

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 404**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)

C07C 51/47 (2006.01)

C07C 57/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 18209325 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3473318**

54 Título: **Procedimiento de purificación cromatográfica de un ácido graso**

30 Prioridad:

11.12.2013 FR 1362444

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**NOVASEP PROCESS (100.0%)
Site Eiffel, Boulevard de la Moselle
54340 Pompey, FR**

72 Inventor/es:

**VALÉRY, ERIC y
BLÉHAUT, JEAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 809 404 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación cromatográfica de un ácido graso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento cromatográfico para la producción de ácidos grasos, y en particular de ácidos grasos poliinsaturados, tales como el ácido eicosapentaenoico, así como a una instalación adaptada para llevar a cabo este procedimiento.

Técnica anterior

10 Los ácidos grasos, incluidos los ácidos grasos poliinsaturados (abreviados PUFAs), son compuestos biológicos particularmente importantes porque intervienen en numerosos procesos biológicos tales como la construcción y el mantenimiento de las membranas celulares, la síntesis de hormonas (por ejemplo, prostaglandinas) que desempeñan un papel en la agregación plaquetaria, los procesos de inflamación y la respuesta inmunológica, etc.

La mayoría de los PUFAs pueden ser sintetizados por un organismo humano, con la excepción de dos familias de PUFAs que tienen que ser aportados obligatoriamente por la alimentación, denominados ácidos grasos esenciales.

Las dos familias de ácidos grasos esenciales son:

- 15 - los omega-6, que son particularmente abundantes en aceites de nueces, girasol, soja, semillas de uva o de maíz y aves grasas (como el pato);
- 20 - los omega-3 que están principalmente presentes en los aceites de nueces, en plantas tales como la colza y el lino y en los pescados grasos (tales como el salmón, el atún, la sardina, la caballa o el arenque). Recientemente se han desarrollado procedimientos para producir omega-3, utilizando cultivos de microalgas, levaduras transgénicas o krill.

Los omega-3 son PUFAs particularmente interesantes por sus propiedades antioxidantes. Entre estos omega-3, el EPA (ácido eicosapentaenoico, C20-5 ω 3) y el DHA (ácido docosahexaenoico, C22-6 ω 3) purificados y sus combinaciones enriquecidas son los más utilizados como complementos alimenticios o medicamentos para reducir las tasas de triglicéridos, los riesgos cardiovasculares, mejorar la cognición o la visión, etc.

25 Estudios clínicos recientes han mostrado que el tratamiento de pacientes que tienen una tasa de triglicéridos superior a 500 ml/dL, con 4 gramos al día de éster etílico de EPA al 96% sin DHA, permitía reducir la tasa de triglicéridos sin aumentar la tasa de LDL (colesterol "malo"), mientras que el tratamiento con 4 gramos al día de una mezcla de ésteres etílicos de EPA y DHA, a aproximadamente el 50% y el 35% respectivamente, conducía a un aumento de la tasa de LDL, concomitante con la disminución de los triglicéridos.

30 Hasta la fecha, los complementos alimenticios de PUFAs utilizados, en particular los omega-3, se basan esencialmente en mezclas que contienen del 30 al 60% de una mezcla de EPA y DHA. En los métodos de separación utilizados hasta la fecha, la mezcla se obtiene mediante una transesterificación de los triglicéridos en ésteres etílicos, seguida por un enriquecimiento de los omega-3 mediante una destilación molecular y/o cocristalización de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados con urea. Los ésteres etílicos enriquecidos se reconvierten opcionalmente en triglicéridos por una ruta química o preferiblemente por una ruta enzimática.

35

Sin embargo, estos procedimientos de separación no son satisfactorios para la producción de un omega-3 tal como EPA, DHA o incluso ácido estearidónico (SDA, C18-S ω 3) de más del 80% o incluso más del 96%, especialmente en forma esterificada.

40 O bien, la purificación de los omega-3 es delicada porque estos compuestos comprenden varios enlaces dobles carbono-carbono que los vuelven sensibles a la oxidación o la degradación. En presencia de oxígeno y cuando se calientan, estos PUFAs se someten en particular a reacciones de isomerización, oxidación, peroxidación y oligomerización.

45 Por tanto, las técnicas de separación expuestas anteriormente permiten obtener una mezcla de PUFAs con un buen rendimiento y un grado de pureza aceptable; pero no se pueden emplear para la separación individual de los PUFAs. Por lo tanto, no permiten que los omega-3 se separen entre sí. De hecho, la destilación molecular, por ejemplo, no puede eliminar económicamente el DHA del EPA o el SDA; no permite una separación eficaz de los omega-3 de cadena larga de tipo C20 y C22. La combinación de la clatración con urea y la destilación molecular permite obtener mezclas de omega-3 con mayor pureza, a costa de un rendimiento generalmente bajo y un alto coste operativo, pero no se puede utilizar para la separación de los omega-3 de cadena larga entre sí, y de EPA y DHA en particular.

50

Por lo tanto, existe una necesidad de proporcionar un procedimiento de purificación industrial de los omega-3 en forma esterificada con pureza muy elevada.

La cromatografía es una técnica de separación fina que permite la purificación o el enriquecimiento eficaz de moléculas en condiciones suaves y protegidas de la luz y el aire.

Esta tecnología se basa en la separación de moléculas que se ponen en contacto con una fase estacionaria con la que tienen diferentes interacciones. El uso de uno o varios fluidos, llamados fases móviles o eluyentes, permite la percolación de las diferentes moléculas a diferentes velocidades. Estas diferentes velocidades permiten separar físicamente las moléculas y recogerlas en forma purificada al final de los procedimientos cromatográficos con una o varias columnas. Las fracciones purificadas se concentran generalmente, en condiciones suaves a temperatura ambiente o temperatura moderada, por medios tales como de una evaporación al vacío o procedimientos con membranas.

5 En ciertos casos, el producto de partida de la purificación cromatográfica es un aceite compuesto por ésteres de ácidos grasos ya enriquecidos mediante destilación molecular, que comprende preferiblemente más del 30% del omega-3 de interés, que ha sufrido un tratamiento de eliminación de compuestos oxidados, ya sea mediante la última destilación molecular o por adsorción, preferiblemente sobre derivados de sílice (gel de sílice, bentonita, tierra de diatomeas) o sobre carbón activo, por ejemplo.

15 Se ha descrito un cierto número de procedimientos cromatográficos para obtener omega-3 con una pureza elevada.

De este modo, el documento US 5.719.302 describe un procedimiento en el que los PUFA se separan, en particular con ayuda de un eluyente supercrítico (gas carbónico a presión), y en particular sobre un lecho móvil simulado (SMB de "Simulated Moving Bed" según la terminología anglosajona).

20 El documento US 2011/0091947 describe otro procedimiento de purificación de omega-3 utilizando la técnica de cromatografía de lecho móvil simulado. El documento describe en particular la sucesión de una etapa de transesterificación enzimática, dos etapas de destilación molecular y una etapa de tipo SMB, estas tres últimas etapas permiten separar los productos en dos fracciones por el orden del tiempo de retención.

25 El documento WO 2011/080503 describe la purificación de omega-3 a partir de un dispositivo que comprende dos dispositivos cromatográficos SMB dispuestos en serie y una zona de lavado, en donde cada dispositivo cromatográfico SMB define una zona de separación y consta de varias columnas. La carga que se va a tratar se inyecta en una primera zona de separación para obtener un flujo de extracto y un flujo de refinado, en donde dicho flujo de refinado comprende los compuestos de interés y a continuación se inyecta en una columna de la segunda zona de separación que no es adyacente a una columna de la primera zona.

30 El documento WO 2013/005051 describe la purificación de omega-3 a través de dos separaciones cromatográficas mediante SMB o AMB ("Actual Moving Bed", es decir, lecho móvil real) en fase inversa con un eluyente hidroorgánico, en donde las dos separaciones mediante SMB o AMB se llevan a cabo secuencialmente en el mismo dispositivo cromatográfico o en dos dispositivos diferentes, en donde el producto intermedio purificado por el primer dispositivo se introduce en el segundo.

35 El documento WO 2013/005048 describe la purificación de EPA con más de un 90% de pureza mediante una primera separación cromatográfica, seguida de dos separaciones cromatográficas mediante SMB o AMB en fase inversa con un eluyente hidroorgánico en cada etapa, en donde el producto intermedio purificado a través de la primera separación cromatográfica se introduce en la segunda separación cromatográfica, y el producto intermedio purificado a través de la segunda separación cromatográfica se introduce en la tercera separación cromatográfica.

40 Sigue existiendo una necesidad de proporcionar un procedimiento para purificar un ácido graso, y en particular un ácido graso poliinsaturado, que se pueda llevar a cabo en una instalación cromatográfica más simple que las de la técnica anterior, además con una productividad específica (masa de producto purificado por masa de fase estacionaria y por unidad de tiempo) elevada y un bajo consumo de disolventes, para reducir los costes de inversión.

