



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 345 529**

② Número de solicitud: 200900892

⑤ Int. Cl.:

C11B 7/00 (2006.01)

B01J 20/283 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **13.03.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2010**

Fecha de la concesión: **11.07.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **21.07.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
21.07.2011

⑰ Titular/es: **Universidad de Almería**
OTRI-Edif. CAE
Ctra. de Sacramento, s/n
04120 La Cañada de San Urbano, Almería, ES

⑱ Inventor/es: **Guil Guerrero, José Luis y**
Rincón Cervera, Miguel Ángel

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico en posición sn-2.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico en posición sn-2. Con la finalidad de purificar triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico a partir de fuentes naturales, se utiliza una columna cromatográfica gravimétrica en fase normal, trabajando en gradiente de polaridad con solventes biocompatibles. Así se consigue la purificación de triglicéridos que cuentan en su estructura con una o más moléculas de ácido gamma-linolénico, pudiendo ser utilizados con diversos fines. Con esta metodología es posible trabajar a escala industrial, pues es fácilmente escalable, a diferencia de otras técnicas que son aplicables a escala analítica pero presentan serios inconvenientes en cuanto a coste y adiestramiento del personal a la hora de utilizarlas con fines industriales, como por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

ES 2 345 529 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico en posición sn-2.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método encuadrado en el sector técnico de la obtención de triglicéridos (TGs) estructurados conteniendo ácido gamma-linolénico (GLA, 18:3n-6) en posición sn-2. Este método se ha adaptado a este fin con el objeto de mejorar la eficacia de los métodos de obtención de los mismos, que son de empleo común en la industria alimentaria y farmacéutica, así como para disminuir los potenciales peligros para la salud de los TGs obtenidos mediante procesos enzimáticos, en los cuales a veces se utilizan solventes potencialmente tóxicos para el ser humano. Por otra parte, mediante este método se obtienen TGs estructurados ricos en GLA en un proceso significativamente más corto, y por tanto con menores probabilidades de alteraciones oxidativas que en los clásicos, en los cuales interviene un largo número de reacciones enzimáticas. Estos TGs estructurados con GLA en posición sn-2 pueden comercializarse como complementos nutricionales.

Estado de la técnica

Los ácidos grasos poliinsaturados, o PUFAs, son moléculas orgánicas consistentes en una cadena hidrocarbonada de 18 o más átomos de carbono con dos o más insaturaciones carbono-carbono en su estructura y un grupo carboxilo al extremo de la misma. La manera más general de proceder a su notación consiste en un número que indica el número de átomos de carbono de su molécula, seguido por dos puntos y el número de insaturaciones que posee. A continuación aparece una "n" en cursiva y un número indicativo de la posición de las insaturaciones en la cadena. En los aceites y grasas naturales de origen vegetal y animal, estos PUFAs se encuentran mayoritariamente esterificados con moléculas de glicerol dando lugar a los triglicéridos. Una vez que los TGs son ingeridos por los seres humanos, son degradados metabólicamente hasta *sn*-2 monoglicéridos y ácidos grasos libres, siendo de esta forma absorbidos por la mucosa intestinal.

Es ampliamente conocida la acción beneficiosa de una variedad de PUFAs sobre la salud. Entre los más conocidos figuran los ácidos GLA, estearidónico (SDA, 18:4n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3). El poder purificar TGs que contengan este tipo de compuestos podría permitir su aplicación en fórmulas farmacológicas y/o alimentarias sin tener que recurrir a incorporar el aceite en su totalidad.

Previamente, se ha conseguido purificar TGs que contienen PUFAs de interés a partir de sus fuentes naturales mediante los procedimientos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de cromatografía en capa fina (TLC) (Christie, W.W., 1999. *Ind. Crop. Prod.* 10: 73-83; Redden, P.R., Huang, Y.S., Lin, X. and Horrobin, D.F. 1995. *J. Chrom. A* 694:381-38 9). Sin embargo, aunque estas metodologías posibilitan la purificación a escala analítica o semipreparativa, no son adecuadas para las necesidades de la industria, que precisa métodos operativos a mayor escala. El procedimiento de purificación de componentes de aceites y grasas por columna cromatográfica gravimétrica con sílice y nitrato de plata ha sido aplicado con éxito para la purificación de ésteres metílicos de ácidos grasos. No obstante, supone además una herramienta útil a la hora de fraccionar TGs, presentando ciertas ventajas como su reducido coste, sus posibilidades de escalado y su facilidad de uso (no siendo necesaria una preparación específica del operario) frente a otras técnicas anteriormente citadas como HPLC, más costosas y que requieren una preparación previa más exhaustiva por parte del personal encargado de su manejo.

