



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102012902090110
Data Deposito	08/10/2012
Data Pubblicazione	08/04/2014

Classifiche IPC

Titolo

METODO DI PRODUZIONE DI ESTERI ETILICI DI ACIDI GRASSI POLIINSATURI E LORO IMPIEGO IN FORMULAZIONI PER USO ORALE NELL'UOMO

9937MRID1 Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“METODO DI PRODUZIONE DI ESTERI ETILICI DI ACIDI GRASSI
POLIINSATURI E LORO IMPIEGO IN FORMULAZIONI PER USO
ORALE NELL’UOMO”**

a nome : **MILANOTRADING s.r.l.**

con sede in: Milano

* * *

La presente invenzione ha per oggetto un nuovo metodo chimico di preparazione di esteri etilici di acidi grassi poliinsaturi, derivati da precursori semilavorati, la loro purificazione ed il loro impiego nella preparazione di formulazioni per uso orale.

Stato dell’arte

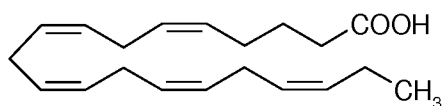
Gli acidi grassi poliinsaturi, in particolare quelli lineari, recanti doppi legami carbonio-carbonio in configurazione “cis” (o “Z”) e separati l’uno dall’altro da un atomo di carbonio saturo, aventi diciotto o più atomi di carbonio totali, sono da tempo noti come importanti o essenziali fattori nutritivi nell’uomo, entrando nella costituzione dei fosfolipidi di membrana e nella biosintesi della prostaglandine.

Più in particolare, quelli denominati “omega-3”, caratterizzati dal fatto di avere, nella denominazione IUPAC, l’ultimo doppio legame tra il terzo ed il quarto atomo di carbonio a partire dal metile terminale della catena, sono stati riconosciuti come importanti nella prevenzione e cura delle dislipidemie e dei danni da esse derivati sul sistema cardiocircolatorio.

Di acidi grassi “omega-3” sono particolarmente ricchi alcuni semilavorati derivanti dall’olio estratto dai pesci marini, soprattutto del

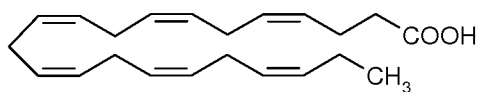
genere *Sardinia* e *Gadus* (merluzzo). Tale olio è costituito da trigliceridi nei quali i principali residui di acidi grassi sono l'acido (*all-Z*)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, o EPA, e l'acido (*all-Z*)-4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico, o DHA, di formula, rispettivamente, (I) e (II).

FORMULA (I)



(*all-Z*)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid
Molecular Weight =302.46
Molecular Formula =C₂₀H₃₀O₂

FORMULA (II)



(*all-Z*)-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA)
Molecular Weight =328.50
Molecular Formula =C₂₂H₃₂O₂

L'EPA è importante nella biosintesi delle prostaglandine e dei trombassani della serie 3, mentre il DHA è il maggior costituente delle membrane sensibili della retina e del cervello.

L'olio di pesce è ricavato dai pesci, o dal loro fegato, mediante procedimenti meccanici o estrattivi.

EPA e DHA, assieme ad altri acidi omega-3 ed altri componenti minori vengono isolati dall'olio di pesce come acidi, sali, esteri od altri derivati funzionali, mediante procedimenti chimici o enzimatici. In particolare, con "olio di pesce EE" del commercio si intende un semilavorato derivante dall'olio, estratto da pesci di vario genere, mediante processi di transesterificazione e costituito prevalentemente dagli esteri etilici degli acidi grassi originali. Sono in commercio, come integratori alimentari, varie specialità contenenti miscele di EPA e DHA e loro derivati a vario titolo.

Soprattutto in Italia è particolarmente ricercata, perché entra nella composizione di specialità farmaceutiche, una miscela di esteri etilici di EPA

e DHA a titolo molto elevato: EPA più DHA maggiore dell'85% del totale, con EPA non inferiore al 40% e DHA non inferiore al 34%; Omega-3 totali maggiori del 95%; rapporto EPA/DHA tra 0,9 e 1,5.

Una miscela di questa qualità è stata ottenuta, sinora, da olio di pesce naturale, mediante raffinazione preliminare (filtrazione, sbiancatura, deodorizzazione, neutralizzazione, lavaggio, essiccamento), transesterificazione per ottenere la miscela di esteri etilici grezzi, trattamento con urea per separare i derivati di acidi grassi saturi e monoinsaturi, distillazione per ottenere il prodotto desiderato. La distillazione deve essere eseguita con la tecnica, e quindi l'apparecchiatura, delle distillazioni "molecolari" o a cammino corto (US2011091947A1 - AK Biotech). La resa complessiva è attorno al 25% in peso sull'olio di pesce e l'attrezzatura per la distillazione molecolare è molto costosa.

