones lipídicas de la invención se pueden proporcionar junto con uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en un antioxidante (por ejemplo, un tocoferol [como alfa-tocoferol o gamma-tocoferol] o un tocotrienol), un estabilizante y un tensioactivo. El alfa-tocoferol y el gamma-tocoferol son componentes naturales en varios aceites de semillas de plantas, incluidos los aceites de canola.

También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de suspensión, agentes endulzantes, agentes saborizantes y agentes perfumantes. Las suspensiones, además de las composiciones lipídicas de la invención, pueden comprender agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

Las formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas se pueden preparar usando técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, los ácidos grasos producidos de acuerdo con los métodos descritos en la presente pueden comprimirse con bases de comprimidos convencionales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes tales como acacia, almidón de maíz o gelatina, agentes disgregantes tales como almidón de papa o ácido algínico, y un lubricante tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Las cápsulas se pueden preparar incorporando estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con la composición lipídica relevante y opcionalmente uno o más antioxidantes.

Las posibles vías de administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, enteral (por ejemplo, oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, una preparación líquida se puede administrar por vía oral o rectal. Además, una mezcla homogénea puede dispersarse completamente en agua, mezclarse en condiciones estériles con diluyentes, conservantes, amortiguadores o propelentes fisiológicamente aceptables para formar un aerosol o inhalante.

Las composiciones lipídicas de la invención están indicadas como productos

farmacéuticos. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición de la invención, que incluye cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente en la presente, para uso como producto farmacéutico.

Las composiciones lipídicas de la invención pueden proporcionar una serie de beneficios que están típicamente asociados a ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Por ejemplo, las composiciones lipídicas de la invención, y las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente en la presente, se pueden usar en el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares, prevención de la muerte en pacientes con enfermedades cardiovasculares, reducción de los niveles de colesterol en suero total, reducción de la PA alta, aumento en la relación HDL:LDL, reducción de los triglicéridos o reducción de los niveles de apolipoproteína B, según se determine mediante pruebas que son bien conocidas por los expertos. Por consiguiente, también se describen métodos para tratar (o prevenir) las enfermedades y afecciones enumeradas anteriormente usando las composiciones lipídicas de la invención.

Como se usa en la presente, los términos "tratamiento" y "tratar" se refieren a revertir, aliviar, inhibir el progreso de una enfermedad o trastorno como se describe en la presente, o retrasar, eliminar o reducir la incidencia o aparición de un trastorno o enfermedad como se describe en la presente, en comparación con lo que ocurriría en ausencia de la medida tomada. Como se usa en la presente, los términos "prevenir" y "prevención" se refieren a la reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una afección determinada, o la reducción o inhibición de la recurrencia o dicha afección en un sujeto que no está enfermo.

Una dosis típica de un ácido graso particular es de 0,1 mg a 20 g, tomada de una a cinco veces por día (hasta 100 g diarios) y está particularmente en el rango de alrededor de 10 mg a alrededor de 1, 2, 5, o 10 g diarios (tomados en una o múltiples dosis). Como se conoce en la técnica, es conveniente un mínimo de alrededor de 300 mg/día de ácidos grasos, especialmente LC-PUFA. Sin embargo, se apreciará que cualquier cantidad de ácido graso será beneficiosa para el sujeto.

Cuando se usa como una composición farmacéutica, la dosis de la composición lipídica que se administrará al paciente puede ser determinada por una persona del oficio de nivel medio y depende de varios factores como el peso del paciente, la edad del paciente, la salud general del paciente, historial del paciente, estado inmunitario del paciente, etc.

Las composiciones de la invención son composiciones que se pueden obtener

fácilmente que pueden tener un perfil de estabilidad mejorado y que pueden contener una mezcla de ácidos grasos en la que las proporciones relativas de ácidos grasos omega-3 y omega-6 son particularmente beneficiosas para la salud humana. La estabilidad puede evaluarse utilizando una variedad de métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio. Dichos métodos incluyen el método de Rancimat, la evaluación de la formación de propanal (particularmente adecuada para los ácidos grasos omega-3), la evaluación de la formación de hexanal (particularmente adecuada para los ácidos grasos omega-6), el método del "valor de peróxido" (por ejemplo, utilizando el método oficial de AOCS Cd 8-53) y el método del "valor de p-anisidina" (por ejemplo, utilizando el método oficial de AOCS Cd 18-90). En los Ejemplos se muestra que las composiciones de la invención se pueden obtener a partir de mezclas de partida que no muestran un perfil de estabilidad mejorado en comparación con las mezclas de referencia (las mezclas de referencia tienen una composición similar con respecto a los LC-PUFA clave) pero que contienen una cantidad significativa de lípidos de origen animal (pescado).