Previamente, la separación de mezclas artificiales de triglicéridos utilizando una fase estacionaria de gel de sílice y nitrato de plata ha sido llevada a cabo exitosamente, pero no fue realizada con solventes biocompatibles ni ha sido ensayada para separar TGs enriquecidos en GLA (Vries, B., 1964. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41:403-406). Únicamente, este procedimiento anterior ha sido utilizado para separar exitosamente TGs ricos en DHA de otros de TGs (Monsanto Co, 2002. US Patent 6399803). Por otra parte, el uso de este tipo de columna, formada por cationes y gel de sílice, también ha sido utilizada para separar fracciones de TGs con distinto índice de yodo, pero no fue ensayada para separar TGs estructurados conteniendo ácidos grasos específicos (Logan, T.D., 1982. European Patent Application 81200401.8).

Descripción de la invención

El procedimiento consiste en hacer pasar los TGs disueltos en hexano a través de una columna cromatográfica gravimétrica cuya fase estacionaria consiste en una mezcla de sílice y nitrato de plata. Esta fase estacionaria, una vez activada a una temperatura apropiada, es introducida en la columna y acondicionada con varios volúmenes de disolventes biocompatibles. Para un desarrollo óptimo del proceso se carga por la parte superior de la columna una cantidad de aceite (mezcla de TGs) equivalente al 2-20% en masa de la fase estacionaria. La cantidad de fase estacionaria utilizada y por tanto la cantidad de aceite que se puede procesar es variable y dependerá de las necesidades específicas de cada aplicación, adoptándose un tamaño de columna mayor o menor en función de las mismas.

Las diferentes fracciones son extraídas y purificadas haciendo pasar una fase móvil en gradiente creciente de polaridad consistente en mezclas de hexano, acetona y etanol en proporción variable en función de la composición de

ES 2 345 529 B1

la mezcla inicial de TGs. Los TGs que contienen los PUFAs son así purificados en fracciones de polaridad variable en función de la naturaleza de dichos TGs. Alícuotas de dichas fracciones son analizadas posteriormente por HPLC y GLC para comprobar sus perfiles de TGs y ácidos grasos respectivamente (figura 1) . Los análisis demuestran que se consiguen fracciones enriquecidas en GLA hasta de un 500% con respecto a la riqueza original de GLA en el aceite.

5

A continuación se presenta un ejemplo que ilustra el método de la invención y que en ningún caso debe considerarse limitativo del alcance de la presente invención.

10 Descripción de una realización modelo

Se utiliza esta técnica para purificar TGs que contienen GLA a partir de aceite de semillas de onagra (*Oenothera biennis* L.). Para ello se procede al relleno de una columna hueca de vidrio con una fase estacionaria formada por gel de sílice y nitrato de plata. A continuación se adicionan por la parte superior de la columna aceite de onagra disuelto en hexano. Seguidamente, se hacen pasar una serie de volúmenes de eluyente en polaridad creciente que son recogidos por separado. Los eluyentes utilizados son biocompatibles, en proporciones variables.

15

Una vez recogidos todos los eluyentes se analiza una alícuota de cada uno por HPLC en fase reversa para comprobar su perfil de TGs. Mediante este procedimiento se consiguen purificar los picos de TGs con mayor contenido en GLA (figura 2) . De dichas fracciones se separa una alícuota que es metilada para comprobar su perfil de ácidos grasos. De este análisis se obtiene una composición de GLA sobre el total de ácidos grasos que forman cada pico.

20

25 Base del funcionamiento

25

En estas columnas los ácidos grasos se separan en función del número y configuración de los dobles enlaces debido a que los iones de plata interaccionan reversiblemente con los dobles enlaces para formar complejos polares doble enlace-Ag⁺. Por tanto a mayor número de dobles enlaces más fuertemente es retenido el ácido y mayor es el tiempo de elución. (Ryu, S., Lee, J., Jeong, B and Hur, H. 1997. US Patent 5.672.726).

