

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 931 084**

21 Número de solicitud: 202230606

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

B01D 11/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

05.07.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.12.2022

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

(100.0%)

Avenida de Séneca, 2

28040 Madrid (Madrid) ES

72 Inventor/es:

CALVO GARRIDO, Lourdes

54 Título: **Proceso integrado y equipo para la obtención de colágeno tipo II o nativo a partir de cartílago de origen animal por contacto con CO₂**

57 Resumen:

Proceso integrado y equipo para la obtención de colágeno tipo II o nativo a partir de cartílago de origen animal por contacto con CO₂.

Los procedimientos tradicionales de obtención de colágeno incluyen varias etapas que, en ocasiones, pueden causar deterioro en la estructura tridimensional tan sensible del colágeno nativo, así como el tratamiento con varios disolventes y agentes agresivos que pueden permanecer en el colágeno como residuos.

La presente invención propone un proceso limpio y simple, integrado, para obtener un colágeno nativo tipo II ya que, a partir de la trituración de la materia prima natural, solo se necesita un tratamiento con CO₂ supercrítico para conseguir un colágeno nativo que mantiene su estructura tridimensional intacta y está libre de disolvente que permitiría su uso en aplicaciones médicas y nutraceuticas.

ES 2 931 084 A1

DESCRIPCIÓN

Proceso integrado y equipo para la obtención de colágeno tipo II o nativo a partir de cartílago de origen animal por contacto con CO₂

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención describe un proceso integrado para la obtención de colágeno nativo a partir de cartílago utilizando solamente un fluido supercrítico, particularmente CO₂ supercrítico. El colágeno obtenido es apropiado para uso médico y nutracéutico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El colágeno es la estructura proteica más abundante de la matriz extracelular del tejido conectivo y membranas basales. Las fibras de colágeno están formadas por subunidades filamentosas finas llamadas fibrillas. A su vez, las fibrillas, se componen de moléculas de colágeno que se agrupan unas detrás de otras de tal manera que se forman dos zonas, una zona de superposición y una zona de brecha, lo que da lugar a la estriación o bandeo característico del colágeno. Entre las moléculas de colágeno se establecen enlaces covalentes que dan resistencia a estas fibrillas y por tanto al colágeno.

15

20

Hasta el momento se han caracterizado 28 tipos distintos de colágeno que forman fibrillas, microfibrillas y estructuras de conexión. Los tipos de colágeno se clasifican según la estructura homóloga de sus dominios y se les asignan números Romanos de I a XXVIII en función de su orden cronológico del descubrimiento. Por ejemplo, la estructura del colágeno tipo II es de tres cadenas $\alpha 1$ ($\alpha 1$ (II)₃) y fue el segundo que se descubrió [1,2].

25

En la Tabla 1 se muestran, además de la composición molecular, algunas características estructurales y la localización de los tres tipos de colágeno más importantes. Las moléculas de colágeno tipo II están constituidas por un dominio COL central y dos dominios en los extremos constituidos por secuencias no colagenosas llamadas telopéptidos; en el extremo C – terminal tienen un telopéptido y un extremo N – terminal parcialmente procesado [3].

35

Tabla 1. Resumen de las principales características del colágeno de tipo I, II y III. [1,2]

Tipo	Composición molecular	Características estructurales	Tejidos representativos
I	$\alpha 1(I)2\alpha 2(I)$	Fibrillas de 300 nm de largo y 50 -90 nm diámetro.	Piel, tendones, huesos, ligamentos, dentina, tejidos intersticiales
II	$\alpha 1(II)3$	Fibrillas de 300 nm de largo y 15 - 45 nm diámetro.	Cartílago, humor vítreo
III	$\alpha 1(III)3$	Fibras de 300 nm de largo, a menudo con el tipo I.	Piel, músculo, vasos sanguíneos

5

El colágeno tipo II o nativo es el principal componente estructural del cartílago. Junto a otros tipos de colágenos específicos de cada tejido está orientado aleatoriamente en una matriz de proteoglicanos viscosos. La rigidez de las fibrillas de este tipo de colágeno imparte fuerza y compresibilidad. Esta propiedad permite que las articulaciones absorban los golpes. Por ello, se utiliza en como suplemento dietario para promover la salud de las articulaciones. Además, se ha probado que puede suprimir la artritis reumatoide. Otras aplicaciones del colágeno tipo II están en la industria alimentaria (como agente clarificante, emulsificante o agente para batidos), en aplicaciones farmacéuticas (como material de ingeniería de tejidos, para microencapsulación y como recubriente) y en la industria cosmética, para la fabricación de champús y pintalabios. No obstante, hoy en día, la mayor demanda está en su uso para la formulación de productos relacionados con la salud articular.

Los procedimientos tradicionales de obtención de colágeno incluyen varias etapas: primero la preparación de la materia prima (que suele incluir una limpieza mecánica, lavado o incluso cocción para desinfectar), seguida de una etapa de trituración y de una digestión ácida o alcalina (para eliminar la fracción no-colagénica y aumentar el rendimiento de la extracción); en segundo lugar, la extracción del colágeno, que puede realizarse mediante hidrólisis enzimática y/o química fundamentalmente con ácidos

fuertes y donde se obtiene una suspensión diluida de colágeno; y, finalmente, la concentración y purificación de la suspensión diluida (Cao, H. y Xu, S. Y. *Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage*, Food Chem. 108 (2008) 439–445; Deyl, Z et al., *Preparative procedures and purity assessment of collagen proteins*, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. (2003), 245-275).

Estos métodos, además de ser muy prolongados pues requieren de varios días, incluyen numerosas etapas, algunas de ellas (como la centrifugación o la cromatografía) muy caras, así como el tratamiento con varios disolventes y agentes agresivos tales como ácidos o sales que pueden permanecer en el colágeno como residuos. La hidrólisis ácida además podría causar deterioro en la estructura tridimensional tan sensible del colágeno nativo.

Sin embargo, en este momento existe la necesidad de hacer los procesos químicos más sostenibles y simples. En este sentido, la extracción con CO₂ supercrítico es propuesta como una tecnología prometedora para el procesamiento de colágeno (Harris, M. et al. *Developments for Collagen Hydrolysate in Biological, Biochemical, and Biomedical Domains: A Comprehensive Review*. Materials, 14(2021), 2806).

Hay procesos patentados que incluyen alguna etapa con CO₂ supercrítico en la producción de colágeno, pero solo con fines de extracción de impurezas. En la patente ES2238926 se propone el desengrasado de piel de cerdo mediante dióxido de carbono comprimido para la posterior obtención de pasta de colágeno de uso alimentario. El método incluye sucesivas compresiones y descompresiones del extractor para provocar la rotura de las membranas de los adipocitos facilitando así el contacto grasa-disolvente. Pero mediante este método solo se consigue desengrasar la piel a partir de la cual se podría obtener un colágeno tipo I, no tipo II o nativo. Requeriría un procedimiento posterior de extracción, concentración y purificación.