Compendio de la invención

45 La invención se refiere en primer lugar a un procedimiento para purificar un primer ácido graso a partir de una mezcla inicial que comprende además al menos un segundo ácido graso, opcionalmente un tercer ácido graso y opcionalmente un cuarto ácido graso, comprendiendo el procedimiento:

- una primera etapa de separación cromatográfica en fase líquida, a partir de la mezcla inicial, llevada a cabo en una primera unidad de separación cromatográfica, que permite recuperar, por un lado, un primer flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un flujo enriquecido en segundo ácido graso;
- 50 - opcionalmente, una segunda etapa de separación cromatográfica en fase líquida, a partir del primer flujo enriquecido en primer ácido graso, llevada a cabo en una segunda unidad de separación cromatográfica, que permite recuperar, por un lado, un segundo flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un flujo enriquecido en tercer ácido graso;
- opcionalmente, una tercera etapa de separación cromatográfica en fase líquida, a partir del tercer flujo

enriquecido en primer ácido graso, llevada a cabo en una tercera unidad de separación cromatográfica, que permite recuperar, por un lado, un tercer flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un flujo enriquecido en cuarto ácido graso;

5 en donde al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única, con reciclado al estado estacionario.

10 De acuerdo con una realización, la primera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única con reciclado al estado estacionario; y/o la segunda unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única con reciclado al estado estacionario; y/o la tercera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única con reciclado al estado estacionario.

De acuerdo con una realización, al menos dos unidades entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica son unidades de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única, con reciclado al estado estacionario.

15 De acuerdo con una realización, al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica y preferentemente la primera unidad de separación cromatográfica, es una unidad de separación cromatográfica con varias columnas; y de manera más particularmente preferida es un sistema de lecho móvil simulado o de lecho móvil real, o un sistema en el que los puntos de inyección y los puntos de recogida de los flujos se desplazan periódicamente de manera asincrónica.

De acuerdo con una realización:

- la primera etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo con un primer eluyente que es un eluyente hidroorgánico; y/o
- 25 - cuando sea apropiado, la segunda etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo con un segundo eluyente que es un eluyente hidroorgánico; y/o
- cuando sea apropiado, la tercera etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo con un tercer eluyente que es un eluyente hidroorgánico.

De acuerdo con una realización:

- el primer eluyente es una mezcla de cetona/agua, de forma más particularmente preferida de acetona/agua;
- 30 - cuando sea apropiado, preferiblemente, el segundo eluyente es una mezcla de alcohol/agua, de forma más particularmente preferida de metanol/agua;
- cuando sea apropiado, preferiblemente el tercer eluyente es una mezcla de cetona/agua, de forma más particularmente preferida de acetona/agua;
- 35 - cuando sea apropiado, preferiblemente el primer eluyente es diferente del segundo eluyente y, cuando sea apropiado, preferentemente, el tercer eluyente es diferente del primer eluyente y del segundo eluyente.

De acuerdo con una realización:

- la concentración en masa del primer eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%, preferiblemente a cerca del 1% o a cerca del 0,5% o a cerca del 0,2% o a cerca del 0,1%;
- 40 - cuando sea apropiado, preferiblemente la concentración en masa del segundo eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%, preferiblemente a cerca del 1% o a cerca del 0,5% o a cerca del 0,2% o a cerca del 0,1%;
- cuando sea apropiado, preferentemente la concentración en masa del tercer eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%, preferiblemente a cerca del 1% o a cerca del 0,5% o a cerca del 0,2% o a cerca del 0,1%.

45 De acuerdo con una realización, el primer ácido graso es un primer ácido graso poliinsaturado.

De acuerdo con los ejemplos:

- el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido eicosapentaenoico, y se recupera preferiblemente al final del procedimiento con una pureza mayor o igual al 80% o al 90% o al 96%; o
- el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido docosahexaenoico, y se recupera preferiblemente al final

del procedimiento con una pureza mayor o igual al 70% o al 80% o al 90% o al 95%; o

- el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido araquidónico, y se recupera preferiblemente al final del procedimiento con una pureza mayor o igual al 70% o al 80% o al 90% o al 95%; o
- el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido docosapentaenoico, y se recupera preferiblemente al final del procedimiento con una pureza mayor o igual al 70% o al 80% o al 90% o al 95%.

De acuerdo con una realización, el procedimiento comprende:

- al menos una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos más tiempo que éste; y preferentemente al menos dos etapas de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos más tiempo que éste; y/o
- al menos una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos menos tiempo que éste; y

en donde el procedimiento comprende preferiblemente:

- la primera etapa de separación cromatográfica que es una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos más tiempo que éste, a continuación la segunda etapa de separación cromatográfica que es una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos más tiempo que éste, a continuación la tercera etapa de separación cromatográfica que es una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos menos tiempo que éste.

De acuerdo con una realización, al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica comprende una columna de separación que tiene una longitud mayor o igual a 5 cm o a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm; y/o que tiene un diámetro mayor o igual a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm.

De acuerdo con una realización:

- la mezcla inicial que alimenta la primera unidad de separación cromatográfica comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos, preferiblemente menos de un 60% o menos de un 40% o menos de un 20% o menos de un 10% o menos de un 5% o menos de un 2% o menos de un 1% de disolventes orgánicos, y de manera más particularmente preferida es una mezcla de ácidos grasos esencialmente desprovista de disolventes orgánicos; y/o
- cuando sea apropiado, el primer flujo enriquecido en primer ácido graso que alimenta la segunda unidad de separación cromatográfica, comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos, preferiblemente menos de un 60% o menos de un 40% o menos de un 20% o menos de un 10% o menos de un 5% o menos de un 2% o menos de un 1% de disolventes orgánicos, y de manera más particularmente preferida es una mezcla de ácidos grasos esencialmente desprovista de disolventes orgánicos; y/o
- cuando sea apropiado, el segundo flujo enriquecido en primer ácido graso que alimenta la tercera unidad de separación cromatográfica, comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos, preferiblemente menos de un 60% o menos de un 40% o menos de un 20% o menos de un 10% o menos de un 5% o menos de un 2% o menos de un 1% de disolventes orgánicos, y de manera más particularmente preferida es una mezcla de ácidos grasos esencialmente desprovista de disolventes orgánicos.

La invención también tiene por objeto una instalación para purificar un primer ácido graso a partir de una mezcla inicial, en donde la instalación comprende:

- una primera unidad de separación cromatográfica en fase líquida, alimentada por un conducto de suministro de mezcla inicial, y a la que están conectados en la salida, por un lado, un primer conducto de flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un conducto de flujo enriquecido en segundo ácido graso;
- opcionalmente, una segunda unidad de separación cromatográfica en fase líquida, alimentada por el primer conducto de flujo enriquecido en primer ácido graso, y a la que están conectados en la salida, por un lado, un segundo conducto de flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un conducto de flujo enriquecido en tercer ácido graso;
- opcionalmente, una tercera unidad de separación cromatográfica en fase líquida, alimentada por el segundo conducto de flujo enriquecido en primer ácido graso, y a la que están conectados en la salida, por un lado, un tercer conducto de flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un conducto de flujo enriquecido en cuarto ácido graso;

en donde al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático, con una columna única, con reciclado al estado estacionario.

5 De acuerdo con una realización, la primera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única con reciclado al estado estacionario; y/o la segunda unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única con reciclado al estado estacionario; y/o la tercera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única con reciclado al estado estacionario; y
10 de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica son unidades de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única, con reciclado al estado estacionario.

De acuerdo con una realización, al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica y preferentemente la primera
15 unidad de separación cromatográfica, es una unidad de separación cromatográfica con varias columnas; y de manera más particularmente preferida, es un sistema de lecho móvil simulado o de lecho móvil real, o un sistema en el que los puntos de inyección y los puntos de recogida de los flujos se desplazan periódicamente de manera asincrónica.

De acuerdo con una realización, al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda
20 unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica comprende una columna de separación que tiene una longitud mayor o igual a 5 cm o a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm; y/o tiene un diámetro mayor o igual a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm.

La presente invención permite superar los inconvenientes del estado de la técnica. Más particularmente, proporciona
25 un procedimiento para la purificación de un ácido graso, y en particular de un ácido graso poliinsaturado que se puede llevar a cabo en una instalación cromatográfica más simple que las de la técnica anterior, teniendo además una productividad específica elevada y un bajo consumo de disolventes.

Esto se logra mediante la implementación de una etapa de separación en una unidad de separación de lecho
estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario.

De este modo, la invención permite proporcionar un ácido graso, y en particular un ácido graso poliinsaturado de
30 pureza elevada, permitiendo su uso en las composiciones de complementos alimenticios o medicamentos, a partir de una carga de múltiples compuestos, y esto a la vez que se minimiza el número de columnas cromatográficas utilizadas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa de forma esquemática una realización de una instalación para llevar a cabo la invención.

35 Descripción de las realizaciones de la invención

La invención se describe ahora con más detalle y de forma no limitativa, en la descripción que sigue a continuación.

De forma general, las proporciones expresadas son proporciones en masa, a menos que se indique lo contrario.

La totalidad de la descripción que sigue a continuación se ha efectuado en relación con la realización preferida en la
40 que el primer ácido graso es un PUFA, denominado "*primer PUFA*". Sin embargo, esta descripción se aplica de manera similar cuando el primer ácido graso no está poliinsaturado. Por tanto, es apropiado reemplazar "*primer PUFA*" por la expresión más general "primer ácido graso" en la descripción a continuación. De este modo, el primer ácido graso también puede ser un ácido graso saturado, un ácido graso monoinsaturado o un derivado de un ácido graso tal como un ácido graso ramificado, natural o modificado.

