

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 896 247**

51 Int. Cl.:

A61K 31/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2019** E 19153420 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021** EP 3666867

54 Título: **Proceso de producción de colesterol de aceite de pescado**

30 Prioridad:

14.12.2018 US 201815896263

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

24.02.2022

73 Titular/es:

**MARKOVITS ROJAS, ALEJANDRO (33.3%)
Avenida Eduardo Frei Montalva 6000 Quilicura
Santiago de Chile, CL;
HÄRTING GLADE, THOMAS FRANCIS (33.3%) y
HÄRTING ECKMAN, STEVEN LEE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MARKOVITS ROJAS, ALEJANDRO;
HARTING GLADE, THOMAS FRANCIS y
HÄRTING ECKMAN, STEVEN LEE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 896 247 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de producción de colesterol de aceite de pescado

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la producción de colesterol de aceite de pescado.

5 Antecedentes de la invención

Actualmente existe una creciente demanda de colesterol de calidad farmacéutica con un contenido de colesterol del 95 % o mayor para la producción de vitaminas D₂, D₃, hormonas y emulsiones de agua en aceite (W/O) en cosméticos.

10 Actualmente, el colesterol a escala industrial se produce principalmente a partir de alcoholes de cera de lana, es decir, la fracción no saponificable de la grasa de la lana, que contiene de aproximadamente 25 % a aproximadamente 32 % de colesterol. Los procesos más comunes para producir colesterol comprenden la formación de un producto de adición insoluble producido al hacer reaccionar el colesterol con una sal metálica seguido de la descomposición del aducto y la recuperación del colesterol. Dichos procesos son capaces de cumplir los requisitos de pureza para las aplicaciones farmacéuticas de colesterol. Por ejemplo, en el documento US 2.536.753 se desvela un proceso en donde la sal metálica es cloruro de zinc.

15 Sin embargo, este proceso conocido genera grandes cantidades de residuos industriales líquidos (RIL), cuya gestión puede aumentar considerablemente los costes de producción. Además, la demanda mundial de lana ha disminuido drásticamente en las últimas décadas, lo que ha provocado una disminución de las existencias de ovinos y a una menor disponibilidad de grasa de lana, lo que hace necesario buscar fuentes adicionales de suministro de colesterol.

20 En Spiric A. et al: "Statistical evaluation of fatty acid profile and cholesterol content in fish (common carp) lipids obtained by different sample preparation procedures", Analytical Chimica Acta, vol. 672, no. 1-2 de julio de 2010, págs. 67-71, se desvela un proceso para extraer colesterol de tejidos de los peces mediante saponificación a 80 °C, seguido de extracción con hexano y éter dietílico.

En el documento GB 526951 se desvela un proceso para la extracción de colesterol de tejidos animales tales como de cerebro, médula espinal, etc. mediante saponificación y extracción con un disolvente no miscible en agua.

25 En el documento GB 489623 se desvela un proceso para obtener colesterol de aceites animales marinos sometiendo el aceite a fraccionamiento mediante múltiples destilaciones secuenciales al vacío del aceite a diferentes temperaturas y presiones, en donde una de las fracciones destiladas comprende colesterol, tanto libre como esterificado. Si se desea, dicha fracción que comprende colesterol puede purificarse adicionalmente mediante la saponificación de la fracción seguido de la extracción de la materia no saponificable, concentración y cristalización.

30 En el Ejemplo 1 del documento GB 489623, el aceite de ballena clarificado se somete a destilación molecular a una temperatura de 90 °C a 220 °C y una presión de entre 0,13 y 0,40 Pa (0,001 y 0,003 mmHg). A medida que se reduce la presión y se eleva la temperatura, se extraen sucesivamente fracciones correspondientes del 0,2 al 2 % que comprenden la mayor parte de los ácidos grasos libres, el escualeno y otras fracciones volátiles. Se extraen más fracciones en proporciones que varían del 0,5 al 10 % entre aproximadamente 120 °C y 160 °C, comprendiendo dichas fracciones colesterol libre y esterificado. Es evidente que se requieren no menos de cuatro destilaciones consecutivas, cada una a una temperatura y presión específicas, para llegar a una fracción rica en colesterol utilizando este proceso.

35 También hay otras diversas desventajas del proceso desvelado en el documento GB 489623. En la actualidad, el aceite de pescado es un producto valioso debido a su contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Las destilaciones múltiples de aceite de pescado aumentan el contenido de ácidos grasos trans del aceite y promueven la polimerización de ácidos grasos insaturados, lo que a su vez disminuye el contenido de EPA y DHA. Las destilaciones múltiples hacen que el aceite de pescado sea inadecuado para el consumo humano o animal.

40 Por otro lado, los aceites de pescado actuales contienen una gran variedad de contaminantes antropogénicos tóxicos y/o nocivos, como los bifenilos policlorados (PCB, por sus siglas en inglés), el diclorodifeniltricloroetano (DDT por sus siglas en inglés,) y sus metabolitos, las dibenzodioxinas (PCDD por sus siglas en inglés,) y los dibenzofuranos (PCDF, por sus siglas en inglés), los hidrocarburos poliaromáticos (PAH, por sus siglas en inglés), los plaguicidas y sus productos de degradación, también conocidos como contaminantes orgánicos persistentes o COP, que son resistentes a la degradación ambiental y, por tanto, bioacumulables. Por lo tanto, las fracciones de destilado que comprenden colesterol comprenderán también uno o más de dichos contaminantes. El contenido de dichos contaminantes en las fracciones de destilado será incluso mayor que en el aceite de pescado. Este hecho, aunque evidente, también se

puede encontrar en la técnica anterior.