Las composiciones de la invención también pueden tener la ventaja de que pueden ser más eficaces, menos tóxicas, de acción más prolongada, más potentes, producir menos efectos secundarios, absorberse más fácilmente y/o tener un mejor perfil farmacocinético (por ejemplo, mayor biodisponibilidad oral y/o menor depuración) que las composiciones lipídicas conocidas en el estado de la técnica, y/o pueden tener otras propiedades farmacológicas, físicas o químicas útiles diferentes a estas.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos en donde:

La Figura 1 muestra los datos de liberación de propanal para el aceite de canola y el aceite de referencia (después de la transesterificación, la destilación y la cromatografía), lo que demuestra la estabilidad mejorada del aceite de canola descrito en la presente; y

La Figura 2 muestra los datos de liberación de propanal para el aceite de canola y el aceite de referencia (después de la refinación RBD, la transesterificación, la destilación y la cromatografía), lo que demuestra la estabilidad mejorada del aceite de canola descrito en la presente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Extracción de aceite de canola con DHA de semillas

La canola de una variedad descrita en la publicación de patente estadounidense n.º US 2018/0016590 A1 se cultivó como un cultivo de verano. La semilla se cosechó y luego se almacenó a temperatura ambiente antes de la trituración.

Se trituraron 272 kg de la semilla para producir aceite con DHA utilizando una prensa de tornillo Kern Kraft KK80. La temperatura del calentador del collar del expulsor se ajustó a la temperatura máxima establecida en el termostato. La temperatura ambiente inicial y de estrangulamiento fue de 20 °C y la distancia estrangulamiento se estableció en 73,92 mm. La semilla se alimentó con recolección continua de aceite y harina sin detener el expulsor hasta que se trituró toda la semilla.

La velocidad de rotación del tornillo sinfín, la temperatura de la harina y el aceite expulsado se controlaron durante todo el prensado. El tiempo de trituración fue de 4 horas para 270 kg, que representa una tasa de rendimiento de 67,5 kg/h. Se obtuvo un rendimiento de 87,2 kg (32 %) de aceite crudo. Después de filtrar para eliminar las partículas finas, el rendimiento fue de 77,2 kg (28 %).

Ejemplo 2 - Aceite de mezcla de referencia

El aceite de pescado puro contiene niveles bajos de ácidos grasos ALA y niveles significativamente más altos de EPA y DHA. Se diseñó una mezcla de aceite de referencia (denominada aquí como "aceite de mezcla de referencia con triglicéridos crudo" o similar) para que sea lo más similar posible en cuanto a su composición al aceite de canola con DHA filtrado obtenido en el Ejemplo 1. Esto se obtuvo (a) haciendo coincidir el nivel total de DHA con el del aceite de canola con DHA y (b) haciendo coincidir la proporción de DHA/(ALA+EPA). Esto se logró mezclando un aceite de pescado rico en DHA (atún), un aceite rico en ALA (aceite de linaza) y aceite de canola estándar. El aceite de mezcla de referencia resultante también tiene un contenido total de omega-3 similar al del aceite de canola con DHA.

Ejemplo 3 – Composiciones de ácidos grasos del aceite de canola crudo con DHA y la mezcla de referencia

Se analizaron las composiciones de ácidos grasos del aceite crudo filtrado y del aceite de mezcla de referencia. Los resultados se muestran a continuación.

Ácido graso		Aceite de canola crudo con DHA (% en peso)	Aceite de referencia crudo (% en peso)
Palmítico	C16:0	4,3	9,6
Esteárico	C18:0	1,9	3,8
Oleico	C18:1n9c	39,4	30,6
Cis-vaccénico	C18:1n7c	3,6	2,0
Linoleico	C18:2n6c	7,8	11,5
GLA	C18:3n6	0,1	0,1
ALA	C18:3n3	21,9	21,2
Araquídico	C20:0	0,7	0,4
SDA	C18:4n3	2,2	0,2

Ácido graso		Aceite de canola crudo con DHA (% en peso)	Aceite de referencia crudo (% en peso)
Gondoico	C20:1n9c	1,4	0,8
Behénico	C22:0	0,3	0,2
ETA	C20:4n3	1,0	0,1
Erúcico	C22:1n9c	0,0	0,1
EPA	C20:5n3	0,4	1,7
DPA3	C22:5n3	0,9	0,4
DHA	C22:6n3	10,2	9,8
	Otro	4,0	7,6

Ejemplo 4 - Evaluación de la estabilidad del aceite

Se realizó un estudio de estabilidad Rancimat utilizando el aceite de canola con DHA crudo y la mezcla de referencia descritos en los Ejemplos 1 y 2, respectivamente. El método consistía en probar alrededor de 2,5 g de material de prueba utilizando los procedimientos estándar para un Metrohm 743 Rancimat a 90 °C.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos de estos aceites a 90 °C. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Aceite	Tiempo	
Aceite de canola con DHA	7 h 29 min	7 h 17 min
Aceite de referencia	10 h 26 min	10 h 11 min

El aceite de canola con DHA mostró una estabilidad consistentemente más deficiente que el aceite de referencia.

Ejemplo 5 - Transesterificación química del aceite crudo de canola con DHA

A un quimiorreactor Buchi CR101 seco, purgado con nitrógeno y equipado con un agitador mecánico, se agregó etanol absoluto (12,5 l) y el aceite de canola con triglicéridos crudo ("aceite de canola con DHA") obtenido en el Ejemplo 1 (5,00 kg), y la mezcla se agitó.

A la mezcla anterior se agregó etóxido de sodio (150 g) que se enjuagó en el reactor con etanol absoluto adicional (2,5 l) y se continuó agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. Un espectro de ¹H RMN registrado de una muestra tomada de la mezcla indicó que la reacción se había completado.