Esiste, peraltro, un metodo chimico di preparazione degli esteri etilici degli acidi grassi Omega-3, riportato in WO2012/088620 A2 col titolo "Omega-3 concentrate". Tale metodo rivendica un processo che, partendo da oli di origine naturale varia, animale o vegetale, mediante idrolisi alcalina seguita da esterificazione con catalisi acida, ottiene una miscela di esteri etilici con titolo in omega-3 totali maggiori di 80%. Occorre, però, una purificazione mediante distillazione molecolare degli esteri etilici grezzi. L'olio usato è di bassa qualità, con Omega-3 totali dal 30 al 50%, l'idrolisi è fatta ad alta temperatura, i sali sodici precipitati sono scartati, le acque contenenti glicerina sono avviate tal quali all'esterificazione, si impiegano grandi quantità di acidi e non si isolano gli acidi grassi intermedi che, così, non sono purificati né lavati. La resa finale è bassa: circa 20 - 25% in peso

sull'olio e recupero di Omega-3 del 50 -60% del contenuto originale.

Descrizione dell'invenzione

Si è ora trovato che si può ottenere una miscela di esteri etilici di EPA e DHA della qualità "farmaceutica" richiesta in Italia e sopra descritta, mediante un processo completamente chimico, semplice ed eseguibile con reattori ed attrezzature normali in un impianto chimico industriale.

Si tratta, in breve, di sottoporre l'olio di pesce EE del commercio, della migliore qualità disponibile, in adatto solvente, a idrolisi alcalina mediante quantità definita di alcali, a temperatura controllata ed in presenza di antiossidanti. Si ottiene un precipitato costituito dai sali alcalini degli acidi grassi costituenti gli esteri dell'olio medesimo. Tale precipitato può essere separato dalle acque madri mediante filtrazione o tenuto unito ad esse nelle fasi successive; la scelta è in conseguenza della qualità dell'olio impiegato e del rapporto EPA/DHA in esso, perché il precipitato è più ricco in EPA dell'olio stesso, mentre le acque madri risultano arricchite in DHA. Dai sali alcalini, mediante acidificazione a pH e temperatura controllati, in ambiente acquoso, si ottengono gli acidi corrispondenti che, dopo estrazione e lavaggio, vengono trasformati negli esteri desiderati mediante catalisi acida nell'alcool corrispondente. La miscela di esteri, opportunamente concentrata, estratta e lavata, viene decolorata con carbone attivo e, se necessario, purificata con urea. La resa è tra il 52 e 82% in peso sull'olio di partenza, in dipendenza dalla necessità di purificazioni.

Tutta la lavorazione avviene in atmosfera inerte ed in presenza di antiossidanti ed inibitori di radicali.

Le differenze, ed i conseguenti miglioramenti, rispetto alla tecnica

precedente, riportata in WO 2012/088620 A2, sono le seguenti:

- L'olio di partenza è "olio di pesce EE" del commercio, così come già definito, di qualità elevata, tipo "45:35", vale a dire avente un contenuto in EPA maggiore del 45% ed un contenuto in DHA maggiore del 35%. La procedura di idrolisi alcalina, condotta preferibilmente in isopropanolo, porta ad ottenere i sali sodici degli acidi grassi Omega-3 come fase solida, separabile dalle acque madri con ottime rese e libera da impurezze e sottoprodotti indesiderati.

- La separazione dei sali sodici degli acidi grassi Omega-3 consente di correggere eventuali squilibri del rapporto EPA/DHA che deve essere tra 0,9 e 1,5; questo perché si è, appunto, trovato che il precipitato è naturalmente arricchito in EPA, mentre il filtrato si ritrova arricchito in DHA.

- La presenza di antiossidanti fin dalle prime fasi della lavorazione, rallenta molto la degradazione dei derivati Omega-3.

- L'isolamento, mediante estrazione in solvente, degli acidi grassi liberi Omega-3 e la loro purificazione mediante opportuni lavaggi, è un ulteriore vantaggio ai fini della qualità del prodotto finito.

- L'esterificazione degli acidi grassi Omega-3 avviene con catalisi acida, in etanolo assoluto ed in condizioni molto blande; gli acidi impiegati sono veramente in quantità catalitica e si è scelto preferibilmente quello che, essendo riportato nella procedura analitica della Farmacopea Europea, è, verosimilmente, il più adatto a dare risultati quantitativi senza danneggiare il prodotto.

- La miscela di esteri etilici Omega-3 ottenuti viene neutralizzata in condizioni tali da evitare nuove idrolisi, ad esempio con sodio etossido,

estratta con un solvente e lavata con acqua.

- È ulteriormente purificata per trattamento con carbone decolorante scelto tra quelli impiegati per uso alimentare o farmaceutico.

- Quando è utile il trattamento di purificazione mediante la formazione di addotti con urea, questa viene impiegata in condizioni blande ed in quantità circa uguale, in peso, rispetto agli esteri da trattare, evitando così volumi elevati e formazione di sottoprodotti indesiderati.