5 En el documento US 7.678.930 (US 2006/0134303 A1) se desvela un proceso para obtener un aceite de pescado reducido en colesterol libre mediante la destilación al vacío del aceite, con un fluido de destilación añadido, denominado "fluido de trabajo", que comprende al menos uno de un éster de ácido graso, una amida de ácido graso y un hidrocarburo

Por otro lado, en el documento US 7.718.698 se desvela un proceso para disminuir la cantidad de contaminantes ambientales en el aceite de pescado, también mediante destilación al vacío del aceite. Estas dos patentes tienen descripciones de procesos idénticas. Por lo tanto, en condiciones de destilación al vacío donde se eliminan los contaminantes ambientales, también se elimina el colesterol libre y viceversa.

10 El destilado del proceso del documento US 7.678.930 tiene un nivel más alto de contaminantes antropogénicos tóxicos y/o nocivos que el aceite de pescado y su contenido de colesterol no es superior al 10 %, por lo tanto, no es adecuado como fuente de colesterol en los alimentos formulados para camarones y langostinos. Lo mismo puede decirse de los concentrados de colesterol obtenidos por el proceso descrito en el documento GB 489623. Dado que en el documento GB 489623 el colesterol se obtiene a partir de dichos concentrados por métodos tales como saponificación seguido de extracción de la materia no saponificable (que también comprende todos los COP) con un disolvente inmiscible en agua, la concentración y la cristalización, el colesterol sólido cristalizado también contendrá contaminantes, lo que por sí solo es suficiente para impedir su uso con fines farmacéuticos.

20 En el documento US 4.104.286 se desvela un proceso para aislar colesterol de huevo entero seco. El proceso comprende el tratamiento del huevo seco con un etanol acuoso al 95 %, seguido de saponificación en hidróxido de metal alcalino etanólico acuoso, y de concentración y purificación con un disolvente de hidrocarburo y metanol. Si este proceso se aplicara al aceite de pescado, la fracción no saponificable, además del colesterol, contendría otros componentes no saponificables como el hidrocarburo escualeno y también la mayoría de los contaminantes orgánicos antropogénicos tóxicos y/o nocivos del aceite de pescado también solubles en etanol acuoso al 95 %.

25 En el documento US 2011/0207952, que desvela un proceso de extracción de colesterol a partir de un residuo de procesamiento de algas, se desvela un proceso de saponificación de una grasa o aceite, extracción con disolvente de la mezcla saponificada y extracción de colesterol de la corriente de solución.

En el documento JPS 63174997 se hace con dióxido de carbono supercrítico.

30 En la solicitud internacional WO2016/096989 se desvela un método para extraer colesterol a partir de un residuo de aceite de pescado, conteniendo el residuo de un proceso estándar para la producción de concentrados de EPA y DHA de aceite de pescado, hasta un 15 % de colesterol. Un experto en la materia sabe que dicho residuo corresponde a aproximadamente el 1 % del aceite de pescado original, lo que equivale a menos del 10 % del colesterol presente en el aceite de pescado original.

Sumario de la invención

35 En un aspecto, la tecnología desvelada se refiere a un proceso para producir colesterol a partir de aceite de pescado, en el que dicho aceite de pescado tiene una cantidad determinada de contaminantes antropogénicos, que comprende las siguientes etapas:

40 (a) destilar aceite de pescado en una mezcla con un fluido auxiliar que comprenda uno o más ésteres etílicos de ácidos grasos compuestos por ácidos grasos C10-C22 en una columna de destilación al vacío conducida a una temperatura de evaporación de 150 a 300 °C y a una presión de columna de 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar) para obtener un primer residuo y un primer destilado,

(b) destilar el primer destilado en una columna de destilación al vacío conducida a una temperatura de evaporación de 150 a 250 °C y a una presión de columna de 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar) para obtener un segundo destilado y un segundo residuo,

(c) poner en contacto el segundo residuo con un álcali para producir una mezcla saponificada,

45 (d) poner en contacto la mezcla saponificada con un disolvente orgánico no polar o con una mezcla de disolventes orgánicos no polares para producir una fase orgánica y una fase acuosa,

(e) separar la fase orgánica de la fase acuosa,

(f) enfriar la fase orgánica para formar una fase sólida y una fase líquida, y

(g) separar la fase sólida de la fase orgánica, en donde la fase sólida separada comprende colesterol que comprende al menos 95 % en peso de colesterol y que tiene un contenido más bajo de contaminantes antropogénicos que en el aceite de pescado, en donde el colesterol se forma en una sola etapa de extracción-cristalización.

5 En una realización, en la etapa (a), el aceite de pescado se destila en una mezcla con un fluido auxiliar. En otra realización, la columna de destilación al vacío es una columna de destilación de paso corto. En otra realización, el aceite de pescado se suministra a la columna de destilación al vacío en la etapa (a) a una velocidad de 1 a 150 kg/h por m² de superficie del evaporador. En otra realización, la relación en peso entre el fluido auxiliar y el aceite de pescado en la mezcla es de aproximadamente 1:100 a 10:100. En otra realización, la mezcla se suministra a la columna de destilación al vacío a una velocidad de 1 a 150 kg/h por m² de superficie del evaporador. En otra realización, la etapa (a) se realiza a una temperatura de evaporación de 150 a 300 °C y a una presión de columna de entre 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar). En otra realización, el primer destilado se suministra a la columna de destilación al vacío en la etapa (b) a una velocidad de 10 a 350 kg/h por m² de superficie del evaporador. En otra realización, la etapa (b) se realiza a una temperatura de evaporación de 100 a 250 °C y a una presión de columna de entre 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar). En otra realización, el álcali de la etapa (c) es NaOH o KOH. En otra realización, el disolvente orgánico no polar o la mezcla de disolventes orgánicos no polares de la etapa (d) comprende disolvente de hidrocarburo alifático. En otra realización, la fase orgánica y la fase acuosa se separan por decantación o centrifugación. En otra realización, la fase orgánica separada se mantiene a menos de 30 °C para formar una fase sólida y una fase líquida. En otra realización, en la etapa (g), la fase sólida separada comprende al menos 95 % de colesterol.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para obtener, a partir de aceite de pescado con un rendimiento de al menos 50 % basado en aceite de pescado, un colesterol de calidad farmacéutica que tenga al menos 95 % de colesterol y un nivel de contaminantes antropogénicos tóxicos y/o nocivos (COP) más bajo que en el aceite de pescado y que produce simultáneamente un aceite de pescado residual o procesado de alta calidad, adecuado para el consumo humano o animal o para la elaboración de concentrados de EPA y DHA.