Procedimiento de preparación

45 El procedimiento de la invención permite obtener un primer PUFA en forma purificada, a partir de una mezcla inicial. La mezcla inicial comprende, además del primer PUFA, otros ácidos grasos no deseados, concretamente en general ácidos grasos saturados o monoinsaturados y otros PUFAs, así como otras posibles impurezas. El segundo ácido graso, el tercer ácido graso y el cuarto ácido graso, mencionados anteriormente, se encuentran entre éstos.

50 La mezcla inicial puede ser una mezcla de ácidos grasos obtenida a partir de peces, plantas, algas y/o levadura, y preferiblemente de peces. Puede ser una materia prima, por ejemplo, aceite de pescado o aceite de algas o aceite de levadura. También puede ser un producto obtenido a partir de las materias primas anteriores y, por ejemplo, obtenido a partir de aceite de pescado, aceite de algas y/o aceite de levadura. El aceite se puede extraer, por ejemplo, a partir de plantas, algas o levaduras naturales o modificadas genéticamente.

- Por "*producto obtenido a partir de una materia prima*", se entiende una materia prima que ha sido sometida a una o varias etapas de tratamiento. Estas etapas de tratamiento pueden comprender una o varias etapas de desintegración celular, molienda, separación o purificación (por ejemplo, fraccionamiento) y/o una etapa de hidrólisis para convertir los triglicéridos en ácidos grasos libres, y/o una etapa de transesterificación para convertir los ácidos grasos en ésteres de alquilo y preferiblemente en ésteres de etilo, y/o una etapa para reducir el índice de peróxido y/o el índice de anisidina (véase más adelante), y/o una etapa de destilación molecular, y/o una o varias etapas de separación cromatográfica, etc.
- De acuerdo con una realización ventajosa, la mezcla inicial es un producto esterificado o transesterificado, tal como un aceite de pescado, un aceite vegetal, un aceite de algas o un aceite de levadura transesterificada.
- Por lo tanto, cada ácido graso (y en particular cada PUFA) obtenido o utilizado en el procedimiento de la invención, puede ser un derivado de ácido graso, en particular en forma de un monoglicérido, diglicérido o triglicérido, de un éster, un fosfolípido, una amida, una lactona o una sal.
- Se prefieren las formas de ácido graso libre y ésteres, y más particularmente los ésteres. Los ésteres son típicamente ésteres alquílicos, por ejemplo, ésteres alquílicos C1-C6, en particular C1-C4, por ejemplo ésteres metílicos y ésteres etílicos. Se prefieren los ésteres etílicos.
- Por lo tanto, el primer PUFA, el segundo ácido graso, el tercer ácido graso y el cuarto ácido graso mencionados en la presente solicitud, pueden estar, por ejemplo, en forma de ácido graso libre o éster, y preferiblemente están en forma de compuestos de éster etílico.
- Haciendo referencia a la figura 1, el procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo en una instalación que comprende una primera unidad de separación cromatográfica 3. La primera unidad de separación cromatográfica 3 asegura la separación entre el primer PUFA y el segundo ácido graso.
- Cada vez que se menciona en la presente solicitud una separación entre el primer PUFA y un ácido graso dado, se entiende que otros ácidos grasos se pueden separar igualmente del primer PUFA, simultáneamente con la separación del ácido graso dado.
- Generalmente, cada separación cromatográfica separa el primer PUFA de un conjunto de compuestos más polares que él o menos polares que él. La separación también se puede llevar a cabo de acuerdo con criterios de tamaño de la longitud de la cadena alifática y el número de insaturaciones. En términos más generales, ya que los efectos posiblemente dependen de los eluyentes utilizados, la separación se lleva a cabo de acuerdo con criterios de tiempo de retención que son diferentes según el caso, lo que permite de este modo separar el primer PUFA de las impurezas que se retienen más o menos tiempo que él.
- La temperatura de la separación se puede ajustar según criterios bien conocidos por los expertos en la técnica, en un intervalo situado entre 5°C y 90°C, preferiblemente entre 15 y 60°C, y aún más preferiblemente entre la temperatura ambiente y 45°C. Si es necesario, la presión se ajusta para mantener un estado monofásico, preferiblemente líquido o supercrítico en la columna.
- La primera unidad de separación cromatográfica 3 está alimentada por un conducto de alimentación con una mezcla de ácidos grasos 1, así como por un conducto de alimentación con el primer eluyente 2.
- En la salida de la primera unidad de separación cromatográfica 3 están conectados, por un lado, un primer conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 5 y, por otro lado, un conducto de flujo enriquecido en segundo ácido graso 4.
- En el contexto de la presente solicitud, el término "*enriquecido*" tiene un significado relativo: una separación entre una especie A y una especie B a partir de un flujo inicial, que permite recuperar un flujo enriquecido en especie A, lo que significa que el flujo recuperado de ese modo tiene una relación en masa A/B superior a la del flujo inicial.
- La mezcla inicial puede haber pasado por etapas preliminares de tratamiento, tales como las que se ha descrito anteriormente, en cuyo caso las unidades de tratamiento correspondientes, no mostradas, se pueden incluir en la instalación de la invención.
- Preferentemente, se proporciona una segunda unidad de separación cromatográfica 6 aguas abajo, para asegurar una separación entre el primer PUFA y un tercer ácido graso. Esta segunda unidad de separación cromatográfica 6 está alimentada por el primer conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 5, así como por un segundo conducto de alimentación enriquecido en segundo eluyente 7.
- En la salida de la segunda unidad de separación cromatográfica 6 están conectados, por un lado, un segundo conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 9 y, por otro lado, un conducto de flujo enriquecido en tercer ácido graso 8.
- Preferentemente se proporciona una tercera unidad de separación cromatográfica 10, para asegurar una separación entre el primer PUFA y un cuarto ácido graso. Esta tercera unidad de separación cromatográfica 10 está alimentada por el segundo conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 9, así como por un conducto de alimentación

enriquecido en tercer eluyente 11.

En la salida de la tercera unidad de separación cromatográfica 10 están conectados, por un lado, un tercer conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 12 y, por otro lado, un conducto de flujo enriquecido en cuarto ácido graso 13.

5 Preferiblemente, el procedimiento comprende exactamente tres etapas de separación cromatográfica en las tres unidades descritas anteriormente.

Alternativamente, el procedimiento comprende solo dos separaciones cromatográficas, en cuyo caso se omite la tercera unidad de separación cromatográfica 10. Por lo tanto, el primer PUFA en forma purificada se recupera directamente en el segundo conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 9.

10 Más alternativamente, el procedimiento comprende solo una separación cromatográfica, en cuyo caso se omiten tanto la segunda unidad de separación cromatográfica 6, como la tercera unidad de separación cromatográfica 10. Por lo tanto, el primer PUFA en forma purificada se recupera directamente en el primer conducto de flujo enriquecido en el primer PUFA 5.

15 Más alternativamente, el procedimiento puede comprender cuatro etapas de separación cromatográfica sucesivas (o adicionales), en cuyo caso las unidades de separación cromatográfica suplementarias se añaden de manera análoga.

La expresión "*unidad de separación cromatográfica*" indica o bien un sistema cromatográfico de columna única o un sistema cromatográfico de varias columnas.

20 Se puede tratar de un sistema cromatográfico de lecho estático o no. En un sistema cromatográfico de lecho estático, la mezcla de compuestos que se va a separar, percola en un espacio (o columna), generalmente cilíndrico. La columna contiene un lecho de material poroso (fase estacionaria) permeable a los fluidos. La tasa de percolación de cada compuesto en la mezcla depende de las propiedades físicas del compuesto. Los compuestos retenidos más tiempo en la fase estacionaria percolan más lentamente que los compuestos retenidos menos tiempo en la fase estacionaria. Este principio hace posible llevar a cabo la separación deseada.

25 Es posible llevar a cabo un tratamiento de ese tipo en varias columnas en serie o en paralelo, pero generalmente se lleva a cabo una separación cromatográfica en un sistema de lecho estático con una columna única.

Ejemplos de tales sistemas cromatográficos de lecho estático son los sistemas HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) o CYCLOJET™ (es decir, sistema con reciclado al estado estacionario).

30 El sistema CYCLOJET™ es tal y como se describe en el documento US 6.063.284, al que se hace referencia expresamente. Se trata de un sistema de separación cromatográfica discontinua con una columna única, en el que las especies (i) retenidas más tiempo y después (ii) las retenidas menos tiempo, se recogen por separado a la salida de la columna, en donde una porción no separada del cromatograma se recicla mediante una bomba principal. La mezcla que se va a separar se inyecta periódicamente por medio de un bucle de inyección en la porción reciclada del cromatograma. El bucle de inyección está conectado preferiblemente entre la bomba principal y la columna. Después de varios ciclos cromatográficos, el procedimiento alcanza un estado estacionario periódico en el que la cantidad de productos inyectados es igual a la cantidad de productos recogidos por separado en la salida de la columna.