Por otra parte, en la patente WO2018030748 se relaciona un método para extraer colágeno del efluente de la liposucción, con CO₂ supercrítico; y en la patente CN102633877A se describe un proceso complejo para obtener colágeno a partir de piel y escamas de pescado en la que el CO₂ supercrítico sólo se utiliza en una etapa para extraer el aceite como un producto secundario. En el documento ES2105323 se recoge un procedimiento para el curtido, teñido e impermeabilización de pieles naturales que

contienen colágeno en el que se utiliza CO₂ supercrítico como fluido de todas estas etapas en sustitución de agua para minimizar el impacto ambiental y el consumo de materias primas.

5 Además, existen publicaciones en las que el CO₂ sub o supercrítico se utiliza como agente esterilización de materiales basados en colágeno (Herdegen, V. et al. *Sterilization of medical products from collagen by means of supercritical CO₂*, Chem. Eng. Technol. 37 (2014) 1891–1895; Bernhardt, A. et al. *Improved sterilization of sensitive biomaterials with supercritical carbon dioxide at low temperature*, PLoS One. 10 (2015) 1–19; Santos-Rosales, V. et al. *Sterile and Dual-Porous Aerogels Scaffolds Obtained through a Multistep Supercritical CO₂-Based Approach*, Molecules 24 (2019) 1-17). En estas descripciones el colágeno ya ha sido procesado y obtenido por métodos convencionales, es un colágeno mineralizado y conformado para generar andamiajes para implantes, obtenido de la dermis del cerdo y de la submucosa o intestino del cerdo. 10 Por tanto, el CO₂ no se utiliza en su producción ni se obtiene colágeno nativo. 15

Por todo lo anterior, sigue existiendo la necesidad de nuevos procesos alternativos sostenibles y simples para la producción de colágeno tipo 2 o nativo, que empleen menores cantidades y tipos de disolventes, condiciones de temperatura más suaves para reducir los requerimientos energéticos y con la recirculación de las materias primas no procesadas y de los disolventes empleados. Adicionalmente, el mercado actual de fármacos y alimentos funcionales exige cada vez más, productos poco procesados y con la menor cantidad de residuos de disolventes o agentes químicos posibles. 20

25 La presente invención propone un proceso limpio y simple, integrado, para obtener un colágeno nativo tipo II ya que, a partir de la trituración de la materia prima natural, solo se necesita un tratamiento con CO₂ supercrítico para conseguir un colágeno nativo que mantiene su estructura tridimensional intacta y está libre de disolvente que permitiría su uso en aplicaciones médicas y nutraceúticas. Después del procedimiento solamente 30 requeriría de molienda y tamizado.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Esta invención describe un método de obtención de colágeno nativo a partir de colágeno de origen animal mediante el empleo de CO₂ supercrítico o subcrítico. El proceso se 35

lleva a cabo en condiciones de presión y temperatura moderada, durante un tiempo suficiente para que el contacto entre el colágeno y el CO₂ sea efectivo. Se obtiene un colágeno nativo desengrasado y estéril que conserva su estructura tridimensional y sus propiedades de calidad y con una humedad apropiada para su almacenamiento.

5

Como materia prima se puede utilizar el colágeno con su contenido en agua original o escurrido, parcialmente secado a temperatura moderada (por ejemplo, en secadero a vacío o con secado intermitente) o parcialmente deshidratada por un tratamiento previo con un disolvente como acetona o etanol. Aunque el contenido en agua de la materia
10 prima para ser tratada con el CO₂ puede ser desde el original hasta el grado de humedad en equilibrio con el entorno, preferentemente el contenido en agua es del 20 - 30% o superior.

La materia prima se pone en contacto con CO₂ subcrítico o supercrítico en unas
15 condiciones de presión de 50 a 500 bar y una temperatura de 20 a 100°C. El caudal de CO₂ está comprendido entre 5 y 120 Kg_{CO2}/h/kg_{materia prima}, durante un tiempo entre 1 y 24 horas.

Para eliminar el CO₂ y recuperar el colágeno tratado, se lleva a cabo una
20 despresurización a una velocidad menor de 20 bar/min. El CO₂ eliminado se recircula al proceso.

Opcionalmente, para reducir la presión de operación, aumentar el rendimiento del proceso, disminuir el consumo de CO₂ o el tiempo de contacto, se puede añadir al CO₂
25 un modificador, como etanol, acetato de etilo, lactato de etilo, alcoholes, acetona o compuestos que son habitualmente conocidos como co-disolventes en el estado del arte.

En una realización preferida de la invención se pone la materia prima en contacto con
30 el CO₂ a temperaturas comprendidas entre 38 y 43 °C y velocidades de despresurización de < 10 bar/min para preservar la calidad del colágeno obtenido, así como utilizar presiones entre 150 y 350 bar para mantener rendimientos altos sin aumentar los gastos energéticos o los costes de equipamiento.

35

El equipo donde se lleva a cabo el proceso comprende un sistema de entrada de materia prima, un recipiente (R1) para contener la materia prima a tratar, una línea de suministro de CO₂, una línea de recuperación del CO₂, dispositivos para el control y la lectura de la presión y la temperatura, elementos de seguridad, un sistema de despresurización y un sistema de descarga del colágeno obtenido.

La línea de suministro de CO₂ utiliza un refrigerante (E1) para sub-enfriarlo antes de comprimirlo en una bomba (P1) y ajustar su temperatura en un cambiador de calor (E2). Después de su contacto con la pasta de colágeno, el CO₂ se recircula, reduciendo previamente su presión, limpiándolo de restos de impurezas y reacondicionarlo a las condiciones de operación.

Opcionalmente, el equipo incluye una línea de suministro de co-disolvente. También para mejorar el contacto efectivo entre la materia prima y el CO₂ se pueden introducir distribuidores si la materia prima se dispone formando un lecho fijo o un tambor rotatorio que permita el movimiento de la materia prima.

El colágeno nativo obtenido mantiene su estructura tridimensional intacta y está libre de disolvente. Se puede alcanzar una humedad inferior al 10%. Todo ello permitiría su uso en aplicaciones médicas y nutraceuticas. Después del procedimiento requeriría como máximo de molienda y tamizado.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el impacto del consumo de CO₂ en el rendimiento del proceso a colágeno medido como pérdida de masa y en el grado de humedad del colágeno obtenido a 350 bar y 40 °C.