El producto de la presente invención, además de poder usarse en procesos para la producción de vitaminas D₂, D₃, hormonas y emulsiones de agua en aceite (W/O) en cosméticos, se puede utilizar como ingrediente suministrado en alimentos formulados para camarones y langostinos.

Uno o más objetivos de la invención se logran mediante el siguiente proceso:

- a) destilar aceite de pescado en una columna de destilación al vacío para obtener un primer residuo y un primer destilado,
- b) destilar el primer destilado en una columna de destilación al vacío para obtener un segundo destilado y un segundo residuo,
- c) poner en contacto el segundo residuo con un álcali para producir una mezcla saponificada,
- d) poner en contacto la mezcla saponificada con un disolvente orgánico inmiscible con agua o con una mezcla de disolventes orgánicos inmiscibles con agua para producir una fase orgánica y una fase acuosa.
- e) separar la fase orgánica de la fase acuosa,
- f) enfriar la fase orgánica para formar una fase sólida y una fase líquida y
- g) separar la fase sólida de la fase orgánica.

40 Aceite de pescado.

Como se usa en el presente documento, la expresión "aceite de pescado" se refiere a aceites obtenidos de peces, crustáceos y otros animales marinos silvestres y de piscifactoría. Dichos aceites se obtienen a partir de todo el cuerpo del pez o de sus subproductos como el hígado, la cabeza, etc. Los ejemplos de dichos aceites comprenden aceite de anchoa, aceite de sardina, aceite de salmón, aceite de jurel, aceite de menhaden, aceite de atún, aceite de krill, aceite de calamar, aceite de abadejo, aceite de arenque, aceite de capelán, aceite de hígado de bacalao y aceite de calamar. Los aceites de pescado pueden proceder de una sola especie o pueden ser mezclas de aceites de pescado.

El aceite de pescado también se refiere a cualquier aceite de pescado que provenga de fábricas de aceite/harina de pescado, incluido el aceite de pescado desgomado o blanqueado o aceite de pescado neutralizado. Dichos aceites, además de triglicéridos, su componente principal, comprenden típicamente entre 0,01 y 10 % de ácidos grasos libres y aproximadamente 2 % o menos de materia no saponificable compuesta principalmente de colesterol, gliceril éteres, alcoholes grasos, escualeno e hidrocarburos saturados. (Young, F.V.K. "The Chemical & Physical Properties of Crude Fish Oils for Refiners & Hydrogenators" Fish Oil Bulletin N.º 18, 1986). El contenido promedio de colesterol del aceite de pescado es de aproximadamente 1 %.

En la presente invención, una columna de destilación al vacío puede ser una columna de destilación de paso corto que tiene un condensador interno próximo a la superficie calentada o evaporador. La columna de destilación de paso

corto también se conoce como columna de destilación molecular cuando la distancia entre el evaporador y el condensador es comparable a la trayectoria libre media de las moléculas de destilado en las condiciones operativas. Por lo tanto, en la presente invención, la columna de destilación al vacío puede ser una columna de destilación de paso corto, una columna de destilación molecular o un equivalente de la misma.

5 a) Destilación del aceite de pescado.

El aceite de pescado se suministra a una columna de destilación al vacío, generalmente a una velocidad en el intervalo de 1 a 150 kg/h por m² de superficie del evaporador, preferentemente a una velocidad en el intervalo de 10 a 100 kg/h por m² de superficie del evaporador.

10 En una realización, la temperatura de evaporación está entre 150 °C y 300 °C, preferentemente entre 180 °C y 280 °C. En una realización, la presión de la columna está entre 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar), preferentemente entre 0,1 y 10 Pa (0,001 y 0,1 mbar). En una realización, la temperatura de evaporación está entre 150 °C y 300 °C, preferentemente entre 180 °C y 280 °C, y la presión de la columna está entre 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar), preferentemente entre 0,1 y 10 Pa (0,001 y 0,1 mbar).

15 El proceso de destilación es el resultado de la separación de un primer destilado que comprende colesterol, otra materia no saponificable del aceite de pescado, ácidos grasos libres y contaminantes antropogénicos, y un primer residuo que comprende aceite de pescado con contenido reducido de colesterol, materia no saponificable y contaminantes antropogénicos. El primer destilado se condensa en el condensador interno. El primer destilado y el primer residuo salen de la columna por separado y se recogen en la salida de la columna. El primer residuo es un aceite de pescado de alta calidad adecuado para el consumo humano o animal o para la elaboración de concentrados de EPA y DHA.

20 En caso de que el contenido de ácido graso libre del aceite de pescado sea inferior a aproximadamente 6 %, lo que ocurre siempre en el aceite de pescado neutralizado, el primer destilado rico en colesterol, a la temperatura del condensador que es preferentemente inferior a 60 °C, puede formar una película viscosa que fluye lentamente en el condensador o incluso puede solidificarse, obstruyendo así el condensador. Esto se debe al alto punto de fusión del colesterol (136 °C). En el estado de la técnica se proporcionan dos soluciones a este problema, ambas recurren a algún fluido auxiliar (AF, por sus siglas en inglés). En una solución, el AF se pone en contacto con el aceite de pescado para formar una mezcla y la mezcla se destila en las condiciones de temperatura y presión anteriormente descritas. La segunda solución consiste en suministrar el AF directamente sobre la superficie del condensador.