- Non è mai necessaria alcuna distillazione del prodotto finito, tanto meno “molecolare”.

- La resa finale va da 50 a 80% in peso sull’olio di partenza.

- Si recupera da 60 a 95% del contenuto in Omega-3 totali dell’olio di partenza.

La miscela di esteri etilici Omega-3, che è liquida, può essere confezionata in capsule di gelatina molle, come varie specialità già in commercio; adsorbita su supporto inerte, come, ad esempio, silice precipitata, terra di diatomee o simili, con opportuni eccipienti solidi, leganti, disaggreganti e lubrificanti, oltre ad antiossidanti, può essere confezionata anche in compresse o capsule opercolate.

Descrizione dettagliata dell’invenzione

Il processo dell’invenzione viene effettuato in atmosfera inerte: una quantità di olio di pesce EE del commercio, di qualità minima 45:35, meglio se distillato, viene sciolto da tre a quattro volumi di etanolo 96% o etanolo assoluto o isopropanolo, preferibilmente isopropanolo. Si aggiunge 1% in peso di antiossidante scelto tra tocoferolo, sodio o potassio metabisolfito, BHA, BHT, acido ascorbico o altri ammessi per uso farmaceutico,

preferibilmente BHT o BHA. A temperatura tra 0° e 60°C, preferibilmente da 15° a 20°C, si aggiunge una soluzione satura di sodio o potassio idrossido, in quantità da 1 a 2 equivalenti/equivalente, preferibilmente 1,1 eq/eq., in uno degli alcoli sopra menzionati, preferibilmente etanolo assoluto. Si agita poi alla stessa temperatura per un tempo che può andare da 1 a 12 ore. Si può filtrare il solido precipitato, lavandolo con etanolo assoluto o isopropanolo, oppure portare a residuo sotto vuoto tutta la miscela di reazione; nel primo caso, le acque madri ed i lavaggi si scartano. Il solido filtrato o il residuo della concentrazione vengono sciolti in quattro o cinque volumi d'acqua; la soluzione viene acidificata con un acido minerale non ossidante, come l'acido cloridrico o solforico a varie concentrazioni, ed estratta ripetutamente con un solvente immiscibile con acqua, come toluene, etere di petrolio o idrocarburi alifatici o cicloalifatici liquidi, etile acetato, etere etilico o isopropilico, diclorometano o cloroformio. Gli estratti riuniti sono lavati con acqua e portati a residuo sotto vuoto, ottenendo una miscela degli acidi corrispondenti ai radicali acilici dei trigliceridi impiegati. Su detta miscela si caricano da tre a quattro volumi di etanolo assoluto. Si aggiunge un catalizzatore acido, in quantità da 0,01 a 0,2 moli/mole, preferibilmente 0,1 moli/mole, scelto tra acidi minerali non ossidanti ed anidri, come acido cloridrico gas, acido solforico, acido fosforico, oppure acido 4-toluensolfonico, benzensolfonico, metansolfonico, oppure acidi di Lewis come alluminio triclорuro, ferro triclорuro, stagno tetracлорuro, titanio tetracлорuro, boro trifluoruro, anche come complesso con etere etilico, boro triclорuro, zinco dicлорuro o altri; preferibilmente boro triclорuro. Si agita a temperatura da 0° a 60°C per un tempo da 1 a 12 ore. Si neutralizza l'ambiente di reazione con alcali minerali

o organici, preferibilmente sodio etossido, e si porta a residuo sotto vuoto. Si riprende con un solvente scelto tra quelli, immiscibili con acqua, già elencati nello stadio precedente e si lava ripetutamente con acqua. Si tratta la fase organica con carbone decolorante, scelto tra quelli per uso farmaceutico o alimentare, in quantità da 1/10 a 1/20 sul peso dell'olio, si filtra, lavando il filtro con lo stesso solvente, e si porta a residuo sotto vuoto. Eventualmente si lava ancora il residuo con acqua deionizzata, a temperatura da 20° a 60°C, due o tre volte; si essicca poi bene sotto vuoto.

Se analiticamente necessario, il residuo viene ancora ripreso con metanolo, da tre a quattro volumi, e urea, da 0,9 a 1,1 volte in peso, omogeneizzato a caldo e lasciato cristallizzare raffreddando lentamente fino a temperatura tra 0° e 15°C. Si filtra il solido cristallizzato, lavandolo con poco metanolo, e si porta il filtrato a residuo sotto vuoto. Il residuo viene lavato ripetutamente con acqua deionizzata, a temperatura da 20° a 60°C ed essiccato accuratamente sotto vuoto. La resa in estere va da 50 a 80% circa in peso sull'olio impiegato.