En la Figura 2 se muestran imágenes TEM de muestras obtenidas a 350 bar. A) 40 °C, 14 h de tratamiento; B) 40 °C, 65 h, 9 ciclos de compresión/descompresión; C) 17 min a 45 °C de las 8 h de tratamiento. La barra de escala es de 200 nm.

La Figura 3 muestra un corte longitudinal y transversal del colágeno obtenido a partir de

cartílago de esternón de pollo pre-secado y tratado con CO₂ supercrítico a 350 bar y 40 °C.

5 En la Figura 4 se esquematiza el equipo para la obtención de colágeno a partir de cartílago mediante CO₂ supercrítico.

La Figura 5 muestra el impacto del tiempo de operación y el caudal en el rendimiento del proceso de producción de colágeno medido como pérdida de masa de la pasta de cartílago de esternón de pollo. El CO₂ supercrítico fue suministrado a 350 bar y 40 °C.
10 La barra de error muestra la desviación estándar promedio. Las líneas sólidas muestran el ajuste polinómico de los datos experimentales.

La Figura 6 representa el impacto de la temperatura en la velocidad de procesamiento a medida que aumentó la ratio CO₂/pasta. La presión fue 350 bar y el caudal 60 kg
15 CO₂/h/kg pasta. La barra de error muestra la desviación estándar promedio. Las líneas sólidas muestran el ajuste polinómico de los datos experimentales.

En la Figura 7 se muestran imágenes TEM de la estructura de colágeno obtenida con CO₂ supercrítico a 350 bar y 40 °C (A) o 43 °C (B).
20

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden, en ningún caso, ser limitativos de su alcance.

25

Ejemplo 1

Este ejemplo se refiere a la obtención de colágeno nativo a partir de cartílago de esternón de pollo solamente con CO₂ supercrítico.

30 El cartílago de esternón de pollo es molido para generar una pasta. Una cantidad aproximada de 20 g de pasta se introduce en el recipiente de acero inoxidable de alta presión de 100 mL, formando un lecho fijo de una relación de longitud a diámetro de aprox. 6: 1. Una malla metálica en el fondo y en la cabeza del lecho evita que el colágeno sea arrastrado durante la operación. Como tiene tendencia a la compactación
35 favoreciendo la formación de canales preferentes, se emplean redistribuidores. A

continuación, se cierra el recipiente y se precalienta a la temperatura de operación. Después se inicia el bombeo del CO₂ y, al alcanzarse la presión de interés, se abre la válvula de contrapresión (BPR), proporcionando un flujo continuo de CO₂ a través del lecho de 4 g/min en promedio que da un caudal másico de 16 g CO₂/h/g pasta. Después de la válvula, el CO₂ es despresurizado y por tanto, se convierte en gaseoso, lo que hace que lo que se hubiera extraído o arrastrado, precipitase en el colector. Una vez transcurrido el tiempo de operación, se procede a la despresurización del equipo. El caudal total de CO₂ pasado se lee en el medidor de flujo. El recipiente se separa del equipo y el producto se descarga para realizar los posteriores análisis.

10

Ejemplo 2

En este ejemplo se describe el análisis del colágeno obtenido.

15

La eficacia del tratamiento descrita en el ejemplo 1 se determina a partir de los datos de contenido en humedad, y carga microbiana del producto obtenido, así como de las imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de su estructura del producto final y de su proporción en colágeno nativo.

20

El *análisis microbiológico* se lleva a cabo tanto en las muestras tratadas como en la pasta de partida para establecer el grado de inactivación durante el tratamiento. Cinco gramos de muestra se mezclan con 45 ml de agua de peptona en condiciones estériles. A continuación, se preparan diluciones en serie y 1 ml de cada dilución se cultiva en placas de Petri conteniendo 20 ml del medio específico adecuado. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos se analiza después del cultivo a 30 °C durante 24 h en medio PCA (del inglés "plate count agar"). El recuento de microorganismos anaerobios se realiza en medio SPS (Sulfito Polimixina Sulfadiazina) después de cultivo en jarra de anaerobiosis a 37°C durante 48 h. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g) y el grado de inactivación se define como el logaritmo del recuento después del tratamiento (N) respecto del inicial (N₀). La máxima desviación estándar en estas medidas es de ± 0,3 ciclos logarítmicos.

30

Primeramente, se analiza el cartílago molido para establecer el punto de referencia del método de producción de colágeno. El recuento de microorganismos anaerobios en este producto es del orden de 10⁴ ufc/g. Típicamente el pollo tiene contaminación anaerobia de especies de *Clostridium*, aunque también podría tener *Staphylococcus aureus* u otros

35

anaerobios estrictos o facultativos. El recuento de aerobios totales es del orden de 10^5 - 10^6 ufc/g dependiendo del lote (en promedio de $7,4 \times 10^5$ cfu/g).

5 El *grado de humedad* de la materia prima y del producto se realiza mediante pérdida de peso en estufa a 105°C hasta lectura constante. La desviación estándar en estas medidas es de $\pm 3\%$.

10 El producto recogido después del tratamiento del recipiente es molido y tamizado en criba de 180 micras para ser *caracterizado estructuralmente* mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). La observación de las muestras mediante TEM permite observar el grado de heterogeneidad de las mismas, es decir, si hay presencia de otro tipo de tejido, el estado de las fibrillas del colágeno (si están definidas o no, su longitud) y la presencia o ausencia del bandeo característico en las mismas.

15 Para determinar el *contenido de colágeno nativo* en el producto obtenido después del tratamiento con CO_2 , se realizan análisis ELISA (del inglés “Enzyme-linked immunosorbent assay”) basados en ensayos de inmunosorción enzimáticos específicos. En una primera etapa se realiza una digestión de la muestra con pepsina, que separa las moléculas de colágeno cuya estructura de triple hélice se mantiene, de
20 aquellas moléculas de colágeno que están degradadas. A continuación, se degrada la muestra con proteinasa K para el análisis posterior con ELISA. El kit que se emplea determina los productos de degradación de los telopéptidos C- terminales del tipo II de colágeno.

25 **Ejemplo 3.**

En este ejemplo se describe el uso de cartílago de esternón de pollo molido sin pre-tratar.

30 El cartílago utilizado está molido, con una cantidad de agua promedio de 68 % y con un contenido en grasa del 2-3%. En este material primario, altamente contaminado microbiológicamente, muy húmedo y con algo de grasa, se investigan dos presiones de operación: 100 bar y 350 bar. La temperatura del tratamiento se mantiene constante en 40°C . Estos ensayos se realizan además a tiempos crecientes de operación, para incrementar las ratios de CO_2 por unidad de masa de pasta. Un resumen de los
35 resultados se muestra en la Tabla 2 y en la Figura 1.