30 Cuando un fluido auxiliar (AF) se utiliza en una mezcla con aceite de pescado, éste incluye cualquier fluido o mezcla de fluidos que se destila en las condiciones de destilación al vacío descritas anteriormente, y que también está en estado líquido a la temperatura del condensador y se disuelve o es miscible con el colesterol, reduciendo así su concentración en la película condensada, formando por tanto una mezcla de fluido que fluye libremente hacia abajo en el condensador e impidiendo la obstrucción o el ensuciamiento del condensador. Cualquier fluido o mezcla de fluidos que cumpla los requisitos anteriores, se puede usar como fluido auxiliar, aunque los fluidos auxiliares preferidos para la presente invención incluyen ésteres etílicos de ácidos grasos insaturados o mezclas de ésteres etílicos de ácidos grasos compuestos principalmente por ácidos grasos insaturados, ya que dichos fluidos auxiliares permiten el uso de una temperatura más baja del condensador, lo que a su vez mejora el rendimiento del sistema de vacío y reduce la velocidad de reevaporación de los condensados, mejorando por tanto el rendimiento total de eliminación del destilado deseado.

40 Si el AF se utiliza en una mezcla con el aceite de pescado, la proporción de fluido auxiliar en relación con el aceite de pescado en la mezcla es de aproximadamente 1 a 10 %, preferentemente de aproximadamente 2 a 8 %. La mezcla, en una base libre de fluido auxiliar, se suministra a la columna de destilación al vacío, a la velocidad descrita anteriormente y las condiciones de destilación son las mismas que las descritas anteriormente sin fluido auxiliar, pero el primer destilado también comprende además el fluido auxiliar.

45 b) Destilación del primer destilado.

El primer destilado se suministra a una columna de destilación al vacío a una velocidad de 10 a 350 kg/h por m² de superficie de evaporación, preferentemente de 50 a 200 kg/h por m².

50 En una realización, la temperatura de evaporación está entre 100 °C y 250 °C, preferentemente entre 140 °C y 220 °C y la presión de la columna está entre 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar), preferentemente entre 0,1 y 10 Pa (0,001 y 0,1 mbar).

El proceso de destilación del primer destilado da como resultado la producción de un segundo destilado que se condensa en el condensador interno, y un segundo residuo que comprende colesterol.

El segundo destilado y el segundo residuo salen de la columna de destilación al vacío por separado y se recogen a la salida de la columna.

c) Saponificación del segundo residuo.

5 A continuación, se saponifica el segundo residuo. Con este fin, el segundo residuo se pone en contacto en agua con un álcali, tal como NaOH o KOH, para formar una mezcla saponificante. La relación en peso entre el segundo residuo y el agua es de 1:0,1 a 1:10, preferentemente de 1:0,1 a 1:1. Alternativamente, el segundo residuo se pone en contacto con un álcali, tal como NaOH o KOH, en una solución que comprende agua y un disolvente polar tal como metanol o etanol o cualquier mezcla de dichos disolventes para formar una mezcla saponificante. La relación en peso entre el segundo residuo y la solución es de 1:0,1 a 1:10, preferentemente de 1:0,1 a 1:1.

10 La cantidad de álcali en el agua o en la solución es igual al valor de saponificación del segundo residuo, preferentemente de 1,01 a 1,20 veces el valor de saponificación del segundo residuo.

La mezcla saponificante se suministra a un recipiente cerrado y se calienta a una temperatura en el intervalo de 30 a 150 °C durante 5 a 120 minutos, preferentemente durante 10 a 30 minutos, para formar una mezcla saponificada.

15 A continuación, la mezcla saponificada se pone en contacto con uno o más disolventes orgánicos no polares, tal como un hidrocarburo alifático tal como hexano, heptano, octano, éter de petróleo, ciclohexano, cicloheptano, benceno o tolueno, lo que produce la separación de dos fases inmiscibles, una fase orgánica que comprende colesterol y una fase acuosa que comprende jabones de ácidos grasos. La relación en peso entre la mezcla saponificada y el disolvente orgánico es de 1:0,5 a 1:10, preferentemente de 1:1 a 1:5.

20 En caso de que la saponificación del segundo residuo se hiciera con NaOH o KOH en agua sola, para facilitar la separación de fases, se pueden añadir uno o más disolventes polares, tal como agua, etanol, metanol o acetona, a la mezcla saponificada en contacto con uno o más disolventes orgánicos no polares, tal como un hidrocarburo alifático, benceno o tolueno.

25 La puesta en contacto de la mezcla saponificada con el disolvente o disolventes se realiza en un recipiente cerrado agitado a una temperatura de 10 a 180 °C, preferentemente de 20 a 120 °C durante un intervalo de tiempo de 1 a 60 minutos, preferentemente entre 2 a 15 minutos, después de lo cual las fases orgánica y acuosa se separan entre sí, por ejemplo, mediante sedimentación o centrifugación. Si es necesario, la fase acuosa separada se puede poner en contacto con uno o más disolventes no polares para formar dos fases inmiscibles adicionales.

30 La concentración de sólidos en la fase orgánica separada se puede aumentar evaporando parcialmente el disolvente hasta alcanzar un contenido de sólidos de 1 a 40 %, preferentemente de 5 a 30 %. La fase orgánica concentrada se mantiene a una temperatura inferior a 30 °C, preferentemente inferior a 20 °C, hasta que se forma una mezcla sólido-líquido. Los sólidos se separan de la mezcla, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación. El sólido separado que tiene un nivel de contaminantes antropogénicos más bajo que el aceite de pescado, comprende al menos 95 % de colesterol.