De acuerdo con una realización, la separación cromatográfica en un sistema de lecho estático de monocolumna con reciclado al estado estacionario es cíclica y comprende las siguientes etapas:

- 40
- establecimiento y mantenimiento de un perfil cromatográfico que circula en la columna por medio de una bomba de eluyente;
 - inyección en dicho perfil cromatográfico circulante de una muestra que comprende al menos los dos compuestos que se van a separar, de forma discontinua y en cada ciclo, realizándose la inyección por medio de un bucle de inyección controlada en una posición de inyección mediante una válvula de inyección, con el fin de inyectar la muestra presente en el bucle en el perfil cromatográfico circulante, en donde la válvula de inyección permanece en la posición de inyección desde el inicio de la inyección hasta que se ha eluido de la columna la totalidad del perfil, a continuación se inclina la válvula de inyección a una posición de carga, para cargar el bucle de inyección cuando todo el perfil está en la columna, y
 - recogida de al menos dos fracciones enriquecidas a partir del perfil circulante, de forma discontinua y periódica.
- 45

50 Esta separación también puede incluir la siguiente etapa:

- paso del eluyente a través de la columna como una fase móvil, de manera esencialmente continua durante el ciclo, por medio de la bomba de eluyente.

Esta separación también puede comprender las siguientes etapas:

- registro de los eventos que se producen desde el inicio de la recogida de una primera fracción hasta el siguiente inicio de recogida de una primera fracción;
- interrupción de la bomba de eluyente durante la recogida de una tercera fracción, en donde esta interrupción continúa hasta el final del ciclo, de modo que los ciclos son reproducibles en el tiempo.

De acuerdo con una realización, no hay ninguna pérdida de perfil circulante durante la inyección en el perfil circulante mantenido.

Una realización detallada de este sistema se muestra en la columna 5 l.36-col. 10 l.41 del documento US 6.063.284 citado previamente.

La unidad de separación cromatográfica también puede ser un sistema cromatográfico de lecho no estático. Un sistema de lecho no estático es un sistema de columnas múltiples, en el que las posiciones relativas del lecho de fase estacionaria y los puntos de inyección y/o de recogida de los flujos, se desplazan con el tiempo.

Ejemplos de tales sistemas de cromatografía de lecho no estático son SMB, iSMB, SSMB, AMB, VARICOL™, MODICON™, POWERFEED™, DCC o MCSGP.

Un sistema SMB incluye una pluralidad de columnas individuales que contienen un adsorbente, que están conectadas en serie. Un flujo de eluyente atraviesa las columnas en una primera dirección. Los puntos de inyección del flujo de alimentación y del eluyente, así como los puntos de recogida de los compuestos separados, se desplazan periódicamente y de forma simultánea por medio de un conjunto de válvulas. El efecto global es simular el funcionamiento de una columna única que contiene un lecho móvil de adsorbente sólido, en donde el adsorbente sólido se desplaza en una dirección a contracorriente del flujo de eluyente. Por lo tanto, un sistema SMB se compone de columnas que contienen lechos estacionarios de adsorbente sólido a través de los cuales pasa el eluyente, pero el funcionamiento es tal que se simula un lecho móvil continuo a contracorriente.

La forma más convencional de un sistema SMB es el sistema SMB de cuatro zonas. Otras formas posibles son los sistemas SMB de tres zonas y los sistemas SMB de dos zonas (como se describen en el artículo « *Two Section Simulated Moving Bed Process* » de Kwangnam Lee, en *Separation Science and Technology*, 35(4):519-534, 2000, al que se hace referencia expresamente).

Un sistema iSMB es tal y como se describe en los documentos EP 0342629 y US 5.064.539, a los que se hace referencia expresamente. Un sistema SSMB divide las introducciones y las recogidas de los flujos en subsecuencias aplicadas de formas periódicas. En los sistemas iSMB y SSMB, existe al menos una etapa en la que el sistema funciona en bucle cerrado, sin entrada ni salida de producto.

Otras variantes de los sistemas SMB son: el sistema SMB que varía con el tiempo y el sistema POWERFEED™, tal y como se describen en el documento US 5.102.553 y en el artículo « *PowerFeed operation of simulated moving bed units: changing flow-rates during the switching interval* », de Zhang et al. en *Journal of Chromatography A*, 1006:87-99, 2003, a los que se hace referencia expresamente; el sistema MODICON™, tal y como se describe en el documento US 7.479.228, al que se hace referencia expresamente; y el sistema SMB con recirculación interna, tal y como se describe en el documento US 8.282.831, al que se hace referencia expresamente.

Un sistema de cromatografía DCC es tal y como se describe en el documento FR 2889077, al que se hace referencia expresamente. Un sistema DCC es un procedimiento secuencial con desplazamiento periódico de los puntos de inyección de la fase móvil y de la mezcla que se va a separar, que tiene la característica de estar constantemente en bucle abierto. Utiliza dos columnas o más.

Un sistema AMB presenta un funcionamiento similar a un sistema SMB. Sin embargo, en lugar de desplazar los puntos de inyección del flujo de alimentación y del eluyente, así como los puntos de recogida, por medio de un sistema de válvulas, un conjunto de unidades de adsorción (columnas) se desplazan físicamente en relación con los puntos de alimentación y recogida. De nuevo, el funcionamiento hace posible simular un lecho móvil continuo a contracorriente.

Un sistema de cromatografía VARICOL™ es tal y como se describe en los documentos US 6.136.198, US 6.375.839, US 6.413.419 y US 6.712.973, a los que se hace referencia expresamente. Un sistema VARICOL™ comprende una pluralidad de columnas individuales que contienen un adsorbente que están conectadas en serie. Se hace pasar un eluyente a través de las columnas en una primera dirección. A diferencia del sistema SMB, los puntos de inyección para la mezcla que se va a separar y para el eluyente, y los puntos de recogida para los compuestos separados en el sistema, se desplazan periódicamente pero de forma asincrónica, por medio de un conjunto de válvulas. El efecto global es crear zonas de separación de longitud variable a lo largo del tiempo, asignando de este modo de manera dinámica la fase estacionaria a las zonas en las que es más útil y permitiendo una potencia de separación similar con menos unidades de separación cromatográfica y un aumento de la productividad. A diferencia de un sistema SMB, un sistema VARICOL™ no simula el funcionamiento de una columna única que contiene un

lecho móvil de adsorbente sólido, en donde el adsorbente sólido se desplaza en una dirección a contracorriente del flujo del eluyente, y por lo tanto el principio de funcionamiento de VARICOL™ no se puede llevar a cabo en un sistema AMB equivalente.

5 La invención establece que al menos una etapa de separación cromatográfica se efectúa en una unidad de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario (en particular una unidad CYCLOJET™ tal y como se ha descrito anteriormente).

Cuando el procedimiento comprende una sola etapa de separación cromatográfica, en la primera unidad de separación cromatográfica 3, entonces esta primera unidad de separación cromatográfica 3 es una unidad de lecho estático de tipo mono-columna con reciclado al estado estacionario.

10 Cuando el procedimiento comprende únicamente dos etapas de separación cromatográfica, sucesivamente en la primera unidad de separación cromatográfica 3 y en la segunda unidad de separación cromatográfica 6, entonces:

- o únicamente la primera unidad de separación cromatográfica 3 es una unidad de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

15 - o únicamente la segunda unidad de separación cromatográfica 6 es una unidad de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

- o tanto la primera unidad de separación cromatográfica 3 como la segunda unidad de separación cromatográfica 6 son unidades de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario.

20 Cuando el procedimiento comprende tres etapas de separación cromatográfica, sucesivamente en la primera unidad de separación cromatográfica 3, la segunda unidad de separación cromatográfica 6 y la tercera unidad de separación cromatográfica 10, entonces:

- o únicamente la primera unidad de separación cromatográfica 3 es una unidad de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

- o únicamente la segunda unidad de separación cromatográfica 6 es una unidad de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

25 - o únicamente la tercera unidad de separación cromatográfica 10 es una unidad de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

- o la primera unidad de separación cromatográfica 3 y la segunda unidad de separación cromatográfica 6 son únicamente unidades de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

30 - o la primera unidad de separación cromatográfica 3 y la tercera unidad de separación cromatográfica 10 únicamente son unidades de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

- o la segunda unidad de separación cromatográfica 6 y la tercera unidad de separación cromatográfica 10 únicamente son unidades de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario;

35 - o al mismo tiempo, la primera unidad de separación cromatográfica 3, la segunda unidad de separación cromatográfica 6 y la tercera unidad de separación cromatográfica 10 son unidades de lecho estático de tipo monocolumna con reciclado al estado estacionario.

Las unidades de separación cromatográfica que no son unidades de lecho estático con reciclado al estado estacionario pueden ser unidades de separación de lecho estático, de tipo monocolumna o no, o unidades de separación de lecho no estático (multicolumnas), en particular de tipo VARICOL™ o SMB o AMB.

40 De este modo, de acuerdo con una realización, la primera etapa se lleva a cabo en una unidad de lecho no estático, la segunda etapa se lleva a cabo en una unidad de lecho estático y, cuando sea apropiado, la tercera etapa se lleva a cabo en una unidad de lecho estático.

La expresión "cuando sea apropiado" significa "suponiendo que la etapa de separación cromatográfica en cuestión esté realmente presente".