El procedimiento de transesterificación se realizó con 5,22 kg de aceite de canola crudo con DHA. A la mezcla de reacción cruda resultante se agregaron alcoholes de petróleo con punto de ebullición a 40-60 °C (alcohol de petróleo, 10 l) y agua (10 l) y la mezcla se acidificó cuidadosamente a pH 7 con ácido clorhídrico al 10 % (se requieren

870 ml en total, tiras indicadoras universales Merck, pH 0-14) con agitación exhaustiva.

La mezcla resultante se dejó reposar en el reactor, después de lo cual se formaron 2 fases. La capa de alcohol de petróleo se eliminó, y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con alcohol de petróleo (3x5 l). Las capas de alcohol de petróleo combinadas se devolvieron al reactor y se evaporaron al vacío hasta obtener un volumen disminuido (aprox. 10 l). La solución concentrada resultante se drenó del reactor, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro (aprox. 1 kg), se filtró y se concentró al vacío para producir un aceite amarillo (5,13 kg).

Ejemplo 6 – Transesterificación química del aceite de mezcla de referencia crudo

A un quimiorreactor Buchi CR101 seco, purgado con nitrógeno y equipado con un agitador mecánico, se agregó etanol absoluto (12,5 l) y el aceite de mezcla de referencia con triglicéridos crudo obtenido de acuerdo con el Ejemplo 2 (5,00 kg), y la mezcla se agitó.

A la mezcla anterior se agregó etóxido de sodio (150 g) que se enjuagó en el reactor con etanol absoluto adicional (2,5 l) y se continuó agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. Un espectro de ^1H RMN registrado de una muestra indicó que se había producido poca o ninguna reacción. Se añadió más etóxido de sodio (57 g) a la mezcla y se continuó agitando.

Después de 5 horas adicionales, un espectro de ^1H RMN de una muestra indicó que la reacción se había completado en un 75 %. Se añadió etóxido sódico adicional (60 ml de una solución al 21 % en etanol) a la mezcla y se continuó agitando durante 3 días, después de lo cual se completó la reacción.

Ejemplo de aislamiento de producto a partir de la transesterificación química de la mezcla de referencia cruda

El procedimiento de transesterificación se realizó con 5,17 kg de aceite de mezcla de referencia crudo. A la mezcla de reacción cruda resultante se agregó alcohol de petróleo (15 l) y agua (3,3 l), y la mezcla se acidificó cuidadosamente a pH 7 con 10 % de ácido clorhídrico (se requieren 910 ml en total) con agitación exhaustiva.

La mezcla resultante se dejó reposar en el reactor, después de lo cual se formaron 2 fases. La capa de alcohol de petróleo se eliminó, y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con alcohol de petróleo (2x7,5 l). Las capas de alcohol de petróleo combinadas se devolvieron al reactor y se evaporaron al vacío hasta obtener un volumen disminuido (aprox. 10 l). La solución concentrada resultante se drenó del reactor, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro (aprox. 1 kg), se filtró y se concentró al vacío para producir un aceite amarillo (5,39 kg).

Ejemplo 7 - Destilación de aceites de canola transesterificados

Procedimiento estándar para la eliminación de más componentes volátiles de mezclas de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) mediante destilación al vacío

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) crudos del aceite de canola crudo con DHA (obtenido en el Ejemplo 5) se sometieron a destilación en las siguientes condiciones. La separación mediante destilación se logró haciendo pasar el aceite crudo transesterificado a través de una película renovada Pope de 2 pulgadas (50 mm), todavía al vacío, equipada con 2 matraces de recolección de 1000 ml que recolectan el destilado y el residuo. Cada uno fue analizado para determinar la composición de ácidos grasos.

El vacío fue suministrado por una bomba rotativa Edwards 3 y el vacío medido por un medidor de vacío ebro VM2000.

El aceite fue suministrado al alambique por una bomba peristáltica Easy-Load II de Cole-Palmer Instrument Company a 4 ml/min con el motor del alambique configurado a 325 rpm con condensador de agua usado para condensar el destilado. El suministro continuó hasta el momento en que uno u otro de los matraces receptores estuvieron llenos.

El aceite crudo de FAEE de canola con DHA se destiló en estas condiciones con las bandas del calentador inicialmente configuradas a 147 °C. El objetivo fue obtener una división 50:50 de destilado:residuo. Durante los primeros 30-45 minutos del experimento, la temperatura de las bandas del calentador se aumentó a 154 °C para aumentar la proporción del aceite que se destilaba y luego el alambique se dejó equilibrar. Después de media hora, la temperatura de las bandas del calentador se ajustó durante media hora hasta 149 °C. El resto de la destilación se realizó a 149 °C. El tiempo total de destilación fue de 350 minutos. Una porción del residuo de la destilación anterior se sometió nuevamente a la eliminación de más componentes volátiles por destilación en las condiciones estándar con la temperatura de las bandas del calentador configurada a 149 °C. El tiempo total de destilación fue de 95 minutos.

Destilación	Suministro	Destilado	Residuo
Primero	1395,4 g	699,5 g	690,5 g
Segundo	376,3 g	211,7 g	160,3 g

Ejemplo 8 - Destilación de FAEE derivados de mezcla de referencia cruda transesterificada

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) crudos de la mezcla de referencia cruda (obtenida en el Ejemplo 6) se sometieron a destilación en las mismas condiciones

que se muestran en el Ejemplo anterior.