35 Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a la luz de los siguientes ejemplos ilustrativos que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como una limitación de la presente invención cuyo alcance se define en las reivindicaciones.

Ejemplo comparativo.

Colesterol de aceite de anchoa según el proceso de patente GB 489623.

40 El aceite de anchoa se procesó de acuerdo con el proceso descrito en la patente GB 489623, como se realizó en el Ejemplo 1 del documento GB 489623 para el aceite de ballena.

45 Se suministraron 100 kg del aceite de anchoa con un contenido total de colesterol de 7,4 mg/g, a una columna de destilación de paso corto VK 83 y se procedió a la destilación a una temperatura de 90 °C y a una presión de 0,3 Pa (0,003 mbar). La temperatura del condensador se fijó a 50 °C. Se obtuvo la cantidad de 1,6 kg de un destilado D1 junto con un residuo R1, correspondiente al aceite de anchoa residual de la primera destilación. El contenido de colesterol de D1 fue inferior al 0,1 %. A continuación, R1 se suministró a una columna de destilación de paso corto VK 83 y se destiló a una temperatura de 130 °C y a una presión de 0,2 Pa (0,002 mbar). La temperatura del condensador se fijó a 50 °C. Se obtuvo una cantidad de 1,1 kg de un destilado D2 junto con un residuo R2, correspondiente al aceite de anchoa residual de la segunda destilación. El contenido de colesterol de D2 fue de 0,8 %.

50 Como la fracción en D2 fue baja, aproximadamente de 1 %, se realizaron las siguientes destilaciones utilizando un fluido auxiliar de la composición que se muestra en la Tabla 1 a continuación. Se debe tener en cuenta que, en

circunstancias similares, el uso de un fluido auxiliar puede ayudar a impedir la obstrucción del condensador, como se describe en el documento US 2.126.467.

5 R2 se mezcló con 5 kg de fluido auxiliar de la composición que se muestra en la Tabla 1 y la mezcla se suministró a una columna de destilación de paso corto VK 83 y se destiló a una temperatura de 180 °C y a una presión de 0,2 Pa (0,002 mbar). La temperatura del condensador se ajustó a 20 °C. Se obtuvo una cantidad de 5,8 kg de un destilado D3 junto con un residuo R3, correspondiente al aceite de anchoa residual de la tercera destilación. El contenido de colesterol en D3 fue de 6,6 %.

10 A continuación, se mezcló R3 con 5 kg de fluido auxiliar de la composición mostrada en la Tabla 1 y la mezcla se suministró a una columna de destilación de paso corto VK 83 y se destiló a una temperatura de 220 °C y a una presión de 0,2 Pa (0,002 mbar). La temperatura del condensador se ajustó a 20 °C. Se obtuvo una cantidad de 5,3 kg de un destilado D4 junto con un residuo R4, correspondiente al aceite de anchoa residual de la cuarta destilación. El contenido de colesterol en D3 fue de 6,2 %.

Tabla 1. Composición del fluido auxiliar en el ejemplo comparativo.

Ester etílico de ácido graso	Concentración de la composición, %
Éster etílico de ácido mirístico (C14:0)	6,6
Éster etílico de ácido palmítico (C16:0)	8,2
Éster etílico de ácido palmitoleico (C16:1)	46,4
Éster etílico de ácido esteárico (C18:0)	1,9
Éster etílico de ácido oleico (C18:1)	29,3
Éster etílico de ácido linoleico (C18:2)	4,1
Éster etílico de ácido alfa-linolénico (18:3)	3,5

15 A continuación, se combinaron y saponificaron 580 g de D3 y 530 g de D4. La extracción se realizó dos veces con 5 kg de éter etílico. El extracto de éter etílico se evaporó recuperando 94 g de residuo. El residuo se disolvió con 250 g de acetato de etilo y se enfrió en un refrigerador durante la noche. Se formaron cristales sólidos. Los sólidos se separaron por filtración y después se secaron en un horno de vacío para obtener 62 g de sólidos secos con una concentración de colesterol de 90,4 %. El total de hidrocarburos poliaromáticos (PAH) de los sólidos fue de 31,5 ppb, superior que en el aceite de anchoa original.

20 En cuanto al aceite de pescado residual de cada destilación, la Tabla 2 muestra el contenido combinado de EPA y DHA, el contenido de ácidos grasos trans y el índice de acidez de cada residuo.

Tabla 2.

Contenido combinado de EPA y DHA, contenido de ácidos grasos trans e índice de acidez					
	Aceite de Anchoa	R1	R2	R3	R4
EPA + DHA, %	26,7	26,8	26,2	25,1	24,3
Ácidos Grasos Trans, %	0,3 %	0,3 %	0,4 %	0,6 %	0,7 %
Índice de acidez, mg KOH/g	6,3	0,3	0,1	<0,05	<0,05

25 Como puede observarse en la Tabla 2, la obtención de fracciones de colesterol mediante el fraccionamiento del aceite de pescado, como se desvela en la patente GB 489623, conduce a un aumento del contenido de grasas trans y a una pérdida de (EPA + DHA), probablemente debido a la polimerización en el aceite de pescado residual. Después de cuatro destilaciones sucesivas, el contenido de ácidos grasos trans aumentó en aproximadamente 130 % y el contenido de EPA + DHA disminuyó en aproximadamente 9 %.

30 El ejemplo comparativo muestra que el colesterol obtenido según el proceso de la patente GB 489623 no es un colesterol de calidad farmacéutica, contiene una cantidad detectable de impurezas que provienen del aceite de pescado y, por tanto, el aceite de pescado residual o procesado no es adecuado para el consumo humano o animal.

Ejemplo 1.

Colesterol de aceite de anchoa neutralizado.