Tabla 2. Condiciones y resultados de inactivación microbiana medido como recuento total de aerobios del tratamiento con CO₂ supercrítico de pasta de cartílago de esternón de pollo.

Muestra	Presión	Temperatura	Tiempo	Ratio CO ₂ /pasta	Caudal CO ₂ /h/ pasta	Reducción en recuento de aerobios, log N/N ₀	Reducción en recuento de anaerobios, log N/N ₀
	(bar)	(°C)	(h)	(g/g)	(g/h/ g)	(*)	(*)
1	100	40	7	77	11	1.0	Algunas colonias blancas (Posiblemente <i>Staphilococcus aureus</i>)
2	350	40	5	91	18	-5.9	-4.4
3	350	40	7	166	18	-5.9	-4.4
4	350	40	14	206	15	-5.9	-4.4
5	350	40	65	357	16	-5.9	-4.4

(*) En los datos reportados con una reducción logarítmica de -5,9 en el recuento de aerobios y de -4,4 en el recuento de anaerobios, no hubo crecimiento en ninguna dilución; por tanto, representan grado de esterilidad.

10 A presión baja se recoge poco precipitado en el colector de salida del CO₂, mientras que en los ensayos realizados a 350 bar, se recoge un precipitado gomoso, amarillento y húmedo. Por otro lado, el producto recogido del recipiente de alta presión después del

15 imágenes TEM se observa que durante el procedimiento se preserva la típica estructura en hélice tridimensional del colágeno nativo tipo II en excelentes condiciones. A modo de ejemplo, en la Figura 2A se muestran imágenes tomadas de la Muestra 4 de la Tabla 2 en la que se consigue un grado de secado muy elevado (<5%) y alcanzar la esterilidad. No se observan fibras degradadas, la estriación es marcada y las fibrillas permanecen

20 alargadas con un tamaño similar, el bandeo característico del colágeno está bien definido.

Por el contrario, en la Figura 2B, se muestra la imagen TEM de la Muestra 5 obtenida en similares condiciones, pero a la que se la somete a un elevadísimo tiempo de

25 tratamiento (65 horas) y nueve ciclos de compresión/descompresión. Claramente, presenta síntomas de degradación con las fibras más rotas y con menor definición del bandeo. En la Figura 2C, también se incluyen las observaciones de una muestra en la que durante un tiempo (17 min) del total del tratamiento (8 h) se eleva la temperatura hasta 45 °C. El estado de las fibras está muy deteriorado por la alta termo-sensibilidad

30 del colágeno.

En los ensayos realizados a mayor presión, además el producto resultó estéril, con

recuento de cero colonias en todas las diluciones tanto de especies aerobias como anaerobias. Ello es debido a que el CO₂ a alta presión tiene actividad antimicrobiana [13,14]. En un trabajo previo realizado sobre un producto natural, cacao, se manifiesta que, con esta reducción de la carga microbiana total, es eliminada también la biocontaminación tipo *enterobacteria* y *staphilococcus aureus* [15]. Además, otros autores a similares condiciones de operación demostraron que también son inactivados virus causantes de patologías humanas, hecho que es muy relevante en el caso de derivados de pollo o aves en general, por el problema sobre la salud de la gripe aviar. Por ejemplo, en experimentos realizados en planta piloto para la preparación de aloinjertos de hueso, se demostró que cuatro tipos de virus (*HIV-1*, *Sindbis*, *Polio Sabin tipo I* y *Pseudorabies*) eran inactivados a valores por debajo del límite de detección aplicando CO₂ a 250 bar, 50°C y 10 min por g de hueso [16]. También, se logró la desinfección de varios virus (*Coronavirus "TEGV"*, *Herpesivurs "PRV"*, *Flavivirus "JEV"*, *Arterivirus"PRRSV"*) en un biomaterial representativo sensible a la temperatura (diferentes líneas celulares), con CO₂ a 40-50°C, 160 bar y 5 min sin causar daños significativos en la bioactividad del biomaterial [17].

Ejemplo 4

En este ejemplo se describe el uso de cartílago molido y pre-secado a vacío hasta un contenido inicial de agua del 34%. La contaminación microbiana es de 480 ufc/g de recuento total de aerobios. En este caso, los ensayos se llevan a cabo a 350 bar y 40°C y con un tiempo de 14 horas. Se consigue un colágeno con un porcentaje de agua final del 5% y además estéril, con una buena estructura del colágeno, con las fibras largas, estructuradas, paralelas y con el bandeo bien definido, tal y como se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 5

Se muestra la obtención de colágeno nativo a partir de cartílago de esternón de pollo pretratado con acetona o etanol antes de procesarse con CO₂ supercrítico.

30

La pasta se trata primero con acetona o con etanol para deshidratar, eliminar grasas y así reducir el tiempo y la presión de tratamiento posterior con CO₂ supercrítico. Se mide el residuo de acetona en el colágeno obtenido. En las muestras tratadas con etanol no se midió el contenido residual puesto que este disolvente es reconocido como seguro, GRAS (del inglés, "Generally Recognized As Safe").

35

El trabajo se realiza sobre similar materia prima al ejemplo 1, aunque por ser de lotes distintos, el contenido inicial de agua es de 77 % para los ensayos con acetona (muestras 6 a 9) y de 81% para los ensayos con etanol (muestras 10 y 11). La acetona y el etanol son suministrados por Scharlau Chemie, S.A. con una pureza $\geq 99,8\%$ y $\geq 99,9$, respectivamente. El CO₂ es el mismo que en el ejemplo anterior.

Pre-tratamiento con acetona y con etanol. Se trata con una ratio de 270 ml de acetona o etanol por cada 100 g de pasta. La mezcla se filtra a vacío con un embudo Büchner. Se repite el proceso a razón de 5 ml por gramo de pasta obtenida del filtrado, seguido de nueva filtración a vacío e inmediatamente se introduce en el recipiente de alta presión para tratarla con CO₂.

Tratamiento con CO₂. Los ensayos se realizan operando con CO₂ a 150 bar y 38-40°C de la misma forma que en el ejemplo 1, pero utilizando un recipiente más pequeño, de 10 mL y una cantidad de pasta del orden de 5 g. El caudal de CO₂ se fija en 3 g/min.