45 De acuerdo con una realización, la primera etapa se lleva a cabo en una unidad VARICOL™ o SMB o AMB, la segunda etapa se lleva a cabo en una unidad CYCLOJET™ y la tercera se lleva a cabo en una unidad VARICOL™ o SMB o AMB.

De acuerdo con una realización alternativa y preferida, la primera etapa se lleva a cabo en una unidad VARICOL™ o SMB o AMB, la segunda etapa se lleva a cabo en una unidad HPLC o CYCLOJET™ y la tercera se lleva a cabo en una unidad HPLC o CYCLOJET™ (en donde una al menos de estas dos últimas etapas se lleva a cabo en una

unidad CYCLOJET™).

En una variante preferida, la primera etapa se lleva a cabo en una unidad VARICOL™, la segunda etapa se lleva a cabo en una unidad CYCLOJET™ y la tercera se lleva a cabo en una unidad CYCLOJET™.

5 De acuerdo con otra variante, cada una de las etapas se lleva a cabo en una unidad HPLC o CYCLOJET™, siendo necesario que al menos una de las etapas se lleve a cabo en una unidad CYCLOJET™, y eventualmente las tres etapas se llevan a cabo en una unidad CYCLOJET™.

Las etapas de separación se pueden llevar a cabo simultáneamente en unidades separadas físicamente o se pueden llevar a cabo secuencialmente, en unidades separadas físicamente o en las mismas unidades.

10 Cabe señalar que cuando se realizan dos etapas de separación cromatográfica en un sistema de tipo SMB o AMB, es posible llevarlas a cabo simultáneamente en un mismo sistema SMB o AMB. Se describe un ejemplo de implementación simultánea en un mismo aparato en el documento WO 2011/080503 o el documento WO 2013/005048 o el documento WO 2013/005051, a los que se hace referencia expresamente.

Preferiblemente, todas las unidades de separación cromatográfica están separadas físicamente.

15 De acuerdo con una realización, la o las columnas de separación (preferiblemente las columnas de separación) de la primera unidad de separación cromatográfica 3, tienen una longitud total o acumulada mayor o igual a 5 cm o a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm; y/o tienen un diámetro mayor o igual a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm.

20 De acuerdo con una realización, la o las columnas de separación (preferiblemente la columna de separación) de la segunda unidad de separación cromatográfica 6, tienen una longitud total o acumulada mayor o igual a 5 cm o a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm; y/o tienen un diámetro mayor o igual a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm.

25 De acuerdo con una realización, la o las columnas de separación (preferiblemente la columna de separación) de la tercera unidad de separación cromatográfica 10, tienen una longitud total o acumulada mayor o igual a 5 cm o a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm; y/o tienen un diámetro mayor o igual a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm.

De acuerdo con una realización, la totalidad de las columnas cromatográficas utilizadas en el procedimiento o la instalación de la invención tienen una longitud total o acumulada mayor o igual a 5 cm o a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm; y/o tienen un diámetro mayor o igual a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm.

30 La longitud y el diámetro de las columnas son las dimensiones útiles de las columnas, es decir, las dimensiones del lecho de fase estacionaria en las columnas. Existen diferentes geometrías de columna, columnas cilíndricas axiales o radiales, pero también celdas con una sección no cilíndrica a las que se hace referencia expresamente (en este caso, el diámetro hace referencia a la dimensión máxima de la sección).

35 Cada etapa de separación cromatográfica se puede llevar a cabo en una fase inversa, como un adsorbente (fase estacionaria). Por ejemplo, se pueden emplear adsorbentes a base de resinas débilmente polares o fases estacionarias a base de sílice modificada químicamente con grupos orgánicos tales como grupos alquilo (especialmente C4, C8, C18, C24, C30), fenilo u otros.

40 Cada etapa de separación cromatográfica se puede llevar a cabo utilizando un eluyente hidroorgánico, es decir, una mezcla de uno o varios disolventes orgánicos con agua. Preferiblemente, todas las etapas de separación cromatográfica se llevan a cabo usando eluyentes hidroorgánicos. Alternativamente, es posible llevar a cabo ciertas etapas de separación cromatográfica con eluyentes puramente orgánicos.

45 Los disolventes orgánicos que se pueden emplear en el contexto de la invención (en particular para formar los eluyentes hidroorgánicos) son, por ejemplo, alcoholes tales como etanol, propanol, isopropanol y de manera más preferible metanol; cetonas tales como acetona o metiletil-cetona; nitrilos tales como acetonitrilo; ésteres tales como acetato de metilo o acetato de etilo; furanos tales como tetrahidrofurano; éteres tales como dietil éter o metil etil éter; y combinaciones de dos o más de dos disolventes entre sí. El metanol y la acetona son los disolventes orgánicos preferidos.

Cada eluyente hidroorgánico se caracteriza por una relación agua/material orgánico, que es la relación en volumen de agua con respecto al o los disolventes orgánicos en el eluyente.

50 La relación agua/material orgánico de cada eluyente hidroorgánico puede variar preferiblemente desde 0,01:99,99 a 30:70, y preferiblemente desde 5:95 a 25:75.

Las diferentes etapas de separación cromatográfica se pueden llevar a cabo con eluyentes que tienen la misma composición o composiciones diferentes.

- Se prefiere usar eluyentes que tienen diferentes composiciones, y en particular que tienen diferentes relaciones agua/material orgánico, lo que hace posible ajustar la fuerza de elución del eluyente en cada etapa de separación y, por lo tanto, obtener la separación de diferentes compuestos en cada etapa. También se puede desear usar eluyentes compuestos por diferentes disolventes orgánicos en las diferentes etapas, con el fin de ajustar la selectividad cromatográfica entre ciertas especies antes de que se vayan a separar en cada etapa de separación y obtener de este modo la separación de diferentes compuestos en cada etapa.
- Preferiblemente, la concentración en masa del primer eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%, preferiblemente a cerca del 1% o a cerca del 0,5% o a cerca del 0,2% o a cerca del 0,1%; cuando sea apropiado, preferiblemente la concentración en masa del segundo eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%, preferiblemente a cerca del 1% o a cerca del 0,5% o a cerca del 0,2% o a cerca del 0,1%; cuando sea apropiado, preferiblemente la concentración en masa del tercer eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%, preferiblemente a cerca del 1% o a cerca del 0,5% o a cerca del 0,2% o a cerca del 0,1%. El control de la composición de los eluyentes se lleva a cabo asegurando los aportes de agua y/o de disolvente(s) orgánico(s) con el fin de realizar los ajustes necesarios.
- En la primera etapa de separación cromatográfica, el primer PUFA se separa preferiblemente de los compuestos (en particular el segundo ácido graso) retenidos más tiempo que el mismo. En este caso, cuando la primera unidad de separación cromatográfica 3 es una unidad de lecho no estático, el flujo enriquecido en primer PUFA es el refinado, y el flujo enriquecido en segundo ácido graso es el extracto.
- En la segunda etapa de separación cromatográfica, el primer PUFA se separa preferiblemente de los compuestos (en particular el tercer ácido graso) retenidos más tiempo que el mismo.
- En la tercera etapa de separación cromatográfica, el primer PUFA se separa preferiblemente de los compuestos (en particular el cuarto ácido graso) retenidos menos tiempo que el mismo.
- Cada flujo final de una etapa de separación cromatográfica se somete preferiblemente a una etapa de concentración. Los flujos se concentran de forma que se elimina el eluyente (disolventes orgánicos y agua) o para reducir el contenido en masa del flujo en disolventes orgánicos y agua a un nivel de menos de un 90% o de menos de un 80% o de menos de un 70% o de menos de un 60% o de menos de un 50% o de menos de un 40% o de menos de un 30% o de menos de un 20% o de menos de un 10% o de menos de un 5% o de menos de un 2% o de menos de un 1% o de menos de un 0,5% o de menos de un 0,1%.
- Por lo tanto, en una realización preferida, al menos una unidad de concentración (no mostrada en la figura) está asociada con cada unidad de separación cromatográfica 3, 6, 10.
- Por lo tanto, preferiblemente, el primer flujo enriquecido en primer PUFA recogido al final de la primera separación cromatográfica, es un flujo concentrado (agotado en eluyente o desprovisto o esencialmente desprovisto de disolventes orgánicos y agua); de manera similar, cuando sea apropiado, el segundo flujo enriquecido en primer PUFA recogido al final de la segunda separación cromatográfica, es preferiblemente un flujo concentrado (agotado en eluyente o desprovisto o esencialmente desprovisto de disolventes orgánicos y agua); igualmente, cuando sea apropiado, el tercer flujo enriquecido en primer PUFA recogido al final de la tercera separación cromatográfica, es preferiblemente un flujo concentrado (agotado en eluyente o desprovisto o esencialmente desprovisto de disolventes orgánicos y agua).
- Opcionalmente, el flujo enriquecido en segundo ácido graso, cuando sea apropiado, el flujo enriquecido en tercer ácido graso y, cuando sea apropiado, el flujo enriquecido en cuarto ácido graso son flujos concentrados (agotados en eluyente o desprovistos o esencialmente desprovistos de disolventes orgánicos y agua).
- En cada unidad de concentración, el eluyente se puede evaporar y condensar para separarlo de la mezcla de ácidos grasos. Se puede usar, por ejemplo, un evaporador con película que cae en la recirculación, un evaporador con flujo ascendente, un evaporador con película raspada, un evaporador de película delgada, un evaporador de termosifón, un evaporador rotativo, una columna de destilación, una columna de rectificación o cualquier otro evaporador o combinación de evaporadores que permita la evaporación del eluyente y la concentración de los ácidos grasos concentrados en el fondo del aparato. La evaporación se lleva a cabo preferiblemente a una presión inferior a la presión atmosférica, en particular a una presión inferior o igual a 750 mbar o inferior o igual a 500 mbar o inferior o igual a 300 mbar.
- Alternativamente, se puede usar un dispositivo de separación de membrana, con uno o varios estadios de separación o una combinación de medios de evaporación y separación de membrana.
- El eluyente obtenido al final de una etapa de concentración (por ejemplo, evaporado y condensado o separado de otro modo), se puede reciclar en una o varias etapas del procedimiento, en particular una o varias de las etapas de separación cromatográfica.
- Por lo tanto, preferiblemente el procedimiento de la invención proporciona un reciclado del eluyente utilizado en la primera etapa de separación cromatográfica. De manera más particularmente preferida, el eluyente se recicla para

ser reutilizado en la primera etapa de separación cromatográfica.