La mezcla de referencia de FAEE se destiló en estas condiciones estándar con las bandas del calentador inicialmente configuradas a 152 °C. El objetivo fue obtener una división 50:50 de destilado:residuo. Después de 20 minutos, la temperatura de las bandas del calentador se configuró a 154 °C para aumentar el flujo de destilado. Después de una hora adicional, la temperatura de las bandas del calentador se configuró a 153 °C y luego a 152 °C durante la siguiente hora. Durante la última hora de la destilación, la temperatura de las bandas del calentador se configuró a 153 °C. El tiempo total de destilación fue de 380 minutos. El residuo de la destilación anterior se sometió nuevamente a la eliminación de más componentes volátiles por destilación en las condiciones estándar. El objetivo fue obtener una división 50:50 de destilado:residuo. La destilación se realizó principalmente con las bandas del calentador configuradas a 150-151 °C. El tiempo total de destilación fue de 195 minutos.

Destilación	Suministro	Destilado	Residuo
Primero	1515,7 g	729,6 g	775,1 g
Segundo	768,5 g	399,7 g	363,3 g

Ejemplo 9 - Separación cromatográfica de FAEE derivados de canola

HPLC preparativa

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) obtenidos en el Ejemplo 7 (es decir, que se habían obtenido a partir de aceite de canola crudo con DHA y se procesaron mediante transesterificación y destilación) se sometieron a separación cromatográfica en las siguientes condiciones. Un sistema de HPLC preparativa que comprende un sistema Waters Prep 4000, un inyector Rheodyne con un bucle de 10 ml, una columna Deltaprep C18 de 300 x 40 mm, un detector de longitud de onda dual Waters 2487 y un registrador de gráficos se equilibró con una fase móvil de metanol al 88 %/agua a 70 ml/min. El detector se configuró a 215 nm y 2,0 unidades de absorbancia a escala completa y el gráfico se ejecutó a 6 cm/h.

Se disolvieron 1,0 g de aceite de FAEE en una cantidad mínima de metanol al 88 %/agua y se inyectaron en la columna a través del inyector Rheodyne. Se recogieron alrededor de 250 ml de fracciones una vez que apareció el frente de solvente después de alrededor de 7 minutos.

Se recogió un total de 43 fracciones durante 140 minutos. Después de 85 minutos, la fase móvil se cambió a metanol al 90 %/agua. Después de 105 minutos, la fase móvil se cambió a metanol al 94 %/agua. Después de 110 minutos, la fase móvil se cambió a metanol al 100 %. Después de que se recolectaron las fracciones finales,

la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100 % a 70 ml/min. Se realizó una HPLC analítica en todas las fracciones y se combinaron las fracciones que contenían predominantemente DHA (rendimiento: 22 %).

HPLC analítica

Se usó un sistema de HPLC que comprende un controlador de bomba Waters 600E, un muestreador automático 717, un detector de matriz de fotodiodos 2996 y un detector de índice de refracción 2414 para el análisis de muestras. El análisis se realizó en una columna Alltima C18 de 150 x 4,6 mm usando metanol isocrático al 90 %/agua o metanol al 95 %/agua a 1,0 ml/min como fase móvil. La recolección y procesamiento de datos se realizó en el software Waters Empower 3.

Ejemplo 10 – Separación cromatográfica de FAEE derivados de la mezcla de referencia

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) destilados de la mezcla de referencia (obtenidos en el Ejemplo 8) se sometieron a separación cromatográfica en las mismas condiciones que se muestran en el Ejemplo anterior.

Se recogió un total de 43 fracciones durante 130 minutos. Después de 75 minutos, la fase móvil se cambió a metanol al 90 %/agua. Después de 95 minutos, la fase móvil se cambió a metanol al 95 %/agua. Después de 110 minutos, la fase móvil se cambió a MeOH al 100 %. Después de que se recolectaron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con MeOH al 100 % a 70 ml/min. Se realizó una HPLC analítica en todas las fracciones y se combinaron las fracciones que contenían predominantemente DHA (rendimiento: aprox. 20 %).

Ejemplo 11 - Análisis de la composición de ácidos grasos para los aceites enriquecidos

Se analizaron las composiciones de ácidos grasos de los productos obtenidos en los Ejemplos 9 y 10. Los resultados se muestran a continuación.

Ácido graso		Aceite de canola con DHA (% en peso) (Ejemplo 9)	Aceite de referencia (% en peso) (Ejemplo 10)
Palmítico	C16:0	0,00	0,00
Esteárico	C18:0	0,00	0,00
Oleico	C18:1n9c	0,00	0,02
Cis-vaccénico	C18:1n7c	0,00	0,00
Linoleico	C18:2n6c	0,60	1,76
GLA	C18:3n6	0,01	0,00
ALA	C18:3n3	0,71	1,89
Araquídico	C20:0	0,03	0,02
SDA	C18:4n3	0,00	0,00
Gondoico	C20:1n9c	0,00	0,00

Ácido graso		Aceite de canola con DHA (% en peso) (Ejemplo 9)	Aceite de referencia (% en peso) (Ejemplo 10)
Behénico	C22:0	0,06	0,00
ETA	C20:4n3	5,30	0,70
Erúcico	C22:1n9c	0,00	0,00
EPA	C20:5n3	0,02	0,14
DPA3	C22:5n3	0,27	0,19
DHA	C22:6n3	92,62	90,25
	Otro	0,39	5,04

Ejemplo 12 - Evaluación de la estabilidad del aceite

Ensayo de estabilidad mediante GC con espacio de cabeza-MS

Se realizó un análisis de espacio de cabeza en los productos enriquecidos descritos anteriormente para evaluar las cantidades de propanal que se liberan en condiciones específicas. Los niveles aumentados de liberación de propanal demuestran una estabilidad reducida para el material de prueba.