La miscela di esteri etilici Omega-3 preparata con il processo dell'invenzione può essere diluita in un solvente volatile, come etere di petrolio, diclorometano o etanolo e la soluzione viene miscelata con silice precipitata o terra di diatomee in quantità tale da ottenere una pasta consistente. Tale pasta viene caricata sulle arelle di un forno che possa essere scaldato e posto sottovuoto. Si essicca il tutto, con vuoto inferiore a 50 mbar e temperatura non superare a 60°C, finché il solvente residuo nella massa solida è inferiore ai limiti ammessi. La massa solida residua viene macinata in apposito granulatore, addizionata di eccipienti che consentano la formazione

di compresse, come lattosio, cellulosa microcristallina, polivinilpirrolidone o PVP, talco e magnesio stearato e compressa con adatti punzoni. Oppure, addizionata solo di lubrificanti secchi, come talco e magnesio stearato, la massa è caricata in apposita opercolatrice per riempire capsule di gelatina dura.

Seguono ora alcuni esempi di preparazione, sia degli esteri etilici Omega-3, che di compresse e capsule oggetto dell'invenzione.

ESEMPIO 1

Olio di pesce EE "45/35" (minimo 45% EPA e 35% DHA) 100 g, viene sciolto in etanolo assoluto 300 ml. Sotto agitazione, si aggiunge BHT 1,0 g ed una soluzione di sodio idrossido 98% 12,8 g in etanolo assoluto 150 ml; si agita poi la miscela a temperatura ambiente per 12 ore. Si raffredda a 0°C e si filtra il solido precipitato, lavandolo con poco etanolo assoluto raffreddato a 0°C. Si scioglie il solido ottenuto in acqua 500 ml, si aggiunge diclorometano 200 ml e si porta la miscela a pH $\approx$ 2 con acido cloridrico 37%, agitando bene. Si agita per alcuni minuti e si separano le fasi; la fase acquosa è estratta ancora con diclorometano 100 ml. Gli estratti riuniti sono lavati con acqua deionizzata 100 ml e portati a residuo sotto vuoto; si ottiene un residuo oleoso di acidi grassi Omega-3, liberi, 74,5 g. Tali acidi grassi vengono sciolti in etanolo assoluto 400 ml, si aggiunge una soluzione 1M in eptano di boro triclorigli, 23,7 ml, si agita brevemente e si lascia a temperatura ambiente, al buio, per 12 ore. Si porta poi a riflusso per 1 ora e si raffredda a 0°C. Si porta a pH neutro con una soluzione 21% di sodio etossido in etanolo e si distilla tutto il solvente sotto vuoto, fino a residuo, su bagno a 60°C. Si riprende il residuo con etere di petrolio, frazione 30° - 50°C, 400 ml ed acqua

deionizzata 100 ml. Si agita bene e si separano le fasi, scartando la fase acquosa inferiore. Si lava la fase organica ancora con acqua deionizzata 100 ml per altre due volte. Si tratta la fase organica lavata con carbone decolorante “Eno Anticromo” 8 g circa, per 40 - 45' e si filtra il carbone, lavando il filtro con etere di petrolio 30 - 50. Si porta a residuo sotto vuoto il filtrato; tale residuo viene lavato due volte con acqua deionizzata scaldata a 55°C, 200 ml per volta ed essiccato bene sotto vuoto a temperatura massima 70°C. Il residuo oleoso, costituito dagli esteri etilici degli acidi grassi Omega-3, pesa 73 g. Il contenuto in EPA è il 48,2%; quello in DHA, il 34,3%; quello in Omega-3 totali, il 90%.

ESEMPIO 2

Olio di pesce EE “45/35 distillato” (minimo 45% EPA e 35% DHA), 100 g, viene sciolto in etanolo 96% 300 ml. Sotto agitazione, si aggiunge BHT 1,0 g ed una soluzione di sodio idrossido 98% 12,8 g in etanolo 96% 150 ml; si agita poi la miscela a temperatura ambiente per 12 ore. Si distilla tutto il solvente sotto vuoto. Il residuo viene sciolto in acqua deionizzata 500 ml, ottenendo una soluzione limpida, si aggiunge diclorometano 200 ml e si porta la miscela a $\text{pH} \approx 2$ con acido cloridrico 37%, agitando bene. Si agita per alcuni minuti e si separano le fasi; la fase acquosa è estratta ancora con diclorometano 100 ml. Gli estratti riuniti sono lavati con acqua deionizzata 100 ml e portati a residuo sotto vuoto; si ottiene un residuo oleoso di acidi grassi Omega-3, liberi, 91,0 g. Tali acidi grassi vengono sciolti in etanolo assoluto 400 ml, si aggiunge una soluzione 1M in eptano di boro triclورو, 23,7 ml, si agita brevemente e si lascia a temperatura ambiente, al buio, per 12 ore. Si porta poi a riflusso per 1 ora e si raffredda a 0°C. Si porta a pH neutro