Preferiblemente, el procedimiento de la invención proporciona un reciclado del eluyente utilizado en la segunda etapa de separación cromatográfica. De manera más particularmente preferida, el eluyente se recicla para ser reutilizado en la segunda etapa de separación cromatográfica.

- 5 Por lo tanto, preferiblemente el procedimiento de la invención proporciona un reciclado del eluyente utilizado en la tercera etapa de separación cromatográfica. De manera más particularmente preferida, el eluyente se recicla para ser reutilizado en la tercera etapa de separación cromatográfica.

10 De acuerdo con realizaciones particulares, el eluyente separado del primer flujo enriquecido en primer PUFA, se recicla más del 50%, preferiblemente más del 60%, preferiblemente más del 70%, preferiblemente más del 80%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95%, preferiblemente más del 98%, preferiblemente más del 99%.

15 De acuerdo con realizaciones particulares, el eluyente separado del segundo flujo enriquecido en primer PUFA, se recicla más del 50%, preferiblemente más del 60%, preferiblemente más del 70%, preferiblemente más del 80%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95%, preferiblemente más del 98%, preferiblemente más del 99%.

De acuerdo con realizaciones particulares, el eluyente separado del tercer flujo enriquecido en primer PUFA, se recicla más del 50%, preferiblemente más del 60%, preferiblemente más del 70%, preferiblemente más del 80%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95%, preferiblemente más del 98%, preferiblemente más del 99%.

20 De acuerdo con realizaciones particulares, el eluyente separado del flujo enriquecido en segundo ácido graso, se recicla más del 50%, preferiblemente más del 60%, preferiblemente más del 70%, preferiblemente más del 80%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95%, preferiblemente más del 98%, preferiblemente más del 99%.

25 De acuerdo con realizaciones particulares, el eluyente separado del flujo enriquecido en tercer ácido graso, se recicla más del 50%, preferiblemente más del 60%, preferiblemente más del 70%, preferiblemente más del 80%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95%, preferiblemente más del 98%, preferiblemente más del 99%.

30 De acuerdo con realizaciones particulares, el eluyente separado del flujo enriquecido en cuarto ácido graso, se recicla más del 50%, preferiblemente más del 60%, preferiblemente más del 70%, preferiblemente más del 80%, preferiblemente más del 90%, preferiblemente más del 95%, preferiblemente más del 98%, preferiblemente más del 99%.

Preferiblemente, el producto de alimentación que se suministra en la entrada de cada unidad de separación cromatográfica y que está destinado a separarse, también está exento de disolventes en la medida que sea posible.

De este modo:

- 35 - la mezcla inicial comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos, preferiblemente menos de un 60% o menos de un 40% o menos de un 20% o menos de un 10% o menos de un 5% o menos de un 2% o menos de un 1% de disolventes orgánico, y de manera más particularmente preferida es una mezcla de ácidos grasos esencialmente desprovista de disolventes orgánicos; y/o
- 40 - cuando sea apropiado, el primer flujo enriquecido en primer PUFA que alimenta la segunda unidad de separación cromatográfica 6, comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos, preferiblemente menos de un 60% o menos de un 40% o menos de un 20% o menos de un 10% o menos de un 5% o menos de un 2% o menos de un 1% de disolventes orgánicos, y de manera más particularmente preferida es una mezcla de ácidos grasos esencialmente desprovista de disolventes orgánicos; y/o
- 45 - el segundo flujo enriquecido en primer PUFA que alimenta la tercera unidad de separación cromatográfica 10, comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos, preferiblemente menos de un 60% o menos de un 40% o menos de un 20% o menos de un 10% o menos de un 5% o menos de un 2% o menos de un 1% de disolventes orgánicos, y de manera más particularmente preferida es una mezcla de ácidos grasos esencialmente desprovista de disolventes orgánicos.

50 El procedimiento de acuerdo con la invención proporciona opcionalmente una etapa de eliminación (o de reducción de la cantidad) de los compuestos oxigenados después de la separación cromatográfica o después de las separaciones cromatográficas.

Preferiblemente, esta etapa no es una etapa de separación cromatográfica, y no se lleva a cabo en una unidad de separación cromatográfica.

Preferiblemente, esta etapa esencialmente no separa el primer PUFA de otros ácidos grasos presentes en el flujo (con la excepción de compuestos oxigenados de tipo aldehídos y peróxidos).

5 La etapa de eliminación de compuestos oxigenados se puede llevar a cabo en una unidad de tratamiento 14, alimentada directa o indirectamente por el tercer conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 12 (o por el segundo conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 9 si solo hay dos etapas de separación cromatográfica, o por el primer conducto de flujo enriquecido en primer PUFA 5 si solo hay una etapa de separación cromatográfica). La salida de esta unidad está conectada con un conducto de recogida del primer PUFA 15 purificado.

10 La unidad de tratamiento 14 puede ser en particular una unidad de destilación molecular o un evaporador de corto recorrido. Un evaporador de corto recorrido está equipado de un condensador interno y puede producir evaporaciones con un tiempo de residencia preferiblemente inferior a 1000 s, preferiblemente inferior a 100 s, preferiblemente inferior a 10 s, a una presión preferiblemente inferior a 10 mbar, preferiblemente inferior a 1 mbar, preferiblemente inferior a 0,1 mbar, preferiblemente inferior a 0,01 mbar, preferiblemente inferior a 0,001 mbar, a una temperatura menor o igual a 200°C, preferiblemente menor o igual a 150°C, preferiblemente menor o igual a 120°C, preferiblemente menor o igual a 100°C, preferiblemente menor o igual a 80°C

15 Alternativamente, la unidad de tratamiento 14 puede ser una unidad de puesta en contacto con un sustrato de adsorción.

20 El sustrato de adsorción es cualquier sustrato capaz de adsorber compuestos oxigenados tales como peróxidos y compuestos de aldehído. Se puede elegir, por ejemplo, entre sílice, alúmina, carbón activo y derivados de los mismos, en particular geles de sílice, silicatos, aluminatos y aluminosilicatos. Una arcilla tal como la bentonita, es un ejemplo de sustrato adecuado, igual que lo es la tierra de diatomeas.

25 La adsorción se puede realizar de forma discontinua, es decir por "lotes" o de forma continua, mediante una percolación a través de un lecho de adsorbente. Preferiblemente, los ácidos grasos no se diluyen durante esa etapa, y en particular no se añade ningún disolvente. La puesta en contacto puede durar, por ejemplo, de 5 minutos a 24 horas, y en particular de 10 minutos a 10 horas, de 20 minutos a 5 horas, de 30 minutos a 2 horas y de 45 minutos a 1 h 30 minutos.

La cantidad de adsorbente utilizada depende de la naturaleza del adsorbente y de su capacidad para capturar los compuestos oxigenados. Puede ser, por ejemplo, de 1 a 1000 g de adsorbente por kg de flujo que se va a tratar (mezcla de ácidos grasos), en particular de 10 a 500 g/kg, y más particularmente de 25 a 200 g/kg.

30 Al final de la puesta en contacto, el adsorbente se separa de la mezcla de ácidos grasos, y este último se puede filtrar para evitar cualquier contaminación con un adsorbente residual.

Preferiblemente, la unión de los compuestos oxigenados al adsorbente es esencialmente irreversible, es decir, que el adsorbente no se regenera.

Sin embargo, es posible regenerar el adsorbente, mediante un tratamiento térmico, por ejemplo, con el fin de limitar el volumen y/o el coste del tratamiento de los residuos.

35 La etapa de tratamiento en la unidad de tratamiento 14, puede permitir reducir el índice de peróxido del flujo tratado, al menos un 25%, preferiblemente al menos un 50%, preferiblemente al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80% o al menos un 90% o al menos un 95% o al menos un 98%.

40 La etapa de tratamiento en la unidad de tratamiento 14, puede permitir reducir el índice de anisidina del flujo tratado, al menos un 25%, preferiblemente al menos un 50%, preferiblemente al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80% o al menos un 90% o al menos un 95% o al menos un 98%.