Método SPME (microextracción en fase sólida):

Selección de fibra de 65 µm PDMS/DVB StableFlex (kit de fibra Supelco 57284-u).

Las fibras se acondicionaron durante 10 minutos antes de su uso a 250 °C en una estación de acondicionamiento Triplus RSH.

Las muestras se incubaron a 40 °C durante 1 minuto antes de la extracción.

Se extrajeron durante 1 minuto del vial con espacio de cabeza.

Se espera que sea un buen método general capaz de capturar una amplia gama de componentes volátiles.

Método GC:

Thermo Scientific TRACE 1310 GC

Columna Thermo Scientific TR-DIOXIN 5MS, 0,25 mm de diámetro interno, película de 30 m 0,1 µm

Inyección dividida 250 °C Split 83, 1,2 ml He/min

Rampa GC: 40 °C 1 min a 100 a 5 °C/min, luego a 300 °C a 50 °C/min

Se utilizó una columna genérica específica para MS con buena sinergia para el análisis del espacio de cabeza. Se empleó una rampa de temperatura inicial lenta para maximizar la separación de los compuestos volátiles antes de aumentar al máximo para mantener el rendimiento de la columna. Se emplearon inyecciones divididas para evitar el requisito de enfriamiento criogénico de la entrada y mejorar la resolución de la

columna.

La separación de los estándares se vio obstaculizada por una superposición de picos, pero se pudo acomodar en la cuantificación. 3 resultados de calibración estándar (0,1, 0,01 y 0,01 %), el ion molecular m/z 56 se empleó para la detección de propanal. El pico base en m/z 58 se utiliza para detectar hexanal.

Método MS:

GC-MS de alta resolución Thermo Scientific DFS

Baja resolución (1000), barrido completo 35-350Da a 0,5 s/barrido

Estándares: - Se realizaron diluciones estándares de propanal y hexanal en ésteres etílicos de canola con DHA suministrados. Estas mezclas estándar se agregaron luego a un volumen de 540 µl a viales de 20 ml con espacio de cabeza.

Se empleó el barrido completo, lo que permite el monitoreo de todos los productos evolucionados en lugar de moléculas específicas.

Resultados de estabilidad del espacio de cabeza:

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos del aceite de canola obtenido en el Ejemplo 9 y el aceite de referencia obtenido en el Ejemplo 10 de T=0 a 2 días. Las muestras de prueba se conservaron durante este período a temperatura ambiente en una caja de luz y bajo iluminación de tubo fluorescente. Se analizó el ion molecular m/z 58, y el cromatograma de masas muestra claramente la aparición de propanal a temperatura ambiente durante 1,37 minutos. El desarrollo de propanal se cuantifica en la tabla a continuación, y los datos se muestran en la Figura 1. El aceite de canola con DHA liberó cantidades sustancialmente menores de propanal, lo que demuestra la estabilidad mejorada del aceite de canola en comparación con el de referencia.

Punto temporal (días)	0	2
Aceite de canola con DHA (ppm de propanal)	823,974	1392,985
Aceite de referencia (ppm de propanal)	1149,539	2318,177

El aceite de canola con DHA mostró una estabilidad superior a la oxidación en comparación con el aceite de referencia.

Ejemplo 13 - Refinación de aceite de canola con DHA

Una porción del aceite de canola obtenido en el Ejemplo 1 se refinó antes de someterse a un enriquecimiento adicional. El proceso de refinación incluyó desgomado, refinación alcalina, blanqueamiento y desodorización.

Desgomado ácido

El desgomado es la eliminación de fosfátidos no hidratables e hidratables del

aceite. El aceite crudo seco obtenido en el Ejemplo 1 se calentó a 53 ± 2 °C, y se agregó 0,2 % de una solución de ácido cítrico al 50 %. Después de aproximadamente 30 minutos de mezclado, se agregó 2,0 % de agua ablandada calentada (53 ± 2 °C) y se mezcló durante aproximadamente 30 minutos. El aceite se calentó a 67 ± 3 °C durante el mantenimiento y luego se centrifugó.

Pretratamiento ácido/Refinación

La refinación es la eliminación de los ácidos grasos libres después de su saponificación con cáustico para hacerlos solubles en agua y su posterior eliminación por centrifugación. Se usó una etapa de pretratamiento ácido para continuar la hidratación de los fosfátidos. El aceite desgomado se calentó a 65 ± 5 °C y se agregó 0,1 % de ácido fosfórico al 85 %, y se mezcló durante un total de 30 minutos. Después de la adición del ácido y el tiempo de retención, se agregó 20 Be' (Baumé; 14,4 %, p/p) de hidróxido de sodio para neutralizar los ácidos grasos libres más un exceso del 0,05 % (p/p). El cáustico y el aceite se mezclaron durante 15 minutos adicionales. El aceite se calentó a 62 ± 2 °C durante la retención de 15 minutos, y luego el aceite se centrifugó.