con una soluzione 21% di sodio etossido in etanolo e si distilla tutto il solvente sotto vuoto, fino a residuo, su bagno a 60°C. Si riprende il residuo con etere di petrolio, frazione 30° - 50°C, 400 ml ed acqua deionizzata 100 ml. Si agita bene e si separano le fasi, scartando la fase acquosa inferiore. Si lava la fase organica ancora con acqua deionizzata 100 ml per altre due volte. Si tratta la fase organica lavata con carbone decolorante “Eno Anticromo” 9 g circa, per 40 - 45' e si filtra il carbone, lavando il filtro con etere di petrolio 30 - 50. Si porta a residuo sotto vuoto il filtrato; tale residuo viene lavato due volte con acqua deionizzata scaldata a 55°C, 200 ml per volta ed essiccato bene sotto vuoto a temperatura massima 70°C. Il residuo oleoso, costituito dagli esteri etilici degli acidi grassi Omega-3, pesa 82 g. Il contenuto in EPA è il 47,3%; quello in DHA, il 45,5%; quello in Omega-3 totali, il 96%.

ESEMPIO 3

Olio di pesce EE “45/35” (minimo 45% EPA e 35% DHA) 100 g, viene sciolto in isopropanolo 300 ml. Sotto agitazione, si aggiunge BHA 1,0 g ed una soluzione di sodio idrossido 98% 12,8 g in etanolo assoluto 150 ml; si agita poi la miscela a temperatura ambiente per 12 ore. Si raffredda a 0°C e si filtra il solido precipitato, lavandolo con isopropanolo. Si scioglie il solido ottenuto in acqua 500 ml, si aggiunge etile acetato 200 ml e si porta la miscela a pH $\approx$ 2 con acido cloridrico 37%, agitando bene. Si agita per alcuni minuti e si separano le fasi; la fase acquosa è estratta ancora con etile acetato 100 ml. Gli estratti riuniti sono lavati con acqua deionizzata 100 ml e portati a residuo sotto vuoto; si ottiene un residuo oleoso di acidi grassi Omega-3, liberi, 80,5 g. Tali acidi grassi vengono sciolti in etanolo assoluto 400 ml, si

aggiunge una soluzione 1M in eptano di boro tricloruro, 23,7 ml, si agita brevemente e si lascia a temperatura ambiente, al buio, per 12 ore. Si porta poi a riflusso per 1 ora e si raffredda a 0°C. Si porta a pH neutro con una soluzione 21% di sodio etossido in etanolo e si distilla tutto il solvente sotto vuoto, fino a residuo, su bagno a 60°C. Si riprende il residuo con etere di petrolio, frazione 30° - 50°C, 400 ml ed acqua deionizzata 100 ml. Si agita bene e si separano le fasi, scartando la fase acquosa inferiore. Si lava la fase organica ancora con acqua deionizzata ml 100 per altre due volte. Si tratta la fase organica lavata con carbone decolorante “Eno Anticromo” g 8 circa, per 40 - 45' e si filtra il carbone, lavando il filtro con etere di petrolio 30 - 50. Si porta a residuo sotto vuoto il filtrato; tale residuo viene lavato due volte con acqua deionizzata scaldata a 55°C, 200 ml per volta ed essiccato bene sotto vuoto a temperatura massima 70°C. Il residuo oleoso, costituito dagli esteri etilici degli acidi grassi Omega-3, pesa 75 g. Il contenuto in EPA è il 47,2%; quello in DHA, il 39,3%; quello in Omega-3 totali, il 91%.

ESEMPIO 4

Olio di pesce EE “45/35 distillato” (minimo 45% EPA e 35% DHA) 100 g, viene sciolto in isopropanolo ml 300. Sotto agitazione, si aggiunge BHA 1,0 g ed una soluzione di sodio idrossido 98% 12,8 g in etanolo assoluto 150 ml; si agita poi la miscela a temperatura ambiente per 12 ore. Si raffredda a 0°C e si filtra il solido precipitato, lavandolo con poco isopropanolo raffreddato a 0°C. Si scioglie il solido ottenuto in acqua 500 ml, si aggiunge diclorometano 200 ml e si porta la miscela a pH $\approx$ 2 con acido cloridrico 37%, agitando bene. Si agita per alcuni minuti e si separano le fasi; la fase acquosa è estratta ancora con diclorometano 100 ml. Gli estratti riuniti sono lavati con