30

Utilidad de la invención

La presente invención se refiere a un método para obtención de TGs estructurados conteniendo GLA en posición sn-2. Estos TGs son biodisponibles en el organismo humano, ya que las lipasas actúan preferentemente en posición sn-1 y sn-3, con lo que los sn-2 monoglicéridos conteniendo GLA remanentes en el aparato digestivo, pueden ser fácilmente absorbidos por la mucosa intestinal, incorporándose al sistema circulatorio y realizando un amplio número de funciones fisiológicas beneficiosas.

35

40

Descripción de los dibujos

Figura 1 - Representa el esquema del proceso de purificación de TGs en columna cromatográfica gravimétrica con sílice y nitrato de plata como fase estacionaria.

45

Figura 2 - Muestra el perfil de TGs del aceite de onagra, obtenido por HPLC en fase reversa.

Figura 3 - Muestra cromatogramas que corresponden a las fracciones de TGs enriquecidas en GLA. Los números 1 y 2 indican los picos que son purificados por este procedimiento.

50

55

60

65

ES 2 345 529 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen GLA en posición *sn*-2 mediante cromatografía en columna gravimétrica en fase normal (CGFN), que incorpora:
- Una fase estacionaria (FE) y una fase móvil (FM)
 - FE formada por una mezcla de gel de sílice y nitrato de plata
 - 10 - FM constituida por una serie de disolventes biocompatibles
 - Un proceso de purificación mediante CGFN usando la FE y FM descrita para obtener TGs enriquecidos en GLA en posición *sn*-2.
- 15 2. Procedimiento para la purificación de TGs que contienen GLA en posición *sn*-2 según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la CGFN se usa para la purificación de TGs obtenidos de fuentes naturales.
- 20 3. Procedimiento para la purificación de TGs que contienen GLA en posición *sn*-2 según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y **caracterizado** por una fase estacionaria que contenga cualquier tipo de metales que pudieran formar complejos con los dobles enlaces contenidos en los PUFAs y así retardar su elución.
- 25 4. Procedimiento para la purificación de TGs que contienen GLA en posición *sn*-2 según reivindicación 2, y **caracterizado** por el uso de la CGFN para aplicar a cualquier tipo de aceite de procedencia microbiológica, vegetal o animal.
- 30 5. Procedimiento para la purificación de TGs que contienen GLA en posición *sn*-2 según reivindicación 4 y **caracterizado** por el uso de disolventes biocompatibles (FM) en gradiente de polaridad.
- 35 6. Uso del procedimiento para la purificación de TGs que contienen GLA en posición *sn*-2 según las reivindicaciones anteriores, en la industria alimentaria y farmacéutica.
- 40 7. Uso del procedimiento para la purificación de TGs que contienen GLA en posición *sn*-2 según la reivindicación 6, en la formulación de complementos nutricionales.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1.

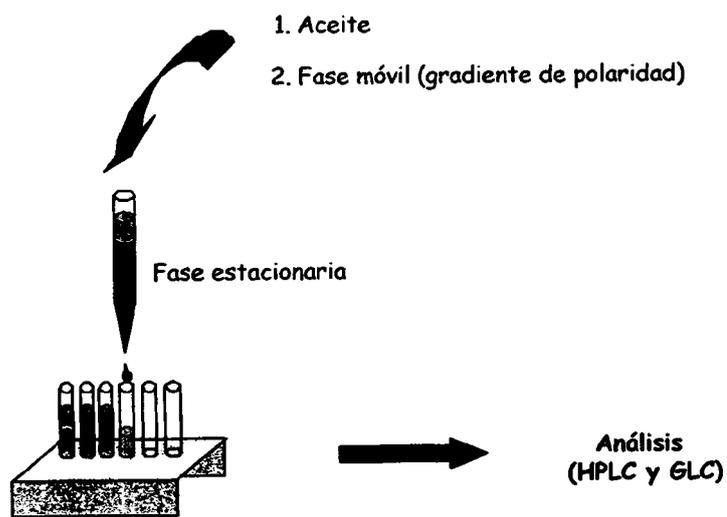


Figura 2.