Tratamiento con sílice Trisyl

El tratamiento con sílice Trisyl se realizó para la eliminación adicional de los jabones, hasta obtener niveles compatibles con el blanqueamiento. El tratamiento previo con Trisyl se combinó con la etapa de blanqueamiento. El aceite refinado se calentó a 68 ± 5 °C y se trató con 0,3 % de Trisyl 300. El aceite/Trisyl se mezcló durante aproximadamente 15 minutos, y luego se continuó el blanqueamiento.

Blanqueamiento

El aceite refinado se trató con arcilla adsorbente para eliminar peróxidos, fosfátidos, cuerpos de color y trazas de jabón. Se usó una etapa de pretratamiento ácido para continuar la hidratación de los fosfátidos. El aceite tratado previamente con Trisyl se mezcló con un 0,2 % (p/p) de una solución de ácido cítrico al 50 %. Después de 15 minutos de mezclar, se agregó 2 % (p/p) de arcilla blanqueadora Tonsil Supreme 126 FF. La mezcla se calentó luego a 90 ± 2 °C al vacío y se mantuvo durante aproximadamente 30 minutos. El aceite se enfrió a 60 ± 2 °C, el vacío se rompió con nitrógeno, se agregó 1,0 kg de agente de filtración y se filtró. Recipiente a presión: Recipiente a presión Cherry-Byrrell de 500 l, camisa de vapor o agua de enfriamiento, todos de acero inoxidable 316 con impulsor y deflectores para mezclar, número de serie del fabricante E-227-94. Prensa de filtro: Se utilizó una prensa de filtro de polipropileno de 24" Sperry, filtro de 4,8 pies cúbicos, soportes de papel y tela.

Desodorización

El aceite blanqueado se sometió a rocío con vapor a alta temperatura y baja presión para eliminar los componentes odoríferos, los componentes de sabor y los ácidos grasos libres adicionales. El color también se reduce mediante el blanqueamiento térmico a temperaturas elevadas. La mitad del aceite blanqueado se desodorizó a 180 ± 2 °C durante 60 minutos con vapor de rocío al 1 %, y se controló la composición de ácidos grasos (FAC). Recipiente de desodorización (OD4): Recipiente de 400 l con capacidad de vacío de fabricación de cobre, camisa de vapor o agua de enfriamiento, todo de acero inoxidable 316. Se observó una ligera disminución del nivel de DHA a 180 °C durante 60 min. Luego se realizó otro ensayo a 180 °C durante 30 min. El producto se envasó en nitrógeno en cubos de plástico de HDPE de 20 l y se almacenó en un refrigerador a 4 °C.

Ejemplo 14 – Refinación del aceite de mezcla de referencia original

Una porción de la mezcla de referencia descrita en el Ejemplo 2 se refinó antes de someterse a enriquecimiento adicional. En el proceso de refinación, la mezcla de referencia se sometió a refinación en las mismas condiciones que se muestran en el Ejemplo anterior.

Ejemplo 15 – Composiciones de ácidos grasos de la mezcla de referencia y del aceite de canola crudo con DHA RBD

Se analizaron las composiciones de ácidos grasos del aceite crudo filtrado RBD (del Ejemplo 13) y el aceite de mezcla de referencia RBD (del Ejemplo 14). Los resultados se muestran a continuación.

Ácido graso		Aceite de canola crudo con DHA (% en peso)	Aceite de referencia crudo (% en peso)
Palmítico	C16:0	4,23	9,22
Estearico	C18:0	2,52	3,89
Oleico	C18:1n9c	42,90	31,62
Cis-vaccénico	C18:1n7c	3,01	1,96
Linoleico	C18:2n6c	7,15	12,18
GLA	C18:3n6	0,54	0,00
ALA	C18:3n3	19,95	22,51
Araquídico	C20:0	0,72	0,38
SDA	C18:4n3	2,25	0,17
Gondoico	C20:1n9c	1,28	0,71
Behénico	C22:0	0,31	0,22
ETA	C20:4n3	1,08	0,00
Erúcico	C22:1n9c	0,00	0,00
EPA	C20:5n3	0,47	1,67
DPA3	C22:5n3	0,96	0,41

Ácido graso		Aceite de canola crudo con DHA (% en peso)	Aceite de referencia crudo (% en peso)
DHA	C22:6n3	9,33	9,20
	Otro	3,32	5,86

Las referencias a "RBD" en relación con los Ejemplos (y las figuras adjuntas) significan que el producto en cuestión se obtuvo directa o indirectamente a partir de los productos "refinados" del Ejemplo 13 (para aceites de canola) y del Ejemplo 14 (para mezclas de referencia).