acqua deionizzata 100 ml e portati a residuo sotto vuoto; si ottiene un residuo oleoso di acidi grassi Omega-3, liberi, 82 g. Tali acidi grassi vengono sciolti in etanolo assoluto 400 ml, si aggiunge una soluzione 1M in eptano di boro tricloruro, 23,7 ml, si agita brevemente e si lascia a temperatura ambiente, al buio, per 12 ore. Si porta poi a riflusso per 1 ora e si raffredda a 0°C. Si porta a pH neutro con una soluzione 21% di sodio etossido in etanolo e si distilla tutto il solvente sotto vuoto, fino a residuo, su bagno a 60°C. Si riprende il residuo con etere di petrolio, frazione 30° - 50°C, 400 ml ed acqua deionizzata 100 ml. Si agita bene e si separano le fasi, scartando la fase acquosa inferiore. Si lava la fase organica ancora con acqua deionizzata 100 ml per altre due volte. Si tratta la fase organica lavata con carbone decolorante “Eno Anticromo” 8 g circa, per 40 - 45' e si filtra il carbone, lavando il filtro con etere di petrolio 30 - 50. Si porta a residuo sotto vuoto il filtrato; tale residuo viene lavato due volte con acqua deionizzata scaldata a 55°C, 200 ml per volta ed essiccato bene sotto vuoto a temperatura massima 70°C. Il residuo oleoso, costituito dagli esteri etilici degli acidi grassi Omega-3, pesa 77,5 g. Il contenuto in EPA è il 47,4%; quello in DHA, il 48,5%; quello in Omega-3 totali, il 97,2%.

ESEMPIO 5

Olio di pesce EE “45/35” (minimo 45% EPA e 35% DHA), 100 g, viene sciolto in etanolo 96% 300 ml. Sotto agitazione, si aggiunge BHT 1,0 g ed una soluzione di potassio idrossido 85% 20,7 g in etanolo 96% 150 ml; si agita poi la miscela a temperatura ambiente per 12 ore. Si distilla tutto il solvente sotto vuoto. Il residuo viene sciolto in acqua deionizzata 500 ml, ottenendo una soluzione limpida, si aggiunge diclorometano 200 ml e si porta

la miscela a $\text{pH} \approx 2$ con acido cloridrico 37%, agitando bene. Si agita per alcuni minuti e si separano le fasi; la fase acquosa è estratta ancora con diclorometano 100 ml. Gli estratti riuniti sono lavati con acqua deionizzata 100 ml e portati a residuo sotto vuoto; si ottiene un residuo oleoso di acidi grassi Omega-3, liberi, 91,5 g. Tali acidi grassi vengono sciolti in etanolo assoluto 400 ml, si aggiunge una soluzione 1M in eptano di boro tricloruro, 23,7 ml, si agita brevemente e si lascia a temperatura ambiente, al buio, per 12 ore. Si porta poi a riflusso per 1 ora e si raffredda a 0°C . Si porta a pH neutro con una soluzione $\approx 10\%$ di sodio idrossido in etanolo 96% e si distilla tutto il solvente sotto vuoto, fino a residuo, su bagno a 60°C . Si riprende il residuo con etile acetato 400 ml ed acqua deionizzata 100 ml. Si agita bene e si separano le fasi, scartando la fase acquosa inferiore. Si lava la fase organica ancora con acqua deionizzata 100 ml per altre due volte. Si tratta la fase organica lavata con carbone decolorante “Eno Anticromo” 9 g circa, per 40 - 45' e si filtra il carbone, lavando il filtro con etile acetato. Si porta a residuo sotto vuoto il filtrato; tale residuo viene lavato due volte con acqua deionizzata scaldata a 55°C , 200 ml per volta ed essiccato bene sotto vuoto a temperatura massima 70°C . Il residuo oleoso, costituito dagli esteri etilici degli acidi grassi Omega-3, pesa 80,1 g. Il contenuto in EPA è il 43,6%; quello in DHA, il 38,5%; quello in Omega-3 totali, il 86,7%.

ESEMPIO 6

Olio di pesce EE “45/35” (minimo 45% EPA e 35% DHA) 100 g, viene sciolto in isopropanolo 300 ml. Sotto agitazione, si aggiunge BHA 1,0 g ed una soluzione di sodio idrossido 98% 12,8 g in etanolo assoluto 150 ml; si agita poi la miscela a temperatura ambiente per 12 ore. Si filtra il solido