El índice de peróxido mide la cantidad de compuestos peróxidos en una mezcla de ácidos grasos. El método de análisis utilizado es preferiblemente Ph Eur 2.5.5 met A.

El índice de anisidina mide la cantidad de compuestos aldehídicos en una mezcla de ácidos grasos. El método de análisis utilizado es preferiblemente Ph Eur 2.5.36.

45 De acuerdo con una realización, el índice de peróxido del flujo que sale de la etapa de tratamiento (producto recogido en el conducto de recogida de primer PUFA 15 purificado) es menor o igual a 10 o menor o igual a 9 o menor o igual a 8 o menor o igual a 7 o menor o igual a 6 o menor o igual a 5 o menor o igual a 4 o menor o igual a 3 o menor o igual a 2 o menor o igual a 1,5 o menor o igual a 1.

50 De acuerdo con una realización, el índice de anisidina del flujo que sale de la etapa de tratamiento (producto recogido en el conducto de recogida de primer PUFA 15 purificado) es menor o igual a 20 o menor o igual a 18 o menor o igual a 16 o menor o igual a 14 o menor o igual a 12 o menor o igual a 10 o menor o igual a 9 o menor o igual a 8 o menor o igual a 7 o menor o igual a 6 o menor o igual a 5.

Otra etapa de tratamiento similar a la descrita anteriormente, y más particularmente una etapa de destilación

molecular, también se puede proporcionar aguas arriba, en particular antes de cualquier etapa de separación cromatográfica.

Producto obtenido

De acuerdo con una realización, el primer PUFA es un ácido graso omega-3.

5 De acuerdo con diferentes realizaciones, el primer PUFA puede ser EPA o DHA o ARA o DPA o SDA.

De acuerdo con una realización, el primer PUFA es EPA, el segundo ácido graso es un ácido graso saturado o monoinsaturado, el tercer ácido graso es DHA o SDA y el cuarto ácido graso es aquel entre DHA y SDA que no es el tercer ácido graso. Por ejemplo, el tercer ácido graso es DHA y el cuarto ácido graso es SDA.

10 La concentración de primer PUFA en el producto final obtenido al final del procedimiento (recogido en el conducto de recogida de primer PUFA 15 purificado o en el tercer conducto de recogida de flujo enriquecido en primer PUFA 12, si no hay una etapa de eliminación de los compuestos oxigenados, o también en el segundo conducto de recogida de flujo enriquecido en primer PUFA 9, si no hay una tercera etapa de separación cromatográfica ni una etapa de eliminación de los compuestos oxigenados, o también en el primer conducto de recogida de flujo enriquecido en primer PUFA 5, si no hay ni una segunda etapa de separación cromatográfica, ni una tercera etapa de separación cromatográfica, ni una etapa de eliminación de los compuestos oxigenados) puede ser mayor o igual a aproximadamente un 80%, preferiblemente mayor o igual a aproximadamente un 90% o aproximadamente un 95% o aproximadamente un 97% o aproximadamente un 98% o aproximadamente un 99% (en relación con el total de ácidos grasos).

20 La concentración de segundo ácido graso en ese producto final puede ser menor o igual a aproximadamente un 1% o aproximadamente un 0,1% o aproximadamente un 0,05% o aproximadamente un 0,03% o aproximadamente un 0,01% (en relación con el total de ácidos grasos).

La concentración de tercer ácido graso en ese producto final puede ser menor o igual a aproximadamente un 1% o aproximadamente un 0,1% o aproximadamente un 0,05% o aproximadamente un 0,03% o aproximadamente un 0,01% (en relación con el total de ácidos grasos).

25 La concentración de cuarto ácido graso en ese producto final puede ser menor o igual a aproximadamente un 1% o aproximadamente un 0,1% o aproximadamente un 0,05% o aproximadamente un 0,03% o aproximadamente un 0,01% (en relación con el total de ácidos grasos).

30 Por ejemplo, el producto final obtenido al final del procedimiento, puede contener EPA en una proporción mayor o igual a aproximadamente un 80% o mayor o igual a aproximadamente un 95% o mayor o igual a aproximadamente un 97% o mayor o igual a aproximadamente un 98% o mayor o igual a aproximadamente un 99% (en relación con el total de ácidos grasos); así como DHA en una proporción menor o igual a aproximadamente un 1% o menor o igual a aproximadamente un 0,1% o menor o igual a aproximadamente un 0,05% o menor o igual a aproximadamente un 0,03% o menor o igual a aproximadamente un 0,01%.

35 El aceite enriquecido en primer PUFA se almacena protegido del aire y la luz antes del envasado y/o el uso, comprendiendo, por ejemplo, la formulación final y/o la encapsulación.

De acuerdo con una realización, el producto final se combina con un vehículo farmacéutica y/o dietéticamente aceptable y/o excipientes y/o diluyentes. Este producto se puede formular de este modo, por ejemplo, en forma de cápsulas recubiertas con gel, cápsulas o comprimidos (o cualquier otra forma adaptada para una administración oral, tópica o parenteral).

40 Cada forma de dosificación individual (por ejemplo, cápsula o cápsula recubierta con gel) puede contener, por ejemplo, de 250 a 1500 mg, preferiblemente de 300 a 1000 mg del producto anterior.

45 De este modo, el producto se puede emplear para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento y/o la profilaxis de factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares, tales como hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hipertensión; y enfermedades cardiovasculares tales como arritmia, fibrilación auricular y/o ventricular, descompensación e insuficiencia cardíaca; para la prevención primaria y secundaria de infarto y reinfarto; para el tratamiento de cualquier otra patología que se pueda tratar con los PUFAs mencionados anteriormente, como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, colitis ulcerosa, patologías tumorales, enfermedades del sistema nervioso, envejecimiento celular, infarto cerebral, enfermedades isquémicas, psoriasis

Alternativamente, el producto se puede utilizar en usos parafarmacéuticos, y en particular en usos dietéticos.

50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla.

Ejemplo 1a: purificación en una etapa a escala de laboratorio

En este ejemplo, se obtiene un éster etílico de EPA en más de un 94% por 2 etapas de cromatografía a partir de una mezcla de ésteres etílicos que contiene más de un 70% de EPA.

El EPA se purifica mediante una etapa de cromatografía, en fase inversa sobre sílice C18, con partículas de 20 µm de diámetro como promedio. Las condiciones de la cromatografía son las siguientes:

- 5
- CYCLOJET™ equipado con una columna de compresión dinámica axial de 39 cm de longitud y 5 cm de diámetro.
 - Eluyente: 93/7 v/v de metanol/agua.

10 Se recoge una fracción que contiene aproximadamente 94% de EPA (área de CPG) y menos de 0,1% de DHA. La tasa de recuperación de EPA en esta fracción es mayor al 95%. La productividad específica es de 2,76 kg de EPA puro/kg de fase estacionaria/día. El consumo específico de eluyente es de 224 L/kg de EPA puro.

Después de la concentración en un evaporador rotativo operado al vacío, la fracción concentrada contiene menos de un 1% de disolventes residuales.

Ejemplo 1b (comparativo)

15 En este ejemplo, la mezcla de ésteres etílicos que contienen más de 70% de EPA del ejemplo anterior, se purifica en un sistema VARICOL™ equipado con 5 columnas de 9 cm de longitud y 4,8 cm de diámetro, con un eluyente con 93/7 v/v de metanol/agua.

El refinado contiene aproximadamente 92% de EPA (área de CPG) y menos de 0,1% de DHA. La tasa de recuperación de EPA en el refinado es superior al 95%. La productividad específica es de 2,46 kg de EPA puro/kg de fase estacionaria/día. El consumo específico de eluyente es de 258 L/kg de EPA puro.

20 La productividad específica de CYCLOJET™ es, por lo tanto, un 12% más alta que la de VARICOL™, y su consumo específico de eluyente es un 13% menor, en comparación con el de VARICOL™. Sorprendentemente, CYCLOJET™ conduce a unos rendimientos superiores a los de VARICOL™ para esta purificación en una etapa.

Ejemplo 2a: ultra-purificación a escala de laboratorio mediante CYCLOJET™

25 En este ejemplo, se obtiene un éster etílico de EPA en más de un 96% mediante una etapa de cromatografía a partir del producto obtenido en el Ejemplo 1a.

El EPA se purifica en fase inversa sobre sílice C18, con partículas de 20 µm de diámetro como promedio. Las condiciones de la cromatografía son las siguientes:

- 30
- CYCLOJET equipado con una columna de compresión dinámica axial de 39 cm de longitud y 5 cm de diámetro.
 - Eluyente: 79/21 v/v de acetona/agua.

Una de las fracciones recogidas contiene aproximadamente 96,8% de EPA (área CPG) y menos de 0,1% de DHA. La tasa de recuperación de EPA en el extracto es de aproximadamente el 95%. La productividad específica es de 3,58 kg de EPA puro/kg de fase estacionaria/día. El consumo específico de eluyente es de 153 L/kg de EPA puro.

35 Después de la concentración en un evaporador rotativo operado al vacío, la fracción concentrada contiene menos de un 1% de disolventes residuales.