Ejemplo 16 - Transesterificación química del aceite de canola con DHA RBD

A un quimiorreactor Buchi CR101 seco, purgado con nitrógeno y equipado con un agitador mecánico, se agregó etanol absoluto (12,5 l) y el aceite de canola con DHA y triglicéridos refinado ("RBD") obtenido en el Ejemplo 13 (5,00 kg), y la mezcla se agitó.

A la mezcla anterior se agregó etóxido de sodio (150 g) que se enjuagó en el reactor con etanol absoluto adicional (2,5 l) y se continuó agitando durante 16 horas a temperatura ambiente. Un espectro de ¹H RMN registrado de una muestra tomada de la mezcla indicó que la reacción se había completado.

El procedimiento de transesterificación se realizó en aprox. 5 kg de aceite de canola con DHA RBD. A la mezcla de reacción cruda resultante se agregaron alcoholes de petróleo con punto de ebullición a 40-60 °C (alcohol de petróleo, 10 l) y agua (10 l) y la mezcla se acidificó cuidadosamente a pH 7 con ácido clorhídrico al 10 % (se requieren 870 ml en total, tiras indicadoras universales Merck, pH 0-14) con agitación exhaustiva.

La mezcla resultante se dejó reposar en el reactor, después de lo cual se formaron 2 fases. La capa de alcohol de petróleo se eliminó, y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con alcohol de petróleo (3x5 l). Las capas de alcohol de petróleo combinadas se devolvieron al reactor y se evaporaron al vacío hasta obtener un volumen disminuido (aprox. 10 l). La solución concentrada resultante se drenó del reactor, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro (aprox. 1 kg), se filtró y se concentró al vacío para producir un aceite amarillo claro pálido (rendimiento: 99 %).

Ejemplo 17 – Transesterificación química del aceite de mezcla de referencia RBD

A un quimiorreactor Buchi CR101 seco, purgado con nitrógeno y equipado con un agitador mecánico, se agregó etanol absoluto (12,5 l) y el aceite de mezcla de referencia con triglicéridos RBD obtenido de acuerdo con el Ejemplo 14 (aprox. 5 kg) y la mezcla se agitó.

A la mezcla anterior se agregó etóxido de sodio (150 g) que se enjuagó en el reactor con etanol absoluto adicional (2,5 l) y se continuó agitando durante 16 horas a

temperatura ambiente. Un espectro de ^1H RMN registrado de una muestra indicó que se había producido poca o ninguna reacción. Se añadió más etóxido de sodio (57 g) a la mezcla y se continuó agitando.

Después de 5 horas adicionales, un espectro de ^1H RMN de una muestra indicó que la reacción se había completado en un 75 %. Se añadió etóxido sódico adicional (60 ml de una solución al 21 % en etanol) a la mezcla y se continuó agitando durante 3 días, después de lo cual se completó la reacción.

Ejemplo de aislamiento de producto a partir de la transesterificación química de la mezcla de referencia RBD

El procedimiento de transesterificación se realizó en aprox. 5 kg de aceite de mezcla de referencia RBD. A la mezcla de reacción cruda resultante se agregó alcohol de petróleo (15 l) y agua (3,3 l), y la mezcla se acidificó cuidadosamente a pH 7 con 10 % de ácido clorhídrico (se requieren 910 ml en total) con agitación exhaustiva.

La mezcla resultante se dejó reposar en el reactor, después de lo cual se formaron 2 fases. La capa de alcohol de petróleo se eliminó, y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con alcohol de petróleo (2x7,5 l). Las capas de alcohol de petróleo combinadas se devolvieron al reactor y se evaporaron al vacío hasta obtener un volumen disminuido (aprox. 10 l). La solución concentrada resultante se drenó del reactor, se secó sobre sulfato de magnesio anhidro (aprox. 1 kg), se filtró y se concentró al vacío para producir un aceite amarillo claro pálido (rendimiento: 99 %).

Ejemplo 18 - Destilación de aceites de canola RBD transesterificados

Procedimiento estándar para la eliminación de más componentes volátiles de mezclas de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) mediante destilación al vacío

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) del aceite de canola con DHA RBD (obtenido en el Ejemplo 16) se sometieron a destilación en las siguientes condiciones. La separación mediante destilación se logró haciendo pasar el aceite crudo transesterificado a través de una película renovada Pope de 2 pulgadas (50 mm), todavía al vacío, equipada con 2 matraces de recolección de 1000 ml que recolectan el destilado y el residuo. Cada uno fue analizado para determinar la composición de ácidos grasos.

El vacío fue suministrado por una bomba rotativa Edwards 3 y el vacío medido por un medidor de vacío ebro VM2000.

El aceite fue suministrado al alambique por una bomba peristáltica Easy-Load II de Cole-Palmer Instrument Company a 4 ml/min con el motor del alambique configurado a 325 rpm con condensador de agua usado para condensar el destilado. El suministro

continuó hasta el momento en que uno u otro de los matraces receptores estuvieron llenos.

Los FAEE del aceite de canola con DHA RBD se destilaron en estas condiciones con las bandas del calentador configuradas inicialmente a 152 °C para obtener una división 50:50 de destilado:residuo. Una porción del residuo de esta destilación se sometió nuevamente a la eliminación de más componentes volátiles por destilación en las condiciones estándar con la temperatura de las bandas del calentador configurada a 152 °C. El tiempo total de destilación fue de aprox. 90 minutos.