El aceite de anchoa (la misma materia prima que en el Ejemplo 1) se neutralizó con soda cáustica y se lavó con agua caliente para producir un aceite de anchoa neutralizado con un índice de acidez de 0,2 mg KOH/g.

Se mezclaron 250 kg del aceite de anchoa neutralizado con 15 kg del fluido auxiliar indicado en la Tabla 1.

5 La mezcla se suministró a una columna de destilación de paso corto VK 83 y se destiló a una temperatura de 253 °C y a una presión de 0,8 Pa (0,008 mbar). La temperatura del condensador se fijó a 20 °C. Se obtuvo una cantidad de 18 kg de un destilado D1 junto con un residuo de aceite de anchoa R1.

10 A continuación, se suministraron 15 kg de destilado D1 a una columna de destilación de paso corto VK 83 a una temperatura de 155 °C y a una presión de 0,7 Pa (0,007 mbar). La temperatura del condensador se fijó a 20 °C. Se obtuvo una cantidad de 3,5 kg de un residuo R2.

15 A continuación, en un reactor agitado, 1 kg de R2 se puso en contacto con 2 kg de agua, 1 kg de etanol (alcohol de 95° (190 proof)) y 110 g de NaOH (99 %) para formar una primera mezcla, se agitó y se calentó a 77 °C durante un periodo de tiempo de 2 horas. Después, la mezcla se enfrió a 35 °C y se puso en contacto en el mismo reactor con 5 kg de hexano para formar una segunda mezcla que se agitó durante 5 minutos y después se dejó reposar hasta que se formaron dos fases inmiscibles: una primera fase acuosa y una primera fase orgánica. Después de separar las dos fases, la primera fase acuosa se puso en contacto con 5 kg de hexano reciente para formar una segunda mezcla que se agitó durante 5 minutos y después se dejó sedimentar para formar una segunda fase orgánica y una segunda fase acuosa. Después de separar estas fases, la primera y la segunda fase orgánica se combinaron y la combinación se puso en contacto con 500 g de agua y 500 g de etanol, se agitó y después se dejó reposar hasta que se formó una
20 tercera fase orgánica y una tercera fase acuosa. La tercera fase orgánica se separó de la tercera fase acuosa y después se evaporó parcialmente para obtener 1 752 g de un residuo R3.

A continuación, el residuo R3 se enfrió durante la noche en un refrigerador a 5 °C. Se formaron cristales sólidos. Los sólidos se separaron por filtración y después se secaron en una estufa de vacío para obtener 261 g de sólidos secos.

En la Tabla 3, a continuación, se presentan los resultados analíticos del Ejemplo 1.

25 Tabla 3. Resultados analíticos del Ejemplo 1.

	Aceite de Anchoa Neutralizado	Destilado D1	Sólido Seco
Colesterol libre, mg/g	7,0	92,7	971,5
Colesterol total, mg/g	7,4	93,0	971,5
Éster de colesterol ¹ , mg/g	0,8	0,5	<LDC
Materia no saponificable, %	1,38	13,40	100
Índice de acidez, mg KOH/g	0,2	2,6	<LDC
Dioxinas, furanos y dioxinas similares a PCB, TEQ ppt (límite inferior)	1,41	12,83	<LDC
PCB 209, ppb (límite inferior)	18,53	225,27	<LDC
PAH totales, ppb	14,11	133,6	<LDC
Plaguicidas, ppb	18,4	241,3	<LDC
¹ Como mg de oleato de colesterol/g de muestra.			
LDC: Límite de cuantificación			

En R1, no hubo diferencia entre el contenido de ácido graso trans y el contenido de EPA + DHA con respecto al aceite de anchoa, y las concentraciones de contaminantes antropogénicos tóxicos y/o nocivos estaban por debajo de los límites de cuantificación.

Ejemplo 2.

Colesterol de aceite de sardina

Se suministraron 240 kg de aceite de sardina a una columna de destilación de paso corto VK 83 y se destilaron a una temperatura de 253 °C y a una presión de 0,3 Pa (0,003 mbar). La temperatura del condensador se ajustó a 50 °C. Se obtuvo una cantidad de 18,6 kg de un destilado D1 junto con un residuo de aceite de sardina R1.

5 A continuación, se suministraron 10 kg de destilado D1 a una columna de destilación de paso corto VK 83 a una temperatura de 170 °C y a una presión de 0,1 Pa (0,01 mbar). La temperatura del condensador se ajustó a 40 °C. Se obtuvo una cantidad de 3,3 kg de un residuo R2.

10 A continuación, se puso en contacto 1 kg de R2 en un reactor agitado con 1,5 kg de agua, 1 kg de etanol (alcohol de 95° (190 proof)) y 105 g de NaOH (99 %) para formar una primera mezcla, se agitó y se calentó a 78 °C durante un periodo de tiempo de 2 horas. Después la mezcla se enfrió a 35 °C y se puso en contacto en el mismo reactor con 5 kg de éter de petróleo para formar una segunda mezcla que se agitó durante 5 minutos y después se dejó reposar hasta que se formaron dos fases inmiscibles: una primera fase acuosa y una primera fase orgánica. Después de separar las dos fases, la primera fase acuosa se puso en contacto con 5 kg de hexano reciente para formar una segunda mezcla que se agitó durante 5 minutos y después se dejó sedimentar para formar una segunda fase orgánica y una segunda fase acuosa. Después de separar estas fases, la primera y la segunda fase orgánica se combinaron y la combinación se puso en contacto con 500 g de agua y 500 g de etanol, se agitó y después se dejó reposar hasta que se formó una tercera fase orgánica y una tercera fase acuosa. La tercera fase orgánica se separó de la tercera fase acuosa y después se evaporó parcialmente para obtener 1 600 g de un residuo R3.