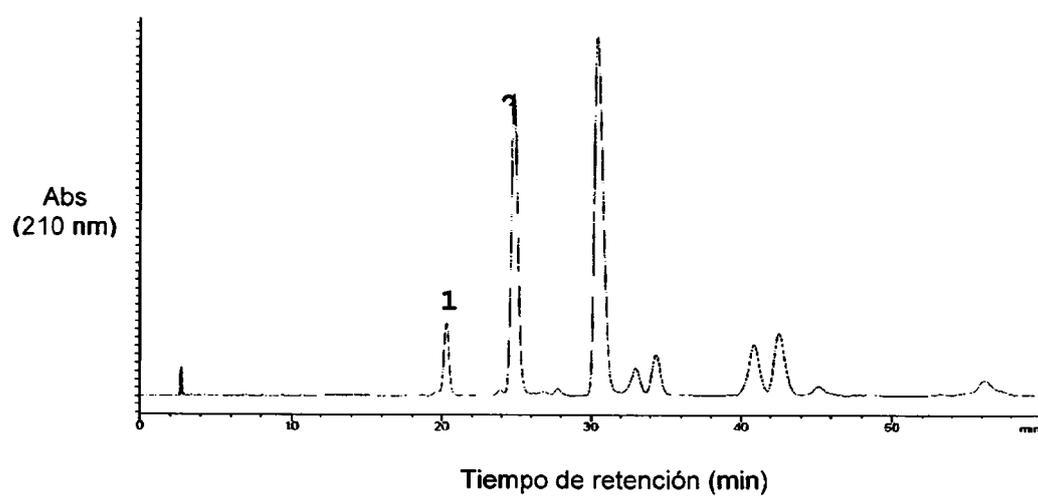
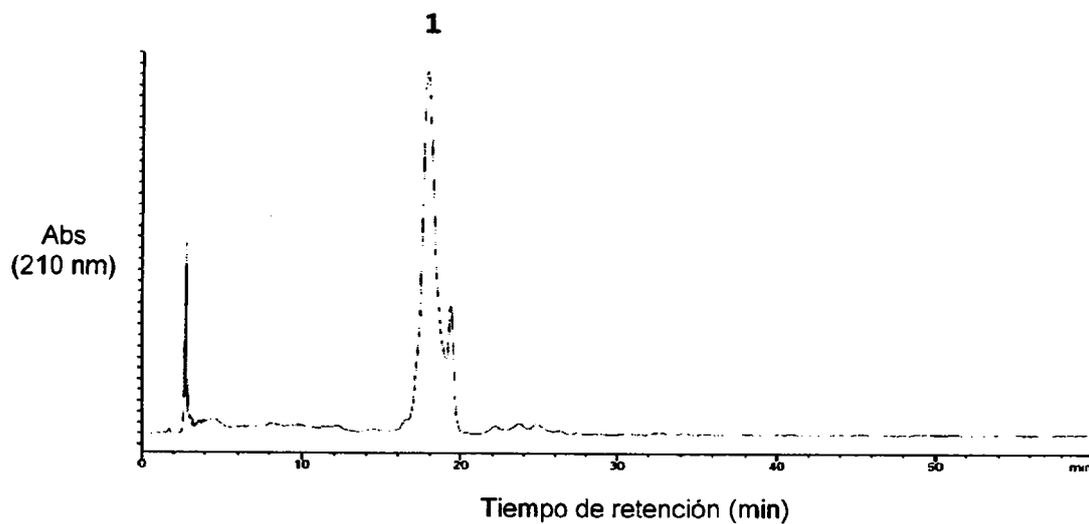
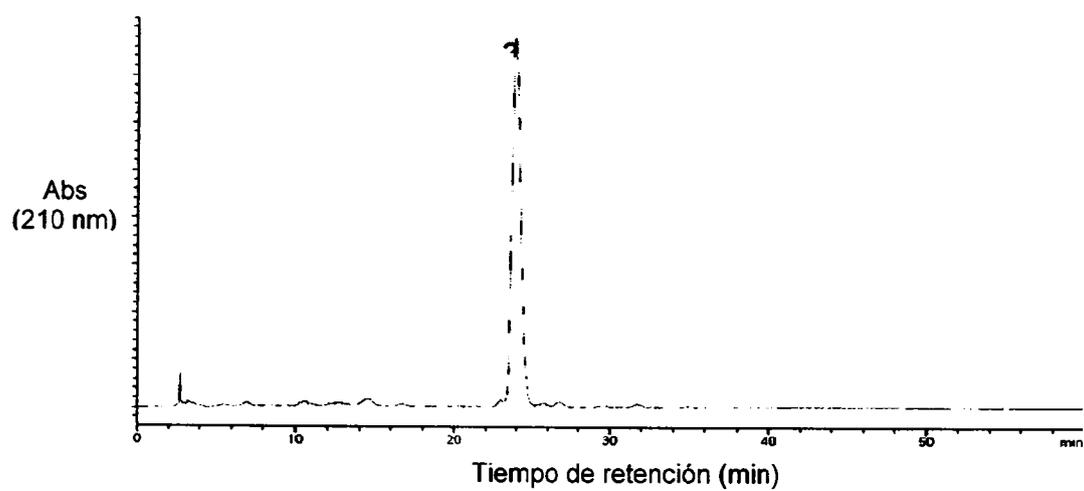


Figura 3.