Destilación	Suministro	Destilado	Residuo
Primero	1596,6	729,9	855,9
Segundo	851,3	503,5	343,1

Ejemplo 19 - Destilación de FAEE derivados de la mezcla de referencia RBD transesterificada

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) de la mezcla de referencia RBD (obtenida en el Ejemplo 17) se sometieron a destilación en las mismas condiciones que se muestran en el Ejemplo anterior.

Los FAEE de la mezcla de referencia RBD se destilaron en estas condiciones estándar con las bandas del calentador configuradas inicialmente a 152 °C para obtener una división 50:50 de destilado:residuo. El residuo de esta destilación se sometió nuevamente a la eliminación de más componentes volátiles por destilación en las condiciones estándar. El objetivo fue obtener una división 50:50 de destilado:residuo. La destilación se realizó principalmente con las bandas del calentador configuradas a 152 °C. El tiempo total de destilación fue de aprox. 200 minutos.

Destilación	Suministro	Destilado	Residuo
Primero	1195,1	674,7	504,6
Segundo	496,4	297,2	197,4

Ejemplo 20 - Separación cromatográfica de FAEE derivados de aceite de canola RBD

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) obtenidos en el Ejemplo 18 (es decir, que se habían obtenido a partir de aceite de canola con DHA RBD y se procesaron mediante transesterificación y destilación) se sometieron a separación cromatográfica en las siguientes condiciones. Un sistema de HPLC preparativa que comprende un sistema Waters Prep 4000, un inyector Rheodyne con un bucle de 10 ml, una columna Deltaprep C18 de 300 x 40 mm, un detector de longitud de onda dual Waters 2487 y un registrador de gráficos se equilibró con una fase móvil de metanol al 88 %/agua a 70 ml/min. El detector se configuró a 215 nm y 2,0 unidades de absorbancia a escala

completa y el gráfico se ejecutó a 6 cm/h.

Se disolvieron 1,0 g de aceite de FAEE en una cantidad mínima de metanol al 88 %/agua y se inyectaron en la columna a través del inyector Rheodyne. Se recogieron alrededor de 250 ml de fracciones una vez que apareció el frente de solvente después de alrededor de 7 minutos.

Se realizó una HPLC analítica en todas las fracciones y se combinaron las fracciones que contenían predominantemente DHA (rendimiento: aprox. 20 %).

Ejemplo 21 – Separación cromatográfica de FAEE derivados de la mezcla de referencia RBD

Los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) destilados de la mezcla de referencia RBD (obtenidos en el Ejemplo 19) se sometieron a separación cromatográfica en las mismas condiciones que se muestran en el Ejemplo anterior.

Se realizó una HPLC analítica en todas las fracciones y se combinaron las fracciones que contenían predominantemente DHA (rendimiento: aprox. 20 %).

Ejemplo 22 - Análisis de la composición de ácidos grasos para los aceites RBD enriquecidos

Se analizaron las composiciones de ácidos grasos de los productos obtenidos en los Ejemplos 20 y 21. Los resultados se muestran a continuación.

Ácido graso		Aceite de canola con DHA (% en peso) (Ejemplo 20)	Aceite de referencia (% en peso) (Ejemplo 21)
Palmítico	C16:0	0,02	0,00
Esteárico	C18:0	0,02	0,00
Oleico	C18:1n9c	0,00	0,00
Cis-vaccénico	C18:1n7c	0,00	0,00
Linoleico	C18:2n6c	2,40	7,28
GLA	C18:3n6	0,06	0,00
ALA	C18:3n3	1,02	1,19
Araquídico	C20:0	0,03	0,00
SDA	C18:4n3	0,03	0,00
Gondoico	C20:1n9c	0,00	0,00
	C20:4n6	0,00	3,66
Behénico	C22:0	0,05	0,00
ETA	C20:4n3	6,76	0,64
Erúcico	C22:1n9c	0,00	0,00
EPA	C20:5n3	0,04	0,00
DPA3	C22:5n3	0,32	0,00
DHA	C22:6n3	88,27	81,12
	Otro	0,99	6,11

Ejemplo 23 - Evaluación de la estabilidad del aceite

El análisis del espacio de cabeza se realizó en los productos enriquecidos descritos en los Ejemplos 20 y 21 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 12. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos del aceite de canola RBD obtenido en el Ejemplo 20 y el aceite de referencia RBD obtenido en el Ejemplo 21 de T=0 a 2 días. Las muestras de prueba se conservaron durante este período a temperatura ambiente en una caja de luz y bajo iluminación de tubo fluorescente. Se analizó el ion molecular m/z 58, y el cromatograma de masas muestra claramente la aparición de propanal a temperatura ambiente durante 1,37 minutos. El desarrollo de propanal se cuantifica en la tabla a continuación, y los datos se muestran en la Figura 2. El aceite de canola con DHA liberó cantidades sustancialmente menores de propanal, lo que demuestra la estabilidad mejorada del aceite de canola en comparación con el de referencia.

Punto temporal (días)	0	2
Aceite de canola con DHA (ppm de propanal)	0,000	706,232
Aceite de referencia (ppm de propanal)	1449,640	1582,057

El aceite de canola con DHA mostró una estabilidad superior a la oxidación en comparación con el aceite de referencia