20 A continuación, R3 se puso en contacto con 200 g de etanol (alcohol de 95° (190 proof)) y se enfrió en un refrigerador a 5 °C durante 8 horas. Se formaron cristales sólidos. Los sólidos se separaron por filtración y después se secaron en una estufa de vacío para obtener 252 g de sólidos secos.

En la Tabla 4, a continuación, se presentan los resultados analíticos del Ejemplo 2.

Tabla 4. Resultados analíticos del Ejemplo 2.

	Aceite de sardina	Destilado D1	Sólido seco
Colesterol libre, mg/g	9,3	118,6	964,9
Colesterol total, mg/g	9,6	118,9	964,9
Éster de colesterol ¹ , mg/g	0,5	0,5	<LDC
Materia no saponificable, %	1,47	16,01	100
Índice de acidez, mg KOH/g	14,4	171,3	<LDC
Dioxinas, furanos y dioxinas similares a PCB, TEQ ppt (límite inferior)	0,5	6,8	<LDC
PCB 209, ppb (límite inferior)	1,61	16,96	<LDC
PAH totales, ppb	17,21	218,12	<LDC
Plaguicidas, ppb	28,15	328,63	<LDC
Colesterol libre, mg/g	21,0	248,5	<LDC
As inorgánico, ppm	2,2	<LDC	<LDC
Metales pesados, ppm	0,06	<LDC	<LDC
¹ Como mg de oleato de colesterilo/g de muestra. LDC: Límite de cuantificación			

25 En R1, no hubo diferencia entre el contenido de ácido graso trans y el contenido de EPA + DHA con respecto al aceite de anchoa, y las concentraciones de contaminantes antropogénicos tóxicos y/o nocivos estaban por debajo de los límites de cuantificación.

Ejemplo 3:

Colesterol de aceite de sardina blanqueado

Se calentaron 250 kg de aceite de sardina con 2 kg de arcilla blanqueadora a 70 °C y a un vacío de 5 000 Pa (50 mbar) en un recipiente agitado durante 30 minutos. Después de separar la arcilla por filtración, se obtuvieron 245 kg de aceite

de sardina blanqueado.

5 Se mezclaron 240 kg de aceite de sardina blanqueado con 10 kg de fluido auxiliar de la composición que se muestra en la Tabla 2 anterior y la mezcla se suministró a una columna de destilación de paso corto VK 83 y se destiló a una temperatura de 245 °C y a una presión de 0,8 Pa (0,008 mbar). La temperatura del condensador se ajustó a 20 °C. Se obtuvo una cantidad de 21,3 kg de un destilado D1 y un residuo de aceite de sardina blanqueado R1.

A continuación, se suministraron 15 kg de destilado D1 a una columna de destilación de paso corto VK 83 a una temperatura de 167 °C y a una presión de 0,4 Pa (0,004 mbar). La temperatura del condensador se ajustó a 20 °C. Se obtuvo una cantidad de 4,4 kg de un residuo R2.

10 A continuación, se puso en contacto 1 kg de R2 en un reactor agitado con 2 kg de agua, 2 kg de etanol (alcohol de 95 ° (190 proof)) y 130 g de NaOH (99 %) para formar una primera mezcla, se agitó y se calentó a 78 °C durante un periodo de tiempo de 1 hora. Después la mezcla se enfrió a 40 °C y se puso en contacto en el mismo reactor con 5 kg de ciclohexano para formar una segunda mezcla que se agitó durante 5 minutos y después se dejó reposar hasta que se formaron dos fases inmiscibles: una primera fase acuosa y una primera fase orgánica. Después de separar las dos fases, la primera fase acuosa se puso en contacto con 5 kg de ciclohexano reciente para formar una segunda mezcla que se agitó durante 5 minutos y después se dejó reposar para formar una segunda fase orgánica y una segunda fase acuosa. Después de separar estas fases, la primera y la segunda fase orgánica se combinaron y la combinación se puso en contacto con 500 g de agua y 500 g de etanol, se agitó y después se dejó reposar hasta que se formó una tercera fase orgánica y una tercera fase acuosa. La tercera fase orgánica se separó de la tercera fase acuosa y después se evaporó hasta la sequedad para obtener 251 g de un residuo R3.

20 A continuación, el residuo R3 se disolvió con 1,2 kg de acetona a 55 °C y se enfrió en un refrigerador a 5 °C durante 24 horas. Se formaron cristales sólidos. Los sólidos se separaron por filtración y después se secaron en una estufa de vacío para obtener 189 g de sólidos secos. La Tabla 5 presenta los resultados analíticos del Ejemplo 3.

Tabla 5. Resultados analíticos del Ejemplo 3

	Aceite de sardina	de Destilado D1	Sólido seco
Colesterol libre, mg/g	7,5	82,5	975,1
Colesterol total, mg/g	8,2	83,9	975,1
Éster de colesterol ¹ , mg/g	1,2	2,4	<LDC
Materia no saponificable, %	1,66	13,04	100
Número ácido, mg KOH/g	7,3	171,0	<LDC
Dioxinas, furanos y dioxinas similares a PCB, TEQ ppt (límite inferior)	0,7	7,6	<LDC
PCB 209, ppb (límite inferior)	3,61	17,08	<LDC
PAH totales, ppb	17,45	247,49	<LDC
Plaguicidas, ppb	22,1	256,4	<LDC
Colesterol libre, mg/g	12,9	142,7	<LDC
As inorgánico, ppm	5,2	<LDC	<LDC
Metales pesados, ppm	0,04	<LDC	<LDC

¹Como mg de oleato de colesterol/g de muestra.
LDC: Límite de cuantificación

25 En R1, no hubo diferencia entre el contenido de ácido graso trans y el contenido de EPA + DHA con respecto al aceite de anchoa, y las concentraciones de contaminantes antropogénicos tóxicos y/o nocivos estaban por debajo de los límites de cuantificación.