La cantidad residual de acetona se mide mediante cromatografía de gases con el método de espacio de cabeza. Aproximadamente 2 g de muestra se introducen en un vial de 10 ml con septum y se sellan. Dicho vial se mantiene en un baño a 60 °C durante 60 minutos, hasta alcanzar el equilibrio de fases. De la fase gaseosa se introduce en el cromatógrafo una muestra de 0,5 ml con una jeringa. Cada muestra se pincha dos veces y se calcula con una media de las áreas obtenidas para minimizar el error. Se utiliza un cromatógrafo de gases equipado con un detector de iones traza (GC-FID SHIMAZDU GC-2010 PLUS). La columna es de sílice capilar “Zebron– ZB-1-HT Inferno” (longitud 20 m, diámetro 0,18 mm, espesor de la pared 0,18 µm). Las condiciones de operación son: la temperatura del horno 40 °C, el tiempo de análisis 6 minutos, la temperatura del inyector 180 °C, el modo SPLIT con una ratio de 19,5, la presión 40,9 kPa, el flujo de nitrógeno 7 ml/min y la temperatura del FID 280 °C. Para hacer el calibrado se utilizan muestras líquidas de acetona-agua.

En la Tabla 3 se muestra un resumen de los resultados obtenidas. Se indica la cantidad de CO₂ utilizada en cada muestra y la humedad del colágeno obtenido, el contenido de colágeno nativo según el ensayo ELISA y la acetona residual. Todas las muestras tienen recuento nulo en las diluciones hasta seis órdenes de magnitud tanto en el recuento de

aerobios como de anaerobios, por tanto, se podrían considerar estériles.

Tabla 3. Propiedades del colágeno nativo obtenido a partir de pasta de esternón de pollo pretratado con acetona o etanol previo al procesamiento con CO₂ supercrítico a 150 bar. Las muestras 6 a 9 fueron pretratadas con acetona, las muestras 10 y 11 con etanol.

Muestra	T	Tiempo	Consumo de CO ₂	Velocidad de despresurización	Humedad final	Acetona residual	Colágeno nativo (ELISA)
	(°C)	(h)	(g CO ₂ /g pasta)	(bar/min)	(%)	(ppm ± SD)	(%)
6	40	5.2	190	4	10	211 ± 15	74
7	40	5.6	204	6	5	185 ± 32	57
8	40	6.7	230	4	5	158 ± 13	
9	40	8.7	299	NM	5	13 ± 1	
10	38	4.9	181	7	29		
11	38	8.8	300	NM	10		66

NM. No medido

El pretratamiento con acetona previo a la extracción con CO₂ reduce el contenido de agua de la pasta a un 35% aproximadamente. Por ello, es por lo que operando con CO₂ a presión mucho más baja que en los ensayos previos del ejemplo 1 (150 vs. 350), se necesita similar cantidad de CO₂ para obtener un colágeno desengrasado, estéril y con la humedad deseada < 10%. La acetona que empapa el colágeno podría haber actuado de modificador (co-disolvente) del CO₂ mejorando la solubilidad del agua y de las grasas.

Después de este procedimiento el contenido de acetona residual es >150 ppm en las muestras obtenidas con ratios de CO₂ menores a 230 kg CO₂/kg pasta (muestras 6, 7 y 8). Según las recomendaciones de la Administración de Drogas Federal de EE.UU. [18], la cantidad residual máxima de acetona en productos farma debe ser <5000 ppm; mientras que en alimentos debe ser 50 ppm [19]. Para ajustar la cantidad de acetona residual se puede pasar CO₂ solo por más tiempo como se hizo en la muestra 9. Al aumentar la ratio de CO₂ a 299 kg CO₂/kg pasta, la concentración residual de acetona es de 13 ppm.

Respecto al pretratamiento con etanol, después de la operación de filtración a vacío se logra una pérdida de masa del orden del 40 %. A continuación, y con una ratio de 300 g CO₂/g pasta, se consigue un producto acorde a criterios de humedad a 150 bar y 38 °C (Muestra 11). En esta última muestra el contenido en colágeno nativo según pruebas ELISA es del 66 %.

Ejemplo 6.

Se describe la obtención de colágeno nativo a partir de cartílago de esternón de pollo con CO₂ supercrítico modificado con etanol.

5

Esencialmente es el mismo procedimiento que en los ejemplos anteriores, al que se le agrega una línea de suministro del etanol; de tal forma que el CO₂ y el etanol se alimentan paralelamente por sendas bombas a la presión deseada de operación. El caudal de CO₂ se fija en 3 g/min y el del etanol se ajusta para dar el porcentaje deseado (3 ó 10% en masa respecto del fluido principal, el CO₂). Ambos fluidos se mezclan y a continuación la corriente obtenida se precalienta a la temperatura de operación. La mezcla fluida entra así al recipiente de alta presión donde pasa a través de la pasta molida de cartílago de esternón de pollo (aprox. 3,5 g). Cuando la operación termina (= cuando pasa la cantidad deseada de CO₂ por masa de pasta cargada), se apagan las bombas y se comienza la despresurización lentamente. En estos ensayos se consigue realizar a una velocidad promedio de 6 bar/min. El producto obtenido se descarga del extractor para realizar los pertinentes análisis posteriores. En la Tabla 4 se muestra un resumen de las muestras obtenidas. La desviación en la medida de la humedad es elevada, del orden de $\pm 5\%$ debido a la retención de algo de etanol en las muestras tratadas con mayor proporción. Para eliminarlo se puede pasar CO₂ supercrítico adicionalmente.

20

25

Tabla 4. Propiedades del colágeno nativo obtenido a partir de pasta de esternón de pollo después de un tratamiento con CO₂ modificado con etanol a 150 bar y 40°C. La humedad de la pasta es de 75%.

Muestra	Proporción de etanol en la mezcla disolvente	Tiempo	Consumo de CO ₂	Consumo de etanol	Velocidad despresurización	Humedad final
	(%)	(h)	(g CO ₂ / g pasta)	(g etanol / g pasta)	(bar/min)	(%)
12	3	3.5	51	1.4	NM	70
13	3	2.5	201	6.4	NM	51
14	3	5.5	351	11.9	5	15
15	10	1.0	51	5.2	NM	68
16	10	3.8	202	20.0	7	13
17	10	6.7	350	34.8	5	5

NM: no medida

Cuando se utiliza un 3% de etanol, se necesitan algo más de 350 g CO₂/g de colágeno para llegar a un producto con un 15 % de humedad. Al introducir un 10% de etanol, la cantidad de CO₂ necesaria para llegar a un 13 % humedad, es de 200 g CO₂/g pasta y para llegar a un grado de humedad del 5 %, 350 g CO₂/g pasta. Respecto de los
5 ensayos con CO₂ solo mostrados en el ejemplo 3, se consigue rebajar la presión al usar etanol como co-disolvente, y también el tiempo de operación. Ello es importante pues aumenta mucho la capacidad del proceso. A cambio hay que introducir 20 g de etanol por g de pasta.