precipitato, lavandolo con poco isopropanolo a temperatura ambiente. Si scioglie il solido ottenuto in acqua ml 500, si aggiunge diclorometano 200 ml e si porta la miscela a $\text{pH} \approx 2$ con acido cloridrico 37%, agitando bene. si aggiunge diclorometano 200 ml e si porta la miscela a $\text{pH} \approx 2$ con acido cloridrico 37%, agitando bene. Si agita per alcuni minuti e si separano le fasi; la fase acquosa è estratta ancora con diclorometano 100 ml. Gli estratti riuniti sono lavati con acqua deionizzata 100 ml e portati a residuo sotto vuoto; si ottiene un residuo oleoso di acidi grassi Omega-3, liberi, 85,4 g. Tali acidi grassi vengono sciolti in etanolo assoluto 400 ml, si aggiunge una soluzione 1M in eptano di boro tricloruro, 23,7 ml, si agita brevemente e si lascia a temperatura ambiente, al buio, per 12 ore. Si porta poi a riflusso per 1 ora e si raffredda a 0°C . Si porta a pH neutro con una soluzione $\approx 10\%$ di sodio idrossido in etanolo 96% e si distilla tutto il solvente sotto vuoto, fino a residuo, su bagno a 60°C . Si riprende il residuo con etile acetato 400 ml ed acqua deionizzata 100 ml. Si agita bene e si separano le fasi, scartando la fase acquosa inferiore. Si lava la fase organica ancora con acqua deionizzata 100 ml per altre due volte. Si tratta la fase organica lavata con carbone decolorante “Eno Anticromo” 8 g circa, per 40 - 45' e si filtra il carbone, lavando il filtro con etile acetato. Si porta a residuo sotto vuoto il filtrato; tale residuo viene lavato due volte con acqua deionizzata scaldata a 55°C , 200 ml per volta ed essiccato bene sotto vuoto a temperatura massima 70°C . Il residuo oleoso, costituito dagli esteri etilici degli acidi grassi Omega-3, pesa 76,3 g. Il contenuto in EPA è il 45,7%; quello in DHA il 36,3%; quello in Omega-3 totali, il 88.7%.

ESEMPIO 7

Il residuo di etilesteri Omega-3 dell'esempio 5), 80,1 g viene addizionato di urea, 88,0 g e di metanolo, 255 ml. Si omogeneizza la miscela scaldando a 55° - 60°C. Si raffredda lentamente, in 4 - 6 ore, a 10 - 12°C. Si tiene circa 1 ora e si filtra il solido cristallino precipitato, lavandolo con metanolo, 79 ml. Si porta a residuo, sotto vuoto, su bagno a 60°C, il filtrato. Si riprende il residuo con acqua deionizzata 220 ml a 55°C si agita bene e si decanta, scartando la fase acquosa inferiore.

Si ripete nello stesso modo con altra acqua deionizzata 220 ml, a 55°C, sulla fase oleosa superiore.

La fase oleosa lavata, viene essiccata sotto vuoto a 70°C. Si ottengono etilesteri Omega-3 purificati, 67,5 g. Il contenuto in EPA è il 44,7%; quello in DHA, il 43,3%; quello in Omega-3 totali, il 94,7%.

ESEMPIO 8

Il residuo di etilesteri Omega-3 dell'esempio 6), 76,3 g viene addizionato di urea, 69,0 g e di metanolo, 200 ml. Si omogeneizza la miscela scaldando a 55° - 60°C. Si raffredda lentamente, in 4 - 6 ore, a 10 - 12°C. Si tiene circa 1 ora e si filtra il solido cristallino precipitato, lavandolo con metanolo, 62 ml. Si porta a residuo, sotto vuoto, su bagno a 60°C, il filtrato. Si riprende il residuo con acqua deionizzata 173 ml a 55°C si agita bene e si decanta, scartando la fase acquosa inferiore.

Si ripete nello stesso modo con altra acqua deionizzata 173 ml a 55°C sulla fase oleosa superiore.

La fase oleosa lavata, viene essiccata sotto vuoto a 70°C. Si ottengono etilesteri Omega-3 purificati, 66,3 g. Il contenuto in EPA è il 47,8%; quello in

DHA, il 42,3%; quello in Omega-3 totali, il 96,8%.

ESEMPIO 9

100 g di etilesteri Omega-3 derivanti da uno dei metodi di preparazione descritti negli esempi precedenti, sono sciolti in 300 ml di etanolo per uso alimentare. Tale soluzione è versata, sotto agitazione, su 100 g di silice precipitata, amorfa. La miscela ottenuta, agitata fino a completa omogeneizzazione, viene essiccata in un forno sottovuoto a 40°C fino ad etanolo residuo inferiore a 5000 ppm e passata in un vagliatore oscillante munito di rete a maglie della finezza desiderata o in un mulino adatto. Il granulato fine ottenuto è unito, in proporzioni variabili, ad eccipienti adatti al confezionamento di compresse e sottoposto a punzonatura per ottenere compresse dal dosaggio desiderato. Ad esempio: granulato di cui sopra (etilesteri Omega-3/silice precipitata 1/1) 1000 mg; cellulosa microcristallina 160 mg; croscarmellosio sodico 100 mg; PVP (polivinilpirrolidone) 60 mg; talco 20 mg; magnesio stearato 60 mg.

Punzone di formato capsulare 21 x 10.

ESEMPIO 10

Il granulato fine (etilesteri Omega-3/silice precipitata 1/1) ottenuto come nell'esempio precedente, viene miscelato a secco con polveri lubrificanti, come talco e magnesio stearato; tipicamente, per 1000 mg di granulato, corrispondente a 500 mg di etilesteri Omega-3, si aggiungono 20 mg di talco e 60 mg di magnesio stearato, si mescola accuratamente e si carica, a raso o con opercolatrice a pistoncini, in capsule opercolate di gelatina dura, formato 0 o 00.

RIVENDICAZIONI

1. Processo per ottenere etil esteri di acido *all-Z*)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) e di acido (*all-Z*)-4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico DHA a partire da un olio di pesce EE, avente un contenuto in EPA maggiore del 45% ed un contenuto in DHA maggiore del 35%, comprendente:

- a) Idrolisi in adatto solvente mediante idrossidi alcalini dell'olio di partenza in presenza di antiossidanti;
- b) Eventuale separazione dei sali sodici solidi degli acidi grassi ottenuti dall'idrolisi dello stadio a) precipitati nell'ambiente di reazione;
- c) Dissoluzione in acqua del prodotto dell'idrolisi alcalina dello stadio a), sia come sale sodico solido separato nello stadio b), sia come residuo totale della reazione di idrolisi;
- d) Precipitazione, mediante acidificazione della soluzione acquosa dello stadio c), degli acidi grassi corrispondenti ai sali alcalini ottenuti dall'idrolisi a), loro estrazione con adatto solvente, lavaggio con acqua e concentrazione;
- e) Esterificazione con catalisi acida in etanolo o in miscele etanolo/acqua degli acidi grassi ottenuti nello stadio d), per ottenere i loro esteri etilici;
- f) Isolamento degli esteri etilici mediante neutralizzazione dell'ambiente di reazione, concentrazione, estrazione mediante adatto solvente degli esteri etilici stessi, lavaggio con acqua, trattamento con carbone decolorante, concentrazione, lavaggio finale con acqua ed essiccamento.

- g) Eventuale purificazione mediante trattamento con urea in metanolo; gli stadi a)-g) essendo effettuati in atmosfera inerte.
2. Processo secondo la rivendicazione 1, in cui i solventi impiegati nello stadio a) sono etanolo 96%, etanolo assoluto (maggiore del 99%) e isopropanolo e gli antiossidanti impiegati sono scelti tra tocoferolo, sodio o potassio metabisolfito, BHA, BHT, acido ascorbico, preferibilmente antiossidanti lipofili, più preferibilmente BHT o BHA.
3. Processo secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui l'idrolisi è condotta con idrossido di sodio o di potassio in eccesso molare preferibilmente di 1,1 moli per mole, a temperatura tra 15° e 20°C, per un tempo di 12 ± 1 ore.
4. Processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui i sali sodici nello stadio b) sono separati dalle acque madri a temperatura ambiente o tra 0° e +5°C e sono lavati con etanolo assoluto o isopropanolo.
5. Processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 4 in cui la dissoluzione dello stadio c) è effettuata a temperatura ambiente.
6. Processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui la precipitazione degli acidi grassi dello stadio d) avviene mediante aggiunta di un leggero eccesso stechiometrico di acido minerale, preferibilmente acido cloridrico acquoso o acido solforico diluito, a temperatura tra 0° e 20°C, fino a $\text{pH} \approx 2$; gli acidi precipitati sono estratti con solventi immiscibili con acqua, preferibilmente etere di petrolio o diclorometano; la concentrazione avviene mediante distillazione sotto vuoto di tutto il solvente, fino ad ottenere un residuo oleoso di acidi grassi Omega-3 prevalenti.
7. Processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 6 in cui l'esterificazione dello stadio e) avviene in etanolo, preferibilmente assoluto

(maggiore del 99%), in presenza di catalizzatori acidi, in quantità da 0,01 a 0,2, preferibilmente 0,1 moli per mole.

8. Processo secondo la rivendicazione 7 in cui il catalizzatore acido è il boro triclورو, tal quale o in soluzione di eptano o diclorometano, e la reazione è condotta per circa 12 ore a temperatura ambiente e per un'ora circa a riflusso del solvente.

9. Processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 8 in cui l'isolamento degli esteri etilici avviene dopo neutralizzazione con soluzioni diluite di idrossido di sodio o di potassio oppure con sodio etossido in soluzione di etanolo.

10. Processo secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 9 in cui l'eventuale purificazione dello stadio g) è condotta aggiungendo una quantità di urea da 0,9 a 1,1 volte in peso.

11. Processo secondo una delle rivendicazioni da 1 a 10 in cui l'idrolisi a) è effettuata in presenza di potassio idrossido e lo stadio b) è assente.

12. Etil esteri di acido *all-Z*)-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) e di acido (*all-Z*)-4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico (DHA) ottenuti dal processo delle rivendicazioni 1-10 adsorbiti su supporti solidi inerti, preferibilmente silice amorfa precipitata.

13. Composizioni farmaceutiche o nutraceutiche comprendenti come ingrediente attivo gli etil esteri della rivendicazione 12.

14. Composizioni secondo la rivendicazione 13 in forma di capsule opercolate di gelatina dura o di compresse.

Milano, 8 ottobre 2012