Ejemplo 4Análisis de contaminantes de los sólidos secos del Ejemplo 2

Se realizó un análisis completo de contaminantes en el producto de colesterol del Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 6:

Tabla 6

		Sólidos secos del Ejemplo 2
Dioxinas y furanos (17 PCDD/F)	OMS(2005)-PCDD/F TEQ (límite inferior), pg/g	< LDC
Bifenilos policlorados (12 PCB de la OMS)	OMS(2005) -PCB TEQ (límite inferior), pg/g	< LDC
Bifenilos policlorados (6 ICES PCB)	6 ndl-PCB Total (límite inferior), ng/g	< LDC
TEQ-Totales OMS-PCDD/F y PCB	OMS(2005)-PCDD/F + PCB TEQ (límite inferior), pg/g	< LDC
PCB 209, Bifenilos policlorados 209 en total	Mono- a DecaCB Total (límite inferior), ng/g	< LDC
Éteres de bifenilos polibromados (24 PBDE)	suma de 24 BDE (excl. LDC), ng/g	< LDC
2-cloropropano-1,3-diol unido a éster (éster de 2-MCPD)	2-MCPD (libre y unido) Total, µg/kg	< LDC
3-cloropropano-1,2-diol unido a éster (éster de 3-MCPD)	3-MCPD (libre y unido) Total, µg/kg	< LDC
3-cloropropano-1,2-diol unido a éster (éster de 3-MCPD) y glicidol (éster de glicidilo)	3-MCPD (libre y unido) Total, µg/kg	< LDC
Arsénico (As)	Arsénico (As), mg/kg	< LDC
13 PAH (EPA) ¹	Suma de todos los PAH identificados positivos, µg/kg	< LDC
Benzo(a)pireno	Benzo(a)pireno, µg/kg	< LDC
Plaguicidas organoclorados y piretroides	DDT (total), mg/kg	< LDC
Plaguicidas organoclorados y piretroides	DDE, p,p', mg/kg	< LDC
PBDE metoxilados (MeO-)	2-MeO-PBDE-68, ng/g	< LDC
PBDE metoxilados (MeO-)	2-MeO-PBDE-47, ng/g	< LDC
¹ Agencia de Protección Ambiental LDQ: Límite de cuantificación		

5 Los compuestos, 2-MeO-PBDE-68 y 2-MeO-PBDE-47, son PBDE (éteres de bifenilos polibromados, por sus siglas en inglés) metoxilados de origen natural, que se acumulan en el aceite de pescado a través de la red trófica marina, pero también pueden originarse por biotransformación de los PBDE.

Los ejemplos muestran que el colesterol obtenido de acuerdo con la presente invención es un colesterol de calidad farmacéutica, que no contiene una cantidad detectable de impurezas procedentes del aceite de pescado y, por tanto, el pescado residual o procesado es adecuado para el consumo humano o animal.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir colesterol de aceite de pescado, en donde dicho aceite de pescado tiene una cantidad determinada de contaminantes antropogénicos, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) destilar aceite de pescado en una mezcla con un fluido auxiliar que comprenda uno o más ésteres etílicos de ácidos grasos compuestos por ácidos grasos C10-C22 en una columna de destilación al vacío conducida a una temperatura de evaporación de 150 a 300 °C y a una presión de columna de 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar) para obtener un primer residuo y un primer destilado,
- (b) destilar el primer destilado en una columna de destilación al vacío conducida a una temperatura de evaporación de 150 a 250 °C y a una presión de columna de 0,01 y 50 Pa (0,0001 y 0,5 mbar) para obtener un
10 segundo destilado y un segundo residuo,
- (c) poner en contacto el segundo residuo con un álcali para producir una mezcla saponificada,
- (d) poner en contacto la mezcla saponificada con un disolvente orgánico no polar o con una mezcla de disolventes orgánicos no polares para producir una fase orgánica y una fase acuosa,
- (e) separar la fase orgánica de la fase acuosa,
15 (f) enfriar la fase orgánica para formar una fase sólida y una fase líquida, y
- (g) separar la fase sólida de la fase orgánica, en donde la fase sólida separada comprende colesterol que comprende al menos 95 % en peso de colesterol y que tiene un contenido más bajo de contaminantes antropogénicos que en el aceite de pescado, en donde el colesterol se forma en una sola etapa de extracción-cristalización.
- 20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la columna de destilación al vacío es una columna de destilación de paso corto.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el aceite de pescado se suministra a la columna de destilación al vacío en la etapa (a) a una velocidad de 1 a 150 kg/h por m² de superficie del evaporador.
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la relación en peso entre el fluido auxiliar y el aceite de pescado en la mezcla es de aproximadamente 1:100 a 10:100.
25
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la mezcla se suministra a la columna de destilación al vacío a una velocidad de 1 a 150 kg/h por m² de superficie del evaporador.
6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa (a) se realiza a una temperatura de evaporación de 180 a 280 °C y a una presión de columna de entre 0,1 y 10 Pa (0,001 y 0,1 mbar).
- 30 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el primer destilado se suministra a la columna de destilación al vacío en la etapa (b) a una velocidad de 10 a 350 kg/h por m² de superficie del evaporador.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa (b) se realiza a una temperatura de evaporación de 140 a 220 °C y/o a una presión de columna de entre 0,1 y 10 Pa (0,001 y 0,1 mbar).
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el hidróxido de metal alcalino de la etapa (c) es NaOH o KOH.
35
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el disolvente orgánico no polar o la mezcla de disolventes orgánicos no polares de la etapa (d) comprende un disolvente de hidrocarburo alifático.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la fase orgánica y la fase acuosa se separan mediante decantación o centrifugación.
- 40 12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la fase orgánica separada se mantiene a menos de 30 °C para formar una fase sólida y una fase líquida.