10 **Ejemplo 7.**

Este ejemplo se refiere al equipo donde se realiza la obtención de obtención de colágeno nativo a partir de cartílago de esternón de pollo.

La Figura 4 muestra un esquema del mismo a escala piloto. El recipiente donde se carga
15 la pasta tiene una capacidad de 11 litros (R1). La línea de suministro de CO₂ utiliza un refrigerante (E1) para sub-enfriarlo evitando su cavitación antes de comprimirlo en una bomba (P1), y un cambiador de calor (E2) para ajustar su temperatura. Hay una línea de suministro en paralelo de co-disolvente. En esta escala, el CO₂ se recircula, así que después del contacto con la pasta, la presión del CO₂ se reduce en dos separadores
20 consecutivos (S1, S2) donde precipita lo que arrastra y extrae. En esta instalación concreta, en el primer separador, la presión es de 75 bar y la temperatura 35°C. En el segundo separador, las condiciones son 35 bar y 10°C. A continuación, el CO₂ se limpia de restos de impurezas en un lecho de adsorbente relleno con alúmina activada (A1) y se licua en un condensador (C1) antes de ser devuelto al proceso. El CO₂ perdido en la
25 despresurización durante la descarga del colágeno y en la recogida de los residuos precipitados en los separadores, se compensa con CO₂ fresco de un tanque de almacenamiento externo.

Los ensayos se realizan sobre lotes entre 600 g y 2 kg de pasta escurridos en un colador
30 para eliminar el exceso de agua libre (del orden del 4 %). De esta forma, la pasta tiene un contenido inicial de agua del 73 %. Para evitar la compactación del lecho de pasta y problemas de canalización se intercalan redistribuidores a varias alturas. La geometría del lecho es similar a la que se usa en los otros ejemplos, es decir de relaciones longitud a diámetro de 6 a 1 o superiores, hasta 8 a 1.

35

Primero se varía el caudal de CO₂ entre 30 y 60 kg CO₂/h/kg pasta operando a 350 bar y 40°C. Los resultados se muestran en la Figura 5. A modo comparativo se incluyen también los datos del ejemplo 3 de escala laboratorio a 16 kg CO₂/h/kg pasta. El aumento del caudal de CO₂ aumenta el rendimiento del proceso. Por ejemplo, a 60 kg
5 CO₂/h/kg pasta, hacen falta 6 h para conseguir obtener el producto de colágeno nativo con la humedad requerida <10 %. Mientras que a 30 hace falta el doble de tiempo. Hasta 22 horas haría falta a caudales de CO₂ bajos para llegar a similar resultado de pérdida de masa. Por otro lado, y en general, la máxima reducción en masa de la pasta durante el tratamiento es del orden del 70 %; es decir, el rendimiento a colágeno del proceso es
10 del 30 %. Esta pérdida de masa se corresponde con la eliminación de agua (aprox. 60%) y de otras sustancias (aprox. 10 %), incluido grasa.

En la Figura 6 se muestra el impacto de la temperatura en la velocidad del proceso medido de nuevo como la pérdida de masa de la pasta. Es mayor a 43°C que a 40°C.
15 En el ejemplo 3 de ensayos en escala laboratorio, el calentamiento del recipiente donde se aloja la pasta se hace rodeando al mismo por una camisa calefactora. En la planta piloto de la Figura 4 se calienta al CO₂ en línea antes de entrar, pero el recipiente donde se aloja la pasta solo está aislado térmicamente. Seguramente esta última forma de operar hace que la pasta de colágeno esté a una temperatura más homogénea dentro
20 del recipiente sin zonas calientes en las paredes. Es por ello, que en los ensayos de laboratorio del ejemplo 3 se observa degradación del colágeno a temperaturas superiores a 40°C, mientras que, en los ensayos piloto, no se observa degradación por operar a 43°C. La Figura 7 se muestra imágenes TEM de ambas muestras. En ambos
25 casos, las fibrillas estaban definidas, con el bandeo típico, sin signos de degradación.

Se obtiene también una ligera mejoría en la velocidad del proceso al operar a mayores presiones, como ya se detectó en el ejemplo 3 realizado a escala laboratorio. Por ejemplo, la velocidad promedio de pérdida de masa de la pasta aumenta un 10% al elevar la presión de 300 a 400 bar, operando a 40°C.

30

En todas las muestras de producto descargado del recipiente, la lectura en placas de recuento aerobio y anaerobio es nula hasta diluciones de 6 órdenes de magnitud y se mantuvo el nivel de colágeno nativo en 60 % en promedio.

REIVINDICACIONES

1. Proceso integrado para la obtención de colágeno tipo II o nativo a partir de cartílago de origen animal por contacto con CO₂ que comprende:
 - 5 - poner en contacto dicho cartílago de origen animal con CO₂ subcrítico o supercrítico en unas condiciones de presión de 50 a 500 bar, una temperatura de 20 a 100°C, un caudal de CO₂ comprendido entre 5 y 120 kg CO₂/hç/kg colágeno, durante un tiempo entre 1 y 24 h.
 - 10 - eliminar el CO₂ restante de la etapa anterior por despresurización a una velocidad menor de 20 bar/min.
 - recuperar el CO₂ eliminado y recircularlo al proceso
 - recuperar el colágeno resultante desengrasado y estéril.

- 15 2. Proceso integrado, según reivindicación 1, caracterizado porque el colágeno de origen animal utilizado como materia prima tiene una humedad del 60 - 80%.

- 20 3. Proceso integrado, según reivindicación 1, donde el colágeno animal utilizado como materia prima tiene una humedad del 60 - 80% y es deshidratado parcialmente hasta una humedad del 20 – 30 % antes de ser puesto en contacto con el CO₂.

- 25 4. Proceso integrado, según reivindicación 3, donde la deshidratación parcial se realiza por secado a temperatura moderada en secadero a vacío o en secadero intermitente.

5. Proceso integrado, según reivindicación 3, donde la deshidratación parcial se realiza por tratamiento con disolvente como acetona o etanol.

- 30 6. Proceso integrado, según reivindicación 1, donde el contacto con CO₂ se realiza en presencia de un co-disolvente.

7. Proceso integrado, según reivindicación 6, donde el co-disolvente es etanol, acetato de etilo, lactato de etilo o acetona.

- 35 8. Proceso integrado, según reivindicación 1, donde el cartílago de origen animal es cartílago de esternón de pollo.