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 529

② Nº de solicitud: 200900892

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.03.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C11B 7/00** (2006.01)
B01J 20/283 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHRISTIE, W. W. "Silver ion and chiral chromatography in the analysis of triacylglycerols". Progress in Lipid research, 1994, Volumen 33, Número 172, páginas 9-18. Ver página 11, párrafo 2; página 12, párrafo 1.	1-7
A	CHAKRABARTY, M. M. et al. "Detection of rearrangement reaction of natural glycerides by chromatography" Journal of Chromatography, 1966, Volumen 22, páginas 84-89. Ver página 84, párrafo 2; página 85, párrafo 1.	1-7
A	US 6399803 B1 (CORLEY, D. G. et al.) 04.06.2002, columna 4, líneas 17-52.	1-7
A	VRIES, B. "Separation of Triglycerides by Column Chromatography on Silica Impregnated with Silver Nitrate". The Journal of the American Oil Chemists' Society, 1964, Volumen 41, páginas 403-406. Ver página 403, resumen.	1-7
A	US 4961881 A (OU, J. D.) 09.10.1990, columna 1, líneas 6-15; columna 5, líneas 12-30; columna 88, ejemplo 1.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.09.2010

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/4

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

C11B, B01J

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

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SÍ
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión:

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

1. Documentos considerados:

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Progress in Lipid research, 1994, Volumen 33, Número 172, páginas 9-18.	1994
D02	Journal of Chromatography, 1966, Volumen 22, páginas 84-89.	1966
D03	US 6399803 B1	04/06/2002
D04	The Journal of the American Oil Chemists' Society, 1964, Volumen 41, páginas 403-406.	1964
D05	US 4961881	09/10/1990

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

La solicitud se refiere a un procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico en posición sn-2 mediante cromatografía en columna gravimétrica en fase normal, donde la fase estacionaria incorpora nitrato de plata.

El documento D01 divulga un procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), donde la fase estacionaria de la cromatografía incorpora iones de plata (página 11, párrafo 2; página 12, párrafo 1).

El documento D02 divulga un procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen ácido linolénico mediante cromatografía de capa fina. La fase estacionaria está formada por una mezcla de ácido salicílico impregnado con nitrato de plata (página 84, párrafo 2; página 85, párrafo 1).

El documento D03 divulga un procedimiento para la purificación de triglicéridos que contiene ácido docosahexaenoico mediante cromatografía en columna gravimétrica en fase normal, donde la fase estacionaria de la columna contiene iones metálicos como plata, magnesio o calcio (columna 4, líneas 17-52).

El documento D04 divulga un procedimiento para la purificación de triglicéridos (dipalmito-oleina, dipalmito-linoleina, triestearina) mediante cromatografía en columna gravimétrica en fase normal, donde la fase estacionaria está formada por una mezcla de gel de sílice y nitrato de plata (página 403, resumen).

El documento D05 divulga un procedimiento para la separación de triglicéridos que contienen ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico) de los que contienen ácidos grasos monoinsaturados (ácido palmitoleico o ácido oleico) mediante un procedimiento en continuo que incorpora cromatografía de columna en fase normal, donde la fase estacionaria está formada por aluminosilicatos junto a iones de plata (columna 1, líneas 6-15; columna 5, líneas 12-30; columna 18, ejemplo 1).

Los documentos citados divulgan procedimientos de purificación de triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico por otras técnicas (documentos D01 y D02) o bien se refieren a técnicas cromatográficas como la definida en la solicitud pero aplicadas a otros glicéridos (documentos D03 - D05).

Se considera que ninguno de los documentos anteriores, solos ni en combinación, divulgan ni dirigen al experto en la materia hacia un procedimiento para la purificación de triglicéridos que contienen ácido gamma-linolénico mediante cromatografía en columna gravimétrica en fase normal y que incorpore nitrato de plata u otras sales de metales en la fase estacionaria.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 1-7 de la solicitud es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).