Ejemplo 2b (comparativo)

En este ejemplo, el refinado concentrado obtenido en el ejemplo 1a se purifica en un VARICOL™ equipado con 5 columnas de 9 cm de longitud y 4,8 cm de diámetro, con un eluyente con 79/21 v/v de acetona/agua.

40 El extracto contiene aproximadamente 97% de EPA (área de CPG) y menos de 0,1% de DHA. La tasa de recuperación de EPA en el extracto es de aproximadamente el 95%. La productividad específica es de 3,35 kg de EPA puro/kg de fase estacionaria/día.

La productividad específica de CYCLOJET es un 7% más alta que la de VARICOL™. Sorprendentemente, CYCLOJET conduce a una mejor productividad que VARICOL™ para la segunda etapa de purificación.

Ejemplo 3: purificación en tres etapas a escala piloto

45 En este ejemplo, se obtiene un éster etílico con más de un 96% de EPA mediante tres etapas de cromatografía a partir de una mezcla de ésteres etílicos que contienen más de un 50% de EPA.

El EPA se purifica mediante tres etapas de cromatografía, en fase inversa sobre sílice C18. Las condiciones de la

ES 2 809 404 T3

cromatografía son las siguientes:

Etapa 1:

- VARICOL™ equipado con 5 columnas de 9 cm de longitud y 59 cm de diámetro. Configuración de las columnas: 1/1,6/1,6/0,8 en las zonas 1/2/3/4 respectivamente.
- 5
- Eluyente: 90/10 v/v de acetona/agua.

El refinado contiene aproximadamente 70% de EPA (área de CPG). Después de la concentración en un evaporador rotativo operado al vacío, el refinado concentrado contiene menos de un 1% de disolventes residuales.

Etapa 2:

- 10
- CYCLOJET equipado con una columna de compresión dinámica axial de 49 cm de longitud y 30 cm de diámetro.
 - Eluyente: 93/7 v/v de metanol/agua.

Se recoge una fracción que contiene aproximadamente 94% de EPA (área de CPG) y menos de 0,1% de DHA. La tasa de recuperación de EPA en la fracción es superior al 95%.

- 15
- Después de la concentración en un evaporador rotativo operado al vacío, la fracción concentrada contiene menos de un 1% de disolventes residuales.

Etapa 3:

- CYCLOJET equipado con una columna de compresión dinámica axial de 49 cm de longitud y 30 cm de diámetro.
 - Eluyente: 79/21 v/v de acetona/agua.
- 20

Se recoge una fracción que contiene aproximadamente 96,8% de EPA (área de GPC) y menos de 0,1% de DHA. La tasa de recuperación de EPA en la fracción es superior al 95%.

Después de la concentración en un evaporador rotativo operado al vacío, la fracción concentrada contiene menos de un 1% de disolventes residuales.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de purificación de un primer ácido graso a partir de una mezcla inicial que comprende además al menos un segundo ácido graso, opcionalmente un tercer ácido graso y opcionalmente un cuarto ácido graso, comprendiendo el procedimiento:

- 5 - una primera etapa de separación cromatográfica en fase líquida, a partir de la mezcla inicial, llevada a cabo en una primera unidad de separación cromatográfica, que permite recuperar, por un lado, un primer flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un flujo enriquecido en segundo ácido graso,
- opcionalmente, una segunda etapa de separación cromatográfica en fase líquida, a partir del primer flujo enriquecido en primer ácido graso, llevada a cabo en una segunda unidad de separación cromatográfica, que permite recuperar, por un lado, un segundo flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un flujo enriquecido en tercer ácido graso,
- 10 - opcionalmente, una tercera etapa de separación cromatográfica en fase líquida, a partir del segundo flujo enriquecido en primer ácido graso, llevada a cabo en una tercera unidad de separación cromatográfica, que permite recuperar, por un lado, un tercer flujo enriquecido en primer ácido graso y, por otro lado, un flujo enriquecido en cuarto ácido graso,
- 15

en donde al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única, con reciclado al estado estacionario,

en donde el primer ácido graso es un primer ácido graso poliinsaturado.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la primera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única, con reciclado al estado estacionario; y/o la segunda unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única, con reciclado al estado estacionario; y/o la tercera unidad de separación cromatográfica es una unidad de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única, con reciclado al estado estacionario.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que al menos dos unidades entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica son unidades de separación cromatográfica de lecho estático con una columna única con reciclado al estado estacionario.

30 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica, es una unidad de separación cromatográfica con varias columnas.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:

- la primera etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo con un primer eluyente que es un eluyente hidroorgánico; y/o
- 35 - cuando sea apropiado, la segunda etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo con un segundo eluyente que es un eluyente hidroorgánico; y/o
- cuando sea apropiado, la tercera etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo con un tercer eluyente que es un eluyente hidroorgánico.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que:

- 40 - el primer eluyente es una mezcla de cetona/agua, de forma más particularmente preferida acetona/agua;
- cuando sea apropiado, preferiblemente, el segundo eluyente es una mezcla de alcohol/agua, de forma más particularmente preferida metanol/agua;
- cuando sea apropiado, preferiblemente, el tercer eluyente es una mezcla de cetona/agua, de forma más particularmente preferida acetona/agua.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el primer eluyente es diferente del segundo eluyente y cuando sea apropiado, el tercer eluyente es diferente del primer eluyente y del segundo eluyente.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que:

- la concentración en masa del primer eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%;

- cuando sea apropiado, la concentración en masa del segundo eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%;
 - cuando sea apropiado, la concentración en masa del tercer eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%.
- 5 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que
- la concentración en masa del segundo eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%;
 - cuando sea apropiado, la concentración en masa del tercer eluyente en disolvente(s) orgánico(s) se controla a cerca del 2%;
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que:
- 10
- el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido eicosapentaenoico; o
 - el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido docosahexaenoico; o
 - el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido araquidónico; o
 - el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido docosapentaenoico.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que:
- 15
- el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido eicosapentaenoico, y se recupera al final del procedimiento con una pureza mayor o igual al 80%; o
 - el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido docosahexaenoico, y se recupera al final del procedimiento con una pureza mayor o igual al 70%; o
- 20
- el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido araquidónico, y se recupera al final del procedimiento con una pureza mayor o igual al 70%; o
 - el primer ácido graso poliinsaturado es el ácido docosapentaenoico, y se recupera al final del procedimiento con una pureza mayor o igual al 70%.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende:
- 25
- al menos una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y un compuesto o compuestos que están retenidos más tiempo que éste; y/o
 - al menos una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y un compuesto o compuestos que están retenidos menos tiempo que éste.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, que comprende la primera etapa de separación cromatográfica que es una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos más tiempo que éste, a continuación la segunda etapa de separación cromatográfica que es una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos más tiempo que éste, a continuación la tercera etapa de separación cromatográfica que es una etapa de separación cromatográfica entre el primer ácido graso y uno o varios compuestos retenidos menos tiempo que éste.
- 30
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que al menos una entre la primera unidad de separación cromatográfica, la segunda unidad de separación cromatográfica y la tercera unidad de separación cromatográfica comprende una columna de separación que tiene una longitud mayor o igual a 5 cm o a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm; y/o que tiene un diámetro mayor o igual a 10 cm o a 20 cm o a 25 cm o a 30 cm o a 40 cm o a 50 cm o a 60 cm.
- 35
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, en el que:
- 40
- la mezcla inicial que alimenta la primera unidad de separación cromatográfica comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos; y/o
 - cuando sea apropiado, el primer flujo enriquecido en primer ácido graso que alimenta la segunda unidad de separación cromatográfica, comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos; y/o
 - cuando sea apropiado, el segundo flujo enriquecido en primer ácido graso que alimenta la tercera unidad de separación cromatográfica, comprende menos de un 80% de disolventes orgánicos.
- 45

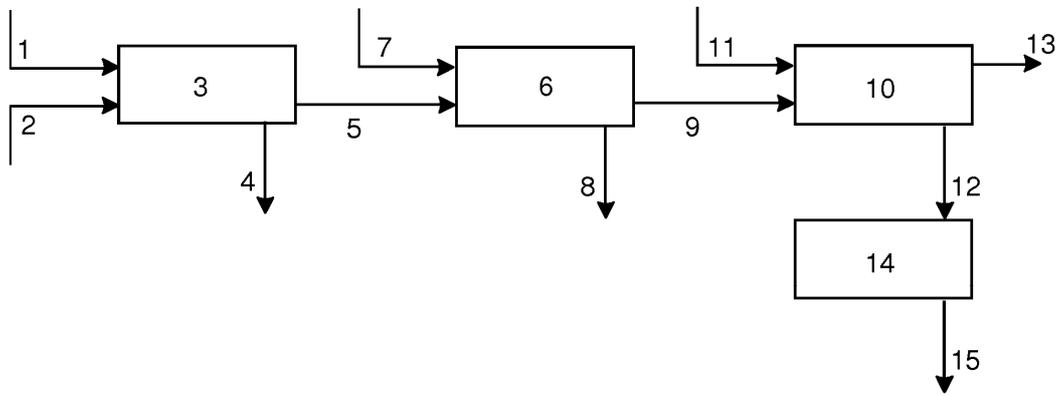


Fig. 1