9. Proceso integrado, según reivindicación 8, donde la materia prima se pone en contacto con CO₂ a temperatura comprendida entre 38 y 43°C y presión entre 150 y 350 bar.
- 5 10. Proceso, según reivindicación 9, donde la velocidad de despresurización del CO₂ restante es menor de 10 bar/min.
11. Equipo para la obtención de colágeno tipo II a partir de cartílago de origen animal según el proceso reivindicado que comprende:
- 10
- un recipiente para contener la materia prima a tratar
 - una línea de suministro de CO₂
 - una línea de recuperación del CO₂
 - dispositivos para el control y la lectura de la presión y la temperatura
 - elementos de seguridad
- 15
- un sistema de despresurización
 - un sistema de descarga del colágeno obtenido
 - una línea de recirculación del CO₂ recuperado.
 - un sistema de limpieza y reacondicionamiento del CO₂ a las condiciones de operación.
- 20
12. Equipo, según reivindicación 11, donde la materia prima se encuentra en el recipiente formando en un lecho fijo dotado de redistribuidores.
13. Equipo, según reivindicación 1, donde el recipiente que contiene la materia prima
- 25
- dispone de un tambor rotatorio que permite el movimiento de la materia prima.
14. Equipo, según la reivindicación 11, que comprende una línea de suministro de co-disolvente.

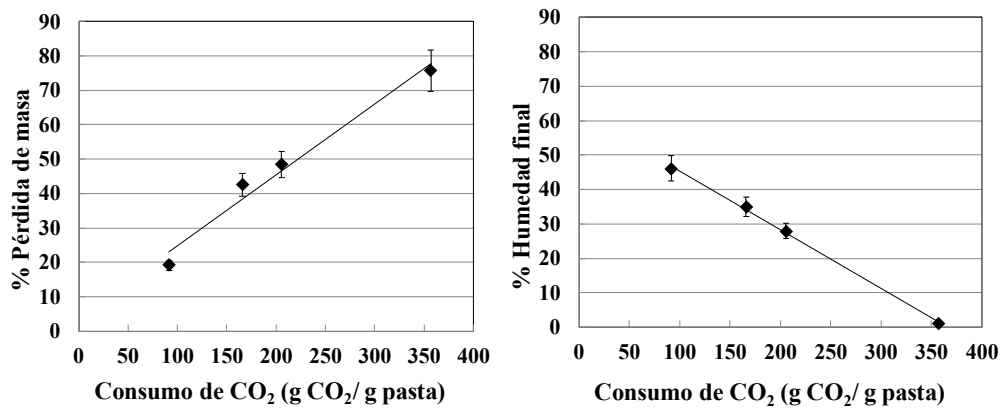


Figura 1

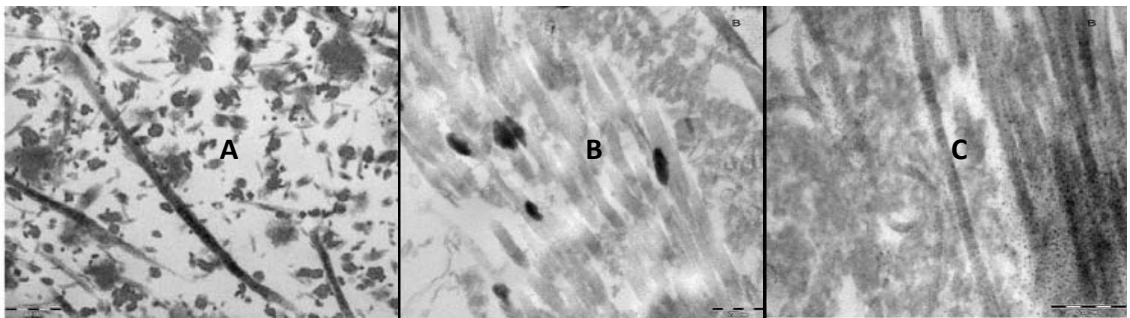


Figura 2

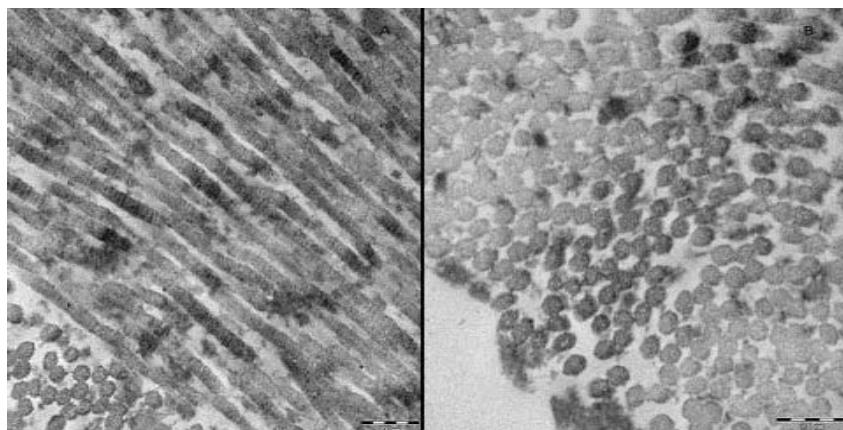


Figura 3

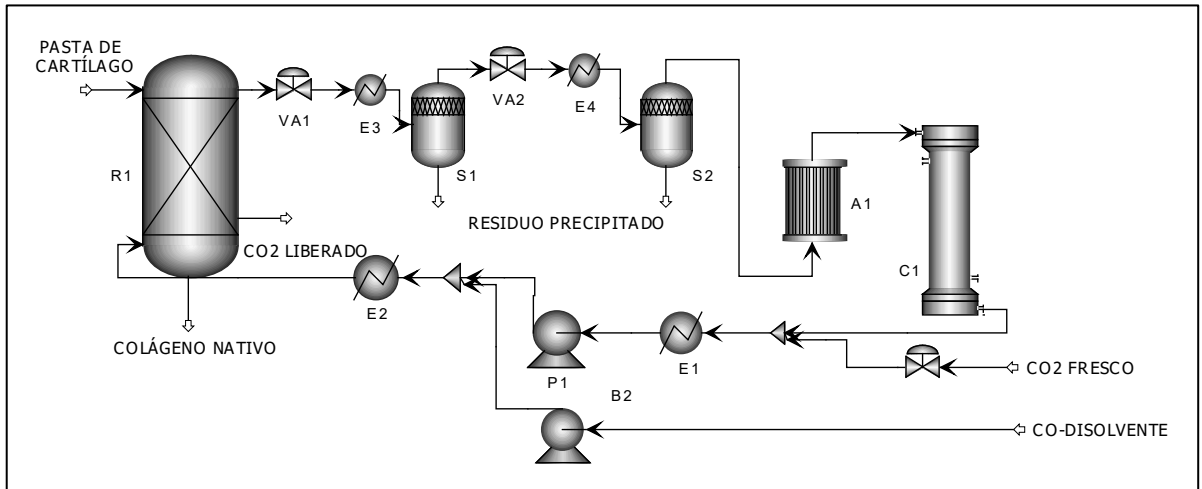


Figura 4

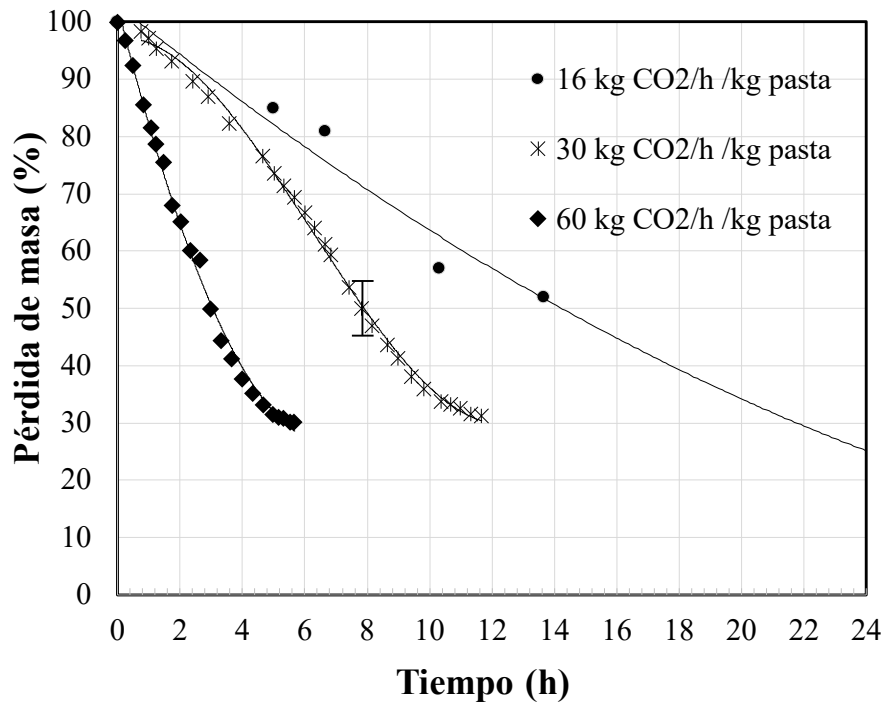


Figura 5

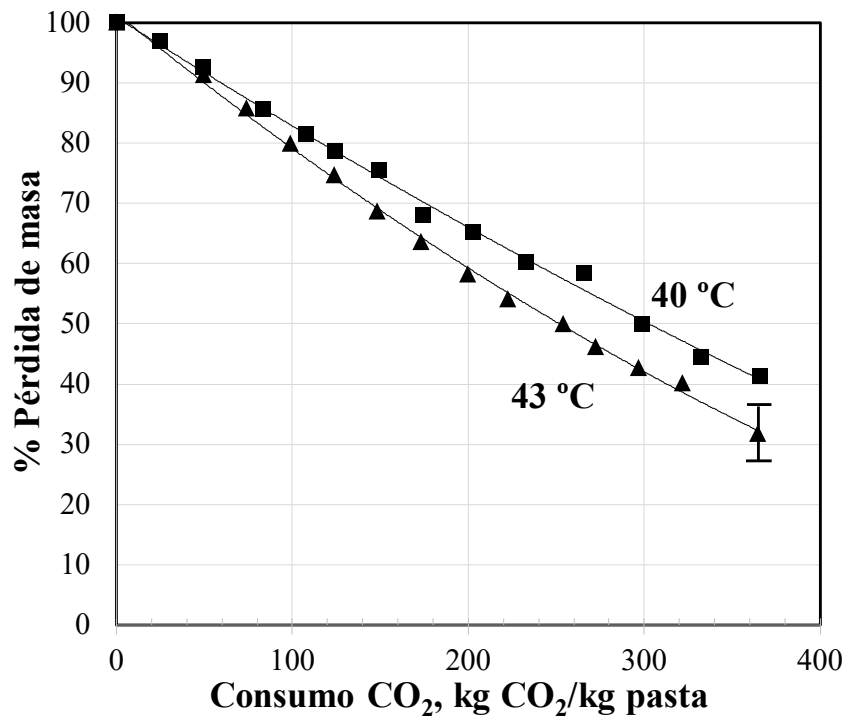


Figura 6

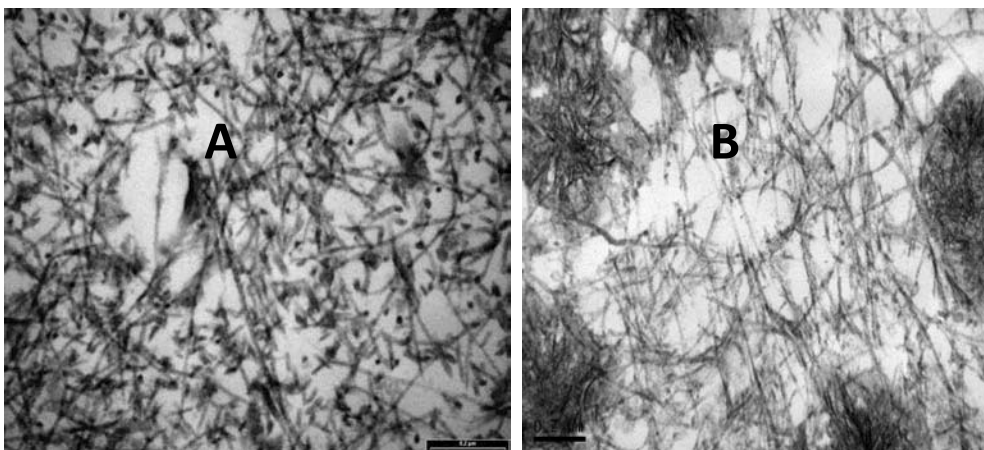


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202230606

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.07.2022

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: **C07K14/78** (2006.01)
B01D11/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20210332081 A1 (SHIN et al.) 28/10/2021, Párrafos 0030-0034, 0046, 0042-0071, 0065; figura 1, párrafos.	1-14
A	WO 2018209008 A1 (AVICENNA NUTRACEUTICALS, LLC) 15/11/2018, Página 3, línea19, 20; página 16, línea 18-página 17, línea 15.	1-14
A	CN 111793145 A (HUNAN WUXING BIOLOGICAL TECH CO LTD) 20/10/2020, Resumen.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.12.2022

Examinador
J. López Nieto

Página
1/2

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

C07K, B01D

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

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET