

Sección departamental de Ciencias de la Alimentación
Departamento de Química-Física Aplicada
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
(CIAL)

Procedimientos de obtención de lípidos portadores como sistemas de liberación de ingredientes alimentarios bioactivos

Memoria presentada por
Daniel Tenllado van der Reijden

Para optar al grado de
Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Directores
Dr. Carlos F. Torres Olivares
Dr. Guillermo J. Reglero Rada

D. Carlos F. Torres Olivares, Profesor Titular de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid.

D. Guillermo J. Reglero Rada, Catedrático de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Madrid.

INFORMAN

Que el presente trabajo titulado "Procedimientos de obtención de lípidos portadores como sistemas de liberación de ingredientes alimentarios bioactivos" y que constituye la memoria que presenta D. Daniel Tenllado Van Der Reijden para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ha sido realizado en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación UAM-CSIC bajo su dirección.

Autorizan expresamente la presentación de la Tesis Doctoral como un compendio de publicaciones.

Y para que conste firman el presente en Madrid a 14 de Enero de 2013.

Fdo. Carlos F. Torres Olivares

Fdo. Guillermo J. Reglero Rada

Índice

Página

| | |
|--|------------|
| Agradecimientos | 4 |
| 1. Introducción general | 5 |
| 1.1. Estructura de la memoria | 5 |
| 1.2. Justificación de la temática y objetivos del trabajo | 7 |
| 1.3. Aportación original del autor..... | 10 |
| 1.4. Antecedentes y estado actual del tema del trabajo | 12 |
| 1.4.1. Lípidos alimentarios..... | 12 |
| 1.4.2. Oxidación de aceites y grasas comestibles | 26 |
| 1.4.3. Modificación de aceites y grasas comestibles..... | 30 |
| 1.4.4. Análisis de aceites y grasas comestibles | 71 |
| 1.5. Bibliografía..... | 75 |
| 2. Artículos que integran la memoria | 88 |
| 2.1. Biochemical Engineering Journal 42 (2008) 105–110 | 89 |
| 2.2. Chromatographia 69 (2009) 729-734 | 95 |
| 2.3. Journal of Thermodynamics (2009) 730960 | 101 |
| 2.4. Separation and Purification Technology 83 (2011) 74–8 | 110 |
| 2.5. Biocatalysis and Biotransformation 30 (2012) 245–254 | 118 |
| 3. Resumen global de los resultados obtenidos y discusión | 128 |
| 3.1 Bibliografía..... | 141 |
| 4. Conclusiones | 145 |

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Guillermo Reglero Rada el haberme dado la oportunidad de iniciar mi carrera científica formándome profesionalmente en el Grupo de Investigación de Tecnología de los Alimentos de la UAM. Gracias por su confianza, sus consejos y por su admirable dedicación al grupo.

Quiero dar las gracias, de manera muy especial, al Dr. Carlos F. Torres Olivares por enseñarme cuanto sé, por su paciencia, su disponibilidad, su trato, buen humor y confianza.

Agradecer al resto de doctores y profesores del Área de Tecnología de los Alimentos de la UAM por su trato cercano y amable, y por dejar que aprendiera un poco de todos ellos.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la UAM: Luis, Jose Mendiola, Alberto, Gonzalo, Bea, Erica, Sergio, Elena, Alicia, Juan Antonio, Ana, David, Maria, Laila y Maika, por los momentos vividos fuera y dentro del laboratorio, por su amistad, buen humor y compañerismo.

Quiero hacer una mención muy especial a mis compañeros de Laboratorio Oscar, Víctor, Guzmán e Inés, sin los cuales esto habría sido mucho más difícil. Gracias por vuestra amistad, por los descubrimientos musicales y por hacer de cada día en el trabajo algo especial.

Gracias a mis padres, Dini y Gonzalo por apoyarme en cada momento de mi vida, por vuestro cariño, y consejo, por confiar en mí y por ser los culpables de ser quien soy.

Gracias a mis hermanos Christian, Paula y Lillo por enseñarme el valor de la amistad y la lealtad. Gracias por estar siempre ahí, por vuestro apoyo y vuestro consejo.

Quiero agradecer a todos mis amigos su amistad, cariño y buenos momentos. No pongo los nombres para no olvidarme de ninguno.

Quiero dar las gracias de manera muy especial a Luz, sin su insistencia y apoyo este proyecto habría sido imposible. Gracias por estar siempre a mi lado, por quererme tanto y hacerme tan feliz. Te quiero.

1. Introducción general

1.1. Estructura de la memoria

El procedimiento relativo al tribunal, defensa y evaluación de la tesis doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid, aprobado por en Consejo de Gobierno de 3 de febrero de 2012, permite presentar la tesis doctoral como un compendio de publicaciones. Para ello se requiere un mínimo de 3 artículos publicados o admitidos para su publicación en revistas científicas de reconocido prestigio o en libros editados de importancia justificada. La memoria del trabajo de Tesis Doctoral debe incluir una introducción general que presente los trabajos compendiados, justifique la temática y explique la aportación original del autor, así como un resumen global de los resultados obtenidos, de la discusión de éstos y de las conclusiones finales. Se ha de incluir una copia completa de los mencionados trabajos.

La memoria de la presente investigación de Tesis Doctoral responde a los requisitos anteriores y está estructurada sobre cinco artículos científicos de los trabajos realizados en torno al tema de la obtención de lípidos portadores como sistemas de liberación de ingredientes alimentarios bioactivos, que han sido publicados en revistas de difusión internacional:

Carlos F. Torres, Daniel Tenllado, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero.

A Versatile GC Method for the Analysis of Alkylglycerols and Other Neutral Lipid Classes.

Chromatographia 69 (2009) 729-734.

Carlos F. Torres, Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero.

A predictive kinetic study of lipase-catalyzed ethanolysis reactions for the optimal reutilization of the biocatalyst.

Biochemical Engineering Journal 42 (2008) 105–110.

Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Carlos Torres, Guillermo Reglero.

Supercritical Phase Equilibria Modeling of Glyceride Mixtures and Carbon Dioxide Using the Group Contribution Eo.

Journal of Thermodynamics (2009) pages: 730960 (9 pp) DOI: 10.1155/2011/730960.

Daniel Tenllado, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres.

A combined procedure of supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil.

Separation and Purification Technology 83 (2011) 74–8.

Óscar Fernández, Daniel Tenllado, Diana Martín, Rosa M. Blanco, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres.

Immobilized lipases from *Candida antarctica* for producing tyrosyl oleate in solvent-free medium.

Biocatalysis and Biotransformation 30 (2012) 245–254.

1.2. Justificación de la temática y objetivos del trabajo

Los sistemas naturales o artificiales portadores de compuestos bioactivos sirven para potenciar la liberación eficaz de tales compuestos, proporcionando una vía de optimizar el grado y velocidad de absorción de dichos compuestos por el organismo. El uso de esta estrategia ha sido principalmente desarrollado para la liberación de principios activos en el campo farmacéutico.

Los sistemas de administración pueden tener un beneficio considerable mediante la protección de los nutrientes esenciales y otros componentes bioactivos de los alimentos durante la digestión. Así se puede evitar la pérdida del componente o interacciones adversas con sustancias inhibitoras de la absorción.

Los lípidos son productos idóneos como sistemas de liberación cuando actúan como portadores de compuestos de carácter hidrófilo ya que mejoran el transporte de importantes moléculas bioactivas a los diferentes tejidos, así como su biodisponibilidad.

La producción de sistemas lipídicos de liberación de ingredientes alimentarios bioactivos está relacionada con la tecnología de lípidos estructurados, es decir lípidos modificados a partir de su estado natural por medios químicos y/o enzimáticos. La formación de sistemas lipídicos portadores conduce a la "lipofilización" de compuestos bioactivos hidrófilos, mejorando el equilibrio hidrófilo/lipófilo de tales moléculas, lo cual facilita su incorporación a matrices alimentarias lipídicas y además incrementa su biodisponibilidad. Ello permite, por ejemplo, aumentar la cantidad de potentes antioxidantes bioactivos cuyo uso en alimentos está muchas veces limitado por falta de solubilidad en las matrices.

Además de conducir las moléculas bioactivas primarias a un sitio específico de un órgano o de un tejido, los lípidos portadores pueden ser por sí mismos compuestos biológicamente activos y se pueden dar acciones sinérgicas con actividad adicional.

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral es contribuir al avance de las tecnologías de obtención de lípidos portadores de ingredientes alimentarios bioactivos como sistemas de liberación de principios activos para mejorar su incorporación a matrices alimentarias, su biodisponibilidad y su actividad biológica. En este sentido, aborda aspectos clave como son los siguientes:

- Las reacciones con enzimas inmovilizadas.
- El fraccionamiento de las mezclas de reacción y purificación de los compuestos obtenidos.
- El análisis de los productos generados en las reacciones.
- La aplicación de las tecnologías estudiadas para comunicar carácter lipófilo a un antioxidante hidrófilo.

Concretamente, el presente trabajo de investigación consiste en los siguientes estudios:

1. Desarrollo de un método rápido para el análisis simultáneo de múltiples clases de lípidos de fuentes diferentes. El objetivo de este trabajo es mejorar y fortalecer la metodología de análisis de muestras lipídicas para disponer de una herramienta analítica eficiente y versátil para el seguimiento de las reacciones de transformación de lípidos orientadas a la obtención de portadores de compuestos bioactivos.

2. Modelización cinética experimental de la reacción enzimática de etanolisis de aceites vegetales con vistas a la reutilización óptima de la enzima empleada, en este caso la lipasa inmovilizada de *Pseudomonas cepacia*. La metodología desarrollada se basa en la utilización del concepto de *pseudo tiempo de reacción* que indica cuánto tiempo sería necesario si la enzima no hubiese sido parcialmente desactivada. El objetivo ha sido disponer un modelo cinético aplicable a reacciones enzimáticas para elucidar expresiones de velocidad de reacción y de la desactivación de la enzima, evaluando el potencial de reutilización de la enzima inmovilizada.

3. Desarrollo de un modelo del comportamiento de los equilibrios de fases en un sistema plurifásico a alta presión de glicéridos en dióxido de carbono supercrítico. El objetivo de este trabajo fue disponer de un modelo predictivo para optimizar, mediante tecnología de fluidos supercríticos, la separación de las mezclas de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos que se producen en las reacciones de alcoholisis enzimática para poder disponer con suficiente pureza de la molécula de partida para la síntesis de lípidos estructurados.

4. Estudio de tecnologías avanzadas de fraccionamiento y purificación, como la extracción con fluidos supercríticos y la destilación molecular, en mezclas de lípidos resultantes de

reacciones enzimáticas. El objetivo de este trabajo fue conocer el comportamiento de tecnologías de efecto análogo en la separación de mezclas lipídicas con el fin de elegir la opción más conveniente para determinados procesos de obtención de lípidos funcionales.

5. Aplicación de las tecnologías y metodologías estudiadas a la obtención de un producto funcional compuesto por un lípido portador y un antioxidante alimentario. El objetivo concreto de este trabajo era conseguir la esterificación de tirosol y ácido oleico, productos procedentes del aceite de oliva, bajo diferentes condiciones de reacción, para evaluar dichas condiciones y obtener un antioxidante de alta actividad, familiar en el ámbito alimentario como es el tirosol, comunicándole un carácter lipófilo que de manera natural no posee con la consiguiente limitación de solubilidad en el aceite de oliva.

1.3 Aportación original del autor

Trabajo 1.

Carlos F. Torres, Daniel Tenllado, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero. A Versatile GC Method for the Analysis of Alkylglycerols and Other Neutral Lipid Classes. Chromatographia 69 (2009) 729-734.

El doctorando participó en la planificación del estudio, realizando el trabajo experimental de laboratorio en cuanto a la adaptación del equipo, obtención, preparación y análisis de las muestras, interviniendo en el análisis estadístico de los resultados. Participó también en la valoración y discusión de los resultados, así como en la obtención de las conclusiones y la preparación del manuscrito del artículo.

Trabajo 2.

Carlos F. Torres, Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero. A predictive kinetic study of lipase-catalyzed ethanolysis reactions for the optimal reutilization of the biocatalyst. Biochemical Engineering Journal 42 (2008) 105–110.

El doctorando participó con sus directores y el resto de autores en la planificación del trabajo y realizó los experimentos de selección de la enzima adecuada a los objetivos planteados. Participó también en la inmovilización de la enzima y llevó a cabo las reacciones enzimáticas tomando muestras a distintos tiempos y analizando estas muestras para obtener los datos necesarios para determinar la cinética de la reacción. Participó en la valoración y discusión de los resultados, así como en la obtención de las conclusiones y la preparación del manuscrito del artículo.

Trabajo 3.

Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Carlos Torres, Guillermo Reglero. Supercritical Phase Equilibria Modeling of Glyceride Mixtures and Carbon Dioxide Using the Group Contribution Eo. Journal of Thermodynamics (2009) pages: 730960 (9 pp) DOI: 10.1155/2011/730960.

El doctorando colaboró en este trabajo participando en la planificación del trabajo con sus directores y asistiendo a la formulación del modelo predictivo por la otra autora del artículo.

Realizó la toma de muestras a distintos tiempos y el análisis de las mismas para obtener los datos necesarios para validar el modelo. Participó en la valoración y discusión de los resultados, así como la obtención de las conclusiones y la preparación del manuscrito de la publicación.

Trabajo 4.

Daniel Tenllado, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres. A combined procedure of supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil. Separation and Purification Technology 83 (2011) 74–8.

El doctorando participó en la planificación de los experimentos con sus directores y llevó a cabo la adaptación de las plantas de extracción con fluidos supercríticos y destilación molecular para los propósitos del trabajo. Llevó a cabo también el los experimentos de extracción con fluidos supercríticos y destilación molecular, realizando la preparación y el análisis de las muestras. Realizó con sus directores la valoración y discusión de los resultados, así como la obtención de las conclusiones. Tuvo una participación destacada en la redacción del manuscrito del artículo.

Trabajo 5.

*Óscar Fernández, Daniel Tenllado, Diana Martín, Rosa M. Blanco, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres. Immobilized lipases from *Candida antarctica* for producing tyrosyl oleate in solvent-free medium. Biocatalysis and Biotransformation 30 (2012) 245–254.*

El doctorando participó con sus directores y el resto de autores en la planificación del trabajo y en el diseño de las reacciones enzimáticas. Llevó a cabo dichas reacciones y el estudio cinético de las mismas mediante la toma de muestras a distintos tiempos y su análisis mediante HPLC y cromatografía de gases. Participó en la valoración y discusión de los resultados, así como en la obtención de las conclusiones y la preparación del manuscrito del artículo.

1.4. Estado actual del tema del trabajo

1.4.1. Lípidos alimentarios

La grasa es un nutriente esencial e imprescindible para la vida; sin embargo, para muchas personas tiene connotaciones negativas para la salud. Por este motivo, las grasas de la dieta han recibido más atención por parte de los profesionales de la salud y del público en general que cualquier otro nutriente. Durante muchos años, la mayoría de las informaciones que llegaban a los hogares resaltaban los aspectos negativos de los lípidos alimentarios; sin embargo, tras muchos años de investigaciones se ha llegado a la conclusión de que las grasas no sólo son necesarias, sino que tomadas en su justa medida, y dependiendo del tipo que sean, pueden ser saludables. Debido a esta sensibilización de la población, las investigaciones sobre el papel de la grasa dietética en la nutrición humana pueden tener consecuencias importantes para los consumidores, los responsables sanitarios e incluso para la industria alimentaria. Sus resultados podrían influir profundamente en la educación nutricional y en el consumo de diversos alimentos, y así modular el estado de salud de las distintas poblaciones. Por otro lado, también podrían tener consecuencias a nivel de la industria alimentaria, sobre la producción agrícola y sobre las tecnologías de preparación de los alimentos.

En las últimas décadas se ha determinado que lo más importante no es sólo la cantidad de grasa ingerida, sino que, dependiendo de la calidad de ésta, los efectos en el organismo pueden variar. Así, los diferentes ácidos grasos pueden ser precursores de distintas moléculas fundamentales cuya actividad puede ser más o menos intensa en el organismo. Lo importante es buscar el equilibrio de los componentes grasos ingeridos sin renunciar a ningún tipo de alimento, para asegurarse niveles adecuados de todos los nutrientes necesarios. Todos los estudios han destacado la necesidad de ingerir una dieta con un perfil lipídico adecuado para que el organismo pueda enfrentarse a distintas situaciones a lo largo de su vida.

La dieta mediterránea es rica en alimentos de origen vegetal, y se caracteriza fundamentalmente por el uso de aceite de oliva como principal fuente grasa, además de un elevado consumo de alimentos de origen marino que garantizan una ingesta de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, también denominados omega 3 (ω -3). Esta representa lo que actualmente se considera una dieta equilibrada y sana, que sirve de referencia para los nutricionistas.

Los lípidos funcionales

Por definición, los lípidos son biomoléculas orgánicas formadas básicamente por carbono e hidrógeno, y oxígeno en porcentajes mucho más bajos; también pueden contener fósforo, nitrógeno y azufre. Todos comparten una propiedad físico-química común: se caracterizan por su insolubilidad en agua y por su solubilidad en disolventes orgánicos. Los lípidos de la dieta constituyen uno de los principios inmediatos más importantes de nuestra alimentación, con varias funciones vitales que los convierten en nutrientes fundamentales para el buen funcionamiento del organismo. Está claro que ejercen una función doble en la fisiología del organismo, como fuente de energía y como reguladores de la función celular, afectando a múltiples acciones fisiológicas en las que están implicados algunos mediadores de señales inter e intracelulares, como hormonas, eicosanoides y ciertos factores de transcripción

Las grasas (sólidas) y los aceites (líquidos), compuestos fundamentalmente por triglicéridos, son los compuestos más abundantes. Junto a ellos se encuentran pequeñas cantidades de esteroides, fosfolípidos y otros compuestos minoritarios tales como vitaminas liposolubles, compuestos fenólicos, etc. Bajo el punto de vista dietético, el concepto de lípidos se asimila al de grasa. Así, las grasas alimenticias incluyen todos los lípidos de los tejidos vegetales y animales que se ingieren como alimentos.

En las primeras etapas de desarrollo, la ingesta de cantidades adecuadas de ácidos grasos esenciales, así como de ácido docosahexaenoico (DHA), presente en cantidades relativamente elevadas en la leche materna, así como en el pescado, permite la correcta formación del sistema nervioso, concretamente del cerebro y la retina, por lo que es importante destacar la necesidad de que las madres ingieran cantidades adecuadas de pescado durante los periodos de gestación y lactancia del niño.

Muchas de las enfermedades más frecuentes en la actualidad, como las cardiovasculares, la artritis reumatoide, enfermedades intestinales o pulmonares, cursan con procesos inflamatorios crónicos que pueden ser modulados en función de los lípidos de la dieta. Así, las grasas poliinsaturadas de la serie n-3, procedentes del pescado que pasan a formar parte de las membranas, son precursoras de citoquinas y eicosanoides menos proinflamatorios que los sintetizados a partir de ácidos grasos de la serie n-6 (ω -6), procedentes de alimentos vegetales como el girasol y el maíz.

A las grasas monoinsaturadas procedentes del aceite de oliva se atribuyen efectos beneficiosos de sobre el sistema cardiovascular, ya que son capaces de disminuir el LDL-colesterol y aumentar el HDL-colesterol. Por otro lado, las grasas poliinsaturadas de la serie n-3 son capaces de disminuir las concentraciones plasmáticas de triglicéridos (TAG) [1] y controlar otros factores como la expresión de moléculas inductoras de los procesos aterogénicos.

Los lípidos como sistemas de administración de sustancias bioactivas

Numerosas moléculas bioactivas aparecen continuamente en la literatura científica reclamando su uso potencial como ingredientes funcionales o nutraceuticos, incluyen compuestos de diverso origen y naturaleza, tales como ácidos fenólicos, esteroides, ácidos grasos o vitaminas [2-6]. Sin embargo muchas de estas moléculas bioactivas tienen como limitación su mala solubilidad en agua, esto hace difícil su manipulación e inclusión en determinados alimentos. Además esta limitación puede disminuir la funcionalidad de estas moléculas, ya que se limita la solubilización luminal y la disolución en el tracto gastrointestinal, eventos necesarios para su biodisponibilidad [7-11]. Por otro lado, diversos ingredientes funcionales han demostrado interesantes propiedades antioxidantes, tanto desde el punto de vista biológico como tecnológico, lo que ofrece una atractiva ventaja para su uso como antioxidantes naturales en alimentos funcionales [2, 4, 8, 12], sin embargo la baja solubilidad en agua de los diversos ingredientes bioactivos, afecta y dificulta su aplicación tecnológica en diversos alimentos.

Los sistemas, naturales o artificiales, de administración oral para la introducción eficiente de un principio activo, pueden ser un medio para optimizar la aplicación de moléculas bioactivas. Esta estrategia es intensamente si se utiliza en el ámbito farmacéutico para el desarrollo de moléculas bioactivas o drogas [11, 13-14]. Se han estudiado diversas estrategias para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos, tales como el uso de tensioactivos, lípidos, emulsiones lipídicas, potenciadores de la penetración celular, micronización, formulación de sales, nanopartículas o dispersiones sólidas [11]. En el caso específico de los sistemas de administración de fármacos como lípidos, se incluyen los triglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos, esteroides y otros derivados sintéticos [15]. Dentro de este último término de derivados lipídicos, los lípidos estructurados pueden ser incluidos. Los lípidos estructurados son acilgliceroides, glicerofosfolípidos u otras moléculas lipídicas que han sido modificadas desde su estado natural por métodos químicos y/o enzimáticos [16]. Dichas modificaciones incluyen la incorporación de nuevos ácidos grasos y otras moléculas, así como la reestructuración de los

lípidos para cambiar las posiciones de los ácidos grasos que los componen con el fin de producir nuevos lípidos.

En la literatura farmacológica se pueden encontrar algunos ejemplos de lípidos estructurados usados como sistemas de administración de fármacos, como el neurotransmisor GABA unido a glicéridos con el fin de promover su difusión a través de la barrera hematoencefálica [17] o el L-Dopa unido a diglicéridos [18] para producir una relación más favorable de L-Dopa/dopamina en plasma y cerebro. También se han preparado pro-fármacos de ácido nicotínico unidos como ésteres a diglicéridos [19], dando lugar a una disminución significativa de los niveles de AG libre en plasma de ratas, sin que se produzca un aumento dramático en los niveles de ácido nicotínico. Marriot y colaboradores [20] patentaron un producto con los mismos efectos terapéuticos que el ácido valproico que no causaba irritación gástrica gracias a la esterificación de glicéridos con ácido valproico.

En el campo de la tecnología de alimentos, la producción de lípidos estructurados se ha orientado a desarrollar lípidos mejorados para su uso tradicional final como ingredientes tecnológicos o con objetivos nutricionales, tales como modificaciones de las propiedades de fusión o cristalización de aceites y grasas, o para su aplicación en productos bajos en calorías [21]. Tomando el avanzado estado del arte de la tecnología de lípidos estructurados [16], la extensión de su uso como ingredientes alimentarios, siendo sistemas lipídicos de administración de moléculas bioactivas, puede tener un beneficio considerable. Al igual que en los sistemas de administración de fármacos lipídicos, los sistemas lipídicos de administración de ingredientes bioactivos permiten la lipofilización ("lipophilization") de las moléculas con escasa solubilidad lipídica, para su aplicación en distintas matrices alimentarias, además los sistemas de administración lipídicos pueden proteger a los nutrientes esenciales y otros componentes bioactivos de los alimentos durante la digestión. Por lo tanto estos sistemas pueden evitar la pérdida del componente bioactivo o evitar interacciones adversas con los inhibidores de la absorción. Además, los sistemas lipídicos de administración podrían transportar importantes moléculas funcionales a diferentes tejidos y mejorar la biodisponibilidad oral de compuestos poco solubles en agua. Por otro lado, los sistemas lipídicos de administración tienen un aspecto adicional de interés, ya que el soporte utilizado como vehículo del compuesto bioactivo puede ser otro compuesto biológicamente activo. De esta manera los sistemas lipídicos de administración pueden aportar una acción sinérgica, la actividad biológica adicional (compuesto

bioactivo y vehículo) y la ayuda para llevar las moléculas bioactivas a un sitio específico (órganos o células).

El metabolismo de ácidos grasos y eicosanoides

Muchas enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la artritis, la colitis ulcerosa, el asma, etc. están asociadas a un consumo desequilibrado o a un metabolismo alterado de determinados AG, que son precursores de unas sustancias conocidas como eicosanoides.

Los eicosanoides o icosanoides son un grupo de moléculas de carácter lipídico originadas por la oxigenación de los ácidos grasos esenciales de 20 carbonos tipo ω -3 y ω -6. Cumplen amplias funciones como mediadores para el sistema nervioso central e intervienen en los eventos de inflamación y respuesta inmune, tanto en vertebrados como en invertebrados. Todos los eicosanoides son moléculas de 20 átomos de carbono y están agrupados en prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, y ciertos hidroxiácidos precursores de los leucotrienos. Estas moléculas están involucradas en las redes de comunicación celular más complejas del organismo animal, incluyendo el ser humano.

Tanto el EPA como el ácido araquidónico son precursores de eicosanoides. El EPA y el ácido araquidónico son sustratos de las mismas enzimas y por tanto compiten entre sí por el centro activo. Los eicosanoides que se derivan de estos dos ácidos grasos son distintos y tienen funciones fisiológicas antagónicas. Por ejemplo, los que provienen del ácido araquidónico tienen una función protrombótica y proinflamatoria, mientras que los que provienen del EPA tienen el efecto opuesto. Por tanto, para que los procesos fisiológicos se desarrollen correctamente, la relación entre EPA y ácido araquidónico debe estar controlada, regulando de esta manera el balance de eicosanoides. El consumo de ciertos alimentos o suplementos de AGs puede regular este metabolismo, controlar la formación de ácido araquidónico y cambiar la producción de eicosanoides, para prevenir desequilibrios y ayudar al control de diversas enfermedades.

La regulación de la fluidez de las membranas

El DHA se encuentra en altas concentraciones en diversas membranas celulares del cuerpo humano, como las de las células de los bastones de la retina en el ojo o en la materia gris [22]. Muchos de los beneficios de los PUFAs ω -3 han sido relacionados con cambios en las

membranas celulares [22] ya que la incorporación de DHA aumenta la permeabilidad de las mismas. Los PUFAs ω -3 tienen mucha facilidad para incorporarse a las membranas celulares donde afectan a la fluidez de los fosfolípidos, al empaquetado molecular y a la actividad de las enzimas ancladas a la membrana.

Se ha relacionado el efecto del DHA con una correcta función de la actividad visual, ya que el DHA se encuentra en muy elevada concentración (30-40% del total de los AGs) en la membrana de las células fotorreceptoras (bastones). Una suplementación de DHA en la infancia produce un mejor desarrollo de la visión [23].

La regulación de la función cerebral

El DHA es esencial para el desarrollo cerebral en niños [24] y para un funcionamiento normal de la función cerebral en adultos. Una insuficiencia en DHA se asocia a un declive en la función cognoscitiva con la edad y a un mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer [25]. Los pacientes con Alzheimer tienen bajos niveles de DHA en suero sanguíneo y cerebro. El β -amiloide (péptido de 39 a 43 aminoácidos) es el principal componente de las placas seniles en el tejido cerebral y una de las moléculas moduladoras de la enfermedad de Alzheimer. Actualmente, se cree que esta molécula es la gran responsable de la cascada de eventos que desencadena la enfermedad [26]. El DHA aumenta 10 veces la transcripción de la enzima que reduce la producción de β -amiloide, disminuyendo su acumulación y potencial toxicidad [27-28].

Por otro lado existen evidencias de que periodos que conllevan deficiencia en DHA, como alcoholismo o periodos postparto, están asociados a cuadros de depresión. Por tanto, una insuficiencia en DHA puede estar relacionada con fenómenos de depresión en adultos [29-30].

Ésteres de ácidos y alcoholes grasos como sistemas de administración de ingredientes bioactivos

Los ácidos fenólicos son compuestos naturales que se encuentran en frutas, verduras, especias y hierbas aromáticas. Este grupo heterogéneo incluye fenoles simples y polifenoles, así como sus derivados. Además de sus propiedades antimicrobianas, anticancerígenas y anti-mutagénicas en sistemas biológicos, la mayoría de los ácidos fenólicos son conocidos por ser potentes antioxidantes [2, 4]. El uso potencial de los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales en los alimentos procesados es de interés actual. Sin embargo, la baja solubilidad de

los compuestos fenólicos en medios hidrófobos es un factor clave que limita su aplicación y biodisponibilidad [31-32]. La lipofilización ("Lipophilization") de ácidos fenólicos, que consiste en la esterificación de los estos con una parte lipófila, dando lugar a nuevas moléculas con un equilibrio hidrófilo/lipófilo modificado. Mediante esta esterificación se pueden utilizar las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos en matrices lipídicas [7].

Como ejemplo de lipofilización del popular ácido ferúlico, Chigorimbo-Murefu y colaboradores [33] lograron la síntesis de ésteres de ácido ferúlico mediante la transesterificación de ferulato de vinilo con hidroxi-esteroides catalizada por lipasas. Los derivados lipídicos obtenidos mostraron mayor actividad anti-radical contra el radical libre ABTS, inhibición más eficiente de la oxidación de las LDL, y mostraron mayor actividad antioxidante que el Trolox y el que el propio ácido ferúlico.

Aunque la biodisponibilidad del hidroxitirosol no es un problema, recientemente se ha demostrado que los ésteres sintéticos derivados de este fenol fueron transportados a través de monocapas diferenciadas de células Caco-2 de manera más eficiente que el hidroxitirosol sin esterificar, lo que significa mejor absorción intestinal de los derivados lipófilos del hidroxitirosol [34]. Otra de las razones del interés en la producción de derivados lipídicos de hidroxitirosol es la mejora de su uso como antioxidante en alimentos. Por todo esto, se están estudiando los derivados de hidroxitirosol con mejor equilibrio hidrófilo/lipófilo, para su posible uso como antioxidantes en alimentos, al mismo tiempo que se aumenta la biodisponibilidad del hidroxitirosol. La metodología más común para convertir el hidroxitirosol en una molécula más lipófila es la esterificación del alcohol primario sin afectar la fracción catecol, que es esencial para los efectos del antioxidantes [8]. Más de 40 análogos lipófilos del hidroxitirosol han sido descritos usando para su síntesis la lipasa de *Candida antarctica* [35]. En algunos casos, los análogos del hidroxitirosol obtenidos fueron incluso más eficaces que el tocoferol o el BHT. Algunos de los análogos lipófilos del hidroxitirosol también han demostrado efecto protector contra el daño oxidativo en células humanas y en particular, hacia el daño sobre el ADN inducido por H₂O₂ [8].

Los flavonoides son el grupo más común entre los compuestos polifenólicos de la dieta humana y se encuentran en gran cantidad en las plantas. Los efectos beneficiosos para la salud producidos por frutas, verduras, té y vino tinto, en ocasiones se han atribuido a los compuestos flavonoides que contienen. Sin embargo el uso de los flavonoides se ve limitado por su baja

estabilidad y solubilidad [9]. La esterificación de ácidos grasos con isoflavonas en los diferentes grupos hidroxilo, otorga a las isoflavonas la lipofilia necesaria para su incorporación en LDL, incrementando así la resistencia a la oxidación de las LDL [36]. La esterificación de los flavonoides con ácidos grasos insaturados también se ha ensayado [37], mostrando evidencias de menor liberación del factor de crecimiento endotelial vascular e indicando que podrían tener mejores propiedades anti-angiogénicas y anti-tumorales. La acilación enzimática de compuestos flavonoides con etil laurato y butirato de etilo, aumentó la capacidad de inhibir la xantina oxidasa y su actividad antiproliferativa, pero disminuyó la actividad de captación de radicales libres [38]. Otros estudios han demostrado que la introducción de un grupo acilo en flavonoides glucosilados mejora significativamente su actividad antioxidante de las LDL [39]. Además el derivado acilado de disacáridos flavonoides aumentó su actividad antimicrobiana contra dos bacterias Gram-positivas [39].

El ácido rosmarínico es un ácido polifenólico que participa en la prevención de la oxidación de LDL y la inhibición de la actividad de proliferación celular, además de tener actividades antibacterianas, antivirales y antioxidantes [40]. La producción de lípidos estructurados con ácido rosmarínico es escasa, pero las pruebas sobre su bioactividad son prometedoras. Los ésteres de ácido rosmarínico formados por procedimientos químicos, mostraron mayor actividad frente a radicales libres que el ácido rosmarínico [41].

Al igual que la mayoría de los fenoles, el ácido cafeico y sus derivados son conocidos por sus propiedades antioxidantes. Se han preparado y testado derivados lipídicos de ésteres de propilo y metilo del ácido cafeico [42].

Los glicéridos como sistemas de administración de compuestos bioactivos

Los triglicéridos son la forma tradicionalmente utilizada para producir lípidos estructurados [16, 43]. El desarrollo actual de la tecnología de estructuración de lípidos permite la producción de TAG sintéticos por el intercambio o la combinación de cualquier ácido graso de cadena corta, media o larga (AGCC, AGCM y AGCL, respectivamente) de interés bioactivo. El ejemplo más representativo y conocido son los TAG sintéticos compuestos por AGCC o AGCM en posiciones sn-1 y sn-3, junto con AGCL (principalmente PUFAs) o ácidos grasos bioactivos de interés en posición sn-2. Este lípido sintético se metaboliza dejando disponible una fuente de energía rápida, debido a los AGCC o AGCM, así como ácidos grasos esenciales o de interés presentes

en la misma molécula. Esto se debe a que los ácidos grasos situados en posición sn-2 son absorbidos preferentemente para entrar en el sistema linfático, mientras que los AGCC y AGCM ubicados en las posiciones sn-1 y sn-3 son absorbidos y transportados hasta el hígado para proporcionar una importante fuente de energía sin ser depositados en el tejido adiposo [21]. Por lo tanto, es fácil pensar que la vinculación de los ácidos grasos funcionales o bioactivos a la posición sn-2 del TAG es de interés en el desarrollo de sistemas de administración oral de ácidos grasos bioactivos.

Como ejemplos, Maurelli y colaboradores [44] sintetizaron TAG por medio de una reacción enzimática entre 1,3-DAG y los isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) en posición sn-2. Muñío y otros [45] produjeron TAG con estructura caprílico-PUFA-caprílico. Del mismo modo, Haraldsson y colaboradores [46] obtuvieron un lípido estructurado tanto con DHA como con EPA en posición sn-2, utilizando un proceso quimio-enzimático.

Estos ejemplos ilustran algunas de las posibilidades de los TAG como sistemas de administración de ácidos grasos bioactivos. La estructuración de TAG ha sido intensamente estudiada desde hace décadas, produciendo gran cantidad de trabajos de investigación y revisiones [16, 21, 43, 47-49]. En cambio, el potencial de los TAG estructurados como sistemas de administración lipídicos de otras moléculas bioactivas diferentes a los ácidos grasos, tales como los ácidos fenólicos o vitaminas, es un campo reciente y se considera interesante en el mundo de los lípidos ofrecer vehículos para ingredientes funcionales.

Algunos intentos de hacer lipófilos los ácidos fenólicos han sido interpretados como la formación de complejos con liposomas, nanopartículas, niosomas o la estructuración con ácidos grasos [50]. En el caso específico de la estructuración de TAG, Reddy y colaboradores [51] describieron la síntesis químico-enzimática de un TAG estructurado con ácido ferúlico en posiciones sn-1 y sn-3. El ácido ferúlico es un ácido fenólico de interés por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, ha sido señalado como potencial agente terapéutico en el tratamiento de radicales libres relacionados con diversos síndromes, tales como trastornos neurodegenerativos, cáncer, enfermedades cardiovasculares y de la piel [50]. Reddy y colaboradores [51] mostraron una mejoría en la actividad antioxidante de los lípidos fenólicos estructurados sintetizados con ácido ferúlico en comparación con el ácido ferúlico.

Xin y colaboradores [52] investigaron la transesterificación catalizada por lipasa de ferulato de etilo con trioleína para formar ferulil-oleínas, mientras que Sun y colaboradores [53] estudiaron la esterificación enzimática de glicerilferulato y ácido oleico para la síntesis de DAG con ferúlico. Del mismo modo, Zheng y colaboradores [54] describieron un método de síntesis enzimática para la preparación de glicéridos estructurados con ferúlico a través de la transesterificación de ferulato de etilo y tributirina. Estos autores pensaron que la estructuración de la tributirina con ácido ferúlico podría producir un nuevo lípido bifuncional con ferúlico, ya que la fracción del ácido ferúlico funciona como un antioxidante natural, mientras que la fracción de ácido butírico, considerado de forma tradicional un AGCC bioactivo, aportaría propiedades anti-inflamatorias y anticancerígenas [55]. Sin embargo, la posible aplicación de butirato como agente antitumoral más allá del colon se ve limitado por el problema de alcanzar concentraciones plasmáticas suficientes para ejercer sus acciones antiproliferativas, además se metaboliza rápidamente, mostrando una vida media corta [56].

Utilizando otros compuestos fenólicos, Karboune y colaboradores [57] sintetizaron lípidos fenólicos estructurados por acidólisis enzimática de aceite de linaza con derivados hidroxilados y/o metoxilados de ácidos cinámico, fenilacético y benzoico. Sabally y colaboradores [58] describieron la producción de MAG y DAG fenólicos por transesterificación enzimática del ácido dihidrocafeico con aceite de linaza.

Éteres lipídicos o alquilgliceroles.

Los éteres lipídicos no polares del tipo 1-O-alkil-2,3-diacil-sn-glicerol o alquilgliceroles (también llamados frecuentemente alcoxilgliceroles), son un grupo de gliceroles con al menos un enlace de tipo éter. En su estructura, una molécula de glicerina se une a una cadena alquílica mediante un enlace éter a través de uno de sus grupos hidroxilo. Los alquilgliceroles pueden contener distintos ácidos grasos en su estructura al esterificar los grupos hidroxilo restantes de la molécula de glicerina. Los tres alcoholes grasos principales en la fracción 1-O-alkil de los alquilgliceroles son C16:0, C18:0 y C18:1, dando lugar a sus correspondientes alquilgliceroles, denominados 1-O-hexadecilglicerol o “chimyl alcohol”, 1-O-octadecilglicerol o “batyl alcohol” y 1-O-octadec-9-enil glicerol o “selachyl alcohol”, respectivamente.

Los alquilgliceroles son derivados lipídicos presentes en todos los tejidos, sobre todo en aquellos que son portadores de células inmunitarias como el hígado, el bazo, la médula ósea, los

glóbulos rojos y los ganglios linfáticos, además forman parte de los lípidos plasmáticos y la leche materna [59] (contiene 10 veces más que la de vaca). La mayor parte de los alquilgliceroles es sintetizada por el organismo y sólo una fracción reducida es aportada por la alimentación. En caso de stress o de insuficiencia de la función inmunitaria, las cantidades sintetizadas por vía interna son insuficientes por lo que el aporte oral es recomendable.

Estos compuestos son el constituyente mayoritario del aceite de hígado de diversas especies de tiburones y otras especies de peces elasmobranquios [60]. El aceite de hígado de tiburón ha sido utilizado durante más de 40 años como agente terapéutico y preventivo de ciertas enfermedades, siendo los alquilgliceroles sus principales ingredientes activos.

Después de su absorción, una gran parte de los alquilgliceroles son divididos en ácidos grasos a nivel del enlace del éter. El resto es incorporado en las membranas celulares para las que son una pieza esencial de estabilidad (función protectora de las membranas contra los radicales libres y función cicatrizante en queratinocitos o cualquier célula epitelial).

Los éteres lipídicos o alquilgliceroles han sido objeto de mucha atención debido a sus especiales propiedades fisiológicas en humanos. Estudios realizados en los últimos años han mostrado que los alquilgliceroles son multifuncionales [61].

Los 1-O-alkil-sn-gliceroles tienen una estructura similar a factores de activación plaquetaria que manifiestan diferentes efectos beneficiosos en la salud humana [62], como la prevención de enfermedades como el asma, la psoriasis, la artritis y la eliminación rápida de metales pesados del cuerpo [137, 139]. El más popular de los alquilgliceroles, debido a sus importantes actividades biológicas, es el 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina o factor activador de plaquetas (PAF), con diversos efectos mediadores sobre las células en una variedad de tejidos y sistemas, incluyendo la circulación, la inflamación, el desarrollo y la reproducción [63]. El 1-O-alkil-sn-glicerol ha reclamado también interés ya que parece mostrar diversos efectos beneficiosos sobre la salud humana y amplificar la producción de PAF, mediante su incorporación en el precursor del PAF 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfolina [64]. Además los alquilgliceroles son potentes agentes antineoplásicos que inhiben el crecimiento, muestran una actividad antimetastásica e inducen la diferenciación y la apoptosis en células de cáncer [64]. Propiedades de estimulación inmunológica también se han atribuido a estas sustancias [65], así como la mejora de la motilidad del esperma de cerdo y la fertilidad [63].

El uso clínico inicial de este tipo de compuestos fue el tratamiento de diferentes leucemias, y más tarde, prevenir las enfermedades asociadas a la radiación en la terapia de radiación contra el cáncer [66]. Los alquilgliceroles estimulan la producción de células sanguíneas por la médula ósea. El alcohol batílico tiene un efecto activador de la producción de los glóbulos rojos, leucocitos y trombocitos en la médula ósea. Son útiles para restaurar las poblaciones de esas células, después de un tratamiento de radioterapia. Estudios llevados a cabo por Brohult y colaboradores [67] han demostrado que los alquilgliceroles distribuidos a título profiláctico (600mg/día) a mujeres irradiadas por un cáncer uterino, tienen un efecto protector sobre las leucopenias y trombocitopenias inducidas por las radiaciones. Firshein describió un incremento de la sensibilidad de los tumores frente a los agentes empleados en quimioterapia cuando se administran junto a alquilgliceroles [68].

Los alquilgliceroles tienen un efecto inhibitor del crecimiento tumoral [69], sobre todo los derivados metoxi-sustituídos. Las células tumorales sólo contienen unas pocas enzimas capaces de degradar los ésteros. A la ingestión en la dieta de estas sustancias se le ha atribuido propiedades anticarcinogénicas [70-71]. El nivel de alquilgliceroles naturales aumenta en células tumorales, aparentemente en un esfuerzo para controlar el crecimiento celular. Estudios recientes indican que la activación de la Proteína Quinasa C (PKC), esencial en determinadas etapas de proliferación celular, puede ser inhibida mediante alquilgliceroles. Esta acción se basa en una inhibición competitiva del 1,2-diacilglicerol (1,2-DAG) por alquilgliceroles. El 1,2-DAG es el mensajero secundario que activa la PKC. Los análogos del 1,2-DAG de tipo alquilo (con algún enlace éter en su estructura), como el 1-O-decil-2-O-decanoilglicerol, 1-O-decanoil-2-O-decilglicerol, 1,2-Odidecilglicerol, 1-O-hexadecil-2-O-acetilglicerol y 1-O-decil-2-O-acetilglicerol, pueden también regular competitivamente la PKC. Al contrario que los 1,2-DAG, estos análogos dan lugar a una disminución en la actividad de la enzima, especialmente cuando el enlace éter se encuentra en la posición *sn*-1 del glicerol [72], e inhiben el efecto estimulador del 1,2-DAG sobre la PKC [73].

Los alquilgliceroles amplían la reacción inmunitaria [74]. La inflamación está presente en toda lesión y representa un factor de activación de los macrófagos, que entonces se vuelven competentes sobre el terreno inmunitario, en los tejidos donde se encuentran los alquilgliceroles, como consecuencia de la lisis inflamatoria de las células, participan en la activación de esos macrófagos. Existen estudios sobre la acción inmunoestimuladora de los alquilgliceroles [74], que

sugieren una primera acción sobre los macrófagos [75-78] además de sobre linfocitos de tipo B y T [79]. El proceso de activación de macrófagos ha sido demostrado con alquilgliceroles naturales, sintéticos y también con derivados de tipo alquilo de lisofosfolípidos. Esta activación de macrófagos desarrolla un incremento en la capacidad fagocítica y además aumenta los efectos citotóxicos en células tumorales *in vivo* [77, 80]. El dodeciliglicerol (DDG), es uno de los más potentes activadores de macrófagos conocidos, aunque el uso de 3-*sn*-octadeciliglicerol, o batyl alcohol (procedente del aceite de hígado de tiburón), produce el mismo efecto que el DDG [61]. Otro efecto de estimulación inmunológica atribuido a estos compuestos es la producción de anticuerpos [81], principalmente de inmunoglobulina G y M [61].

Además, se ha comprobado que el batyl alcohol tiene una mayor capacidad antiviral *in vitro* si se compara con la de determinados fármacos (como el foscarnet) empleados como antivirales en terapia contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 [82]. Hostetler y Mellors patentaron un tratamiento basado en alquilgliceroles para tratar la infección por VIH en casos en que se manifiesta una resistencia a otros fármacos antivirales [83].

Debido a estas propiedades, los alquilgliceroles pueden emplearse como terapia complementaria en el tratamiento de desórdenes neoplásicos y como potenciadores del sistema inmune en diversas enfermedades infecciosas [61].

Los alquilgliceroles sustituidos con un grupo metoxilo, presentes en el aceite de hígado de tiburón en una proporción en torno al 3% del total de alquilgliceroles, tienen también una importante actividad biológica como estimulador del sistema inmune y como agente anticancerígeno [61].

Otras propiedades funcionales atribuidas a los 1-O-alquilgliceroles, son el aumento de la movilidad de espermatozoides y la mejora de la fertilidad [84-85] así como la estimulación de la hematopoyesis [86].

La forma más habitual de administración de alquilgliceroles es la de cápsulas de 250 a 500 mg de aceite de hígado de tiburón, que contienen un 20% de alquilgliceroles (50-100 mg). La dosis o ingesta diaria recomendada de alquilgliceroles varía dependiendo del tipo de desorden hacia el que está dirigida. De este modo, como terapia complementaria a tratamientos tradicionales contra el cáncer, la dosis aproximada podría ser de entre 3 y hasta un máximo de 6

cápsulas de 500 mg al día. Como potenciador del sistema inmune en la prevención de diversas enfermedades, una medida adecuada es la de 2 ó 3 cápsulas de 250 mg al día [61].

Los alquilgliceroles como sistemas de administración de ingredientes bioactivos

Buscando encontrar agentes terapéuticos, se han preparado alquilgliceroles sintéticos que no se encuentran en la naturaleza [87], tales como análogos del PAF que presentan un residuo de cadena corta en la posición sn-2 distinto a un grupo acetilo [88]. Este residuo de cadena corta puede contener un ω -metilo, ω -aldehído, ω -alcohol, o un grupo ω -carboxilo con actividad semejante al PAF. Se ha demostrado que cuanto menor sea el residuo presente en sn-2 más activo será el lípido análogo del PAF [89-90].

Torres y colaboradores [91] sintetizaron alquil-diacylgliceroles estructurados que contenían residuos de ácidos grasos de cadena corta en posiciones sn-2 y sn-3, mediante transesterificación enzimática de 1-O-octadecil-glicerol y butirato de etilo. La bioaccesibilidad potencial de este alquilglicerol sintético se estudió mediante la simulación de la digestión intestinal de la molécula por enzimas pancreáticas en condiciones *in vitro* [92]. Este estudio demostró que la estructura propuesta de 1-O-alquil-sn-glicerol con un residuo de cadena corta producía como producto mayoritario después de la hidrólisis intestinal, la forma 2-butirol-1-O-octadecil-glicerol. Por otro lado, en la producción de este alquilglicerol estructurado, Torres y colaboradores [91] afirmaron que esta molécula podría tener un interés adicional, ya que el butirato es el residuo de cadena corta en posición sn-2. Para que el butirato sea un pro-fármaco eficiente, debe existir un vínculo suficientemente estable entre el vehículo y el residuo de butirato, con el objetivo de aumentar la vida media *in vivo* del butirato [93]. En el estudio *in vitro* de digestión intestinal realizado [92], se demostró que la pro-droga tributirina tradicionalmente propuesta [94] fue completamente hidrolizada a ácido butírico, en contraste con la forma estable esterificada del ácido butírico obtenida como 2-butirol-1-O-octadecil-glicerol, mostrando el potencial de esta molécula sintética como portador de butirato.

Otro ejemplo reciente de los alquilgliceroles como sistemas de administración de sustancias bioactivas fue la síntesis de éteres de hidroxitirosol [95]. Los derivados obtenidos conservaron la capacidad antioxidante [96] del hidroxitirosol en matrices lipídicas y su biodisponibilidad fue demostrada [34].

Por otro lado, los 1-O-alquilgliceroles han demostrado tener un destacado efecto en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Estos compuestos han mejorado considerablemente la absorción de agentes carcinoestáticos en el cerebro. Debido a sus características anfífilas, se ha estudiado su tendencia a reunirse en vesículas con forma de bicapa lipídica para, de este modo, poder ser utilizados como transportadores de fármacos [97].

Definitivamente el uso de los alquilgliceroles como vehículos de ingredientes bioactivos parece un campo prometedor, con la ventaja añadida de la propia actividad biológica de los alquilgliceroles.

1.4.2. Oxidación de aceites y grasas comestibles

La oxidación de aceites y grasas produce la degradación de los mismos y origina el enranciamiento. El término enranciamiento se aplica para describir la aparición de olores y sabores indeseables como consecuencia de determinados cambios en la fracción grasa de los alimentos. La oxidación de aceites y grasas se da en el tiempo como una degradación primaria que conduce a una degradación posterior más intensa denominada degradación secundaria.

Degradación primaria

La degradación primaria de los lípidos se produce por factores y agentes externos que producen distintas alteraciones en la molécula lipídica. Se puede dividir la degradación primaria de aceites y grasas en degradación bioquímica, auto-oxidación y foto-oxidación

Degradación bioquímica

Está provocada por enzimas o microorganismos. Las lipasas hidrolizan las grasas generando ácidos grasos libres. Estos, si bien disminuyen la palatabilidad de los alimentos, no cambian sus propiedades nutricionales ya que durante la digestión también se someten a la acción de estas lipasas para poder ser asimilados. Otras enzimas como las lipooxidasas provocan procesos oxidativos, si bien estos procesos no son los más frecuentes, pueden ser importantes en determinados casos.

La degradación bioquímica de las grasas puede ser evitada mediante la desactivación de las enzimas por calor o degradación proteica y mediante la esterilización del medio, que provoca la

muerte de los microorganismos y la desactivación de las enzimas. También puede evitarse envasando correctamente la grasa (sin oxígeno), refrigerándola (disminuyendo la velocidad de las enzimas) y secándola correctamente (manteniendo la humedad lo más baja posible).

Auto-oxidación

Es la denominación que recibe la degradación química. Es con diferencia, la causa más importante del deterioro de aceites y grasas. Es el proceso indeseable, resultado de la exposición al oxígeno, que genera en las grasas compuestos inaceptables e incluso tóxicos. Es un proceso complejo que origina productos de descomposición variados como perácidos orgánicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y combinaciones de los anteriores.

El mecanismo más aceptado es la vía del radical libre que interacciona con el oxígeno. Este mecanismo se activa con las radiaciones electromagnéticas (luz), calor, iones metálicos, o metaloproteínas y se propaga solo. Históricamente se creía que la adición de oxígeno a la molécula de ácido graso formaba un anillo de cuatro átomos como producto de reacción primaria. Esta molécula recibe el nombre de "peróxido". En realidad se forma un hidro-peróxido debido a la adición de oxígeno sobre el carbono alfa del doble enlace. A pesar de ello la denominación histórica todavía perdura y se sigue hablando de peróxidos para designar a los productos de la degradación primaria de una grasa. Estos productos evolucionan hacia los llamados de degradación secundaria que son fruto de las diversas rupturas de las moléculas de hidroperóxidos.

Los factores que influyen en la auto-oxidación son:

1. Activadores o prooxidantes
 - a) El oxígeno,
 - b) El grado de insaturación, de gran importancia en la cinética puesto que la degradación es geométricamente proporcional al grado de insaturación,
 - c) Metales que catalizan el proceso de adición de oxígeno. Concentraciones muy bajas reducen a la mitad el tiempo de conservación,
 - d) La exposición a la luz y el calor.

2. Desactivadores o antioxidantes

Son sustancias que, en pequeñas cantidades, interfieren el proceso normal de oxidación y evitan o retardan la creación de productos de degradación. Generalmente actúan como receptores de radicales evitando su propagación, se conocen como antioxidantes:

- a) PG o galato de propilo,
- b) BHT o butilhidroxitolueno,
- c) BHA o butilhidroxianisol,
- d) Los tocoferoles, presentes principalmente en las grasas y aceites vegetales en forma de cuatro isómeros: alfa, beta, gamma y delta, con actividades distintas para cada uno de ellos.

La legislación de cada país especifica cuáles de ellos pueden usarse y su concentración máxima permitida en los diferentes productos alimenticios.

También se debe hablar de los sinérgicos, o sustancias que por sí solas no actúan como antioxidantes pero que acentúan la acción de los antioxidantes descritos. Como ejemplos de sinérgicos se pueden citar los ácidos cítrico, ascórbico, tartárico, fosfórico, los fosfolípidos y el EDTA. Se piensa que su acción se debe a la desactivación de los metales prooxidantes mediante su quelación, ya que en presencia de metales, los antioxidantes tienen muy poca eficacia. El más conocido y utilizado es el ácido cítrico. El ácido fosfórico es efectivo pero el nivel de dosificación es crítico ya que puede producir olores extraños aunque la estabilidad sea alta. Los fosfolípidos también son eficaces, pero de forma similar pueden presentar problemas de olor y sabor.

Foto-oxidación

Es la reacción de un doble enlace con oxígeno en presencia de luz y de un “sensibilizador” adecuado. Es una reacción más rápida que la auto-oxidación y la diferencia en la reactividad entre C18:1, C18:2 y C18:3 es aritméticamente proporcional al número de dobles enlaces. La riboflavina es un sensibilizador que activa el doble enlace y produce los mismos productos que la auto-oxidación. Pero la eritrosina o el azul de metileno activan el oxígeno que se acopla a un

carbono insaturado y provoca una migración del doble enlace. Uno de los inicios de la auto-oxidación de los aceites vegetales podrían ser reacciones de foto-oxidación por parte de los pigmentos naturales de dichos aceites, presentes incluso después del refinado.

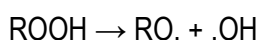
Degradación secundaria

Los productos resultantes de la fisión de los hidroperóxidos pueden ser etano, eteno, pentano, aldehídos, cetonas, ésteres, lactonas, alcoholes o éteres, saturados o insaturados. Entre los aldehídos se pueden encontrar alcanales, alquenes, alcadienes, alcatrienales que pueden originar olores agradables o desagradables.

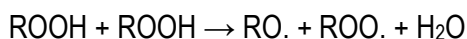
La respuesta humana al olor depende de la concentración de un componente en particular y de la presencia de otros compuestos odoríferos. La concentración de muchos de estos compuestos, suficiente para generar una apreciación organoléptica, se mide en ppm e incluso en ppb. Por ello, cantidades muy pequeñas de productos de degradación pueden tener un efecto muy significativo sobre el olor de una grasa o de una matriz que la contenga.

La formación de muchos de estos compuestos se explica a partir de la estructura original de los hidroperóxidos, por las rutas principales de ruptura de la molécula. Pero hay algunos que no se pueden explicar, bien sea por la presencia de sustratos no previstos como pueden ser trazas de ácidos no identificados con dobles enlaces en posiciones no habituales, bien sea por rutas de oxidación inusuales.

Cuando la concentración de hidroperóxidos es baja, su descomposición se realiza a nivel monomolecular; esta vía es la más usual en muchos productos alimentarios:



A medida que la oxidación progresa y aumenta la velocidad de formación de hidroperóxidos, se llega a concentraciones suficientes para que el mecanismo pase a ser bimolecular:



En el proceso de oxidación de lípidos se originan tres tipos de radicales libres: alcóxidos, peróxidos y alquilos. Su evolución es muy importante en el desarrollo del enranciamiento.

Como se ha descrito, el proceso de oxidación se inicia con la formación de hidroperóxidos; se propaga por vía radicalaria, los hidroperóxidos se descomponen en moléculas de cadena corta, y los radicales libres se acoplan y forman polímeros. Gráficamente este proceso puede tener la expresión de la Figura 1.

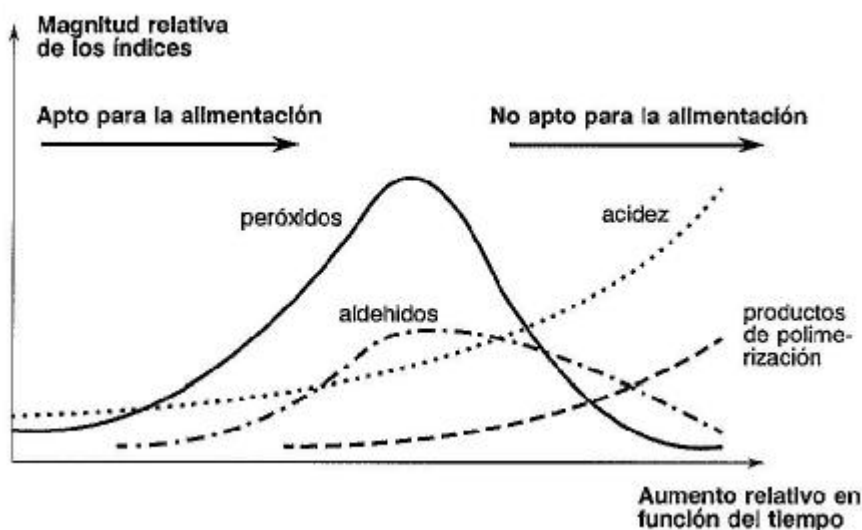


Figura 1. Evolución de los productos de degradación en función del tiempo.

Si la oxidación no es el resultado de una aceleración controlada, no podemos definir el estado de oxidación de una grasa a partir del índice de peróxidos. Si una grasa tiene peróxidos es porque ha sufrido un proceso de oxidación, pero no se puede precisar en qué grado. Y, además, un índice de peróxidos bajo no permite afirmar que la grasa no está oxidada, como se ha visto en la evolución de los peróxidos a 180°C. Por otra parte, el proceso de desodorización en el refinado de aceites, elimina los peróxidos.

1.4.3. Modificación de aceites y grasas comestibles

Se distinguen tres campos fundamentales en la modificación de aceites y grasas, estos son:

- Las modificaciones biológicas que conducen a la obtención de nuevos aceites y grasas,
- Las modificaciones físicas que alteran la composición y distribución de los componentes de aceites y grasas mediante elementos físicos,

- Las modificaciones químicas que producen un cambio en la estructura química de los componentes de aceites y grasas.

Modificación Biológica

Existen tres maneras de obtener nuevos aceites y grasas de fuentes vegetales:

Una posibilidad es tomar una planta silvestre que produce aceite con un ácido graso y/o perfil de triglicéridos interesante y hacerla adecuada para el cultivo a escala comercial. Esto es generalmente un proceso lento que requiere muchos años.

Un segundo enfoque, cuando existe diversidad genética, es cruzar especies apropiadas a través del proceso de reproducción de semillas. Esto se ha hecho de manera muy eficaz con las especies de Brassica para obtener las semillas oleaginosas de la colza. Además si es necesario la reserva de genes puede ser aumentada por tratamiento químico o irradiación sobre las semillas con el objetivo de que puedan producir nuevas especies con características interesantes. Esta es la base de las líneas de bajo ácido linolénico de las semillas de lino.

Finalmente, pueden ser identificados los genes necesarios para aspectos particulares de la biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos en ciertas especies, estos genes pueden ser clonados y transferidos a otras plantas. La colza ha demostrado ser muy flexible en este aspecto, y su composición de ácidos grasos ha sido modificada de varias formas, algunas de las cuales ya han alcanzado la aplicación comercial. Los procedimientos de modificación de genes también se aplican a la soja y otras oleaginosas. En la actualidad se ha logrado comercializar también de esta manera aceite de girasol alto oleico.

Otra fuente de nuevos lípidos son los microorganismos cultivados en medios de fermentación adecuados. La introducción comercial de una nueva fuente de lípidos no es una cuestión simple ya que tendrá que competir con los aceites existentes, disponibles a granel y a precios de productos básicos. La introducción comercial de estas grasas será difícil a menos que el aceite obtenido posea propiedades específicas novedosas, como los aceites que contienen γ -linolénico. La demanda y el interés en algunos cultivos nuevos pueden venir más de la industria oleoquímica que de la industria de la alimentación, ya que tradicionalmente la industria oleoquímica ha utilizado aceites de menor calidad y más baratos que los utilizados por la industria alimentaria. En la actualidad existe interés en nuevos cultivos que producen aceites con

altos niveles de un solo AG, como el ácido láurico, oleico, erúcico, o ácidos con grupos hidroxilo o epoxi.

Modificación física

La mezcla de aceites y grasas para la producción de mezclas con mejores propiedades físicas o nutricionales tiene una larga historia. La mayoría de las mezclas contienen dos o más aceites con el objetivo de combinar propiedades nutricionales con propiedades físicas deseables. También se mezclan aceites con el objetivo de obtener una mezcla con propiedades semejantes a las iniciales a menor coste, para ello se han desarrollado diversos programas informáticos [98]. Por otro lado la interesterificación normalmente se lleva a cabo en mezclas de aceites.

“Appetize Shortening”

Es el resultado de la investigación conjunta entre el proveedor (Source Food Technology, Burnsville, MN EE.UU.) y CT Hayes de la Universidad de Brandeis. Permite el uso de grasas animales sin los inconvenientes que normalmente se asocian a esta grasa. Esto es posible mediante la eliminación del 90% del colesterol de la grasa animal por un procedimiento patentado de destilación a vapor y mediante la mezcla de la grasa tratada con aceite vegetal suficiente para compensar el ácido mirístico en la grasa animal. Hayes demostró que, entre los ácidos grasos saturados, el ácido mirístico tiene el mayor efecto en los niveles de colesterol en plasma, pero estos efectos son insignificantes si el nivel de ácido linoleico es suficientemente alto [99-100]. Por lo tanto la mezcla debe contener entre dos y tres veces más ácido linoleico que ácido mirístico. El “Appetize Shortening” contiene poco o nada de ácido trans, en contraste con el aceite vegetal parcialmente hidrogenado que desea reemplazar.

Aceites de fritura o “Good-Fry”

Este aceite para fritura es una mezcla de aceites vegetales con alto contenido en AG oleico, como el de maíz o el de girasol, mezclado con hasta un 6% de aceite de sésamo y/o aceite de salvado de arroz, los cuales muestran una alta estabilidad oxidativa en virtud de los antioxidantes presentes como compuestos minoritarios.

Es interesante saber que algunos de estos antioxidantes son especialmente activos a las temperaturas de fritura. La naturaleza del aceite vegetal (con sus bajos niveles de ácido linoleico) y la de los aceites de mezcla (con su alta estabilidad oxidativa) se combinan para producir un aceite de fritura muy estable. Por esta razón los aceites de fritura pueden utilizarse más tiempo que otros. Esto los hace

ser más seguros debido a sus bajos niveles de productos de oxidación y polimerización, además resultan más económicos ya que son reemplazados con menor frecuencia.

Extracción y fraccionamiento de aceites y grasas

La extracción y fraccionamiento de grasas y aceites, tanto de origen vegetal como de origen animal, es un importante campo de estudio. Dentro de los posibles procesos de extracción y fraccionamiento de aceites y grasas se encuentran el fraccionamiento tradicional, el fraccionamiento con urea, la destilación, la extracción con disolventes y la extracción con fluidos supercríticos.

El **fraccionamiento** es un procedimiento usado para la separación de aceites y grasas en dos o más componentes en función de su solubilidad (en los aceites o grasas disueltas) y/o punto de fusión.

Este tema ha sido revisado por Timms [99]. A la fracción menos soluble, con mayor punto de fusión, se le denomina estearinas y a la fracción más soluble, con menor punto de fusión, se le llama oleínas. Ambos productos pueden ser de interés industrial, en ocasiones ambas fracciones tienen valor, pero hay veces en las que sólo una de las fracciones es de interés y se debe buscar salida comercial a la fracción de menor valor. El fraccionamiento se puede repetir de nuevo sobre una de las fracciones obtenidas para dar nuevas fracciones, pero esto sólo es posible cuando se obtienen productos de alto valor para el mercado, como los sustitutos de la manteca de cacao. Este proceso se realiza generalmente de una de estas tres maneras:

1. Cristalización a partir de un solvente como la acetona o hexano; ofrece productos de calidad superior, pero es más caro de operar,
2. En el proceso de Lanza o Lipofrac una solución acuosa de detergente es añadida después de la cristalización de la grasa fundida. La estearina sólida, recubierta con el detergente, entra en la fase acuosa, lo que facilita la separación de la oleína de la estearina. Este procedimiento está en desuso.
3. El método actual más utilizado consiste en fraccionamiento en seco. El aceite líquido se enfría lentamente para fomentar la producción de grandes cristales de estearinas, que luego se separan por filtración.

En el fraccionamiento en seco la cristalización se produce durante varias horas y requiere un buen control. La temperatura debe ser reducida a una tasa fija y esto debe ser combinado con una agitación eficiente pero lenta. El objetivo de la filtración es la completa separación de sólidos y líquidos, puede llevarse a cabo bajo presión reducida o bajo presiones de hasta 50 bar con un filtro.

Este tipo de fraccionamiento se aplica principalmente al aceite de palma [100], a los aceites láuricos (coco y almendra de palma), al aceite de mantequilla, grasa animal, soja endurecida y al aceite de semilla de algodón.

La grasa láctea contiene muchas más especies de triglicéridos que el aceite de palma, por lo que sus fracciones son menos diferenciadas. Las fracciones, ya sean por separado o después de la adición a la grasa láctea de nuevo, encuentran numerosos usos específicos, como la producción de mantequilla para untar (mezcla de la estearina dura con la oleína blanda) y de productos de panadería tales como pasta de hojaldre (grasa láctea y estearina) [101-102].

Fraccionamiento con urea.

Cuando la urea cristaliza en metanol o etanol en presencia de ciertos compuestos alifáticos, forma prismas hexagonales que contienen un canal en el que los ácidos grasos o sus ésteres de alquilo pueden ser atrapados si tienen las dimensiones adecuadas [103].

Los AGS forman complejos estables con más facilidad que los AGI. El ácido oleico forma un compuesto de inclusión más fácilmente que los AGPI. En un caso típico de urea y AG mezclados, se cristaliza en metanol a 0-4° C. Los cristales se separan de las aguas madres, y los AG se recuperan de ambas fracción. Los AGPI, por lo general permanecen en las aguas madres. El procedimiento es sencillo, no hace daño a los PUFA, se puede repetir una o más veces para aumentar el enriquecimiento de un AG en particular y puede llevarse a cabo en un gramo, en un kilogramo o hasta escala de toneladas [104].

Este método ha sido utilizado para concentrar tanto γ -linolénico (del 18% al 80%) como ácido estearidónico (del 4% al 16%) del aceite de semilla de grosella negra [105]. Los AGPI ω 3 de aceite de pescado también son fácilmente concentrados por el fraccionamiento con urea. Por ejemplo, el aceite de arenque con un 12% de AG ω 3 (estearidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico), produjo un concentrado con el 69% de estos tres ácidos, con el aceite

de arenque americano (menhaden oil) el nivel se elevó del 22% al 91% [106]. Por fraccionamiento con urea la cantidad de AG ω 3 de grasa de foca se elevó al 88% (DHA 68%), el proceso consistió en cristalización a -10°C durante 24 horas con una proporción de urea/AG de 4.5 [107].

El fraccionamiento con urea se está desarrollando como un procedimiento rápido y ecológicamente responsable para la separación de ácidos grasos [290-292].

Destilación

La destilación no se aplica generalmente a los ésteres de glicerol (excepto para el aislamiento de MAG a partir de mezclas MAG/DAG), sino a los AG libres o a los ésteres de alquilo de bajo peso molecular. Por ejemplo, los ácidos C8 y C10, que son componentes importantes de los triglicéridos de mediana longitud, se recuperan por destilación de los AG libres a partir de aceites láuricos (coco, almendra de palma). Para los AG y ésteres de alquilo de alto peso molecular se suele emplear la destilación molecular.

La demanda de los consumidores de alimentos naturales, libres de residuos y contaminantes, así como las crecientes restricciones al uso de disolventes orgánicos impuestas por las legislaciones alimentarias de los diferentes países, obligan a la tecnología de alimentos a avanzar en la búsqueda de nuevos procesos y nuevos productos. La destilación molecular es un proceso de separación térmica eficiente que produce una mínima descomposición térmica produciendo un producto de máxima calidad. Esta técnica es de utilidad para destilar, concentrar, purificar, separar o desodorizar mezclas complejas.

La destilación molecular es una tecnología basada en la evaporación de los componentes de una mezcla de baja volatilidad en contacto con una superficie calefactada y su posterior condensación en una superficie fría muy cercana a la anterior [108]. Esta operación se lleva a cabo a muy bajas presiones, del orden de 10^{-6} bar. A estas presiones se consiguen altas volatilidades relativas de los componentes de la mezcla, lo que permite trabajar a bajas temperaturas, algo que es muy beneficioso en la separación de compuestos termolábiles. Esta técnica se ha utilizado en el aislamiento de concentrados de ácidos de cadena larga como el EPA (C20:5) y DHA (C22:6) [109]. Este suele ser el último paso en el procedimiento de purificación y está precedido por otros métodos de concentración.

A diferencia de los evaporadores y destiladores convencionales la destilación molecular se lleva a cabo sobre una película muy fina de la mezcla a destilar y se realiza durante tiempos muy cortos a alto vacío protegiendo así sustancias sensibles térmicamente. Las claves de la superioridad de este proceso incluyen el corto tiempo de residencia del líquido alimentado, trabajar a temperaturas considerablemente bajas debido a la alta capacidad de vacío, y la gran eficacia en la transferencia térmica y de masa.

Estas características hacen que la destilación molecular sea una técnica de separación adecuada para purificar o concentrar productos termosensibles de alto peso molecular, de elevada viscosidad o de altos puntos de ebullición y/o fusión.

Esta tecnología tiene diversas aplicaciones en la industria de grasas y aceites, petroquímica, farmacéutica, cosmética y perfumería. Han sido descritos diversos procesos que utilizan la destilación molecular aplicados a: la recuperación de compuestos de alto valor añadido (esteroles y tocoferoles) a partir de destilados desodorizados [295-297], refinación física de aceites vegetales [110], Concentración de monoglicéridos [111], recuperación de antioxidantes naturales a partir de diversas fuentes vegetales [112], recuperación de carotenoides a partir de aceite de palma [113], concentración de escualeno a partir de aceite de hígado de tiburón [114].

Extracción y fraccionamiento con fluidos supercríticos

Las tecnologías tradicionalmente utilizadas para la obtención de extractos alimentarios utilizan disolventes orgánicos, que comportan un riesgo debido a su toxicidad, a su poder inflamable y a los residuos que generan. Por este motivo, se han desarrollado nuevas tecnologías respetuosas con el medio ambiente, que no representan ningún riesgo para la salud y que garantizan una calidad superior de los productos.

Aunque las propiedades disolventes de los fluidos supercríticos fueron inicialmente observadas por Hannay y Hogarth, en el año 1880 [115], es en el año 1974 cuando se presentan las primeras patentes de descafeinado del café mediante extracción con fluidos supercríticos [116-117], y es entonces cuando la extracción con fluidos supercríticos (SFE) despierta interés en la tecnología de alimentos como técnica de procesado.

La SFE es una técnica de separación de sustancias disueltas o incluidas dentro de una matriz, basada fundamentalmente en la capacidad disolvente que tienen determinados fluidos en

estado supercrítico (FSC). La extracción con fluidos supercríticos está plenamente implantada a escala comercial en la obtención del lúpulo para la elaboración de cerveza, la obtención de café y té sin cafeína y para la extracción de aromas y sabores de especias y hierbas aromáticas.

Los fluidos supercríticos son líquidos o gases en condiciones ambientales, llevados a unas condiciones operativas de presión elevada y temperatura moderada, por encima de su punto crítico. La propiedad más importante que presentan es su elevado poder disolvente en estado supercrítico. El poder disolvente de los FSC puede ser modulado modificando su densidad. La densidad del fluido supercrítico puede modificarse cambiando las condiciones de presión y temperatura aplicadas, permitiendo así la disolución selectiva de sustancias en el FSC.

Como se observa en la Figura 2, los tres estados de la materia están separados por líneas que representan los equilibrios sólido-líquido o de fusión, sólido-gas o de sublimación y líquido-gas o de vaporización. También aparecen dos puntos característicos: el punto triple, donde coexisten los tres estados, y el punto crítico, al final de la curva de vaporización, caracterizado por una presión crítica (P_c) y una temperatura crítica (T_c).

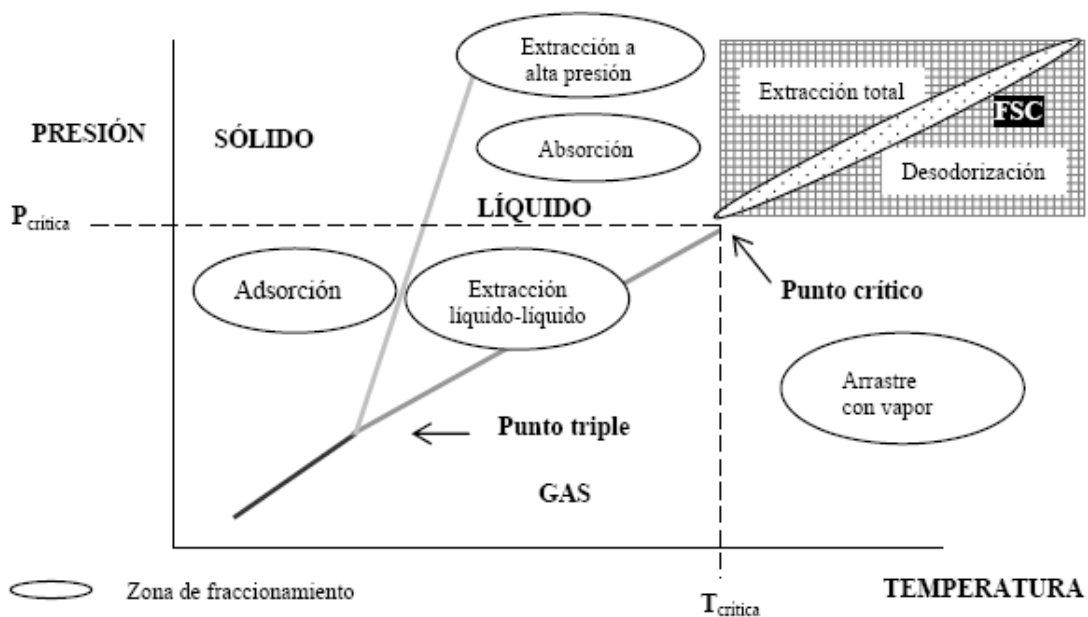


Figura 2. Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia.

En el punto crítico dejan de existir las fases líquida y gaseosa como tales, apareciendo una nueva fase llamada fase supercrítica, donde el poder disolvente puede ser bajo o alto, sin que se

produzca un cambio de fase, sólo realizando pequeñas variaciones de presión y temperatura. Por encima del punto crítico la sustancia no es un líquido ni un gas propiamente dicho, pero posee propiedades de ambos. En este estado, el material es compresible, llena y toma la forma de su contenedor; características que no tiene cuando está en estado líquido (fluido no compresible que ocupa el fondo del contenedor). No obstante tiene la densidad de un líquido y por tanto su poder disolvente [118].

El poder disolvente de una sustancia pura depende, en gran parte, de su densidad. La densidad por encima del punto crítico depende básicamente de la presión y la temperatura pero, en cualquier caso, está más cercana a la de los líquidos que a la de los gases. La densidad aumenta si lo hace la presión a temperatura constante y si disminuye la temperatura a presión constante. Esta es la causa de sus buenas propiedades disolventes, ya que las interacciones entre las moléculas del fluido y las del soluto son fuertes. En las proximidades de la temperatura crítica de un fluido, el cambio en la densidad ocurre de forma rápida en un intervalo de presión pequeño, que hace difícil su control.

La viscosidad es mucho más baja que la de los líquidos, lo que le confiere propiedades hidrodinámicas favorables. Aunque la viscosidad aumenta rápidamente en la región crítica, su valor es un orden de magnitud inferior que el de los disolventes líquidos orgánicos, incluso a altas presiones (300-400 bar). La bajísima tensión superficial permite una alta penetrabilidad a través de sólidos porosos y lechos empaquetados. Estas características son importantes para otra de las aplicaciones de estos fluidos: su uso cromatográfico.

Como sucede con otras operaciones de extracción, la extracción con CO₂ supercrítico es un proceso de separación que depende básicamente de dos factores: transferencia de materia y equilibrio de fases [119]. Los fluidos supercríticos tienen coeficientes de difusión intermedios entre los líquidos y los gases. Estos coeficientes de difusión altos, junto a valores reducidos de la viscosidad, permiten que los fluidos supercríticos sean capaces de penetrar y difundir a través de matrices de muy diverso tipo, lo que les confiere unas características de transferencia de materia mejores que las de los líquidos. Por esta razón, los procesos de extracción con este tipo de fluidos son rápidos. En general, la difusión del fluido supercrítico aumenta con la temperatura y disminuye con la presión. Por otro lado el coeficiente de difusión de un compuesto en un fluido supercrítico se reduce cuando se emplean modificadores, debido a las interacciones entre el compuesto y el modificador, y entre el compuesto y el disolvente [120].

El tipo de extracción depende del tipo de material de partida que se emplee. Así se pueden distinguir procesos extractivos en la que los solutos están disueltos en una matriz líquida, solutos disueltos en una matriz semisólida, solutos disueltos en líquidos dentro de una matriz sólida o solutos disueltos en una matriz sólida. Cuando el material de partida es sólido, la estrategia se basa en la difusión del fluido supercrítico a través de la matriz sólida. Por el contrario cuando el material que se quiere procesar es líquido, el proceso que se lleva a cabo es una extracción en columna en contracorriente, en la que el fluido supercrítico se introduce por la parte inferior y la muestra por la parte superior de la columna. Este tipo de proceso se puede llevar a cabo de manera continua, lo que supone una gran ventaja comercial [121]. En este tipo de procesos se obtiene un extracto, en la parte superior de la columna, y una mezcla de compuestos no extraídos por el fluido supercrítico, en la parte inferior de la columna. En estas extracciones es muy importante la relación entre el flujo del fluido supercrítico y el flujo de muestra alimentado, esto se denomina relación disolvente/alimentación o "Solvent to Feed" (S/F). La relación S/F es una variable que tiene gran relevancia en la transferencia de materia y el equilibrio de fases en procesos de extracción en columna en contracorriente.

Además de todas las propiedades mencionadas anteriormente, un fluido supercrítico debe poseer otras para ser empleado como disolvente en la industria alimentaria. En este sentido, el dióxido de carbono presenta una serie de características que hacen que su uso sea ventajoso frente a otras sustancias, como: ser incoloro, inodoro, barato, fácilmente eliminable, no dejar residuo, ni ser tóxico, ni inflamable, ni corrosivo, ni oxidante. Por otro lado el CO₂ posee baja tensión superficial y sus condiciones críticas son fácilmente alcanzables. Tiene una densidad relativamente alta en el punto crítico, lo que le confiere un alto poder solvente. Además se adquiere de forma comercial con diferentes grados de pureza y está admitido como disolvente seguro (GRAS).

Generalmente los disolventes polares tienen mayor capacidad solvente que los apolares y pueden disolver compuestos de diferente polaridad. Una limitación que presenta el dióxido de carbono como fluido supercrítico es su carácter apolar. Por otro lado la solubilidad en el CO₂ supercrítico disminuye a medida que aumenta el peso molecular de los compuestos a disolver. Esta característica puede no ser una desventaja, ya que confiere mayor selectividad en la extracción de compuestos y aumenta las posibilidades de fraccionamiento. Moyler estudió la solubilidad de diferentes ingredientes vegetales en CO₂ supercrítico [307-308]. Al mismo tiempo

el CO₂ es susceptible de ser polarizado al variar la densidad, es decir, al variar la presión y la temperatura. Esta capacidad en el CO₂ es mucho menor que en los hidrocarburos, por ejemplo, para conseguir una polaridad por unidad de volumen comparable a la del ciclohexano líquido se necesita una presión de 2700 bar y 45 °C [122]. Existe una alternativa al uso de condiciones tan extremas que consiste en la adición de pequeñas cantidades (<10%) de modificadores. Los modificadores son sustancias polares que, al ser añadidas junto con el CO₂, varían enormemente la polaridad del fluido supercrítico.

Los disolventes más frecuentemente usados como modificadores en tecnología de alimentos son el etanol, el metanol y la acetona. Los inconvenientes del uso de modificadores son los atribuibles al uso de disolventes orgánicos. Sin embargo, la baja dosificación y su solubilidad en el fluido supercrítico, hacen que sus residuos en el extracto sean prácticamente inapreciables. En tecnología de alimentos se tiende a evitar su uso o restringirlo al etanol.

Del Valle y Aguilera revisaron el estado de la SFE en la industria alimentaria destacando como aplicaciones comerciales: la extracción de lúpulo, saborizantes, colorantes, antioxidantes y otros compuestos bioactivos naturales, descafeinado del café y fraccionamiento de aceites y grasas [123].

Brunetti y colaboradores estudiaron en 1989 la desacidificación de aceites de oliva mediante fluidos supercríticos [124], esto condujo al desarrollo de una patente en 1995 para la desacidificación de aceites vegetales [125]. Mangold señaló que las ventajas de la extracción con CO₂ supercrítico, en función de la calidad del aceite obtenido, con respecto a la extracción con disolventes orgánicos son [126]: Aceites prácticamente libres de fosfolípidos y glicolípidos (los aceites convencionales contienen hasta un 1–3 % de lípidos polares), menor contenido de hierro y gossipol, obtención de aceites más claros y desodorizados, menores pérdidas por refinación y menor requerimiento de sosa cáustica.

Brunner afirmó que la separación de ácidos grasos libres mediante destilación a vacío es eficaz, pero usando CO₂ supercrítico, dicha separación se puede llevar a cabo a temperaturas mucho menores [127]. Molero Gómez y Martínez de la Ossa compararon la extracción de germen de trigo con CO₂ supercrítico y con hexano, llegando a la conclusión de que la SFE es competitiva económicamente ya que simplifica las etapas de refinado y elimina por completo la etapa de destilación con disolvente, siendo estas etapas las más costosas en términos de

consumo energético [128]. Friederich y List compararon la extracción con CO₂ supercrítico y con hexano de aceite de soja comprobando que se obtenían rendimientos similares (en torno al 20%) y la misma composición de AG [129].

Debido a sus condiciones suaves de extracción y la atmósfera no oxidante que proporciona, la SFE con CO₂ supercrítico es una herramienta ideal para la extracción de antioxidantes lipídicos [130]. No obstante, también se ha comprobado que a veces la estabilidad oxidativa de los aceites de nuez [321-322] y de girasol [131] extraídos por SFE con CO₂ es menor que en el aceite obtenido a través de métodos mecánicos. Se piensa que estas diferencias se podrían deber al contenido en O₂ que podría tener el CO₂ supercrítico empleado en estos estudios. Esta inestabilidad es mayor cuando se tratan aceites refinados con CO₂ supercrítico, ya que el contenido de tocoferoles de partida es menor, pudiéndose mejorar añadiendo trazas de ácido ascórbico [131].

Cheung y colaboradores compararon la extracción de lípidos a partir de algas pardas (*Sargassum hemiphyllum*) mediante extracción con CO₂ supercrítico y extracción Soxhlet, obteniendo altos rendimientos comparables a la extracción Soxhlet. Además obtuvieron cantidades de AG ω -3 significativamente superiores mediante SFE [132].

Modificación química de lípidos

Una reacción química en la que, a partir de unas moléculas se obtienen unos productos diferentes, siempre implica una redistribución de enlaces [133]. Cuando, por ejemplo, representamos una reacción como $A+B \rightarrow C+D$, estamos indicando implícitamente un balance de materia, es decir, que los átomos presentes en A y B se encuentran también en C y D, aunque, evidentemente, están distribuidos de forma diferente.

Una reacción química puede considerarse tanto desde una perspectiva termodinámica como desde un punto de vista cinético. En el primer caso, lo más inmediato es indicar el cambio de energía libre que se produce al transcurrir la reacción. Por ejemplo, si la reacción $A+B \rightarrow C+D$ transcurre en condiciones estándar, la variación de energía libre es ΔG° . Evidentemente, el valor de esta magnitud no representa la variación real de energía libre, ya que raras veces se dará la reacción en condiciones estándar, es decir, con todos los reactivos y productos a concentración 1M. Pero sí aporta un dato valioso: un valor de ΔG° negativo, por ejemplo, indica que la reacción

tiende a producirse de izquierda a derecha, aunque las condiciones actuales puedan obligar a lo contrario. En las reacciones de hidrólisis ΔG° es siempre negativo: el aumento de entropía que implica la escisión hidrolítica de un compuesto químico es responsable de ello. Los aceites comestibles, por concretar, son triésteres de glicerol con ácidos grasos, luego para su hidrólisis $\Delta G^\circ < 0$. Si se mezcla el aceite (A) con agua (B), necesariamente se tendrá $\Delta G < 0$. La reacción de hidrólisis, en principio, debe producirse con una gran liberación de energía, pero todos tenemos experiencia de que al mezclar aceite con agua, el aceite permanece inalterado durante mucho tiempo. La razón de esta aparente paradoja estriba en que en una reacción química, para que los reactivos se conviertan en productos es preciso pasar por un estado intermedio, el estado de transición. Como se esquematiza en la Figura 3, en el estado de transición ni se han terminado de romper los enlaces que hay en A y B, ni se han acabado de formar los que han de aparecer en C y D. El estado de transición representa una situación inestable, de modo que, para pasar de A+B a C+D, es necesario comunicar a los reactivos la energía necesaria para que alcancen el estado de transición. Esta energía se denomina energía de activación, y se representa con el símbolo ΔG^\ddagger . Es evidente que la existencia de un estado de transición implica una dificultad al progreso de la reacción y que cuanto mayor sea el valor de ΔG^\ddagger , tanto más difícil será que la reacción se produzca.

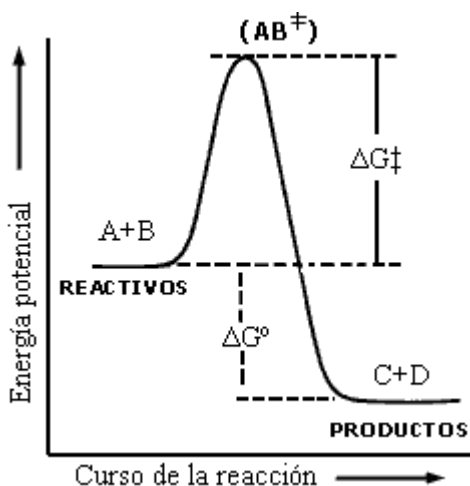


Figura 3. Esquema del curso de una reacción donde se representa el estado de transición.

La consideración de una reacción desde un punto de vista cinético es fácil si se trata de una reacción elemental. Por ejemplo, para una reacción $A \rightarrow B$, la velocidad,

$$v = \frac{d[B]}{dt}$$

será proporcional a la concentración de A, es decir, $v=k[A]$. La constante de proporcionalidad, k , recibe el nombre de constante cinética y mide la facilidad intrínseca con que los reactivos se convierten en productos. Si la reacción elemental implica dos moléculas, es evidente que la velocidad dependerá de la concentración de ambas de modo que $v=k[A][B]$.

Las consideraciones elementales anteriores, sobre cinética y termodinámica de reacciones químicas no son independientes. Intuitivamente se puede pensar que debe existir una relación entre ΔG^\ddagger y k , de modo que una energía de activación grande, al implicar un mayor obstáculo al avance de la reacción, se correlaciona con una constante cinética pequeña. Por otro lado, es también evidente que el valor de la energía de activación no tiene ningún efecto sobre el balance energético de la reacción. Independientemente de cuál sea la magnitud de ΔG^\ddagger , ΔG° permanece invariable. En el transcurso de la reacción, la energía de activación que hay que comunicar a los reactivos para que alcancen el estado de transición, es devuelta al pasar desde este a los productos.

Continuando con el ejemplo de la hidrólisis de un éster, donde A y B son el éster y el agua respectivamente, mientras que C y D representan al ácido y el alcohol resultantes. En el estado de transición el desplazamiento parcial de los electrones del enlace C=O hacia el oxígeno hace posible que un par de electrones libres del agua realice un ataque nucleofílico al carbono del éster. Como consecuencia, aparece un enlace parcial entre el átomo de carbono, que pasa a ser tetraédrico, y el oxígeno del agua. Pero éste queda con una carga parcial positiva y esta es la causa principal de la inestabilidad del estado de transición, ya que el oxígeno es un elemento electronegativo. De hecho, esta inestabilidad puede implicar una energía de activación tan elevada que en muchos casos la reacción de hidrólisis de ésteres, pese a ser exergónica, no se produce al mezclarlos con agua.

No obstante, la química orgánica enseña que en presencia de sosa concentrada sí se produce la hidrólisis de los ésteres. Desde tiempo inmemorial se ha empleado este procedimiento para fabricar jabones sólidos (sales sódicas de los ácidos grasos) a partir de grasas y aceites. Este proceso precisamente ha dado el nombre, saponificación, a la reacción de

hidrólisis de ésteres en presencia de una base fuerte como la sosa. ¿Cuál es el motivo por el que una base facilita la reacción de hidrólisis? Hay que advertir que lo esencial de una base es que posea un par de electrones libres capaces de captar un protón. Pues bien, la base puede ceder parcialmente sus electrones libres a la molécula de agua reactiva, de modo que compense la carga negativa que poseería de otro modo el oxígeno en el estado de transición. En consecuencia, la inestabilidad del estado de transición (y la energía de activación) disminuye. Por lo que se ha comentado antes, la reacción se acelera en presencia de la base. Además al término de la reacción, los productos formados son los mismos que si la base no hubiera estado presente y, lo que es más importante, la base se recupera en el mismo estado inicial. De este modo, la base acelera la reacción sin consumirse en ella. Este es el rasgo fundamental de un catalizador químico: facilitar cinéticamente las reacciones sin gastarse. Una única molécula de catalizador puede participar así en la transformación de un número muy elevado (en teoría, indefinido) de moléculas de reactivos. Un catalizador, aunque estabiliza el estado de transición y rebaja, por tanto, la energía de activación, no altera el balance termodinámico de la reacción. El valor de ΔG° no se afecta y, como $\Delta G^\circ = RT \ln K_{eq}$, el estado final de la reacción, (el estado de equilibrio termodinámico), no se afecta por la presencia de un catalizador; simplemente, se alcanza más rápidamente.

Por otro lado no hay que olvidar que la reacción transcurre en disolución, y que las moléculas, por tanto, poseen libertad de movimiento. Teniendo presente esta circunstancia, es razonable pensar que la estabilización del estado estacionario es un suceso sumamente improbable. En efecto, exige la concurrencia de tres moléculas, la del éster, la de agua y la base con una disposición espacial concreta. No basta que la molécula de agua se acerque a la del éster; es preciso que lo haga de modo que uno de los pares de electrones libres del oxígeno quede orientado hacia el carbono para poder realizar el ataque nucleofílico. Y la base debe acercarse a la molécula de agua de forma que sus electrones libres queden en proximidad de uno de los átomos de hidrógeno del agua. Por este motivo, en las reacciones de saponificación se emplea sosa muy concentrada: la abundancia de iones OH^- , aumenta la probabilidad de la formación de este complejo.

El ejemplo que se ha mencionado corresponde a un tipo particular de catálisis, la catálisis ácido-base. Pero los rasgos fundamentales de la catálisis, es decir, rebajar la energía de activación por estabilizar el estado de transición (y, por ende, facilitar cinéticamente la reacción),

no consumirse en ella y no alterar su balance termodinámico, son comunes a todos los mecanismos catalíticos.

Los catalizadores que emplean los organismos vivos son las enzimas. Llama la atención que las enzimas son catalizadores mucho más eficaces que cualquier catalizador químico. Se acaba de hablar de la saponificación de los ésteres. Pues bien, para completar la reacción de hidrólisis de una grasa en presencia de NaOH concentrada (p. ej., 1 M) hacen falta unas 3 horas a 100°C aproximadamente. Sin embargo, la digestión de las grasas en el organismo, que implica su hidrólisis, se completa en mucho menos tiempo y a 37° C, gracias a la actuación de unas enzimas, las lipasas. Además, las enzimas poseen otra propiedad de la que carecen los catalizadores químicos: la especificidad. La catálisis que ejerce la sosa, puede emplearse para la hidrólisis de cualquier éster, pero también para la hidrólisis de amidas, de anhídridos, etc. e incluso para otras reacciones no hidrolíticas. Sin embargo, una hidrolasa (una enzima que cataliza reacciones de hidrólisis) no es capaz de catalizar otro tipo de reacciones. Más aún, las enzimas no sólo poseen especificidad de reacción, sino también de sustrato. Una lipasa no hidroliza (al menos, no lo hace con eficacia) un éster distinto de un triacilglicerol, ni una amida, etc. Y la asparaginasa, enzima que hidroliza el enlace amida de la asparagina, no cataliza apenas la hidrólisis de la glutamina, que sólo difiere de la asparagina en poseer un átomo de carbono más.

En 1897 Sabatier y Senderens demostraron que los compuestos olefinicos se podrían reducir con hidrógeno en presencia de níquel o de otro catalizador metálico. Poco después Normann aplicó el proceso sobre grasas insaturadas. La hidrogenación parcial es un proceso muy utilizado para la modificación de aceites líquidos obtenidos a partir de semillas oleaginosas o de pescado [99].

En 1990 se afirmó que una tercera parte de las grasas comestibles eran hidrogenadas y sólo una décima parte procedían del fraccionamiento o la interesterificación. Estas proporciones han cambiado probablemente a la luz de los crecientes volúmenes de aceite de palma para el fraccionamiento, y la preocupación por los ácidos trans formados durante la hidrogenación parcial. La hidrogenación es adecuada para aceites vegetales altamente insaturados como los de soja, colza y algodón, así como para los aceites de pescado; mientras que el fraccionamiento es de mejor aplicación para el aceite de palma y otros aceites saturados.

Al hidrogenar parcialmente un aceite se producen los siguientes cambios:

- Un cambio en el punto de fusión del aceite como consecuencia de la mayor proporción de ácidos monoeno saturados y/o trans, esto afecta a la capacidad de ser extendido, a la respuesta oral, y al rendimiento de cocción. Se produce una mejora en la estabilidad frente a la oxidación atmosférica, ya que se produce una reducción de los niveles de ácidos poliinsaturados que son tan fácilmente oxidados.
- Se produce una reducción en el valor nutricional del producto, en relación con la reducción de los niveles de ácidos grasos esenciales (α -linolénico y linoleico), y en relación con el aumento de los niveles de AG trans y AG saturados. Es posible volver a agregar los ácidos grasos esenciales en el producto final mediante la mezcla con aceites apropiados.
- Debido a la reacción con el hidrógeno en presencia de un catalizador heterogéneo, los centros insaturados en el aceite a hidrogenar pueden sufrir uno de estos tres destinos: (1) El doble enlace puede reaccionar con el hidrógeno y se satura, como consecuencia de esto se reducen los ácidos dieno a monoenos y los ácidos monoeno se saturan. (2) El doble enlace puede cambiar la configuración de los isómeros naturales cis y transformarse en ácidos trans, estos tienen un punto de fusión más alto que los isómeros cis, por lo que este cambio conduce a un aumento en el punto de fusión sin ningún tipo de incorporación de hidrógeno o cambio en el índice de yodo. (3) La interacción entre el doble enlace, el catalizador y el hidrógeno puede llevar a la migración del doble enlace.

Cuando se hidrogena parcialmente el ácido linoleico se espera obtener sólo monoenos C18 ($\Delta 9$ y $\Delta 12$) pero cada uno de ellos puede continuar reaccionando. Bajo condiciones de hidrogenación selectiva extendida, el producto obtenido es más complejo y los ésteres de C18-monoeno pueden incluir los isómeros cis y trans desde $\Delta 5$ a $\Delta 15$ (22 isómeros).

La hidrogenación parcial es un proceso flexible y puede producir diferentes productos dependiendo de la naturaleza del material de partida, el grado de hidrogenación y la selectividad del catalizador, lo que influye en la proporción de los isómeros monoenos cis y trans y en las cadenas de acilo saturado. La naturaleza de los productos de hidrogenación se controla a través de las condiciones del proceso. Los factores más importantes son el catalizador (diámetro de poro, longitud de los poros, nivel de actividad y cantidad), la temperatura de reacción, la presión

de hidrógeno y el grado de agitación (que afecta a la transferencia de hidrógeno y aceite hacia y desde la superficie del catalizador). La hidrogenación (reducción) se ve favorecida por una alta concentración de hidrógeno en el catalizador (aumento de la presión, y aumento de agitación), mientras que la isomerización se ve favorecida por factores que conducen a un aumento en la demanda de hidrógeno (utilización de un aceite más insaturado, aumento de la temperatura y aumento de la concentración y actividad del catalizador).

El catalizador comercial que se utiliza es el níquel. La reacción se efectúa normalmente a temperaturas entre 180 y 200°C y a una presión alrededor de 3 bar. Los catalizadores son mejorados continuamente. El Informe Hastert [134] mostró como la carga de níquel caía continuamente desde el 0,25% (antes de 1960) al 0,1% (en 1970) y 0,05-0,1% (en 1990), actualmente lo normal es una carga de níquel de entre 0.025 y 0.05%. Esto es en parte una consecuencia en la mejora de diseño de la planta, pero además se debe considerar que el área superficial del catalizador ha aumentado de 70m²/g en 1970 a 180m²/g en 1993. Desarrollos interesantes que se están llevando a cabo implican el uso de metales preciosos (platino y paladio) que, aunque más caros, ofrecen una mayor velocidad de reacción a menores temperaturas y con menos formación de isómeros trans. De esta manera la hidrogenación podrá continuar existiendo como una técnica de procesamiento adecuada por muchos años.

Por otro lado King y col. describieron un proceso de hidrogenación de aceites vegetales utilizando mezclas de CO₂ supercrítico e hidrógeno. Este proceso se llevó a cabo con presiones superiores a 138 bar y temperaturas de 120-140°C y un catalizador convencional de Ni [135], de esta manera se utiliza el fluido supercrítico como medio de la reacción.

La producción de grasas para untar, como alternativa a la mantequilla, ha conducido a una mayor demanda de grasas sólidas. La mayor parte de esta demanda ha sido satisfecha por el uso de aceites vegetales parcialmente hidrogenados, pero la preocupación sobre los efectos de los ácidos insaturados trans, ha aumentado el interés en buscar formas alternativas para la producción de grasas con el punto de fusión requerido. Esto se puede lograr por interesterificación de las grasas naturales o previamente fraccionadas. Los productos obtenidos de esta manera probablemente contienen más ácidos grasos saturados que sus equivalentes parcialmente hidrogenados, pero no tendrán ningún ácido graso trans [136]. La interesterificación puede llevarse a cabo utilizando un catalizador químico o enzimático.

La interesterificación se efectúa generalmente en lotes de 10-15 toneladas a 80-90°C durante 30-60 minutos, a un costo no muy diferente al de la hidrogenación parcial. No requiere equipos costosos ni el uso de gases explosivos. Para obtener un producto con las propiedades deseadas un aceite “blando” es interesterificado con un uno “duro”, que puede ser una estearina fraccionada, un aceite láurico, o un aceite de semilla totalmente hidrogenado. Esta última es una opción aceptable científicamente e industrialmente, pero tiene la desventaja de que la palabra hidrogenado tendrá que aparecer en la etiqueta. El cliente medio no aprecia la diferencia entre grasas parcialmente hidrogenadas (con AGI trans) y totalmente hidrogenadas (sin AG insaturados).

El catalizador empleado normalmente es un metal alcalino en una concentración de 0,1-0,2% o un alcoholato de sodio (por lo general metóxido de sodio) a una concentración de 0.2-0.3%. Se cree que el verdadero catalizador es un anión DAG obtenido como resultado de la interacción del álcali con el triglicérido. Puesto que el catalizador es fácilmente destruido por ácido, agua o peróxidos, el aceite a interesterificar debe estar libre de estas impurezas. Los aceites naturales y aceites fraccionados por lo general no tienen sus cadenas de acilo organizadas de forma aleatoria, la interesterificación con un catalizador químico provoca que estos AG se dispongan aleatoriamente en el triglicérido. No hay ningún cambio en la composición de ácidos grasos, sólo en la composición de los triglicéridos, pero esto conduce a una modificación de las propiedades físicas de la grasa. Con catalizadores enzimáticos se pueden lograr interesterificaciones selectivas.

Las aplicaciones típicas de la interesterificación son las siguientes:

- Las estructuras cristalinas de las margarinas obtenidas a base de aceite de girasol o de colza, junto con los aceites hidrogenados, se estabilizan por interesterificación, que conduce a la asignación al azar de los ésteres de glicerol.
- Se obtienen grasas sólidas con un 60% de ácidos grasos esenciales por medio de la interesterificación del aceite de girasol con un 5% de grasa “dura”.
- La margarina producida por interesterificación, por ejemplo de estearina de palma y aceite de girasol (1:1), no contiene grasas hidrogenadas y por lo tanto tampoco ácidos trans.
- La interesterificación química se utiliza en la producción de caprenin, salatrim y olestra.

La interesterificación también puede ser catalizada por enzimas, muchas de las cuales muestran útiles características de especificidad. Las lipasas 1,3-específicas, tales como las derivadas de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *arrhizus*, *Rhizopus delemar* y *Rhizopus niveus* son particularmente útiles para la interesterificación. Estas enzimas se utilizan para llevar a cabo el intercambio de acilo en las posiciones sn-1 y sn-3, dejando grupos acilo en la posición sn-2 sin alterar. [138].

Unilever tiene una patente para la mejora de la fracción media del aceite de palma para obtener un equivalente a la manteca de cacao. La fracción media del aceite de palma es rica en ácido palmítico y tiene muy poco ácido esteárico, esta deficiencia puede paliarse por acidólisis enzimática con ácido esteárico. La reacción se limita al intercambio de ácido palmítico por ácido esteárico en las posiciones sn-1 y sn-3, dejando inalterado el ácido oleico en la posición sn-2. La interesterificación química daría lugar a la asignación aleatoria de todas las cadenas de acilo en el triglicérido, y los productos obtenidos tendrían un comportamiento de fusión diferente del requerido para un equivalente a la manteca de cacao. Otro de los productos fabricados por Unilever utilizando la interesterificación enzimática, con nombre Betapol, se utiliza como componente de preparados para lactantes [137].

Bohenin es el nombre dado a glicerol 1,3-behenato 2-oleato, que inhibe la floración de grasa cuando se añade al chocolate. Se produce en Japón por interesterificación enzimática de trioleína y ácido behénico (C22:0) en presencia de una lipasa 1,3 estereoespecífica.

Existe gran cantidad de trabajos que muestran cómo, con una enzima apropiada como *Mucor miehei* o *Candida antarctica*, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el EPA y/o DHA pueden ser introducidos en los aceites vegetales o glicéridos sintéticos para dar productos con mayor valor nutritivo. De la misma manera AG C8 y C10 pueden ser introducidos en aceites vegetales, con el consiguiente cambio en las propiedades nutricionales y valores de energía. Los triglicéridos que se obtienen de esta manera pueden tener un AGCL y dos AGCC o dos AGCL y un AGCC [138]. Esta reacción puede ser utilizada para producir triglicéridos con ácidos de cadena corta y media en las posiciones sn-1 y sn-3 fácilmente metabolizables, y un ácido graso esencial en la posición sn-2. Este tema ha sido objeto de revisión [139].

Modificación enzimática de lípidos

Las enzimas son sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles. En estas reacciones, las moléculas sobre las que actúa la enzima son llamadas sustratos, y estas los convierten en diferentes moléculas, los productos. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran en tasas significativas. Las reacciones mediadas por enzimas se denominan reacciones enzimáticas.

Las enzimas son generalmente proteínas globulares que pueden presentar tamaños muy variables. Las actividades de las enzimas vienen determinadas por su estructura tridimensional, que a su vez viene determinada por la secuencia de aminoácidos. Casi todas las enzimas son mucho más grandes que los sustratos donde actúan, y solo una pequeña parte de la enzima (alrededor de 3 o 4 aminoácidos) está directamente involucrada en la catálisis. La región que contiene estos residuos encargados de catalizar la reacción es conocida como centro activo. Las enzimas también pueden contener sitios con la capacidad de unir cofactores, necesarios a veces en el proceso de catálisis, o de unir pequeñas moléculas, como los sustratos o productos (directos o indirectos) de la reacción catalizada. Estas uniones pueden incrementar o disminuir la actividad enzimática, dando lugar así a una regulación por retroalimentación.

Al igual que las demás proteínas, las enzimas se componen de una cadena lineal de aminoácidos que se pliega durante el proceso de traducción para dar lugar a una estructura terciaria tridimensional, susceptible de presentar actividad. Cada secuencia de aminoácidos es única y por tanto da lugar a una estructura única, con propiedades únicas. En ocasiones, proteínas individuales pueden unirse a otras proteínas para formar complejos, en lo que se denomina estructura cuaternaria de las proteínas.

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación (ΔG^\ddagger) para una reacción (Figura 4), así se acelera la tasa de la reacción. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más deprisa que la correspondiente reacción no catalizada.

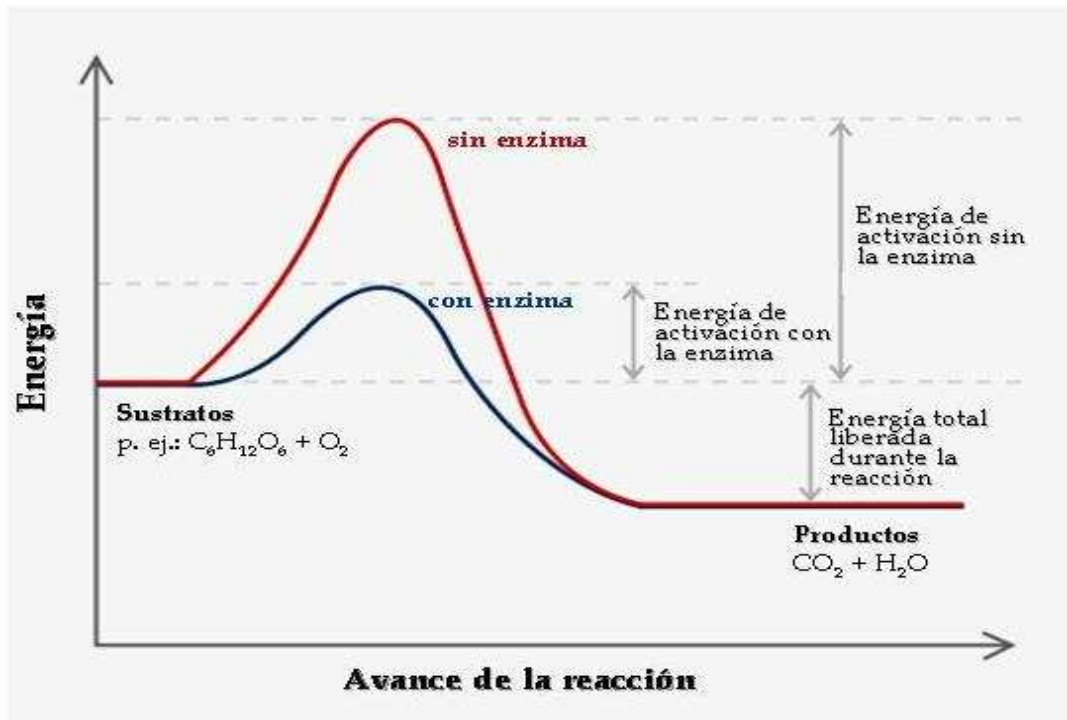


Figura 4. Estabilización del estado de transición cuando una reacción es catalizada por una enzima.

Al igual que ocurre con otros catalizadores, las enzimas no son consumidas por las reacciones que catalizan, ni alteran su equilibrio químico. Sin embargo, las enzimas difieren de otros catalizadores por ser más específicas.

El modelo de ajuste inducido es el más utilizado al realizar estudios de interacción enzima-sustrato. Este modelo propone que las interacciones iniciales entre la enzima y el sustrato son relativamente débiles, pero suficientes para producir ciertos cambios conformacionales en la enzima, que estabilizan e incrementan la fuerza de la interacción. Estos cambios conformacionales implican a una serie de aminoácidos catalíticos del centro activo, en los cuales se producen los enlaces químicos correspondientes entre la enzima y el sustrato. Después de la unión, uno o más mecanismos de catálisis disminuyen la energía del estado de transición de la reacción, por medio de una ruta alternativa a la reacción.

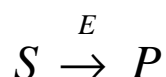
Cinética enzimática

Uno de los objetivos más importantes en los estudios de la cinética enzimática es determinar el mecanismo químico que subyace en la reacción enzimática, por ejemplo, determinar la

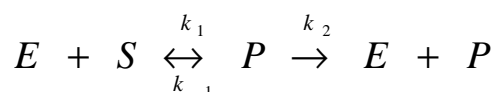
secuencia ordenada de sucesos que transcurren en la transformación de sustrato en producto. Las aproximaciones cinéticas discutidas posteriormente pueden proporcionar información relacionada con la velocidad de reacción de los intermediarios enzimáticos formados, pero no permitirán identificar qué intermediarios son exactamente.

Cinética de Michaelis-Menten

Para conocer las claves moleculares de la acción eficaz y específica de las enzimas es necesario estudiar los trabajos de Leonor Michaelis (1875-1949) y Maud Menten (1879-1960) [140]. El primero era un joven profesor de la universidad de Berlín; la segunda, una doctora de origen canadiense, aún más joven. Sus nombres han pasado a la historia de la bioquímica, hasta el punto que se puede decir que la Enzimología comienza realmente con ellos. Michaelis y Menten se interesaron por la reacción catalizada por la invertasa, una enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa para producir glucosa y fructosa, reacción que se podría abreviar como:



donde E representa a la enzima y P a los productos de la reacción. Como esta reacción es irreversible, a simple vista, la velocidad de la reacción vendría dada por $v=k[S]$, en la que k sería la constante cinética. Esta ecuación implicaría que, al representar v en función de [S], se debería obtener una línea recta, que pasaría por el origen y cuya pendiente sería k. No obstante, la representación era muy diferente. Como ya había observado Víctor Henri en 1903 [141], se obtenía una curva de pendiente continuamente decreciente, que tendía asintóticamente a un valor de velocidad que no se podía superar por mucho que se elevara la concentración del sustrato. Pero Henri no acertó a comprender la razón de este resultado que, por el contrario, fue el punto de partida del modelo de Michaelis y Menten. Supusieron estos autores que, para que el sustrato se convirtiera en producto, un requisito esencial era que se uniera previamente a la enzima, formando un complejo. La propuesta de de Michaelis y Menten se esquematiza pues:



Esquema 1. Mecanismo de unión de único sustrato para una reacción enzimática. k_1 , k_{-1} y k_2 son las constantes cinéticas para cada una de las etapas de la reacción.

Hoy en día estamos tan acostumbrados a ver este esquema como prototipo de una reacción enzimática, que puede costar trabajo comprender el verdadero mérito de Michaelis y Menten al proponerlo. Efectivamente, si el sustrato debe formar un complejo con la enzima (lo que, posteriormente, se ha llamado el complejo de Michaelis), la velocidad de la reacción, es decir, la velocidad de aparición del producto, vendrá dada por $v=k_2[ES]$. Y es evidente que la concentración de complejo ES no puede superar el valor de la concentración total de enzima, lo que justifica que la velocidad tienda asintóticamente a un valor máximo al aumentar la concentración de sustrato.

El modelo de Michaelis-Menten implica que la unión de la enzima con el sustrato no se efectúa por una simple adsorción inespecífica, sino que tiene lugar a través de una localización concreta de la enzima, llamada centro activo. El sustrato encaja en el centro activo, en primer lugar porque sus estructuras son más o menos complementarias desde un punto de vista estérico. Pero además, y esto es más importante, se establecen múltiples interacciones entre los aminoácidos que forman el centro activo y el sustrato. Se trata de interacciones no covalentes, débiles cada una de ellas, pero fuertes en su conjunto al ser muy numerosas. Tanto la complementariedad estérica del centro activo y el sustrato, como el establecimiento de múltiples interacciones, explican la especificidad de la interacción enzima-sustrato.

Si se admite la existencia del complejo de Michaelis como un intermediario en la conversión del sustrato en producto, es posible desarrollar la ecuación que relaciona la velocidad de la reacción con la concentración de sustrato. Se ha comentado antes que $v=k_2[ES]$ y existen diversos procedimientos para expresar $[ES]$ en función de la concentración de sustrato. Uno de ellos es considerar que la reacción enzimática transcurre mayoritariamente en el estado estacionario, que es el periodo de tiempo durante el cual se puede suponer que la concentración de ES permanece constante, ya que se forma a partir de la enzima y el sustrato libres a la misma velocidad que desaparece para disociarse y para formar producto, y como en la inmensa mayoría de los casos, comienza antes de 0,1s tras la mezcla de la enzima y el sustrato y se prolonga varios minutos, la suposición de estado estacionario es habitualmente válida. En el estado estacionario:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

e imponiendo esta condición en las ecuaciones cinéticas, se llega a:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}}$$

Ecuación 1.

Esta es la famosa ecuación de Michaelis-Menten; es la ecuación de una hipérbola. Su representación gráfica, limitada al primer cuadrante, el único en que tiene sentido físico la ecuación, se puede observar en la Figura 5. Como era de esperar, la representación satisface la observación experimental de que la velocidad no aumenta indefinidamente, sino que tiende asintóticamente a V_{\max} , el valor máximo que puede alcanzar la velocidad en respuesta a un aumento en la concentración de sustrato. Si la reacción enzimática se describiera adecuadamente por el esquema 1, la velocidad máxima sería el producto de k_2 por $[E]_0$, la concentración total de enzima en términos de centros activos. Pero, en general, el Esquema 1 es sólo una aproximación, y el mecanismo de la reacción enzimática implica un número superior de etapas entre la formación del complejo de Michaelis y la formación del producto. En general, se puede escribir:

$$V_{\max} = k_{cat} [E]_0$$

Ecuación 2.

donde k_{cat} , constante catalítica o número de recambio, es una constante, combinación de todas las constantes cinéticas de las etapas comprendidas entre el complejo de Michaelis y la formación del producto. Sus dimensiones son de (tiempo)⁻¹. La Ecuación 2 permite elaborar una definición de constante catalítica como el número máximo de moléculas de sustrato que cada centro activo es capaz de transformar en producto en una unidad de tiempo. La actuación de una

enzima tiene un carácter cíclico ya que, al no consumirse en la reacción, una molécula de enzima es capaz de catalizar la transformación de muchas moléculas de sustrato, es decir, de realizar muchos ciclos de catálisis. Pues bien, a la vista de estas consideraciones, la constante catalítica se podría definir como el número máximo de ciclos de catálisis que cada centro activo puede realizar en la unidad de tiempo.

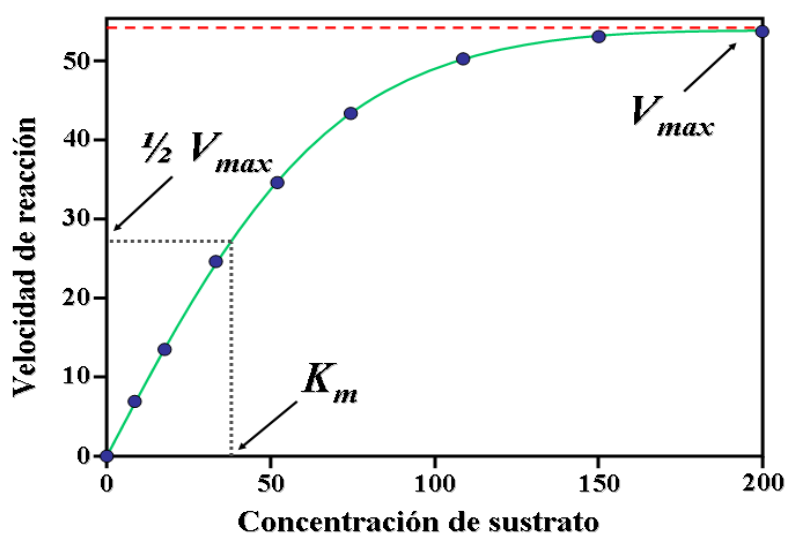


Figura 5. Representación gráfica de la curva de saturación de una enzima donde se puede observar cómo evoluciona la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de la reacción.

En la Ecuación 1 aparece un parámetro, K_m , constante de Michaelis, que algebraicamente resulta de una combinación de las diferentes constantes cinéticas. Su sentido físico, como concentración de sustrato para la que se alcanza una velocidad igual a $V_{max}/2$, se puede obtener fácilmente a partir de la Ecuación 1 y se recoge en la Figura 5. Es importante observar que la constante de Michaelis tiene dimensiones de concentración. Aunque no sea tan evidente y tan general, la constante de Michaelis tiene también el significado de constante de disociación aparente de los complejos enzima-sustrato en el estado estacionario. Finalmente, hay que advertir que la validez de la Ecuación 1 no se restringe al caso del simple mecanismo representado por el Esquema 1. Ya se ha apuntado que puede aplicarse a otros mecanismos más complejos; lo que variará en cada caso es la forma de las expresiones algebraicas que relacionan K_m y k_{cat} con las diferentes constantes cinéticas, pero en todos los casos son válidos los significados físicos que se han dado para esos parámetros. También es válida la ecuación de

Michaelis-Menten en el caso de que la reacción sea reversible, siempre que las velocidades se determinen en los momentos iniciales del estado estacionario. La notación v_0 que aparece en la Ecuación 1 significa precisamente velocidad inicial. Incluso es posible aplicar la Ecuación 1 a reacciones que impliquen más de un sustrato, si se expresa la velocidad de la reacción en función de la concentración de un sustrato, manteniendo constante la concentración de los demás. Naturalmente, en estos casos los valores de K_m y k_{cat} son valores aparentes, dependientes de la concentración de aquellos sustratos que no se han variado durante la reacción.

Reacciones multisustrato

Los sistemas en los que intervienen diferentes sustratos (multisustrato) no pueden ser descritos adecuadamente por ecuaciones de velocidad derivadas de suposiciones de rápido equilibrio. Las reacciones multisustrato siguen una serie de complejas ecuaciones que describen cómo se unen los sustratos y en qué orden lo hacen. Para obtener las ecuaciones de velocidad de estas reacciones se utilizan aproximaciones como las del método de King-Altman [142] o la modificación de este de Cha [143].

El análisis de estas reacciones es mucho más sencillo si la concentración del sustrato A se mantiene constante y la del sustrato B varía. En estas condiciones, la enzima se comporta igual que en una reacción de un único sustrato, por lo que en una gráfica de velocidad la concentración de sustrato dará unos valores aparentes de las constantes cinéticas, K_m y V_{max} , para el sustrato B. Si se realizan una serie de medidas a diferentes concentraciones fijas de sustrato A, los datos obtenidos permitirán saber a qué tipo de mecanismo pertenece la reacción enzimática.

Para una enzima que una dos sustratos A y B, y los transforme en dos productos P y Q, existen dos tipos de mecanismos descritos hasta ahora.

- Mecanismo de complejo ternario
- Mecanismo de ping-pong

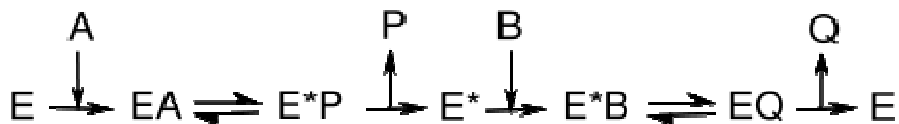
Mecanismo de complejo ternario



Esquema 2. Mecanismo de complejo ternario al azar para una reacción enzimática. La enzima E une los sustratos A y B y libera los productos P y Q en un orden no definido.

Las enzimas (E) que presentan este mecanismo de reacción unen al mismo tiempo los dos sustratos (A y B), dando lugar a un complejo ternario EAB. El orden secuencial de unión de los sustratos puede ser al azar (mecanismo al azar) o seguir un orden particular (mecanismo ordenado). Si fijamos la concentración del sustrato A y variamos la de B, y representamos gráficamente el comportamiento de la enzima mediante un diagrama de Lineweaver-Burke, obtendremos una serie de rectas con un punto de intersección común a todas ellas.

Mecanismo de ping-pong



Esquema 3. Mecanismo de ping-pong para una reacción enzimática. La unión de los sustratos A y B tiene lugar en un orden definido y secuencial, por medio de un intermediario enzimático modificado, E*.

Como se puede apreciar en la figura superior, las enzimas con un mecanismo de ping-pong pueden presentar dos estados, la conformación normal (E) y la conformación modificada químicamente (E*) o conformación intermedia. En este tipo de mecanismo, el sustrato A se une a la enzima E, que pasa a un estado intermedio E*, por ejemplo, por transferencia de un grupo químico al centro activo de la enzima. En este momento puede ser liberado el primer producto de la reacción (P). Únicamente cuando el sustrato A ya ha sido liberado del centro activo en forma de P, y la enzima está activada en forma de E*, la enzima puede unirse al sustrato B, que devuelve a la enzima modificada E* a su estado original E, y liberarlo en forma de producto Q. Si

fijamos la concentración de A y variamos la de B, y representamos gráficamente el comportamiento de la enzima con mecanismo de ping-pong en un diagrama de Lineweaver-Burke, obtendremos una serie de rectas paralelas entre sí.

Lipasas

Las lipasas (acilglicerolhidrolasas E.C.3.1.1.3) son enzimas que actúan en la célula como catalizadores en reacciones lipolíticas (catabolismo de grasas y aceites) a través de la hidrólisis de los enlaces éster de acilgliceroles [346-349]. Son activas únicamente adsorbidas sobre una interfase oleo-acuosa, "activación interfacial". La mayoría de las lipasas tienen un elemento estructural diferenciador, la tapadera, que está formada por un oligopéptido helicoidal anfipático, que se coloca sobre el centro activo de la lipasa cuando está inactivo. Tiene dos conformaciones: abierta (en interfase o medio orgánico) y cerrada o inactiva (en medio acuoso). Cuando la lipasa está en una interfase hidrófoba la tapadera se desplaza dejando libre el sitio activo, produciéndose la llamada activación interfacial. El sitio activo se caracteriza por estar formado por la llamada triada catalítica (Serina-Histidina-Aspartato ó ácido glutámico) que es crucial en todas las reacciones catalizadas por lipasas [346, 349].

Además de las funciones biológicas en bacterias, hongos, plantas y animales, las lipasas tienen un gran interés en numerosos procesos industriales, detergentes, alimentos, industrias del sabor, producción de fármacos, derivados de esteres y amino ácidos, uso en química fina, agroquímicos, uso como biosensores, biorremediación, cosméticos y perfumería [273, 276]. Además, las lipasas son las enzimas más utilizadas en la síntesis química orgánica, catalizan la quimio-, regio- y/o estereo-selectividad de la hidrólisis de los ésteres de ácidos carboxílicos o la reacción inversa en disolventes orgánicos [273-276].

La disponibilidad de las lipasas y su utilidad ha sido revisada en numerosas ocasiones [329, 350-352]. Las reacciones enzimáticas tienen varias ventajas potenciales sobre las reacciones similares no enzimáticas. Por lo general se producen en condiciones más suaves de temperatura y pH, por tanto son menos propensas a inducir cambios no deseados, especialmente en los ácidos grasos poliinsaturados.

De mayor importancia es su especificidad. Las lipasas pueden ser regio-específicas, estereo-específicas o específicas estructurales. Lipasas, como las obtenidas a partir de *Aspergillus niger*,

Mucor javanicus., *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delegar* y *Rhizopus niveus* son 1,3-específicas. Esto significa que en las reacciones los cambios en los triglicéridos se limitan a las posiciones sn-1 y sn-3, los grupos acilo en posición sn-2 se mantienen inalterados. Esta especificidad es explotada con frecuencia en la interesterificación enzimática. Unas importantes lipasas específicas estructurales son las que discriminan a las cadenas de acilo con dobles enlaces cerca del grupo carboxilo. Esto incluye los ácidos con insaturación en la posición 4 (DHA), la posición 5 (ácido araquidónico y el EPA) y la posición 6 (γ -linolénico). La lipólisis de los triglicéridos que contienen tales ácidos grasos lleva a la hidrólisis preferencial de AG saturados y de AGI dejando residuos de ésteres de glicerol (mono-, di- y triglicéridos), enriquecidos en ácidos grasos con insaturaciones en las posiciones $\Delta 4$, $\Delta 5$ o $\Delta 6$. Por otra parte, si la enzima se utiliza para promover la esterificación de una mezcla de ácidos grasos estos serán discriminados. Estos AG serán esterificados con menos facilidad y por lo tanto se concentrarán en los residuos de AG sin reaccionar. La esterificación con butanol ha sido ampliamente utilizada, pero parece que hay alguna ventaja en el uso de alcohol láurico. Algunas compañías ofrecen aceites de onagra y borraja con el doble de nivel de γ -linolénico, obtenido a través de modificación enzimática.

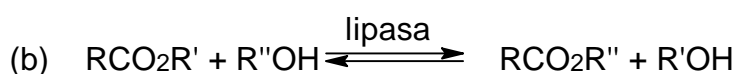
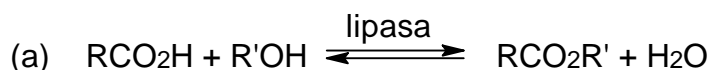
Las reacciones que llevan a cabo las lipasas son:

1) **Hidrólisis:** Ruptura de un enlace éster existente entre un alcohol y un ácido por la acción de una molécula de agua que actúa como nucleófilo. En el caso de la hidrólisis de un triglicérido se rompe el enlace éster existente entre el ácido graso y el glicerol para obtener el ácido graso libre y el alcohol, la lipasa utiliza una molécula de agua para realizar la catálisis.

2) **Alcoholisis:** Ruptura del enlace éster existente entre un ácido y un alcohol por la acción de una molécula de etanol que actúa como nucleófilo. En el caso de la alcoholisis de un triglicérido se rompe el enlace éster existente entre el ácido graso y el glicerol para obtener el éster etílico del ácido graso (fatty-acid-ethyl-ester FAEE) y el alcohol, la lipasa utiliza una molécula de etanol para realizar la catálisis.

3) **Glicerolisis:** Ruptura de un enlace éster existente entre un ácido y un alcohol por la acción de una molécula de glicerol que actúa como nucleófilo. En el caso de la glicerolisis de un triglicérido se rompe el enlace entre el ácido graso y el glicerol para obtener un diacilglicerol (DAG) y un monoacilglicerol (MAG), la lipasa utiliza una molécula de glicerol para realizar la catálisis.

4) **Esterificación:** Proceso por el cual se forma un enlace éster. Un éster es un compuesto derivado formalmente de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol. La reacción de esterificación pasa por un ataque nucleofílico del oxígeno de la molécula del alcohol al carbono del grupo carboxilo. El protón migra al grupo hidroxilo del ácido que luego es eliminado como agua. Esta reacción también puede darse entre un ácido graso esterificado con alguna otra molécula, en este caso se denomina trans-esterificación.



(a) Esterificación y (b) trans-esterificación reversibles catalizadas por lipasa.

Inactivación enzimática

En las reacciones llevadas a cabo con lipasas se debe tener en cuenta que se trabaja con un biocatalizador proteico, por lo que se deben cuidar todos los aspectos que influyen en la conformación tridimensional de la proteína. Los factores que juegan un papel importante en la conformación tridimensional proteica son:

Temperatura: las enzimas son sensibles a la temperatura pudiendo verse modificada su actividad por este factor. Los rangos de temperaturas óptimos pueden llegar a variar sustancialmente de unas enzimas a otras. Normalmente, a medida que aumente la temperatura, una enzima verá incrementada su actividad hasta el momento en que comience la desnaturalización de la misma, que dará lugar a una reducción progresiva de dicha actividad.

pH: el rango de pH óptimo también es muy variable entre diferentes enzimas. Si el pH del medio se aleja del óptimo de la enzima, esta verá modificada su carga eléctrica, lo que modificará la estructura de los aminoácidos y por tanto la actividad enzimática.

Concentración salina: al igual que en los casos anteriormente mencionados, la concentración de sales del medio es crucial para una óptima actividad enzimática. Una elevada concentración o una ausencia de sales en el medio pueden impedir la actividad enzimática, ya

que las enzimas precisan de una adecuada concentración de iones para mantener su carga y su estructura.

Actividad de agua: Para que la enzima conserve su conformación tridimensional, y por tanto su actividad catalítica, debe estar rodeada de moléculas de agua, que no intervienen en la reacción que catalizan si no que se encuentran rodeando ciertos grupos polares de aminoácidos de la superficie de la enzima, lo que permite que esta mantenga su actividad catalítica. Estas moléculas de agua juegan un papel importante en las reacciones llevadas a cabo con lipasas no inmovilizadas, puesto que al encontrarse libres en el medio de reacción tienden a formar gotas de agua rodeadas de enzima, provocando agregación enzimática. Esta agregación impide que los sustratos lleguen con facilidad al centro activo de la enzima y por tanto disminuye la velocidad de reacción. La agregación enzimática debido a estas moléculas de agua que rodean los grupos polares de la enzima es doblemente perjudicial en las reacciones catalizadas por lipasas, puesto que los sustratos de estas son apolares. Además la agregación enzimática puede impedir que los centros activos trabajen con normalidad impidiendo por ejemplo la apertura de la tapa de la lipasa. Debido a esto es muy recomendable, al trabajar con lipasas, que estas se encuentren inmovilizadas sobre un soporte inerte que evite esta agregación.

En estas reacciones resulta necesario evaluar no solo el curso de la reacción con el tiempo para conocer su cinética, sino también la desactivación de la lipasa empleada durante el proceso. La estabilidad del biocatalizador va a condicionar la reutilización del mismo y por lo tanto el número de ciclos de reacción en los que el mismo lote de lipasa puede ser empleado.

Inmovilización enzimática

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente. Posteriormente esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas por su unión a un soporte [144].

La inmovilización enzimática produce ventajas como el aumento de la estabilidad del biocatalizador, la posibilidad de reutilización del derivado, lo que va a disminuir los costes del proceso, y la posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la

aplicación de la enzima inmovilizada. Por otro lado la inmovilización también acarrea ciertos inconvenientes como la alteración de la conformación de la enzima respecto a su estado nativo, la gran heterogeneidad del sistema enzima-soporte donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte, la pérdida de actividad de la enzima durante la movilización y por último el biocatalizador inmovilizado es más caro.

En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: inmovilización por retención física e inmovilización por unión química.

Métodos de inmovilización por retención física

Consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por pre-polímeros foto-entrecruzables o polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato [335-336], carraginato o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero. Seguidamente se inicia la polimerización por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. El atrapamiento puede ser en geles o en fibras, que suelen ser más resistentes que los geles. En el primer caso, la enzima queda atrapada en el interior de un gel, mientras que en el segundo caso la enzima se encuentra ocluida dentro de las microcavidades de una fibra sintética. El atrapamiento, de gran sencillez desde el punto de vista experimental, requiere poca cantidad de enzima para obtener derivados activos. Como ventaja adicional, la enzima no sufre ninguna alteración en su estructura. De todas formas, el atrapamiento requiere un control riguroso de las condiciones de polimerización, así como la comprobación de que la naturaleza química del proceso no altera los grupos reactivos de la proteína.

Inclusión en membranas

- **Microencapsulación:** En esta técnica, las enzimas están rodeadas de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (originadas por polimerización interfacial) o no permanentes (generadas por surfactantes, también llamadas "micelas reversas"). Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica, con tamaños comprendidos entre 1 y 100mm de diámetro.

- **Reactores de membrana:** El desarrollo de reactores o sistemas que contengan enzimas atrapadas ha despertado gran interés en la industria. Estos reactores emplean membranas permeables al producto final, permeables o no al sustrato inicial y obviamente impermeables a la enzima. Mediante una bomba se establece un flujo líquido de sustrato que atraviesa el reactor. En general, en esta metodología, se procede inicialmente a la adsorción de la enzima sobre la membrana que formará el reactor.

Métodos de inmovilización por unión química

Unión a soportes. Son los métodos de inmovilización más utilizados y de los que se dispone de una mayor información. La elección del soporte y del tipo de enlace resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Se debe procurar que la inmovilización incremente la afinidad por el sustrato, disminuya la inhibición, amplíe el intervalo de pH óptimo y reduzca las posibles contaminaciones microbianas. Además el soporte debe tener resistencia mecánica adecuada a las condiciones de operación del reactor y ser fácilmente separable del medio líquido para que pueda ser reutilizado.

Se han utilizado una gran variedad de materiales como soporte para la inmovilización de numerosas enzimas. Estos materiales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma, aunque generalmente se encuentran en forma de cilindro, hojas, fibras y más corrientemente en forma esférica. Los soportes pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- **Soportes inorgánicos.** Dentro de este grupo tenemos una gran variedad de soportes, que pueden ser naturales (bentonita, piedra pómez, sílice, etc.) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.).
- **Soportes orgánicos.** Las enzimas se pueden unir a estos soportes mediante adsorción o por unión covalente. Se pueden clasificar en:
 - Polímeros naturales, a su vez divididos en polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan, etc.) y proteínas fibrosas (colágeno, queratina, etc).

- Polímeros sintéticos a su vez divididos en poliolefinas (poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos, etc.) y otros tipos como alcohol polivinílico, poliamidas, etc.

Adsorción

En la adsorción, la enzima se une a un soporte sin funcionalizar mediante interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Los principales factores que influyen en la adsorción son:

- el pH del medio: controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y del sólido;
- la fuerza iónica: al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima, ya que los iones inorgánicos se unen con más fuerza al soporte que la proteína;
- el diámetro de poro: debe ser aproximadamente dos veces el tamaño del eje mayor de la enzima;
- la presencia de iones que actúen como cofactores de la enzima, ya que pueden incrementar la carga enzimática del derivado.

Como principales ventajas de este método destacan: su preparación sencilla, su bajo coste, no produce cambios de especificidad enzimática y los derivados son estables en medios de trabajo con bajo contenido en agua. Los inconvenientes de la adsorción son principalmente la optimización de las variables que controlan la adsorción, los derivados obtenidos son poco estables desde el punto de vista mecánico y la unión al soporte es débil.

Unión covalente

La unión covalente de una enzima a un soporte es quizá el método de inmovilización más interesante desde el punto de vista industrial. La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y los

ácidos aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden intervenir en la unión covalente.

Este método presenta ventajas como que la manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla, la carga de enzima permanece constante después de la inmovilización, los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o de tanque agitado. Además los derivados obtenidos por unión covalente poseen una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH ya que tienen estabilizada su estructura terciaria.

Sin embargo, la inmovilización por enlace covalente también presenta una serie de inconvenientes. Se debe conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos. Además el proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo. Por otro lado la inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

Reticulado

También denominado entrecruzamiento o “cross-linking”. Es una técnica que ha sido ampliamente utilizada en la estabilización de muchas enzimas [337-340]. El método del reticulado consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre las moléculas de enzima. Como reactivos bifuncionales se pueden emplear dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio e, incluso, diaminas si están activadas con carbodiimida. El resultado del reticulado son enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura.

El **co-reticulado**, permite eliminar las pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo, la albúmina bovina). Un procedimiento mixto de inmovilización muy común consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre una resina

de intercambio iónico o un soporte polimérico (con lo que se consigue una elevada carga enzimática) y posteriormente añadir el reactivo bifuncional.

Actualmente el método más novedoso de “cross-linking” consiste en la cristalización de enzimas y su posterior reticulado con glutaraldehído (Cross-Linked Enzyme Crystals o CLECs). El aumento de estabilidad se basa en la obtención de un entramado cristalino, donde las moléculas de enzima están rodeadas exclusivamente por otras moléculas de proteína. De esta manera la propia enzima actúa como soporte, y su estructura terciaria está estabilizada por las uniones covalentes intermoleculares. La estructura cristalina posee canales microscópicos (20-50Å) que permiten el paso de sustratos hasta el centro activo de la enzima donde se cataliza la reacción. Estos cristales pueden soportar temperaturas elevadas y pH extremos, así como la acción de las proteasas. Esta tecnología se ha aplicado a enzimas muy diferentes [145], las cuales se han utilizado en la obtención de compuestos enantioméricamente puros y en la síntesis de péptidos.

Efectos de la inmovilización enzimática

A menudo, la inmovilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas. En primer lugar se producen cambios en su estabilidad. En segundo lugar, la enzima inmovilizada es un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, activadores, etc.) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima. Como consecuencia, la actividad enzimática se ve afectada por efectos de tipo difusional, estérico y del microentorno.

Efectos en la estabilidad. Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones [146]:

- Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente en aquellos métodos en los que intervienen enlaces de tipo covalente, como el reticulado o la unión a soportes activados. La inmovilización

covalente multipuntual se puede combinar con la adición de reactivos bifuncionales que den mayor rigidez a la estructura de la enzima.

- Una protección frente a las proteasas en el medio. Se ha visto que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis.
- Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.
- Existe una alteración del microentorno de la enzima debido a la interacción de la enzima con el soporte. En otros casos el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la afinidad del soporte por el agua o su capacidad para retenerla, regula la actividad de la enzima [147]. Cuanto mayor es esta afinidad, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa.

Efectos en la actividad enzimática. Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido o a que los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima. Por otro lado la inmovilización puede originar un cambio conformacional en la enzima que de lugar a una forma inactiva o las condiciones experimentales del proceso de inmovilización pueden causar la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios (disminución o aumento de la actividad enzimática) se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

La difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno. Existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales como por ejemplo: disminuir el tamaño del biocatalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor, etc. Con estas medidas se consigue

reducir el grosor de la capa de Nernst, y como consecuencia, el valor de k'_m disminuye. Hornby y su equipo [148] desarrollaron una expresión matemática que permite calcular la actividad de las enzimas inmovilizadas, teniendo en cuenta tanto los factores de difusión como los electrostáticos. La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente [149].

Recuperación del biocatalizador

Al aumentar la escala de la reacción catalizada, desde el laboratorio a la planta piloto, es necesario tener en cuenta que el biocatalizador debe ser recuperado para su utilización en el siguiente ciclo de reacción, en la medida de lo posible, de forma cuantitativa, pudiendo así estudiar la desactivación del mismo. Si la recuperación de la enzima no se hace de forma cuantitativa, se puede confundir la pérdida de carga enzimática con la desactivación de la enzima. La recuperación de la enzima, a escala laboratorio, se realiza normalmente por filtración a vacío sobre papel, este procedimiento es adecuado pues el volumen de muestra es reducido, pero a escalas superiores, como reactores de 5L, este procedimiento es complejo.

Para facilitar la recuperación de la enzima a escalas superiores a la del laboratorio se desarrollan diversos procedimientos como la fabricación de celdillas donde alojar el biocatalizador y poder así recuperarlo con facilidad. Estas celdillas se construyen con mayas de acero con un tamaño de poro definido que permita el paso de los sustratos e impida que el biocatalizador salga de la celdilla al medio de reacción. Estas celdillas se anclan al eje de las aspas que agitan el medio de reacción, por lo que se facilita el paso del medio a través de la maya. Que el biocatalizador se encuentre alojado en el interior de estas celdillas permite un rápido vaciado del reactor, facilita la recuperación cuantitativa de la enzima y además impide la degradación del biocatalizador por abrasión del soporte.

Alteración del equilibrio de la reacción enzimática

Las reacciones catalizadas por lipasas son reacciones en equilibrio, por lo que en muchos casos alterando el medio de reacción se puede potenciar la formación de producto, la velocidad de la reacción, la estabilidad del biocatalizador e incluso la selectividad de la lipasa.

En algunos casos es conveniente trabajar a presión reducida o borbotear un gas inerte sobre el medio de reacción con el fin de desplazar el equilibrio termodinámico de las reacciones hacia

la formación de producto. Por ejemplo, durante la trans-esterificación de FAEE con glicerina se genera etanol al formarse el enlace éster, al retirar este etanol producido, desplazamos el equilibrio de la reacción hacia la formación de productos. En otras ocasiones la presión reducida busca retirar el agua formada durante una reacción de esterificación. En estas ocasiones se debe tener en cuenta que la enzima necesita cierta hidratación para mantener su conformación tridimensional y conservar así su actividad lo máximo posible. En este caso no solo se puede retirar el agua formada utilizando presión reducida; gran cantidad de publicaciones describen reacciones donde se utiliza un adsorbente, como el tamiz molecular, para retirar el agua producida durante la reacción. Este material adsorbente es inerte y no interfiere en la reacción más que retirando el agua que va apareciendo según transcurre la reacción, tras la catálisis el material adsorbente se puede recuperar con facilidad por filtración.

El orden de adición de los sustratos y su adición en sucesivas etapas puede evitar la aparición de agregados enzimáticos y/o minimizar la desactivación enzimática. Si una alta concentración de uno de los sustratos inactiva la enzima o altera de alguna manera la actividad enzimática es recomendable añadirlo de forma secuencial a la reacción para conservar, en la medida de lo posible, la actividad de la enzima.

La velocidad y el tipo de agitación son también factores que deben ser controlados, ya que facilitan que los sustratos realicen choques efectivos en el centro activo de la enzima. Una agitación reducida o que no provoque el movimiento de todo el medio de reacción puede producir reacciones muy lentas, debido a que el sustrato tarda en llegar al centro activo, e incluso puede provocar distintas concentraciones de los sustratos en el medio de reacción, con lo que la catálisis no se realiza en un medio homogéneo provocando que la reacción no sea reproducible. Una agitación excesiva o un mal diseño de las aspas, pueden provocar también la abrasión del soporte sobre el que se encuentra inmovilizada la enzima o, en el caso de enzimas no inmovilizadas, la desnaturalización de la proteína.

También es posible aumentar la velocidad de la reacción facilitando el acceso de la enzima a uno de los sustratos, por ejemplo es posible adsorber uno de los sustratos sobre un soporte inerte, con el fin de incrementar la superficie de contacto entre sustratos y minimizar las limitaciones difusionales o por transferencia de materia.

Como ya se ha comentado existen lipasas regioselectivas y no regioselectivas. Es posible, mediante la manipulación del medio de reacción o las condiciones de reacción, hacer selectiva una lipasa que no lo es y viceversa, incluso es posible cambiar la especificidad de una enzima regioselectiva. Por ejemplo la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada por Novozym (435), una de las más utilizadas en biocatálisis, es una enzima no selectiva, pero se ha descrito que añadiendo un exceso de etanol, en reacciones de alcoholisis, la enzima aumenta su afinidad por las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos pudiendo ser utilizada como enzima 1,3 selectiva.

Fluido supercrítico como medio de reacción enzimática

El uso de CO₂ supercrítico como medio de reacción ha tenido un rápido crecimiento en los últimos tiempos [354-357]. Como ya se ha comentado las propiedades solventes del CO₂ supercrítico se pueden regular ajustando la presión y la temperatura. La difusividad de los sustratos en CO₂ es mayor que en otros disolventes orgánicos y permite una excelente transferencia de materia [150]. Además, el CO₂ puede ser eliminado fácilmente de los productos de reacción, minimizando los costes de limpieza, por otro lado tiene la ventaja adicional de ser respetuoso con el medio ambiente [358-359]. La utilización de fluidos supercríticos como medio de reacción en síntesis orgánica de diversos productos ha demostrado ventajas frente al empleo de disolventes tradicionales [151], se han llevado a cabo procesos de transesterificación de aceite de colza [152] y de soja [153] para la producción de biodiésel en metanol supercrítico.

Migración de grupos acilo en reacciones enzimáticas

Existe un gran interés en utilizar los lípidos como vehículos de sustancias de interés biológico, mediante la síntesis de lípidos estructurados que porten estas sustancias. La obtención de diglicéridos y monoglicéridos es una estrategia adecuada como primera etapa para la construcción de lípidos estructurados. Estos precursores de los lípidos estructurados pueden estar en su forma isomérica 1,2-DAGs y 2-MAGs y como 1,3-DAGs y 1-MAGs. La distribución entre las distintas isoformas de mono- y diglicéridos va a condicionar el tipo de lípido estructurado que se pueda sintetizar. Estudiar la migración de grupos acilo desde la posición β - hasta la posición α - de la glicerina es una estrategia de interés para la obtención de un tipo de mono- y diglicérido u otro, que puedan ser posteriormente empleados como precursores de lípidos estructurados.

Esta migración de grupos acilo debe ser minimizada durante el transcurso de las reacciones de hidrólisis y alcoholisis ya que, si esta migración transcurre muy rápidamente, daría lugar a compuestos de mayor grado de hidrólisis o alcoholisis, tales como monoglicéridos, si el producto objetivo de la reacción son DAGs, o glicerina si el producto objetivo de la reacción son MAGs. Se puede decir que al potenciar la migración de grupos acilo durante una reacción de hidrólisis o alcoholisis mediada por lipasas 1,3 específicas, se va a favorecer la aparición de nuevos enlaces éster en posición 1 que serán rápidamente catalizados, aumentando así la velocidad de reacción pero potenciando que el producto de la reacción sea exclusivamente glicerina y AG o FAEE respectivamente. Por ello, distintas variables de la reacción como temperatura, tiempo y el contenido del nucleófilo (agua o etanol) deben ser rigurosamente controladas para favorecer el progreso de la reacción y minimizar la acil-migración.

Por el contrario, la migración de grupos acilo puede ser de interés tras finalizar el proceso. La migración de los grupos acilo en los DAGs y MAGs, de unas posiciones a otras, se da de manera espontánea hasta alcanzar un equilibrio entre las especies que se forman, esta migración se da de manera muy lenta. Este proceso se puede acelerar por medio de la utilización de bases y ácidos al mismo tiempo que se ve favorecido por la temperatura [154].

1.4.4. Análisis de aceites y grasas comestibles

Las herramientas analíticas más utilizadas son las cromatográficas. La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas. Se basa en el principio de retención selectiva. El objetivo de esta técnica es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes presentes en una muestra.

Las técnicas cromatográficas [155] son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra la muestra a través de una fase estacionaria. Esta fase estacionaria consiste en un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de que los componentes hayan pasado por la fase estacionaria, separándose, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.

Diferencias sutiles en el coeficiente de reparto de los compuestos da como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y por tanto una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla.

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según cómo esté dispuesta la fase estacionaria:

➤ Cromatografía plana. La fase estacionaria se sitúa sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son:

- Cromatografía en papel
- Cromatografía en capa fina

➤ Cromatografía en columna. La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen:

- Cromatografía de líquidos
- Cromatografía de gases
- Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía de gases es útil para gases o para compuestos relativamente volátiles, lo que incluye a numerosos compuestos orgánicos. En el caso de compuestos no volátiles se recurre a procesos denominados de "derivatización", a fin de convertirlos en otros compuestos que se volatilicen en las condiciones de análisis.

Dentro de la cromatografía líquida destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography), que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad, normalmente en su modalidad de fase reversa, en la que la fase estacionaria tiene carácter no polar, y la fase móvil posee carácter polar (generalmente agua o mezclas con elevada proporción de la misma, o de otros disolvente polares, como por ejemplo metanol). El nombre de "reversa" viene dado porque tradicionalmente la fase estacionaria estaba compuesta de sílice o alúmina, de carácter polar, y por tanto la fase móvil era un disolvente orgánico poco polar.

Análisis de lípidos neutros mediante HPLC-ELSD

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un tipo de cromatografía en la que la fase móvil es un líquido que fluye a alta presión a través de una columna que contiene una fase estacionaria con partículas de tamaño muy pequeño.

La cromatografía de fase normal utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar. Esta técnica se caracteriza por separar los compuestos en base a los grupos funcionales polares presentes en la molécula, no teniendo apenas relevancia en la separación, las cadenas alquílicas o grupos hidrófobos. Este hecho posibilita la separación de clases de lípidos independientemente de la longitud y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada. No obstante, la estructura total de la molécula afecta a la separación, y aunque el efecto de los grupos alquilo sobre el tiempo de retención es limitado, también se debe tener en cuenta. Además, los efectos estéricos tienen también influencia en la retención, haciendo posible la separación de isómeros *cis* y *trans*. Por lo tanto, este tipo de cromatografía es la de elección cuando se tienen que analizar mezclas comerciales de aceites, debido a la presencia de una mezcla compleja de especies químicas.

El sistema de detección evaporativo de dispersión de luz ha revolucionado el análisis de lípidos mediante HPLC desde su introducción sobre el año 1978 [156]. Este tipo de detector trabaja mediante la dispersión de luz que producen las partículas sólidas de los solutos que permanecen en la muestra después de la evaporación de la fase móvil. El detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) ha permitido un gran avance en la detección de clases de lípidos mediante HPLC. Este detector no está limitado por la naturaleza del disolvente, su flujo o temperatura ambiente. Una de las principales ventajas del ELSD frente a otros detectores como los de fluorescencia, UV-visible o fotodiodos es su enorme versatilidad, ya que es un detector de masa y permite la detección y la cuantificación de metabolitos, tengan o no grupos cromóforos en su estructura. Esta característica hace que el ELSD ofrezca normalmente una cuantificación mucho más rápida y directa, ya que no es necesario derivatizar los compuestos para que sean detectados, y proporciona una respuesta cuantitativa. En el análisis de lípidos por HPLC el detector evaporativo de dispersión de luz puede ser usado para aquellos solutos que tengan volatilidad inferior a la de la fase móvil. El ELSD tiene gran aplicación en análisis farmacéutico,

ya que permite la detección directa de todos los compuestos no volátiles, siendo indiferente su estructura química.

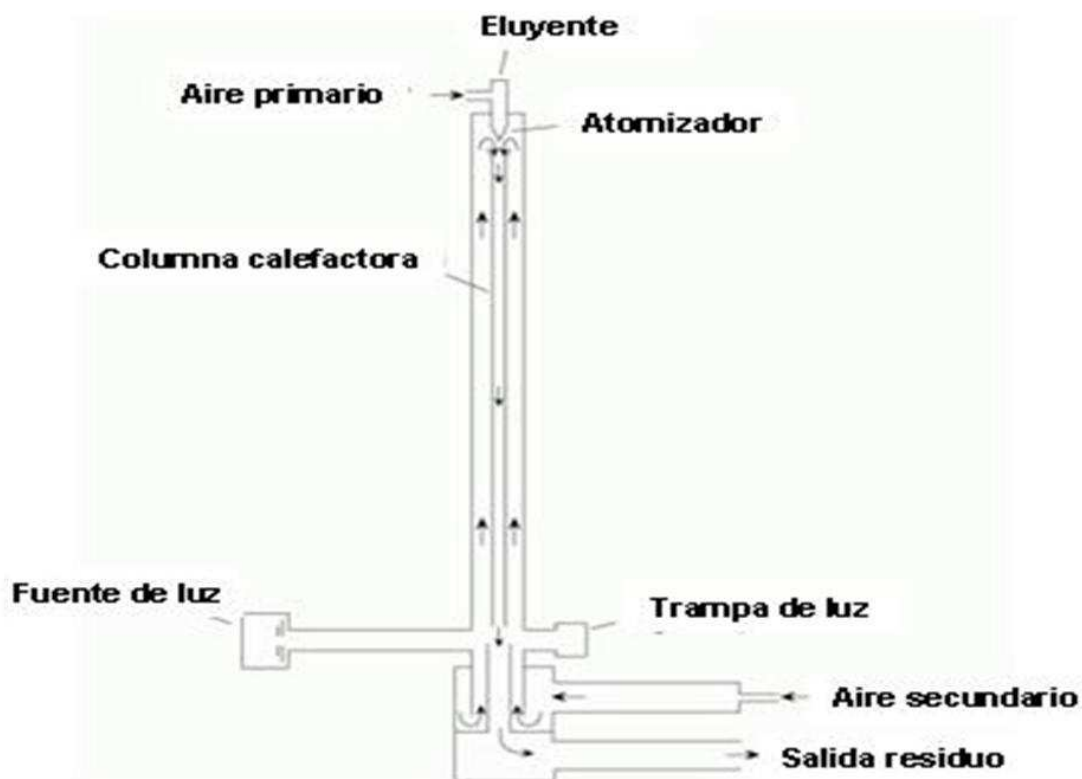


Figura 6. Diagrama del detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD).

Análisis de lípidos por cromatografía de gases

El primer trabajo en el que se hace pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna data de 1951, dando lugar a la técnica conocida como cromatografía de gases. Esta técnica, descrita por Martin y James en 1952, es en la actualidad un método usado ampliamente para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido una técnica de rutina usada en la mayoría de los laboratorios. Respecto a la cromatografía líquida, la cromatografía de gases tiene la ventaja de disponer de detectores mucho más universales (por ejemplo, el de ionización de llama). Además, para numerosas aplicaciones, los métodos son más simples, más rápidos y más sensibles que los correspondientes a la cromatografía líquida de alta

resolución. La instrumentación requerida para cromatografía de gases también es mucho más sencilla y económica que la empleada en HPLC.

Sin embargo, en cromatografía de gases, la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es considerable, a diferencia de la cromatografía líquida. Por ello, la cromatografía de gases presenta limitaciones en tres casos: compuestos poco volátiles, generalmente los de peso molecular superior a 300 u.m.a., compuestos sensibles a una elevación de la temperatura y compuestos que se encuentran en forma iónica (puesto que son en general poco volátiles).

Por esta razón, la cromatografía de gases se emplea cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C. En cambio, cuando los compuestos a analizar son poco volátiles y/o termolábiles, la técnica separativa adecuada suele ser la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.5 Bibliografía

1. Eslick, G.D., P.R.C. Howe, C. Smith, R. Priest and A. Bensoussan, *Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis*. International Journal of Cardiology, 2009. 136(1): p. 4-16.
2. Hollman, P.C.H., *Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001. 81(9): p. 842-852.
3. Marangoni, F. and A. Poli, *Phytosterols and cardiovascular health*. Pharmacological Research, 2010. 61(3): p. 193-199.
4. Stasiuk, M. and A. Kozubek, *Biological activity of phenolic lipids*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. 67(6): p. 841-860.
5. Kritchevsky, D. and S.C. Chen, *Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review*. Nutrition Research, 2005. 25(5): p. 413-428.
6. Ruiz-Rodriguez, A., G. Reglero and E. Ibañez, *Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010. 51(2): p. 305-326.
7. Figueroa-Espinoza, M.-C. and P. Villeneuve, *Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(8): p. 2779-2787.
8. Chillemi, R., S. Sciuto, C. Spatafora and C. Tringali, *Chapter 135 - Hydroxytyrosol Lipophilic Analogues: Synthesis, Radical Scavenging Activity and Human Cell Oxidative Damage Protection, in Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, R.P. Victor and W. Ronald Ross, Editors. 2010, Academic Press: San Diego. p. 1233-1243.

9. Chebil, L., C. Humeau, A. Falcimaigne, J.-M. Engasser and M. Ghoul, *Enzymatic acylation of flavonoids*. *Process Biochemistry*, 2006. 41(11): p. 2237-2251.
10. Carr, T.P. and E.D. Jesch, *Food Components that Reduce Cholesterol Absorption*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, L.T. Steve, Editor. 2006, Academic Press. p. 165-204.
11. Kohli, K., S. Chopra, D. Dhar, S. Arora and R.K. Khar, *Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability*. *Drug Discovery Today*, 2010. 15(21–22): p. 958-965.
12. Nagao, A. and J. Terao, *Antioxidant activity of 6-phosphatidyl-L-ascorbic acid*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990. 172(2): p. 385-389.
13. Müllertz, A., A. Ogbonna, S. Ren and T. Rades, *New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010. 62(11): p. 1622-1636.
14. Dicko, A., L.D. Mayer and P.G. Tardi, *Use of nanoscale delivery systems to maintain synergistic drug ratios in vivo*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010. 7(12): p. 1329-1341.
15. Sunil Kamboj, S.B.a.A.B.N., *Solid lipid nanoparticles: an effective lipid based technology for poorly water soluble drugs*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2010. 5(2): p. 78-90.
16. Akoh C, K.B., *Food Lipids*, ed. A.C. D. 2008, New York: CRC Press.
17. Jacob, J.N., G.W. Hesse and V.E. Shashoua, *.gamma.-Aminobutyric acid esters. 3. Synthesis, brain uptake, and pharmacological properties of C-18 glyceryl lipid esters of GABA with varying degree of unsaturation*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1987. 30(9): p. 1573-1576.
18. Garzon-Aburbeh, A., J.H. Poupaert, M. Claesen and P. Dumont, *A lymphotropic prodrug of L-dopa: synthesis, pharmacological properties and pharmacokinetic behavior of 1,3-dihexadecanoyl-2-[(S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoyl]propane-1,2,3-triol*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1986. 29(5): p. 687-691.
19. Cordi A, L.J., Duhault J, Espinal J, Boulanger M, Broux O, Husson B, Volland JP, and Mahieu JP *Synthesis of 1,2-diacyl-3-nicotinoyl glycerol derivatives and evaluation of their acute effects on plasma lipids in the rat*. *Arzneimittel-Forschung* 1995. 45(9): p. 997-1001.
20. Thomas B.Marriott, G.Y.P., *Glyceryl valproates*, A. Laboratories, Editor. 1987: Canada.
21. Martin, D., G. Reglero and F. Señoráns, *Oxidative stability of structured lipids*. *European Food Research and Technology*, 2010. 231(5): p. 635-653.

22. Ehringer, W., D. Belcher, S.R. Wassall and W. Stillwell, *A comparison of the effects of linolenic (18:3[Omega]3) and docosahexaenoic (22:6[Omega]3) acids on phospholipid bilayers*. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1990. 54(2): p. 79-88.
23. Hoffman, D.R., E.E. Birch, D.G. Birch, R. Uauy, Y.S. Castañeda, M.G. Lopus and D.H. Wheaton, *Impact of Early Dietary Intake and Blood Lipid Composition of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids on Later Visual Development*. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2000. 31(5): p. 540-553.
24. Lauritzen, L., H.S. Hansen, M.H. Jørgensen and K.F. Michaelsen, *The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina*. *Progress in Lipid Research*, 2001. 40(1-2): p. 1-94.
25. Morris, M.C., D.A. Evans, J.L. Bienias, C.C. Tangney, D.A. Bennett, R.S. Wilson, N. Aggarwal and J. Schneider, *Consumption of Fish and n-3 Fatty Acids and Risk of Incident Alzheimer Disease*. *Arch Neurol*, 2003. 60(7): p. 940-946.
26. Hardy, J.A.H., Gerald A., *Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis*. *Science*, 1992. 256.
27. Lim, G.P., F. Calon, T. Morihara, F. Yang, B. Teter, O. Ubeda, N. Salem, S.A. Frautschy and G.M. Cole, *A Diet Enriched with the Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid Burden in an Aged Alzheimer Mouse Model*. *The Journal of Neuroscience*, 2005. 25(12): p. 3032-3040.
28. Puskás, L.G., K. Kitajka, C. Nyakas, G. Barcelo-Coblijn and T. Farkas, *Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100(4): p. 1580-1585.
29. Hibbeln, J.R., *Fish consumption and major depression*. *The Lancet*, 1998. 351(9110): p. 1213-1213.
30. Hibbeln, J. and N. Salem, *Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1995. 62(1): p. 1-9.
31. Stamatis, H., V. Sereti and F.N. Kolis, *Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001. 11(4-6): p. 323-328.
32. Buisman, G.J.H., C.T.W. van Helteren, G.F.H. Kramer, J.W. Veldsink, J.T.P. Derksen and F.P. Cuperus, *Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants*. *Biotechnology Letters*, 1998. 20(2): p. 131-136.
33. Chigorimbo-Murefu, N.T.L., S. Riva and S.G. Burton, *Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009. 56(4): p. 277-282.

34. Mateos, R., G. Pereira-Caro, S. Saha, R. Cert, M. Redondo-Horcajo, L. Bravo and P.A. Kroon, *Acetylation of hydroxytyrosol enhances its transport across differentiated Caco-2 cell monolayers*. Food Chemistry, 2011. 125(3): p. 865-872.
35. Torres de Pinedo, A., P. Peñalver, D. Rondón and J.C. Morales, *Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure*. Tetrahedron, 2005. 61(32): p. 7654-7660.
36. Meng, Q.-H., P. Lewis, K. Wähälä, H. Adlercreutz and M.J. Tikkanen, *Incorporation of esterified soybean isoflavones with antioxidant activity into low density lipoprotein*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1999. 1438(3): p. 369-376.
37. Mellou, F., H. Loutrari, H. Stamatis, C. Roussos and F.N. Kolisis, *Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells*. Process Biochemistry, 2006. 41(9): p. 2029-2034.
38. Hadj Salem, J., I. Chevalot, C. Harscoat-Schiavo, C. Paris, M. Fick and C. Humeau, *Biological activities of flavonoids from Nitraria retusa (Forssk.) Asch. and their acylated derivatives*. Food Chemistry, 2011. 124(2): p. 486-494.
39. Mellou, F., D. Lazari, H. Skaltsa, A.D. Tselepis, F.N. Kolisis and H. Stamatis, *Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity*. Journal of Biotechnology, 2005. 116(3): p. 295-304.
40. Holzmannova, V., *Rosmarinic acid and its biological activity*. Chemicke Listy, 1996. 90: p. 486-496.
41. Chapado, L., P.J. Linares-Palomino, S. Salido, J. Altarejos, J.A. Rosado and G.M. Salido, *Synthesis and evaluation of the platelet antiaggregant properties of phenolic antioxidants structurally related to rosmarinic acid*. Bioorganic Chemistry, 2010. 38(3): p. 108-114.
42. Fiuza, S.M., C. Gomes, L.J. Teixeira, M.T. Girão da Cruz, M.N.D.S. Cordeiro, N. Milhazes, F. Borges and M.P.M. Marques, *Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004. 12(13): p. 3581-3589.
43. Osborn, H.T. and C.C. Akoh, *Structured Lipids—Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2002. 1(3): p. 110-120.
44. Maurelli, S., F. Blasi, L. Cossignani, A. Bosi, M. Simonetti and P. Damiani, *Enzymatic Synthesis of Structured Triacylglycerols Containing CLA Isomers Starting from $sn-1,3$-Diacylglycerols*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2009. 86(2): p. 127-133.
45. Muñío, M.d.M., A. Robles, L. Esteban, P.A. González and E. Molina, *Synthesis of structured lipids by two enzymatic steps: Ethanolysis of fish oils and*

- esterification of 2-monoacylglycerols*. *Process Biochemistry*, 2009. 44(7): p. 723-730.
46. Halldorsson, A., C.D. Magnusson and G.G. Haraldsson, *Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols*. *Tetrahedron Letters*, 2001. 42(43): p. 7675-7677.
 47. Akoh, C. and L. Yee, *Enzymatic synthesis of position-specific low-calorie structured lipids*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997. 74(11): p. 1409-1413.
 48. Porsgaard, T., *Handbook of Functional Lipids*, ed. A. C. 2006, Florida: Taylor and Francis Group.
 49. Roy, C.C., L. Bouthillier, E. Seidman and É. Levy, *New lipids in enteral feeding*. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2004. 7(2): p. 117-122.
 50. Barone, E., V. Calabrese and C. Mancuso, *Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases*. *Biogerontology*, 2009. 10(2): p. 97-108.
 51. Reddy, K.K., K.S. Shanker, T. Ravinder, R.B.N. Prasad and S. Kanjilal, *Chemoenzymatic synthesis and evaluation of novel structured phenolic lipids as potential lipophilic antioxidants*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2010. 112(5): p. 600-608.
 52. Xin, J.-y., L. Zhang, L.-l. Chen, Y. Zheng, X.-m. Wu and C.-g. Xia, *Lipase-catalyzed synthesis of ferulyl oleins in solvent-free medium*. *Food Chemistry*, 2009. 112(3): p. 640-645.
 53. Sun, S., L. Shan, Y. Liu, Q. Jin, Y. Song and X. Wang, *Solvent-free enzymatic synthesis of feruloylated diacylglycerols and kinetic study*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009. 57(1-4): p. 104-108.
 54. Zheng, Y., X.-M. Wu, C. Branford-White, X. Ning, J. Quan and L.-M. Zhu, *Enzymatic synthesis and characterization of novel feruloylated lipids in selected organic media*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009. 58(1-4): p. 65-71.
 55. Hamer, H.M., D. Jonkers, K. Venema, S. Vanhoutvin, F.J. Troost and R.J. Brummer, *Review article: the role of butyrate on colonic function*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2008. 27(2): p. 104-119.
 56. Egorin, M.J., Z.-M. Yuan, D.L. Sentz, K. Plaisance and J.L. Eiseman, *Plasma pharmacokinetics of butyrate after intravenous administration of sodium butyrate or oral administration of tributyrin or sodium butyrate to mice and rats*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 1999. 43(6): p. 445-453.
 57. Karboune, S., R. St-Louis and S. Kermasha, *Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by acidolysis of flaxseed oil with selected phenolic acids*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008. 52-53: p. 96-105.

58. Sabally, K., S. Karboune, R. St-Louis and S. Kermasha, *Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids*. Journal of Biotechnology, 2006. 127(1): p. 167-176.
59. Hallgren, B. and S. Larsson, *The glyceryl ethers in man and cow*. Journal of Lipid Research, 1962. 3(1): p. 39-43.
60. Mangold, H.K.P., F., *Ether lipids: biochemical and biomedical aspects*. 1983, New York: Academic Press. xvii, 439 p.
61. Pugliese, P.T., K. Jordan, H. Cederberg and J. Brohult, *Some Biological Actions of Alkylglycerols from Shark Liver Oil*. Journal of Alternative & Complementary Medicine, 1998. 4(1): p. 87.
62. Mangold, H. and N. Weber, *Biosynthesis and biotransformation of ether lipids*. Lipids, 1987. 22(11): p. 789-799.
63. Cheminade, C., V. Gautier, A. Hichami, P. Allaume, D. Le Lannou and A. B. Legrand, *1-O-Alkylglycerols Improve Boar Sperm Motility and Fertility*. Biology of Reproduction, 2002. 66(2): p. 421-428.
64. Pedrono, F., B. Martin, C. Leduc, J. Le Lan, B. Saiag, P. Legrand, J.-P. Moulinoux and A.B. Legrand, *Natural Alkylglycerols Restrain Growth and Metastasis of Grafted Tumors in Mice*. Nutrition and Cancer, 2004. 48(1): p. 64-69.
65. Mitre, R., M. Etienne, S. Martinais, H. Salmon, P. Allaume, P. Legrand and A.B. Legrand, *Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation*. British Journal of Nutrition, 2005. 94(5): p. 753-762.
66. Brohult, A., J. Brohult, S. Brohult and I. Joelsson, *Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix*. Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica, 1977. 56(4): p. 441-448.
67. Brohult, A., J. Brohult, S. Brohult and I. Joelsson, *Effect of Alkoxyglycerols on the frequency of fistulas following radiation-therapy for Carcinoma of the uterine cervix*. Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica, 1979. 58(2): p. 203-207.
68. Firshein, R.N., *Method of treating cancer using alkylglycerols in conjunction with chemotherapy*. 1997: United States.
69. Berdel, W.E. and S. Okamoto, *Ether lipids in cancer chemotherapy*. Keio J Med, 1990. 39(2): p. 75-8.
70. Brohult, A., J. Brohult and S. Brohult, *Regression of tumour growth after administration of alkoxyglycerols*. Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica, 1978. 57(1): p. 79-83.
71. Brohult A, B.J., Brohult S, Joelsson I., *Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols*. Acta Obstet Gynecol Scand, 1986. 65(7): p. 779-85.

72. Heymans, F., C. Da Silva, N. Marrec, J.-J. Godfroid and M. Castagna, *Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C*. FEBS Letters, 1987. 218(1): p. 35-40.
73. Daniel, L.W., G.W. Small, J.D. Schmitt, C.J. Marasco, K. Ishaq and C. Piantadosi, *Alkyl-linked diglycerides inhibit protein kinase C activation by diacylglycerols*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988. 151(1): p. 291-297.
74. Palmblad, J., J. Samuelsson and J. Brohult, *Interactions between Alkylglycerols and human neutrophil Granulocytes*. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 1990. 50(4): p. 363-370.
75. N Yamamoto, S.H., J G Haddad, and M A Kowalski, *Vitamin D3 binding protein required for in vitro activation of macrophages after alkylglycerol treatment of mouse peritoneal cells*. Immunology, 1991. 74(3): p. 420–424.
76. Yamamoto, N. and B.Z. Ngwenya, *Activation of Mouse Peritoneal Macrophages by Lysophospholipids and Ether Derivatives of Neutral Lipids and Phospholipids*. Cancer Research, 1987. 47(8): p. 2008-2013.
77. Yamamoto, N., B.Z. Ngwenya, T.W. Sery and R.A. Pieringer, *Activation of macrophages by ether analogues of lysophospholipids*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 1987. 25(3): p. 185-192.
78. Yamamoto, N., D.A.S. Claire, S. Homma and B.Z. Ngwenya, *Activation of Mouse Macrophages by Alkylglycerols, Inflammation Products of Cancerous Tissues*. Cancer Research, 1988. 48(21): p. 6044-6049.
79. Homma, S., I. Millman and N. Yamamoto, *A serum factor for macrophage activation after in vitro dodecylglycerol treatment of mouse lymphocytes*. Immunol Cell Biol, 1990. 68(2): p. 137-142.
80. Berdel, W.E., W.R. Bausert, H.U. Weltzien, M.L. Modolell, K.H. Widmann and P.G. Munder, *The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid-activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma*. European Journal of Cancer (1965), 1980. 16(9): p. 1199-1204.
81. Ngwenya, B.Z. and D.M. Foster, *Enhancement of Antibody Production by Lysophosphatidylcholine and Alkylglycerol*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 1991. 196(1): p. 69-75.
82. Hammond, J.L., D.L. Koontz, H.Z. Bazmi, J.R. Beadle, S.E. Hostetler, G.D. Kini, K.A. Aldern, D.D. Richman, K.Y. Hostetler and J.W. Mellors, *Alkylglycerol Prodrugs of Phosphonoformate Are Potent In Vitro Inhibitors of Nucleoside-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Select for Resistance Mutations That Suppress Zidovudine Resistance*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001. 45(6): p. 1621-1628.
83. Hostetler, K.Y.y.J.W.M., *Treatment of drug-resistant human immunodeficiency virus infection*. 2002: United States.

84. Legrand, A., *1-O-alkylglycerols for pharmaceutical or veterinary use for preserving and/or improving sperm*. 1999: United States.
85. Mitre, R., C. Cheminade, P. Allaume, P. Legrand and A.B. Legrand, *Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm*. Theriogenology, 2004. 62(8): p. 1557-1566.
86. Linman, J.W., *Hemopoietic Effects of Glyceryl Ethers. III. Inactivity of Selachyl Alcohol*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.), 1960. 104(4): p. 703-706.
87. Hartvigsen, K., A. Ravandi, R. Harkewicz, H. Kamido, K. Bukhave, G. Hølmer and A. Kuksis, *1-O-alkyl-2-(ω -oxo)acyl-sn-glycerols from shark oil and human milk fat are potential precursors of PAF mimics and GHB*. Lipids, 2006. 41(7): p. 679-693.
88. Akira, T., *A family of phospholipid autacoids: Occurrence, metabolism and bioactions*. Progress in Lipid Research, 1995. 34(2): p. 151-184.
89. Tanaka T., T.A., Tsukatani H. , *Platelet-activating factor (PAF)-like phospholipids formed during peroxidation of phosphatidylcholines from different foodstuffs*. Biosci Biotech Biochem, 1995. 56: p. 1389-1393.
90. Kern, H., T. Volk, S. Knauer-Schiefer, T. Mieth, B. Rüstow, W.J. Kox and M. Schlame, *Stimulation of monocytes and platelets by short-chain phosphatidylcholines with and without terminal carboxyl group*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1998. 1394(1): p. 33-42.
91. Torres, C.F., L. Vázquez, F.J. Señoráns and G. Reglero, *Enzymatic synthesis of short-chain diacylated alkylglycerols: A kinetic study*. Process Biochemistry, 2009. 44(9): p. 1025-1031.
92. Martín, D., M. Morán-Valero, F. Señoráns, G. Reglero and C. Torres, *In Vitro Intestinal Bioaccessibility of Alkylglycerols Versus Triacylglycerols as Vehicles of Butyric Acid*. Lipids, 2011. 46(3): p. 277-285.
93. Coradini, D., C. Pellizzaro, G. Miglierini, M.G. Daidone and A. Perbellini, *Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: Improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line*. International Journal of Cancer, 1999. 81(3): p. 411-416.
94. Kuroiwa-Trzmielina, J., A. de Conti, C. Scolastici, D. Pereira, M.A. Horst, E. Purgatto, T.P. Ong and F.S. Moreno, *Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: Efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug*. International Journal of Cancer, 2009. 124(11): p. 2520-2527.
95. Madrona, A., G. Pereira-Caro, R. Mateos, G. Rodríguez, M. Trujillo, J. Fernández-Bolaños and J. Espartero, *Synthesis of Hydroxytyrosyl Alkyl Ethers from Olive Oil Waste Waters*. Molecules, 2009. 14(5): p. 1762-1772.

96. Pereira-Caro, G., A. Madrona, L. Bravo, J.L. Espartero, F. Alcludia, A. Cert and R. Mateos, *Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives*. Food Chemistry, 2009. 115(1): p. 86-91.
97. Gopinath, D., D. Ravi, B.R. Rao, S.S. Apte and D. Rambhau, *1-O-Alkylglycerol vesicles (Algosomes): their formation and characterization*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. 246(1-2): p. 187-197.
98. Block, J., D. Barrera-Arellano, M. Figueiredo and F. Gomide, *Blending process optimization into special fat formulation by neural networks*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997. 74(12): p. 1537-1541.
99. F. D. Gunstone, F.B.P., *Lipid technologies and applications*, ed. M. Dekker. 1997, New York.
100. Deffense, E., *Dry multiple fractionation: trends in products and applications*. Lipid Technolgy, 1995. 7: p. 34-38.
101. WDeGreyt, A.H., *Food and non-food applications of milk fat*. Lipid Technolgy, 1993. 5: p. 138-140.
102. Bhaskar, A., S. Rizvi, C. Bertoli, L. Fay and B. Hug, *A comparison of physical and chemical properties of milk fat fractions obtained by two processing technologies*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1998. 75(10): p. 1249-1264.
103. Herman, S., *Urea inclusion compounds of fatty acids*. Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids, 1954. 2(0): p. 243-267.
104. Gunstone, F., *The availability of polyunsaturated acids*. Lipid Technolgy, 1997. 9: p. 91-94.
105. H-J Wille, H.T., *Continuous process for the concentration of polyunsaturated acids*. Fat Science and Technology, 1988. 90: p. 476-481.
106. H-J Wille, H.T., MLagarde, *Preparation of stearidonic acid concentrates*. Fat Science Technology, 1991. 93: p. 383-368.
107. UN Wanasundara, F.S., *Concentration of ω -3 PUFA of marine oils; determination of optimum conditions*. Food Chemistry, 1999. 65: p. 41-49.
108. Fregolente, L.V., P.B.L. Fregolente, A.M. Chicuta, C.B. Batistella, R. Maciel Filho and M.R. Wolf-Maciel, *Effect of Operating Conditions on the Concentration of Monoglycerides Using Molecular Distillation*. Chemical Engineering Research and Design, 2007. 85(11): p. 1524-1528.
109. Breivik, H., G. Haraldsson and B. Kristinsson, *Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997. 74(11): p. 1425-1429.
110. Cvengros, J., *Physical refining of edible oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1995. 72(10): p. 1193-1196.

111. Szelağ, H. and W. Zwierzykowski, *The Application of Molecular Distillation to Obtain High Concentration of Monoglycerides*. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 1983. 85(11): p. 443-446.
112. Chang, S.S., B. Ostric-Matijasevic, O.A.L. Hsieh and C.-L. Huang, *Natural antioxidants from rosemary and sage*. *Journal of Food Science*, 1977. 42(4): p. 1102-1106.
113. Ooi, C., Y. Choo, S. Yap, Y. Basiron and A. Ong, *Recovery of carotenoids from palm oil*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1994. 71(4): p. 423-426.
114. Pietsch, A. and P. Jaeger, *Concentration of squalene from shark liver oil by short-path distillation*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2007. 109(11): p. 1077-1082.
115. Hannay, J.B.y.H.J. *On the solubility of solids in gases*. in *Proceedings of the Royal Society*. 1880.
116. Roselius, W., O. Vitzthum, y P. Hubert, *Decaffeinated coffee*. 1974: U.S.
117. Zosel, K., *Caffeine recovery*. 1974: USA.
118. Luque de Castro, M.D., Valcárcel Cases, Miguel; Tena, M.T, *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*, ed. E. Reverté. 1993, Barcelona.
119. King, M.B.y.O.J.C., *Physico-chemical data required for the design of near-critical fluid extraction process*. Blackie Academic Profesional, ed. M.B.K.y.T.R. Bott. 1993, London, UK.
120. Mukhopadhyay, M., *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*, ed. C. Press. 2000, Boca Raton, Florida.
121. Reglero, G., F.J. Señoráns, y E. Ibanez, *Supercritical Fluid Extraction: An Alternative to Isolating Natural Food Preservatives*. CRC Press, ed. G.V.B.-C.y. col. 2005, Boca Ratón, FL.
122. Rizvi, S.S.H., *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials* Blackie Academic & Professional. 1994, London, UK.
123. del Valle, J.M. and J.M. Aguilera, *Revision: Extracción con CO2 a alta presión. Fundamentos y aplicaciones en la industria de alimentos / Review: High pressure CO2 extraction. Fundamentals and applications in the food industry*. *Food Science and Technology International*, 1999. 5(1): p. 1-24.
124. Brunetti, L., A. Daghetta, E. Fedell, I. Kikic and L. Zanderighi, *Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1989. 66(2): p. 209-217.
125. Ayorinde, F.O.y.M.H., *Deacidification of vegetable oils*, U.S.P.a.T.O. Granted, Editor. 1995: USA.

126. Mangold, H.K., *Extraction and fractionation of lipids with supercritical carbon dioxide and other inorganic solvents*, in *International Conference on Oils, Fats and Waxes: Fats from the future*. 1983: Auckland, Nueva Zelanda.
127. Brunner, G., *Fractionation of fats with supercritical carbon dioxide*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2000. 102(3): p. 240-245.
128. Molero Gomez, A. and E. Martinez de la Ossa, *Quality of wheat germ oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2000. 77(9): p. 969-974.
129. Friedrich, J.P. and G.R. List, *Characterization of soybean oil extracted by supercritical carbon dioxide and hexane*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982. 30(1): p. 192-193.
130. Díaz-Reinoso, B., A. Moure, H. Domínguez and J.C. Parajó, *Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(7): p. 2441-2469.
131. Calvo, L., M. Cocero and J. Díez, *Oxidative stability of sunflower oil extracted with supercritical carbon dioxide*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1994. 71(11): p. 1251-1254.
132. Cheung, P.C.K., A.Y.H. Leung and P.O. Ang, *Comparison of Supercritical Carbon Dioxide and Soxhlet Extraction of Lipids from a Brown Seaweed, Sargassum hemiphyllum (Turn.) C. Ag. f.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. 46(10): p. 4228-4232.
133. Vera, L.F. (2007) *Enzimas: qué son y para qué sirven*. VIII Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica 101, 399-417.
134. Hastert, R., *Past, present and future of the hydrogenation process*. *Lipid Technology*, 1998. 10: p. 101-105.
135. King, J., R. Holliday, G. List and J. Snyder, *Hydrogenation of vegetable oils using mixtures of supercritical carbon dioxide and hydrogen*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001. 78(2): p. 107-113.
136. Allen, D.A., *Fat modification as a tool for product development*. *Lipid Technology* 1998. 10(2): p. 10:29-33, 53-57.
137. Kavanagh, A.R., *A breakthrough in infant formula fats*. Vol. 4. 1997, Montrouge, France: Libbey-Eurotext.
138. Gunstone, F.D., *Movements towards tailor-made fats*. *Progress in Lipid Research*, 1998. 37(5): p. 277-305.
139. Gunstone, F.D., *Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999. 79(12): p. 1535-1549.
140. Michaelis, L. and M.L. Menten, *The kinetics of the inversion effect*. *Biochemische Zeitschrift*, 1913. 49: p. 333-369.

141. Henri, V., *Lois générales de l'Action des Diastases*. Nature Biotechnology, 1903. 68(1758): p. 221.
142. King, E.L. and C. Altman, *A schematic method of deriving the rate laws for enzyme-catalyzed reactions*. Journal of Physical Chemistry, 1956. 60(10): p. 1375-1378.
143. Cha, S., *A simple method for derivation of rate equation of rate equation of rate equations for enzyme-catalyzed reactions under rapid equilibrium assumption or combined assumptions of equilibrium and steady state*. Journal of Biological Chemistry, 1968. 243(4): p. 820-&.
144. Arroyo, M., *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*. Ars Pharmaceutica, 1998. 39(23-39).
145. Margolin, A.L., *Novel crystalline catalysts*. Trends in Biotechnology, 1996. 14(7): p. 223-230.
146. Klibanov, A.M., *Immobilized enzymes and cells as practical catalysts*. Science, 1983. 219(4585): p. 722-727.
147. Reslow, M., P. Adlercreutz and B. Mattiasson, *On the importance of the support material for bioorganic synthesis-influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media*. European Journal of Biochemistry, 1988. 172(3): p. 573-578.
148. Hornby, W.E., M.D. Lilly and E.M. Crook, *Some changes in reactivity of enzymes resulting from their chemical attachment to water-insoluble derivatives of cellulose*. Biochemical Journal, 1968. 107(5): p. 669-&.
149. Katchals.E, I. Silman and R. Goldman, *Effect of microenvironment on mode of action of immobilized enzymes*. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 1971. 34: p. 445-&.
150. Chrisochoou, A. and K. Schaber, *Design of a supercritical fluid extraction process for separating mixtures incurred in enzyme-catalyzed reactions*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 1996. 35(4): p. 271-282.
151. Subramaniam, B. and M.A. McHugh, *Reactions in supercritical fluids - a review*. Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development, 1986. 25(1): p. 1-12.
152. Kusdiana, D. and S. Saka, *Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol*. Fuel, 2001. 80(5): p. 693-698.
153. He, H., T. Wang and S. Zhu, *Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process*. Fuel, 2007. 86(3): p. 442-447.

154. Laszlo, J., D. Compton and K. Vermillion, *Acyl Migration Kinetics of Vegetable Oil 1,2-Diacylglycerols*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008. 85(4): p. 307-312.
155. Miguel Valcárcel Cases, A.G.H., *Técnicas analíticas de separación*, ed. Reverté. 1994.
156. Charlesworth, J.M., *Evaporative analyzer as a mass detector for liquid chromatography*. Analytical Chemistry, 1978. 50(11): p. 1414-1420.

2. Artículos que integran la memoria

1. Carlos F. Torres, Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero. *A predictive kinetic study of lipase-catalyzed ethanolysis reactions for the optimal reutilization of the biocatalyst.* **Biochemical Engineering Journal** 42 (2008) 105–110.
 2. Carlos F. Torres, Daniel Tenllado, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero. *A Versatile GC Method for the Analysis of Alkylglycerols and Other Neutral Lipid Classes.* **Chromatographia** 69 (2009) 729-734.
 3. Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Carlos Torres, Guillermo Reglero. *Supercritical Phase Equilibria Modeling of Glyceride Mixtures and Carbon Dioxide Using the Group Contribution Eo.* **Journal of Thermodynamics** (2009) pages: 730960 (9 pp)
 4. Daniel Tenllado, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres. *A combined procedure of supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil.* **Separation and Purification Technology** 83 (2011) 74–8.
 5. Óscar Fernández, Daniel Tenllado, Diana Martín, Rosa M. Blanco, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres. *Immobilized lipases from *Candida antarctica* for producing tyrosyl oleate in solvent-free medium.* **Biocatalysis and Biotransformation** 30 (2012) 245–254.
-



A predictive kinetic study of lipase-catalyzed ethanolsis reactions for the optimal reutilization of the biocatalyst

Carlos F. Torres*, Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2008

Received in revised form 6 June 2008

Accepted 6 June 2008

Keywords:

Enzyme inactivation

Ethanolsis

Kinetics

Lipase

Pseudo reaction time

ABSTRACT

A new application of the kinetics modeling for the optimal reutilization of an immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* in the ethanolsis of vegetable oils is presented. Two different rate expressions were explored to take into account the lipase inactivation. The methodology developed is based on the utilization of the pseudo reaction time that indicates how much longer the reaction mixture must remain in the reactor (actual reaction time) to achieve the conversion that would have been achieved if the enzyme had not been partially deactivated (pseudo reaction time).

An initial batch of lipase was employed in 15 consecutive trials in order to quantitatively characterize the process over a range of lipase activity and to validate the ability of the methodology utilized to describe the kinetics of both ethanolsis and deactivation. Then, the model developed was employed to predict the time necessary to attain a desired conversion in subsequent reaction cycles in both, trials with the same batch of lipase with different degree of inactivation, and trials with a new batch of immobilized lipase with different specific activity.

The reaction times predicted to attain a 38% disappearance of glyceryl ester bonds were experimentally verified by carrying out the corresponding ethanolsis reactions of 100 g of sunflower oil. The agreement between the desired and experimentally attained conversions achieved validates the methodology developed to estimate reaction time in lipase-catalyzed ethanolsis reactions.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The lipase from *Pseudomonas cepacia* (recently reclassified as *Burkholderia cepacia*) has been widely used in the hydrolysis and transesterification of triglycerides and in the enantioselective synthesis and hydrolysis of a variety of esters [1–5].

Lipase-catalyzed ethanolsis of fats and oils has been widely used for production of pure monoacylglycerols [6], highly purified concentrates of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids [7], structured lipids [8], bio-fuel [9], and selective recovery of minor components found in fats and oils deodorizer distillates [10].

Several kinetic models have been developed to describe lipase-catalyzed hydrolysis and ethanolsis reactions [4,11–13,14]. These models describe the rate of release of fatty acid residues from the precursor acylglycerol and the rate of formation of the different acylglycerol species. Some of the described models incorporate enzyme deactivation term to evaluate the decrease of activity of the lipase during the course of the reaction. The rate expression obtained permit one to evaluate the rates of release of the different

fatty acid residues present in the precursor oil, determine the preference of the lipase for *sn*-1,3 versus *sn*-2 fatty acid residues, and also provides mechanistic information concerning lipase-catalyzed reactions.

Loss of enzyme activity with time is the deactivation of the enzyme as time elapses as a consequence of thermal effects and alcohol concentration. Knowledge of the rate law governing the deactivation process is often important in modeling enzyme-catalyzed processes and that would be of interest in process design. One of the problems that arise when one tries to evaluate the loss of enzyme activity in batch reactors is the fact that the time of the reaction and the time at which the set of experiments is started are equivalent. This fact does not permit one to separate the rate of the reaction from the rate at which the enzyme is losing activity because both processes occur simultaneously. One strategy to overcome this problem is to carry out several cycles of reaction with the same batch of lipase. Hence, it is possible to distinguish between the time characteristic of the ethanolsis reaction (reaction time) and that corresponding to lipase deactivation (the time elapsed since the start of the first experiment). Each cycle involves the same elapsed time for the ethanolsis reaction but this elapsed time will differ from the time during which the lipase has been susceptible to deactivation. Thus, the mathematical model used in

* Corresponding author. Tel.: +34 914973091; fax: +34 914978255.
E-mail address: carlos.torres@uam.es (C.F. Torres).

the analysis of the data should account for the effect of deactivation of the enzyme in the combined rate expressions for the rate of consumption of fatty acid residues and the rates of release of the corresponding fatty acid ethyl esters.

In this work, the ethanolysis of sunflower oil catalyzed by *P. cepacia* lipase is studied. The primary thrust of this research was to validate a model for elucidating rate expressions for both the ethanolysis reaction and deactivation of the enzyme, and to develop a methodology to assess the potential for reuse of the immobilized enzyme.

A modified version of the generalized Michaelis–Menten rate expressions, proposed by Torres and Hill [3] for the ethanolysis of menhaden oil, was employed to describe the kinetics of the ethanolysis reaction. The effect of enzyme deactivation was taken into account exploring two different deactivation rate expressions similarly to those proposed by Malcata et al. [14]. By using this methodology, a mathematical model with high correlative capability of the experimental data was developed. In addition, these rate expressions were used to predict how long the reaction mixture must remain in the reactor as a consequence of: (1) the specific activity of the particular batch of lipase employed and (2) its partial inactivation. These predictions result decisive to optimize the reutilization of the biocatalyst and to achieve similar reaction conversions regardless the residual lipase activity or the batch of lipase utilized. The predicted reaction times were utilized several times with the same batch of immobilized lipase to experimentally demonstrate both the feasibility of the methodology developed and the accuracy of kinetic rate expressions utilized.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Sunflower oil, with less of <0.5% (w/w) of humidity, according to the vendor specifications, was utilized as source of triacylglycerols in the present study. *P. cepacia* (PS) was obtained from Amano (Lombard, IL). All solvents used were HPLC grade from Lab scan (Dublin, Ireland). Ethanol absolute (water content <0.1%, w/w) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain) and was dried with molecular sieves 4 Å from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The rest of the materials were used without further purification.

2.2. Methods

2.2.1. Lipase immobilization

500 mg of lipase PS were solved in 5 ml of sodium phosphate buffer 0.2 M, pH 7. This mixture was added dropwise to 500 mg of celite 545 coarse from Fluka (St. Louis, MO, USA) in a 120-ml flask and the final mixture was placed in a orbital shaker 30 min at 200 rpm. Then, 20 ml of chilled acetone were added. The suspension was allowed to stand in the mentioned orbital shaker for another 5 min at 200 rpm and was vacuum filtered. Finally, the immobilized lipase was washed with 5 ml of chilled acetone and dried by vacuum filtration. During the washing procedure null loss of lipase activity was observed.

2.2.2. Ethanolysis reaction

10 g of a mixture of sunflower oil containing 8% (w/w) of hexadecane (internal standard) and 1.5 g of ethanol were placed in a 120-ml flask and mixed by swirling. After 0.5 g of the immobilized lipase PS was added, the flask was stoppered and placed in an orbital shaker (200 rpm) at 40 °C. Samples (100 µL) were withdrawn periodically, and the flasks were resealed after each sampling. Unless other thing is stated, trials were allowed to proceed for 6 h.

Four identical batches were simultaneously prepared and allowed to react concurrently under identical conditions to ensure that sufficient lipase would always be available for use in subsequent cycles. Only one of the batches was used for sampling and the other batches were utilized as reservoir of lipase with identical reaction and recovery history. Hence, any lipase that might have been lost in the procedural steps involved in a particular cycle (removing aliquots for analysis, recovery by filtration, washing, etc.) could be easily replaced with the mentioned three batches that had been processed simultaneously in an identical manner. Thus, identical amounts of lipase could be utilized in all cycles.

In order to obtain a broad range of experimental data to fit adequately the proposed kinetics model, the same batch of lipase was employed in 15 consecutive reaction cycles. Each experimental reaction cycle was carried out up to a desired time; the immobilized lipase was then recovered by filtration under vacuum and utilized as a biocatalyst in the subsequent reaction cycle. This procedure permits one to carry out numerous ethanolysis reactions with the same batch of lipase but with different degree of inactivation, and thus provide appropriate information to fit the parameters of the kinetic model.

2.2.3. Study of lipase stability

In order to study the stability of the immobilized lipase PS under the experimental reaction conditions, several cycles of the ethanolysis reaction were carried out with the same initial mixture of sunflower oil and ethanol. The lipase was first submerged in a fresh reaction mixture for 5 min to allow the liquid to wet the sample and then dried at room temperature under vacuum for 2 min. One washing with acetone was effected to eliminate the reaction mixture from the biocatalyst. Then, the lipase was again dried under vacuum for 1 min. Finally, the lipase was weighed to ensure that no traces of either reaction mixture or acetone were present. This lipase was subsequently used as a catalyst for a total of 15 charges of reactants according to the procedure described in the previous section. For each charge, the lipase was used to catalyze the reaction for 6 h. Then, it was recovered at room temperature using the washing procedure described above and was reused with the next charge to the batch reactor. The lipase recovery process took approximately 10 min.

2.2.4. Analysis of reaction products (gas chromatography)

The samples (100 µL) were mixed with 2 ml of chloroform ethanol 2:1 (v/v) and immediately filtered with a 0.45 µm Sartorius (Goettingen, Germany) nylon syringe filter. Samples were then dried with sodium sulfate. Aliquots of the final transparent solution (250 µL) were diluted with 750 µL of hexane. 1 µL of the diluted sample was injected into an Agilent (Avondale, PA) gas chromatograph (6890N Network GC System) coupled to an autosampler (Agilent 7683B). The capillary column was a 30 m HP-88 (Avondale, PA) (0.25 mm i.d.). The temperatures of the injector and detector were both 220 and 250 °C, respectively. The temperature program was as follows: starting at 100 °C and then heating to 180 °C at 20 °C/min; followed by heating from 180 to 220 °C at 15 °C/min. The final temperature (220 °C) was held for 30 min. Identification of the various free fatty acids was based on a PUFA No 3 standard (#4-7085) obtained from Supelco.

3. Mathematical modeling

3.1. Reaction rate for the ethanolysis reaction: uniresponse model

Rate expressions based on a generalized Michaelis–Menten mechanism for the ethanolysis reaction were utilized (Fig. 1). A ping-pong mechanism controlled by the rate of deacylation of the

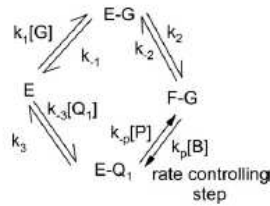


Fig. 1. Schematic representation of the ethanolysis reaction. E, the enzyme; G, glyceryl ester bond (reactant glyceride); E–G, activated form of the enzyme and the native ester bond; F–G, covalent transformed form of the enzyme and the native ester bond; E–Q, activated form of the enzyme and the fatty acid ethyl ester; B, ethanol; P, lower glyceride liberated from the native ester; Q, fatty acid ethyl ester. $k_1, k_{-1}, k_2, k_{-2}, k_p, k_{-p}, k_3, k_{-3}$, are rate constants.

enzyme was proposed. These rate expressions are similar to those described by Malcata et al. [14] and by Lessard and Hill [13] for lipase-catalyzed hydrolysis reactions. In particular a modification of these rate expressions, presented by Torres and Hill [3], was employed. The main differences with respect to the model proposed by Malcata et al. are: (1) the rate expressions contain the concentration of ethanol rather than the concentration of water; (2) a term for the reverse of the ethanolysis reaction is incorporated in the rate expressions.

The rate expression of the model is represented by:

$$\frac{d[G]}{dt} = \frac{(v_{max}/K_m)[G][B] - (v_{maxr}/K_i)[P][Q]}{1 + ([G]/K_m) + ([P]/K_i)} \quad (1)$$

[G], [Q], and [P] are the molar concentrations of the parent acylglycerol, the fatty acid ethyl ester formed by reaction, and the lower acylglycerol, respectively. [B] denotes the concentration of ethanol, the v_{max} are the maximum rates of reaction at a particular glyceride bond [G] at a saturating concentration of the substrate (and in the absence of the other glycerides); the v_{maxr} are the maximum rates of reaction between the fatty acid ethyl esters [Q] and the lower glyceride [P]; the K_m are the Michaelis–Menten constants for the glycerides and the K_i are the inhibition constants for the corresponding ethyl esters. The lumped parameters, v_{max} , v_{maxr} , K_i , and K_m are defined as:

$$v_{max} = \frac{k_2 k_p [E]_{tot}}{k_p + k_{-p}} \quad (2)$$

$$v_{maxr} = k_{-2} [E]_{tot} \quad (3)$$

$$K_i = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad (4)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} k_{-p}}{k_1 (k_p + k_{-p})} \quad (5)$$

Eq. (1) can be simplified by reparameterization following the approach of Malcata et al. [14] to yield:

$$\frac{d[G]}{dt} = \frac{\Omega_2 [G][B] - \Psi_2 [P][Q]}{1 + K_1 [G]} \quad (6)$$

The corresponding lumped parameters [Ψ_2 , Ω_2 , and K_1] are summarized in Table 1.

3.2. Loss of enzyme activity with time

To characterize the loss of enzyme activity (a), the key variable is the time elapsed since the start of the first experiment ($t - t_0$). The rate of ethanolysis reaction depends not only on the time the triacylglycerols and ethanol in a particular batch are in contact with the lipase, but also on the enzymatic activity profile during the time that batch is being processed. Graphical depictions of the resulting

Table 1
Relations between model parameters and the rate constants in Fig. 1

| Parameter | Mechanistic interpretation |
|------------|---|
| Ω_2 | $\frac{k_2 k_1 k_3 [E]_{tot}}{\Delta}$ |
| Ψ_2 | $\frac{k_{-2} k_{-3} [E]_{tot}}{k_3}$ |
| K_1 | $\frac{1}{\Delta} \left(\frac{k_1}{k_{-1}} + \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} - \frac{k_{-3}}{k_3} \right)$ |
| Δ | $1 + \frac{k_{-3}}{k_3} [G_0]$ |

functional dependence of species concentrations on time, during a particular batch trial, thus require the use of a three-dimensional plot. However, in order to obtain plots that can be more readily interpreted, it is convenient to employ the concept of pseudo reaction time in order to permit representation of the data in two dimensions [14]. The pseudo reaction time represents a mathematical combination of the time elapsed since the start of the first experiment in the series and the time elapsed during a particular trial. The pseudo reaction time for a particular trial is defined as:

$$t^* = \frac{\int_{t_1}^t a(\tilde{t}) d\tilde{t}}{a_0} \quad (7)$$

where a is the activity of the enzyme at a particular time; a_0 is the activity of the enzyme at time t_0 , t^* is the pseudo reaction time, \tilde{t} is a dummy variable, t_1 is the time at which processing of the particular batch of interest was initiated, and $(t - t_1)$ is the (elapsed) time during which a particular batch of oil is in contact with the lipase (the actual reaction time). In physical terms, the pseudo reaction time t^* becomes equal to the actual reaction time $(t - t_1)$. When the rate of deactivation is significant, the difference between the actual reaction time and the pseudo reaction time indicates how much longer the reaction mixture must remain in the reactor to achieve the conversion that would have been achieved if the enzyme had not been partially deactivated.

For the purpose of modeling, deactivation is usually treated as if it occurs in a single step. It is often assumed that irreversible deactivation of the active enzyme (E) to an inactive form (E_d) obeys first-order kinetics:

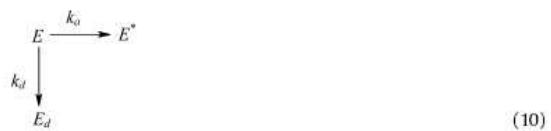


Then, the manner in which the enzyme activity varies with time is given by:

$$a(t) = a_0 \exp[-k_d(t - t_0)] \quad (9)$$

where t is time; t_0 is the time at which the first experiment with a particular sample of enzyme is started; $a\{t\}$ is the activity of the enzyme at a particular time t ; a_0 is the activity of the enzyme at time t_0 ; and k_d is the first order deactivation rate constant. The parameter a_0 can arbitrarily be assigned a value of one and subsequent activities are thus normalized with respect to this initial activity. Eq. (9) will be referred as Model A of enzyme deactivation.

In addition, deactivation of the immobilized lipase was considered as if the native enzyme (E) is deactivated to an inactive form (E_d) in one of two parallel processes, the other of which leads to another active stable form (E^*):



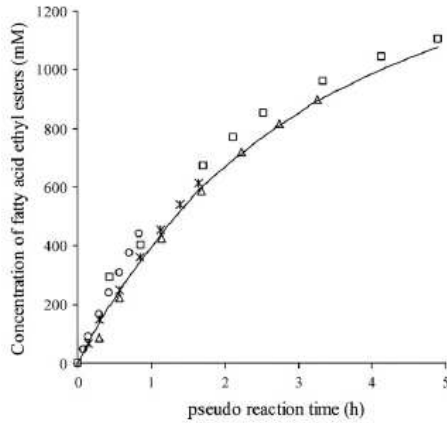


Fig. 2. Comparison between the experimental fatty acid ethyl ester concentration ((□) 2nd trial; (Δ) 5th trial; (*) 10th trial; (○) 15th trial) and values calculated with Model A (—) in the ethanolysis of sunflower oil at 40 °C mediated by Batch I of *Pseudomonas cepacia* lipase. Initial concentrations of ester bonds in triacylglycerols and ethanol were, respectively, 2424 mM and 2398 mM.

In this case (Model B of deactivation) the variation of enzyme activity with time is then given by:

$$a(t) = a_0 \{ k_a \exp[-k_d(t - t_0)] + (1 - k_a) \} \quad (11)$$

The pseudo reaction time expression corresponding to deactivation types A and B can be obtained by replacing, respectively, Eqs. (9) and (11) in Eq. (7):

$$t_A^* = \frac{1}{a_0} \left\{ \frac{1}{k_d} [\exp[-k_d(t_1 - t_0)] - \exp[-k_d(t - t_0)]] \right\} \quad (12)$$

$$t_B^* = \frac{1}{a_0} \left\{ \frac{k_a}{k_d} [\exp[-k_d(t_1 - t_0)] - \exp[-k_d(t - t_0)]] + (1 - k_a)(t - t_1) \right\} \quad (13)$$

Note that in the limit as k_d approaches zero, the difference in the exponential terms approaches $k_d(t - t_1)$ and t^* approaches $(t - t_1)$. Additionally, when t approaches infinity, the enzyme activity approaches zero for deactivation type A, while $a(t)$ approaches $(1 - k_a)$ for deactivation type B. The reader should also note that the value of $(t - t_1)$ represents the sum of the times that the enzyme was used as a biocatalyst in previous trials and the total time necessary to recover the catalyst in the various filtration steps prior to its use in the trial of interest.

In this work, the lipase stability was studied by carrying out a total of 15 trials in order to ensure that significant overall inactivation of the lipase was obtained. To characterize the kinetics of both the ethanolysis reaction and inactivation of the lipase, we utilized the data from trials 2, 5, 10, and 15. These four cycles provide sufficient information to quantitatively characterize the process over a range of lipase activity and to validate the ability of the methodology utilized to describe the kinetics of both ethanolysis and deactivation.

4. Results and discussion

4.1. Ethanolysis reactions

Inspection of Fig. 2 reveals how the concentrations of fatty acid ethyl esters present in the reaction mixture change during the 2nd, 5th, 10th, and 15th trials. The concentration of fatty acid ethyl esters

Table 2

Parameter estimates for lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil (Models A and B)

| Parameter ^a | Model A | Model B |
|------------------------|----------------------|--------------------|
| Ω_2 | 0.84E-04 ± 0.009E-04 | 1.8E-04 ± 0.03E-04 |
| Ψ_2 | 0.37E-04 ± 0.008E-04 | 1.6E-04 ± 0.07E-04 |
| K_1 | 0.04E-04 ± 0.002E-04 | 3.3E-04 ± 0.03E-04 |
| k_d | 2.26E-02 ± 0.009E-02 | 4.3E-02 ± 0.06E-02 |
| k_a | – | 0.86 ± 0.001 |
| RSS ^b | 0.0160 | 0.0022 |

^a The units for Ω_2 and Ψ_2 are $\text{mM}^{-1} \text{h}^{-1}$, for K_1 (mM^{-1}), and k_d and k_a (h^{-1}).

^b $\text{RSS} = \sum [(C^{\text{exp}} - C^{\text{cal}})/C^{\text{exp}}]^2$.

at 6 h of the 2nd, 5th, 10th and 15th trials total 1104.3, 897.7, 613.9 and 441.8 mM, respectively. These results indicate that the inactivation of the lipase plays a significant effect on the production of FAEE achieved in each of the trials studied. If inactivation were negligible, similar levels of FAEE were found at 6 h, in the four trials under study. For this reason, an enzyme deactivation term was incorporated in the kinetic model to describe the loss of enzyme activity with time. Incorporation of this deactivation term permits one to incorporate the concept of pseudo reaction time that transform the reaction times of each trial into their corresponding new values, i.e. those that would have been achieved if the enzyme had not been partially deactivated.

In the kinetic model utilized in the present study, the effects of reversibility and inhibition must be accounted for, although the improvement in the data fit obtained by inclusion of parameter K_1 in Eq. (6) was much smaller than that obtained by incorporation of the parameter associated with the reverse reaction (parameter Ψ_2).

Fig. 2 permits one to assess the quality of the data fit when the enzyme deactivation is given by type A. The mathematical form of this model (Model A) is obtained by combining Eq. (6) with a term ($e^{-k_d t}$) accounting for type A of enzyme deactivation rate. The parameters obtained in the regression procedure are given in Table 2, together with the residual sum of squares (RSS).

In order to improve the quality of the fit, a second mathematical expression to describe the deactivation of the lipase (i.e. deactivation type B) was also utilized. The mechanism for deactivation of the immobilized lipase considers irreversible deactivation accompanied by a parallel irreversible rearrangement to a stable form. The quality of the data fit obtained in this case (Model B) is depicted in Fig. 3. This model has the mathematical form of Eq. (6) with a term $1 + k_a(e^{-k_d t} - 1)$ accounting for type B of deactivation rate. The corresponding parameter estimates are given in Table 2.

Figs. 2 and 3, together with the RSS values obtained in Models A and B (see Table 2) clearly indicate that model B of enzyme deactivation provides a much better data fit than Model A. This result indicates that the most likely mechanism for inactivation of lipase follows two parallel processes leading to an active stable form and an inactive form of the lipase. Additionally, a high correlation of all experimental data could be achieved with Model B, and thus this model was employed in the prediction of reaction times for the optimal reutilization of the biocatalyst.

4.2. Prediction of reaction time

The concept of pseudo reaction time appears as a consequence of the inactivation of the lipase and permits one to fit the kinetic data of the numerous reactions effected with the same batch of lipase with different degrees of inactivation. One important application of this concept is to predict how much longer a reaction mixture should proceed to achieve a determined degree of ethanol-

Table 3
Concentrations of FAEE in the ethanolysis reactions (Batch II of immobilized lipase)

| Trial | Initial time, t_1 (h) | Accumulated time, t (h) | Reaction time, $t - t_1$ | Experimental FAEE concentration (mM) |
|-------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| 2 | 2.93 | 6.21 | 3.28 | 792.3 |
| 3 | 6.21 | 11.72 | 5.51 | 958.5 |
| 4 | 11.72 | 18.01 | 6.29 | 877.5 |
| 5 | 18.01 | 25.89 | 7.88 | 847.9 |

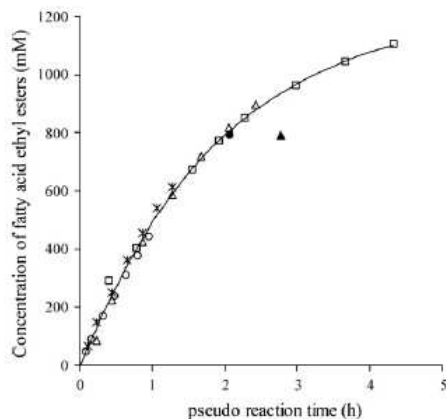


Fig. 3. Comparison between the experimental fatty acid ester concentration ((□) 2nd trial; (Δ) 5th trial; (✱) 10th trial; (○) 15th trial) and values calculated with Model B (—) in the ethanolysis of sunflower oil at 40 °C mediated by Batch I of *Pseudomonas cepacia* lipase. Initial concentrations of ester bonds in triacylglycerols and ethanol were, respectively, 2424 mM and 2398 mM. Representation of fatty acid ethyl ester concentration obtained with Batch II (second trial): (▲) initial lipase activity = 1; (●) initial lipase activity = 1.34.

ysis depending on the degree of inactivation of the lipase utilized. Then, a first prediction was effected with the same batch of lipase employed in the previous 15 trials (referred as Batch I). This batch corresponds to an immobilized lipase that has been working in ethanolysis reactions for 90 h. We fix a concentration of FAEE 933.7 mM as a target yield to be achieved regardless the residual activity of immobilized lipase utilized. According to Model B, the pseudo reaction time that produces this glyceryl ester bonds concentration is $t^* = 2.772$ h. Finally, by using Eq. (13) it is possible to predict the actual reaction time necessary to reach the target concentration for the sixteenth trial. This reaction time resulted to be 19.7 h. The 16th trial was carried out experimentally, and the concentration of FAEE attained at a reaction time of 19.7 h was 876.0 mM. This result demonstrates a reasonable agreement between the experimental reaction conversion and the conversion predicted by the kinetic model.

Nevertheless, the model could not be employed to predict reaction times when a new batch (referred as Batch II) of lipase is employed, since it is very difficult to obtain two batches of immobilized lipase with the exact same specific activity. This means that if Batch II of lipase is utilized, the FAEE concentration is quite different from 933.7 mM at $t^* = 2.772$ h could be obtained just because of the fact that Batch I and Batch II of lipases have not the exact same initial activity. In order to overcome this problem, the concept of pseudo initial activity (a_0^*) was developed. a_0^* can be defined as the initial activity that should have Batch II of immobilized lipase to achieve the target concentration at the pseudo reaction time given by the kinetic model. Using the concept of pseudo initial activity it is possible to predict the elapsed time necessary to achieve the target concentration for different batches of immobilized lipase.

Of course, this predictive methodology is based on the assumption that the new batch of lipase (Batch II) will present the same deactivation rate than the batch of lipase employed to develop the kinetic model (Batch I). Also, it has to be pointed out that the value of a_0^* (initial activity of Batch II) is related to that of a_0 (initial activity of Batch I) which was arbitrary assigned a value of one.

In order to validate this methodology to predict the optimal reutilization of the biocatalyst, new ethanolysis reactions of up to 100 g of sunflower oil were effected with a new batch of immobilized lipase (referred as Batch II). Again, the pseudo reaction time was fixed to 2.772 h, expecting a concentration of FAEE of 933.7 mM. The results obtained are given in Table 3. As can be observed in Table 3 for trial 2 the concentration of FAEE achieved was of 792.3 mM. As it could be expected, this value is different from that obtained with Batch I of lipase, may be due to different specific activity of the two batches of immobilized lipase utilized. The concentration of FAEE achieved (792.3 mM) compare to that predicted by the model (933.7 mM) indicates that the lipase activity of Batch II is lower than that of Batch I. This discrepancy, which is represented on Fig. 3, can be employed to find out a value of a_0^* that fits both the experimental and the predicted concentration of glyceryl ester bonds achieved (see Fig. 3). The optimal value resulted to be $a_0^* = 1.34$ and was then used to estimate how long the ethanolysis reaction should proceed to achieve the target concentration in the subsequent trials. The reader should note that the optimal a_0^* value resulted to be greater than a_0 (which was arbitrary assigned to be one). The a_0^* value should be interpreted as the initial activity that the new batch of lipase should have had in order to achieve the same glyceryl ester bonds concentration that the Batch I of lipase achieved at the given pseudo reaction time.

Based on the pseudo initial activity value obtained ($a_0^* = 1.34$) to correct the deviation between the experimental and target concentration, the reaction times for three consecutive trials were predicted. These values together with the experimental total ester bonds concentrations obtained are shown in Table 3; good agreement between the experimental concentration of FAEE achieved in each trial and the target value of 933.7 mM was obtained. This agreement support the methodology developed to predict the reaction time for the optimal reutilization of the biocatalyst in the ethanolysis reaction of vegetable oils.

5. Conclusions

A kinetic study of the sunflower oil ethanolysis catalyzed by *P. cepacia* lipase was carried out in this work to stand a methodology for the optimal reutilization of the biocatalyst. Mathematical expressions to represent both the rate of appearance of FAEE and the lipase deactivation rate were optimized. A high correlation of the experimental compositions obtained for 15 successive reaction cycles employing 10 g of sunflower oil and during 6 h each (i.e. the same batch of lipase was utilized for 90 h) was achieved.

The optimal reutilization of the biocatalyst involves estimate the time necessary to attain a desired total glyceryl ester bonds conversion. In this work, this necessary time was predicted using the optimal pseudo reaction time expression derived, which contains

information of both the reaction rate and the lipase deactivation rate. The methodology was applied to predict the necessary reaction time in subsequent trials employing the same initial batch of lipase, and also, in new reaction trials utilizing a new batch of lipase. In this last case, also specific activity of the particular batch of lipase employed was taken into account in order to allow the use of the same expression of pseudo reaction time in the prediction of the necessary reaction time.

Reaction times predicted to attain a 38% appearance of FAEE were experimentally verified by carrying out the corresponding ethanolsis reactions of 100 g of sunflower oil. The agreement between the desired and experimentally attained conversions achieved validates the methodology developed to estimate reaction time in lipase-catalyzed ethanolsis reactions.

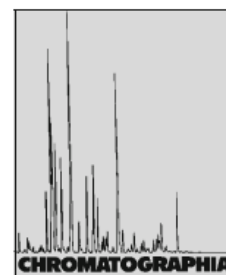
Acknowledgements

This work was supported by Comunidad Autonoma de Madrid (ALIBIRD, project number S-505/AGR-0153) and by Ministerio de Educación y Ciencia (Spain) project AGL2006-02031/ALI. Postdoctoral contracts (Programa Ramon y Cajal) for Carlos Torres and Tiziana Fornari were provided by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). A research associate contract for Daniel Tenllado was provided by Universidad Autonoma de Madrid.

References

- [1] G.G. Haraldsson, B. Kristinsson, R. Stigudardottir, G.G. Gudmundsson, H. Breivik, The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 1419–1424.
- [2] H. Breivik, G.G. Haraldsson, B. Kristinsson, Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 1425–1429.
- [3] C.F. Torres, M. Moeljadi, C.G. Hill Jr., Lipase-catalyzed ethanolsis of fish oils: multi-response kinetics, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 274–281.
- [4] C.F. Torres, C.G. Hill, C. Otero Jr., Lipase-catalyzed ethanolsis of borage oil: a kinetic study, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 756–763.
- [5] T. Schulz, J. Pleiss, R.D. Schmid, Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols—a quantitative model, *Protein Sci.* 9 (2000) 1053–1062.
- [6] R. Irimescu, Y. Iwasaki, C.T. Hou, Study of TAG ethanolsis to 2-MAG by immobilized *Candida antarctica* lipase and synthesis of symmetrically structured TAG, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (2002) 879–883.
- [7] C.F. Torres, T.J. Nettekoven, C.G. Hill Jr., Preparation of purified acylglycerols of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their re-esterification with conjugated linoleic acid, *Enzyme Microb. Technol.* 2 (2003) 49–58.
- [8] R. Irimescu, K. Furihata, K. Hata, Y. Iwasaki, T. Yamane, Utilization of reaction medium-dependent regioselectivity of *Candida antarctica* lipase (Novozym 435) for the synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-docosahexaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 285–289.
- [9] H. Nouredini, X. Gao, R.S. Philkana, Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 769–777.
- [10] Y. Watanabe, T. Nagao, Y. Hirota, M. Gitano, Y. Shimada, Purification of tocopherols and phytosterols by a two step in situ enzymatic reaction, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 339–345.
- [11] C.F. Torres, A.M. Toré, T. Fornari, F.J. Señoráns, G. Reglero, Ethanolsis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: a kinetic study, *Biochem. Eng. J.* 34 (2007) 165–171.
- [12] P. Maciej, K.W. Szweczyk, Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 736–744.
- [13] L.P. Lessard, C.G. Hill Jr., Effect of pH on the production of lipolyzed butter oil by a calf pregastric esterase immobilized in a hollow-fiber reactor, I. Uniresponse kinetics, *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2000) 183–195.
- [14] F.X. Malcata, C.G. Hill Jr., C.H. Amundson, Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor, Part II, Uniresponse kinetic studies, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 984–1001.

A Versatile GC Method for the Analysis of Alkylglycerols and Other Neutral Lipid Classes



Carlos F. Torres[✉], Daniel Tenllado, Francisco J. Señorans, Guillermo Reglero

Sección Dept. Ciencias de la Alimentación, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco 28049 Madrid, Spain; E-Mail: carlos.torres@uam.es

Received: 29 July 2008 / Revised: 10 October 2008 / Accepted: 17 November 2008

Abstract

The present study focuses on the GC analysis of alkylglycerols and other neutral lipid classes. For that matter, a simple and rapid method based on the direct on-column injection has been developed for the simultaneous analysis of numerous fatty samples from different sources. Chemical transformation or treatment of the sample before the injection of samples is not required. In addition, quantification of different lipid classes was also evaluated with satisfactory results. Excellent results regarding reproducibility and resolution were observed. This method can be utilized for multiple purposes such as analyses of edible oils, shark liver oils, deodorizer distillates, time course analyses of lipase-catalyzed reactions, etc.

Keywords

Gas chromatography
On-column injection
Non-polar lipids
Sterols
Alkylglycerols

Introduction

Lipid classes occur in nature as a complex mixture of molecular species in which the fatty acids and other aliphatic moieties are present in different combinations. One excellent method of resolving this complexity is to use high-temperature gas chromatography [1]. In

some lipids, such as cholesterol esters, only the single fatty acid moiety will vary; in others, for example triacylglycerols, every position of each molecule may be esterified by a different fatty acid. Ideally, it would be preferable if lipids could be separated into individual molecular species without being modified in any way. The chromatographic

methods used for the analysis of molecular species of lipids differ little in principle from those used for simpler aliphatic molecules such as the fatty acids. When they are applied to the isolation of molecular species of more complicated lipids, the separations achieved depend on the combined physical properties of all the aliphatic residues. If triacylglycerols are considered to illustrate the magnitude of the analytical problem, a triacylglycerol with only five different fatty acid constituents may consist of 75 different molecular species.

In addition to the separation of lipid classes, it is also possible to separate each particular lipid class according to their molecular weight but there is no useful resolution by degree of unsaturation, although some partial separations may be attained. High-temperature GC has until recently been used largely to separate molecular species simply according to the combined chain-lengths of the fatty acid moieties. However, improvements in technology have also led to separations according to the degree of unsaturation. In essence, high temperature GC is simply an analytical technique, but one which is capable of a high degree of precision. It can be married well with mass spectrometry.

The length of column used plays a crucial role and a compromise between

Original
DOI: 10.1365/s10337-008-0935-5

© 2009 Vieweg+Teubner | GWV Fachverlage GmbH

Published online: 10 January 2009

Table 1. Retention times (t_R), resolution, and response factors (R_F) of the different lipids under study

| | t_R (min) | Resolution | R_F |
|--|-------------|------------|-------|
| Dodecane | 1.8 | 21.3 | 1.000 |
| Linoleic acid methyl ester | 4.3 | 89.0 | 1.370 |
| Oleic acid | 4.4 | 3.9 | 1.073 |
| Batyl alcohol | 5.5 | 24.0 | 1.074 |
| 2-Monolein | 5.7 | 5.1 | 1.388 |
| Squalene | 6.1 | 7.8 | 0.869 |
| α -Tocopherol | 6.5 | 8.9 | 1.153 |
| β,γ -Tocopherol | 6.9 | 8.7 | 1.153 |
| δ -Tocopherol | 7.4 | 7.4 | 1.153 |
| Stigmasterol | 8.2 | 8.6 | 0.901 |
| Palmityl palmitate | 9.4 | 11.2 | 0.857 |
| 1,2-Di- <i>O</i> -hexadecyl glycerol | 16.5 | 44.9 | 1.182 |
| 1,2 Diolein | 21.5 | 35.5 | 1.919 |
| 1,3 Diolein | 22.1 | 5.9 | 1.919 |
| Cholesteryl ester | 23.6 | 17.4 | 1.271 |
| Cholesteryl ester | 24.9 | 18.0 | 1.271 |
| Cholesteryl oleate | 26.4 | 13.0 | 1.271 |
| 1- <i>O</i> -Palmityl-2,3-dipalmitoyl-glycerol | 27.8 | 9.4 | 0.772 |
| Triolein | 37.9 | 30.0 | 1.111 |

the optimum in terms of resolution with a need to limit the exposure time of the solute to high temperatures to the minimum has to be found.

Another important aspect is the precision that can be attained in quantification. It is virtually essential that electronic integration be applied for peak area measurements, ideally with some form of automatic base-line correction. Many different gas chromatographs have been used for the purpose, and most modern instruments appear suitable, but it is evident that the nature of the injection system can be of crucial importance. The minimum requirement is for some form of on-column injection. Grob [2], for example, demonstrated that techniques based on sample vaporization in the injector are not suitable for intact lipids as discrimination in favor of the less volatile constituents occurs. With splitless injection, most losses were found to be a consequence of insufficient elution from the syringe needle; split injection gave even worse results, although the reasons for this were not clear, and only cold on-column injection gave acceptable recoveries. Any involatile material ("dirt") on the column from previous analyses affected the injection because of adsorption effects [3, 4]. In addition, the flow-rate of the carrier gas can have a marked effect on sample loss and discrimination, and thermal

decomposition takes place to change the sample composition [5]. Cold on-column injection eliminates many of these problems, although other factors then come into play [6].

A method combining a baseline separation of the different components present in deodorizer distillate has been published [7]. Analysis of the tocopherol and sterol content of deodorizer distillate usually requires a laborious sample preparation procedure including saponification and derivatization. Determination of vitamin E compounds along with other important chemicals in vegetable oils and fats has been accomplished by capillary GC-FID with continuous on-line removal of triglycerides via transesterification [8]. Numerous GC methods for the analysis of sterols and steryl esters have been reviewed recently [9]. In addition, direct injection without derivatization for the analysis of free and esterified sterols has also been reported [10].

Analysis of alkylglycerols requires numerous steps including saponification, fractionation, silylation, and subsequent analysis [11]. For that matter identification and quantification of samples containing free and esterified alkylglycerols frequently combines GC and LC analyses and results laborious and very time consuming. Therefore, a method for simultaneous analysis of neutral lipid

classes occurring in shark liver oil and its derivatives enormously facilitates the monitoring of processes involving these substances such as fractionation, purification, chemical and/or enzymatic modifications, and biological determinations.

Previously in our lab, an LC method with evaporative light scattering detection (ELSD) for the simultaneous analysis of alkoxyglycerols and other neutral lipid classes [12] has been developed. However, the separation achieved was not influenced by the nature of the aliphatic residues. In other words, normal phase chromatography is based on the polar groups of the molecule regardless of the non-polar side chain of the lipid class under study. In an attempt to improve the separation of the different lipid classes attained by the mentioned LC-ELSD, we have developed an easy and rapid GC methodology for the simultaneous analysis of neutral lipid classes including alkylglycerols.

The present study is based on the direct on-column injection without chemical transformation of the sample, for the analysis of numerous fatty samples from different sources. With this methodology, separation of numerous lipid classes according to both structure and chain length is attained. Hence, a higher number of chemical species from each lipid class can be simultaneously identified and quantified. This method is intended to be used for multiple purposes such as simultaneous analyses of alkylglycerols and other neutral lipids, edible oils, deodorizer distillates, lipase-catalyzed reactions, etc.

Experimental

Materials

Hexadecane and dodecane were purchased from Merck (Hohenbrunn, Germany) and stigmasterol, palmityl palmitate, cholesteryl oleate, squalene, linoleic acid methyl ester, 1,2-di-*O*-hexadecyl-*rac*-glycerol, 1-oleyl-*rac*-glycerol, oleic acid, 1-*O*-palmityl-2,3-dipalmitoyl-*rac*-glycerol, α and δ -tocopherol, triolein, batyl alcohol and diolein were purchased from Sigma-Aldrich (Bornem,

Belgium) and were at least 90% pure except cholesteryl oleate that was technical grade. All solvents were LC-grade from Lab-Scan (Dublin, Ireland).

Gas Chromatography

Separations were performed on a Hewlett-Packard 5890 series II gas chromatograph with on-column injection using a 7 m 5% phenyl methyl silicone capillary column (Quadrex Corporation, New Haven, CT, USA) (0.25 μm I.D.). 12 cm of a 530 μm I.D. deactivated column was used as pre-column. An injector and detector temperature of 43 and 360 $^{\circ}\text{C}$ respectively were utilized. The temperature program was as follows: starting at 40 $^{\circ}\text{C}$ and then heating to 250 $^{\circ}\text{C}$ at 42 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ with 10 min hold, followed by heating from 250 to 325 $^{\circ}\text{C}$ at 7.5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ with 30 min hold. Helium was used as a carrier gas at a pressure of 5.2 Psi. The peaks were computed using GC chemstation software.

Results and Discussion

Response Factors

Two different internal standards namely dodecane and hexadecane were utilized for the quantification of the different neutral lipids under study. Response factors were calculated accurately weighing the pure component and by means of five successive injections. Good repeatability of the response factors was observed over the period of time of the present study. Linoleic acid methyl ester, oleic acid, batyl alcohol (1-*O*-octadecylglycerol), 2-monolein, α -tocopherol, stigmaterol, palmityl palmitate, 1,2-di-*O*-hexadecyl glycerol, diolein, cholesteryl oleate, 1-*O*-palmityl-2,3-dipalmitoyl-glycerol, and triolein were used as the estimated response factors for fatty acid methyl/ethyl esters, fatty acids, non-esterified alkylglycerols, monoacylglycerols, tocopherols, sterols, waxes, dialkylglycerols, diacylglycerols, sterol esters, and triacylglycerols respectively. The response factors obtained are shown

Table 2. Relative standard deviation (RSD) of the intra-day and inter-day response times for the different lipid classes analyzed

| | Intra-day | | Inter-day | |
|--|-----------|------|-----------|-------|
| | SD | RSD | SD | RSD |
| Dodecane | 0.003 | 2.06 | 0.002 | 1.81 |
| Linoleic acid methyl ester | 0.002 | 2.05 | 0.002 | 2.36 |
| Oleic acid | 0.003 | 2.26 | 0.004 | 3.00 |
| Batyl alcohol | 0.002 | 1.96 | 0.003 | 2.78 |
| 2-Monolein | 0.004 | 5.64 | 0.004 | 5.30 |
| Squalene | 0.004 | 1.94 | 0.004 | 2.28 |
| α -Tocopherol | 0.001 | 1.86 | 0.020 | 23.33 |
| δ -Tocopherol | 0.001 | 2.30 | 0.022 | 22.94 |
| Stigmaterol | 0.003 | 1.90 | 0.003 | 2.31 |
| Palmityl palmitate | 0.003 | 2.03 | 0.003 | 2.25 |
| 1,2-Di- <i>O</i> -hexadecyl glycerol | 0.002 | 2.10 | 0.002 | 2.32 |
| 1,3 + 1,2 Diolein | 0.007 | 9.25 | 0.004 | 5.30 |
| Cholesteryl ester | 0.003 | 3.04 | 0.004 | 3.54 |
| 1- <i>O</i> -Palmityl-2,3-dipalmitoyl-glycerol | 0.002 | 2.39 | 0.002 | 2.11 |
| Triolein | 0.004 | 3.00 | 0.004 | 2.72 |

Table 3. Relative standard deviation (RSD) of the intra-day and inter-day retention times for the different lipid classes analyzed

| | Intra-day | | Inter-day | |
|--|-----------|------|-----------|------|
| | SD | RSD | SD | RSD |
| Dodecane | 0.004 | 0.24 | 0.003 | 0.15 |
| Linoleic acid methyl ester | 0.022 | 0.53 | 0.052 | 1.23 |
| Oleic acid | 0.026 | 0.59 | 0.060 | 1.36 |
| Batyl alcohol | 0.050 | 0.91 | 0.108 | 1.96 |
| 2-Monolein | 0.054 | 0.96 | 0.117 | 2.06 |
| Squalene | 0.056 | 0.93 | 0.120 | 1.98 |
| α -Tocopherol | 0.057 | 0.89 | 0.123 | 1.90 |
| γ -Tocopherol | 0.058 | 0.85 | 0.123 | 1.79 |
| δ -Tocopherol | 0.059 | 0.80 | 0.128 | 1.74 |
| Stigmaterol | 0.060 | 0.74 | 0.125 | 1.53 |
| Palmityl palmitate | 0.066 | 0.71 | 0.130 | 1.39 |
| 1,2-Di- <i>O</i> -hexadecyl glycerol | 0.048 | 0.29 | 0.079 | 0.48 |
| 1,2-Diolein | 0.012 | 0.05 | 0.016 | 0.07 |
| 1,3-Diolein | 0.016 | 0.07 | 0.016 | 0.07 |
| Cholesteryl ester | 0.008 | 0.03 | 0.009 | 0.04 |
| Cholesteryl ester | 0.008 | 0.03 | 0.008 | 0.03 |
| Cholesteryl oleate | 0.012 | 0.04 | 0.015 | 0.06 |
| 1- <i>O</i> -Palmityl-2,3-dipalmitoyl-glycerol | 0.013 | 0.05 | 0.018 | 0.06 |
| Triolein | 0.053 | 0.14 | 0.048 | 0.13 |

in Table 1. This table also shows the resolution of the different peaks and it can be observed that in all cases it was higher than 3.5, which indicates complete separation of all compounds under study.

Table 1 also shows the retention times and resolution of β , γ -tocopherol and δ -tocopherol that were obtained injecting a standard δ -tocopherol with a purity of ca. 90%. It should also be indicated that the cholesteryl oleate utilized in the lipid mixture was technical

grade and contained also two other cholesteryl esters (t_R 23.6 and 24.9).

Reproducibility

Variability intra-day and inter-day of both retention times and response was evaluated for the different lipid classes under study. The relative standard deviation of intra-day variation for retention times and areas never exceeded of 1 and 10, respectively (Tables 2 and 3).

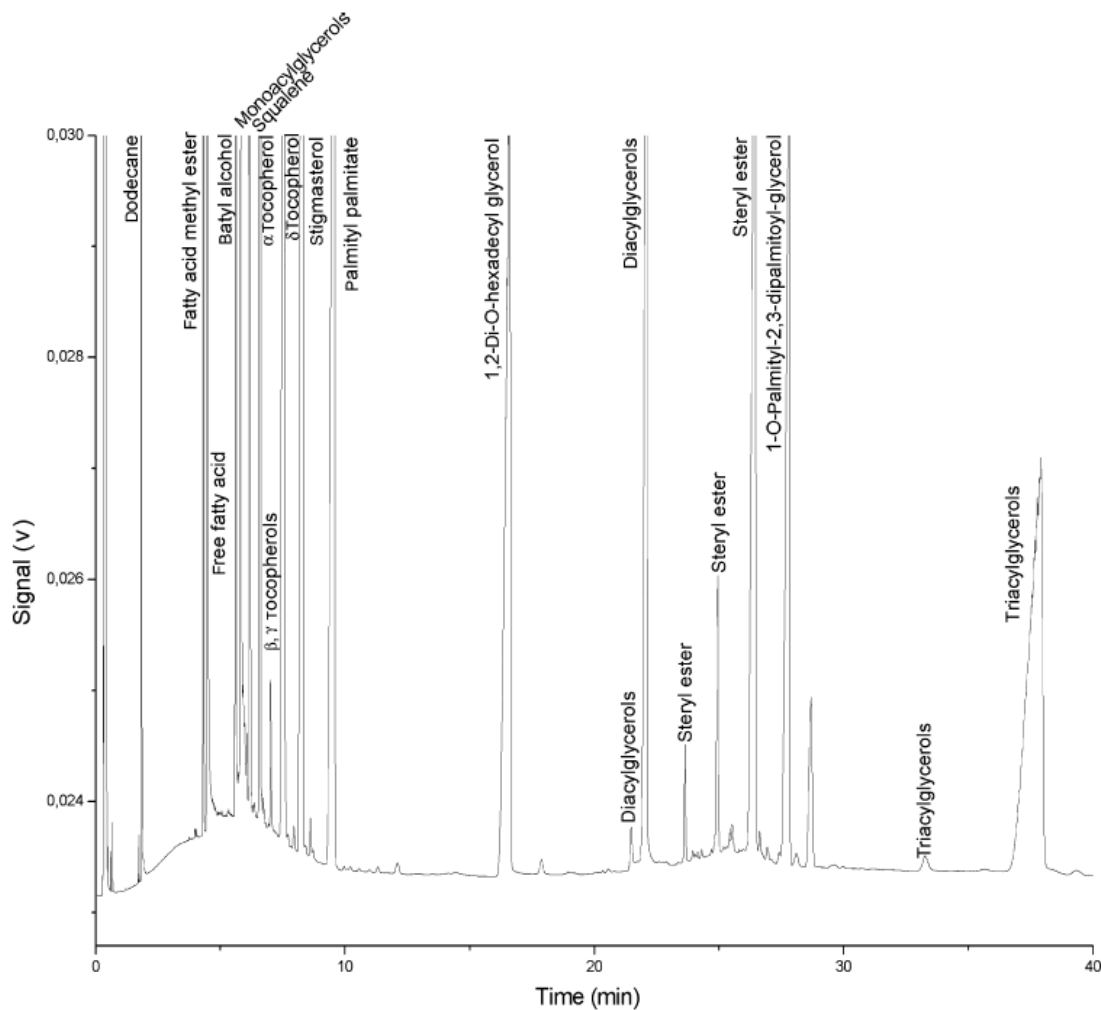


Fig. 1. Separation of the different lipid classes

To determine inter-day variation, six injections of the mixture ($n = 6$) of lipids under study were performed in five separate days during a total period of time of 1 month. Inspection of Table 3 indicates a very good reproducibility regarding the retention times and an acceptable precision in the response. It should be noted that variation inter-day of the response was smaller than 6 except for tocopherols (ca. 20). This result besides the apparition of a slight color in the solution containing the lipid mixture indicates

than these compounds are partially oxidized over time. The rest of the compounds were stable along the study and provide very small variation in both response and retention time.

Quantification of Samples

In order to validate the proposed GC method, the lipid mixture utilized in the present study (Fig. 1) was also quantified. For that matter the response factors for each lipid class were utilized. Quan-

tification of ca. 96% (w/w) of the total lipids analyzed over a month period was attained. Taken into consideration the lack of derivatization procedures in the present study and the partial degradation of tocopherols, the results obtained were excellent.

In addition, analyses of a deodorizer distillate from soybean oil, a mixture of steryl esters produced via lipase-catalyzed esterification of butteroil fatty acids with sterols, and an intermediate product of ethanolysis of shark liver oil were effected.

Original

The results are shown in Figs. 2, 3, and 4. Quantification of these samples was also carried out (Table 4). The weight balance obtained for the three product mixtures 1, 2, and 3 was ca. 81, 110, and 75%, respectively.

Figure 3 shows fatty acid ethyl esters that can be separated by their corresponding chain length, non esterified alkylglycerols (separated in two peaks including butyl alcohol), monoesterified alkylglycerols (that possess a similar retention time to those of diacylglycerols), and diesterified alkylglycerols with retention times among those of 1-*O*-palmityl-2,3-dipalmitoyl-*rac*-glycerol and triacylglycerols.

In order to identify the different peaks, in some cases, such as the mixture of steryl esters, the product was first analyzed via LC according to our previously published method [11]. Hence, it is possible to know the composition of our product in lipid classes. Then, peak assignment can be easily effected considering two main assumptions: (i) the number of sterols and (ii) the number of fatty acids, according to chain length, contained in the product mixture. Figure 3 shows that ca. 24 different steryl esters can be separated. If one takes into consideration that three main sterols and eight different fatty acids were separated up to 24 different sterols could be obtained. This result indicates the versatility of the present methodology and how well it can work together with other analytical techniques such as LC.

In order to provide more accuracy in the identification of peaks this methodology is intended to be coupled to a mass spectrometer in the near future.

Conclusions

The methodology herein described can be utilized for the analysis of numerous lipid classes without any treatment by simple on-column injection. Good reproducibility regarding the retention times and responses can be obtained for the different lipid classes studied. The response factors calculated can be uti-

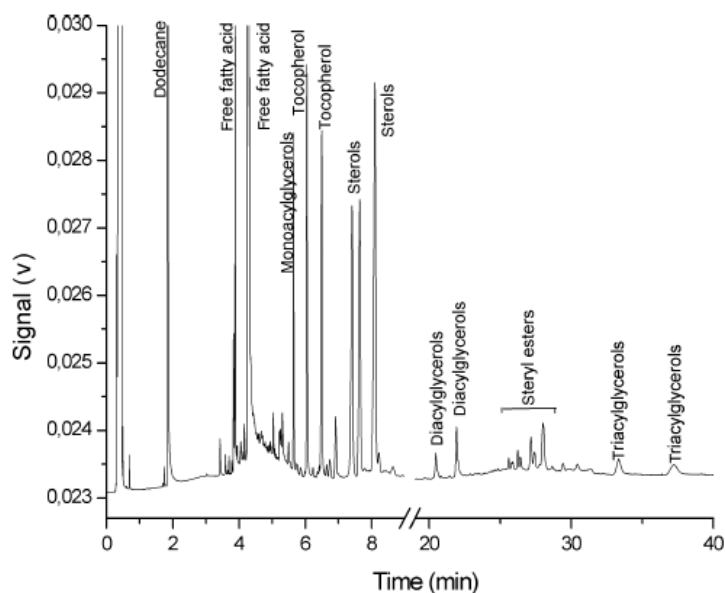


Fig. 2. GC analysis of a deodorizer distillate from soybean oil

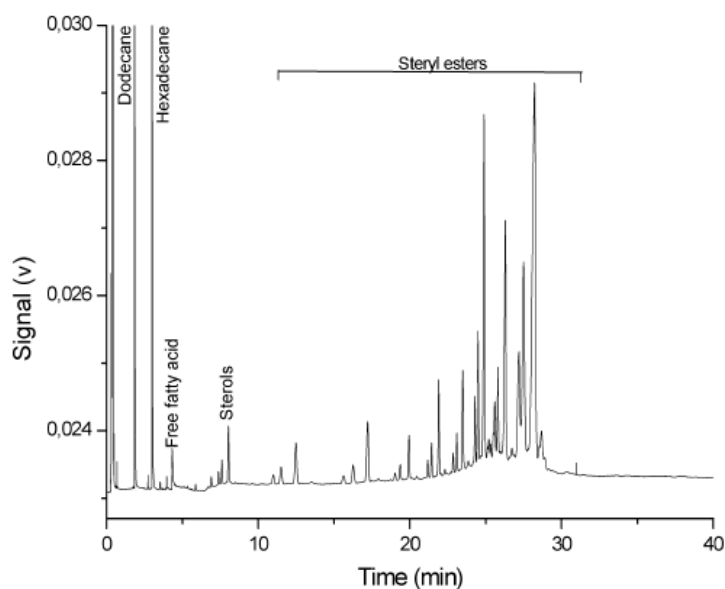


Fig. 3. GC analysis of steryl esters produced via lipase-catalyzed esterification of butteroil with sterols

lized for quantification of major and minor constituents of numerous fats and oils. In addition, monitoring the kinetics

of lipase-catalyzed reactions involving sterols, alkoxyglycerols and acylglycerols is also possible.

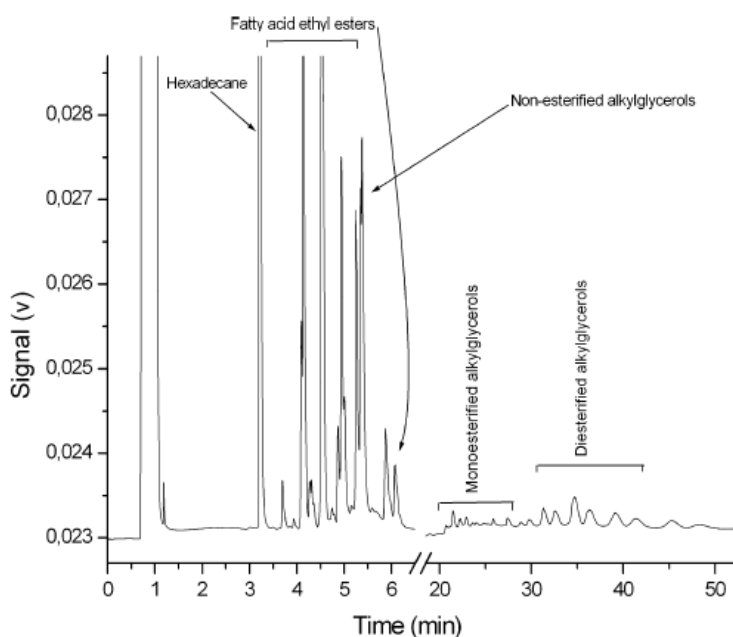


Fig. 4. GC analysis of an intermediate product obtained via ethanolysis of shark liver oil

Table 4. Quantification of a deodorizer distillate from soybean oil (1) a mixture of steryl esters produced via lipase-catalyzed esterification of butteroil fatty acids with sterols (2), and an intermediate product of ethanolysis of shark liver oil (3)

| w/w (%) | 1 | 2 | 3 |
|-------------------------------|------|------|------|
| Dodecane | 23.4 | 4.6 | 0.0 |
| Hexadecane | 0.0 | 8.4 | 12.6 |
| Fatty acid ethyl esters | 0.0 | 0.0 | 35.4 |
| Non-esterified alkylglycerols | 0.0 | 0.0 | 5.5 |
| Free fatty acids | 26.0 | 1.0 | 0.0 |
| Monoacylglycerols | 5.8 | 0.0 | 0.0 |
| Tocopherols | 4.7 | 0.0 | 0.0 |
| Sterols | 10.3 | 1.3 | 0.0 |
| Monoesterified alkylglycerols | 0.0 | 0.0 | 4.4 |
| Diacylglycerols | 3.2 | 0.0 | 0.0 |
| Steryl ester | 6.5 | 95.4 | 0.0 |
| Diesterified alkylglycerols | 0.0 | 0.0 | 18.6 |
| Triacylglycerols | 1.5 | 0.0 | 0.0 |

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of the company Nobo

and the CDTI project CENIT HIGEA (CEN-20072003). This work was also supported by the Comunidad Autonoma de Madrid (ALIBIRD, project number

S-505/AGR-0153) and the Ministerio de Educación y Ciencia (project AGL2006-02031/ALI), Spain. A postdoctoral contract (Programa Ramón y Cajal) for C. Torres was provided by the Ministerio de Educación y Ciencia and the Universidad Autónoma de Madrid, Spain.

References

- Christie WW (2003) In: PJ Barnes & Associates (eds) *Lipid Analysis—3rd edn*. The Oily Press Lipid Library, England
- Grob K (1979) *J Chromatogr A* 178:387–392. doi:10.1016/S0021-9673(00)92496-8
- Grob K (1984) *J Chromatogr A* 287:1–14. doi:10.1016/S0021-9673(01)87669-X
- Grob K, Bossard M (1984) *J Chromatogr A* 294:65–75. doi:10.1016/S0021-9673(01)96115-1
- Mares P, Husek P (1985) *J Chromatogr A* 350:87–103. doi:10.1016/S0021-9673(01)93509-5
- Grob K, Neukom HP (1980) *J Chromatogr A* 189:109–117. doi:10.1016/S0021-9673(00)81511-3
- Verleyen T, Verhe R, Garcia L, Dewettinck K, Huyghebaert A, De Greyt W (2001) *J Chromatogr A* 921:277–285. doi:10.1016/S0021-9673(01)00881-0
- Ballesteros E, Gallego M, Valcarcel M (1996) *J Chromatogr A* 719:221–227. doi:10.1016/0021-9673(95)00198-0
- Abidi SL (2001) *J Chromatogr A* 935:173–201. doi:10.1016/S0021-9673(01)00946-3
- Choong Y-M, Lin H-J, Chen C-W, Wang M-L (1999) *J Food Drug Anal* 7:279–290
- Bordier CG, Sellier N, Foucault AP, Le Goffie F (1996) *Lipids* 31:521–528. doi:10.1007/BF02522646
- Torres CF, Vazquez L, Senorans FJ, Reglero G (2005) *J Chromatogr A* 1078:28–34. doi:10.1016/j.chroma.2005.04.015

Research Article

Supercritical Phase Equilibria Modeling of Glyceride Mixtures and Carbon Dioxide Using the Group Contribution EoS

Tiziana Fornari, Daniel Tenllado, Carlos Torres, and Guillermo Reglero

Department of Production and Characterization of Novel Foods, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM), C/Nicolás Cabrera, 9. Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Tiziana Fornari, tiziana.fornari@uam.es

Received 19 May 2011; Revised 27 July 2011; Accepted 29 July 2011

Academic Editor: Roumiana P. Stateva

Copyright © 2011 Tiziana Fornari et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The Group Contribution Equation of State (GC-EoS) was extended to represent high-pressure phase equilibria behavior of mixtures containing mono-, di-, triglycerides, and carbon dioxide (CO₂). For this purpose, the alcohol-ester and the alcohol-triglyceride binary group interaction parameters were regressed in this work, using experimental phase equilibria data from the literature. The capability of the parameters obtained was assessed by applying the GC-EoS model to simulate the supercritical CO₂ fractionation of a complex glyceride mixture, which was produced by the ethanolysis of sunflower oil. Experimental data was obtained in a countercurrent packed extraction column at pressures ranging from 16 to 25 MPa and temperatures from 313 to 368 K. The GC-EoS model was applied in a completely predictive manner to simulate the phase equilibria behavior of the multistage separation process. The chemical analysis of the glyceride mixture allowed a significant simplification of its complex composition and thus, a simple and satisfactory simulation of the supercritical extraction process was achieved.

1. Introduction

Lipid compounds are gaining increasing attention due to a wide range of applications in the food industry. Particularly, monoglycerides and diglycerides are potentially attractive starting materials for numerous synthetic applications [1, 2]. They can be employed for the synthesis of structured lipids, phospholipids, glycolipids, lipoproteins, and preparation of numerous enzyme agonists and antagonists [3]. Monoglycerides are the most commonly used surface-active lipids and can be used for emulsification, aeration, as defoaming agents, oil stabilizers, and so forth [4]. Additionally, diglycerides have been developed in recent years as alternatives for fat/oil [5].

Mono-, di-, and triglyceride mixtures are commonly produced by glycerol esterification with fatty acids, transesterification of triglycerides or lipase-catalyzed hydrolysis, or alcoholysis of oils. Generally, the goal is the manufacture of a final product with a defined glyceride composition, and purification of the reaction product is often necessary.

Supercritical carbon dioxide SCCO₂ has been widely studied as a potential solvent for lipid extraction and fractionation [6]. In the case of glyceride mixtures, differences in molecular weight, polarity, and chemical structure of the glyceride species directly affect the resultant SCCO₂ separation process. That is, the distribution of the different species between the liquid and supercritical phase depends not only on the CO₂-glyceride and glyceride-glyceride interactions, but also on the glyceride vapor pressures [7].

Solubility data of mono-, di-, and triglycerides in SCCO₂ reported in the literature [8–12] corroborate these ideas. Although trilaurin has a molecular weight 2.3 times higher and a vapor pressure 150 times smaller than monolaurin, the high polarity of monolaurin was found to limit its solubility in SCCO₂ [10, 11]. When the fatty-acid chain length is increased, a greater monoglyceride solubility is obtained compared to the triglyceride solubility of an equivalent fatty-acid chain length, as demonstrated for the case of the monoolein/triolein pair [12]. Therefore, as the fatty-acid chain length increases, the difference in molecular weight and vapor

pressure between the mono-, di-, and triglyceride becomes more significant, minimizing the polarity differences of the respective lipid species.

Solubility and vapor-liquid equilibrium data are frequently employed to the regression of phase equilibria thermodynamic model parameters. Then, these models can be utilized to the simulation and optimization of supercritical extraction (SFE) processes. Particularly, the Group Contribution Equation of State (GC-EoS) [13, 14] has been applied as the phase equilibria predictive tool in the simulation and optimization of supercritical countercurrent extraction and fractionation of several lipid-type raw materials [15–18]. The great advantage of the group contribution approach is the representation of the usually complex (multicomponent) raw material by using a reduced number of functional groups. In turn, the validity of the group contribution method is very much supported by the accuracy of the resulted group interaction parameters.

Recently, Fornari [19] presented a revision of the GC-EoS parameter table and demonstrate the capability of the model to represent high-pressure vapor-liquid equilibria of several oil-constituent substances (fatty acids, fatty acid alkyl esters, triglycerides, tocopherols, and squalene) with SCCO_2 . Nevertheless, the lack of some binary group interaction parameters in the GC-EoS parameter matrix did not allow the phase equilibria prediction of glyceride mixtures and CO_2 . Thus, the alcohol-ester and alcohol-triglyceride binary interaction parameters were obtained in this work, and the parameters regressed were tested by applying the model in a predictive manner to simulate the supercritical fractionation of a complex glyceride mixture.

2. Experimental

2.1. Equipment and Method. The supercritical fluid extraction (SFE) plant employed in this work comprises a countercurrent extraction column (316 stainless steel), two cascade separator cells (270 mL capacity), and a cryogenic trap at atmospheric pressure. The column is 100 cm height, 12 mm internal diameter and is packed with Fenske rings (3×0.5 mm). The extract can be fractionated by a cascade decompression in the two separator cells. All units are electrically thermostated. The SFE pilot plant has computerized instrumentation and a control system with several safety devices including valves and alarms [16].

A continuous flow of CO_2 was pumped (Dosapro Milton Roy pump) up to the extraction pressure and preheated up to the extraction temperature before being introduced into the packed column. When the operating pressure and temperature were stabilized, the liquid sample was pumped (100 mL/h) from the top of the extraction column during 60 min. Then, CO_2 was introduced into the column for additional 30 min (without pumping liquid sample) to ensure that all material was extracted. The liquid sample was also preheated up to the extraction temperature before being introduced into the column and thus, the extraction procedure was carried out under isothermal condition. In all experiments, the first separator (S1) was maintained at 15 MPa and 333 K, while the second separator cell (S2) was

maintained at low pressure (<2 MPa) in order to recover all the remained extracted material in this unit. Samples were collected from the fraction not extracted or residue (bottom product) and from the liquid material precipitated in the separators (top products). All samples were weighted and analyzed; the material balance closed in all experiments with an accuracy of 90% or greater. The compositions of raffinate (bottom product) were employed to test the GC-EoS model simulation.

2.2. Materials and Analysis

2.2.1. Sample and Reagents. Sunflower oil was purchased in a Spanish market. The partial ethanolsis of the oil was carried out in our laboratory as described in previous work [20]. According to the analysis carried out in our laboratory, the reaction product resulted contained (weight basis) 48.2% of fatty acid ethyl esters, 17.0% of monoglycerides, 26.5% diglycerides, and 7.9% triglycerides, together with minor amounts of free fatty acids. Carbon dioxide N38 (99.98%) was purchased to AL Air Liquide España S. A. (Madrid, Spain). All solvents used were HPLC grade from Lab-Scan (Dublin, Ireland).

2.2.2. HPLC Analysis. The composition analyses of the neutral lipids were effected on a kromasil silica 60 column (250 mm by 4.6 mm, Análisis Vinicos, Tomelloso, Spain) coupled to a CTO 10A VP 2 oven, an LC-10AD VP pump, a gradient module FCV-10AL VP, a DGU-14A degasser, and an evaporative light scattering detector ELSD-LT from Shimadzu (IZASA, Spain). The ELSD conditions were 2.2 bars, 35°C, and gain 3. The flow rate was 2 mL/min. A splitter valve was used after the column and only 50% of the mobile phase was directed through the detector. The column temperature was maintained at 35°C. The mobile phase utilized has been previously reported by Torres et al. [21].

2.2.3. Gas Chromatography. For the analysis of fatty acid ethyl esters, one μL of the diluted sample was injected into an Agilent (Avondale, PA) gas chromatograph (6890N Network GC System) coupled to an autosampler (Agilent 7683B). The capillary column was a 30 m HP-88 (Avondale, PA) (0.25 mm i.d.). The temperatures of the injector and detector were 220 and 250°C, respectively. The temperature program was as follows: starting at 100°C and then heating to 180°C at 20°C/min; followed by heating from 180 to 220°C at 15°C/min. The final temperature (220°C) was held for 30 minutes. Hexane was employed as solvent in preparing the samples. Identification of the various free fatty acids was based on a PUFA no. 3 standard (no. 4-7085) obtained from Supelco.

3. The GC-EoS Model

The GC-EoS [13, 14] is a group contribution equation of state originally developed for both nonpolar and polar components. The residual Helmholtz energy of the system is calculated assuming two contributions: a free volume repulsive term and a contribution which accounts for energy

attractions among groups. A detail description of the model equations is given in the appendix.

In the repulsive term, each substance is characterized by its critical hard sphere diameter d_c . In the original model [13], the d_c values are calculated from critical properties for gases, and for solvents are fitted to pure component vapor pressure data. Nevertheless, these procedures cannot be adopted for low-volatile and thermolabile substances, such as high molecular weight glycerides, since their critical parameters are unattainable and the vapor pressure data are usually scarce and inaccurate. In these cases, the following procedure, which was applied in this work, can be adopted. First, Fedors group contribution method [22] is used to calculate the glyceride critical temperature, and the procedure described by Bottini et al. [23] (based on the use of infinite dilution activity coefficient data) to estimate the glyceride d_c values. Then, the glyceride critical pressure can be derived from (A.5) of the appendix.

The GC-EoS attractive term has five pure-group parameters (T^* , q , g^* , g' , and g'') and four binary interaction parameters (k_{ij}^* , k'_{ij} , α_{ij} , and α'_{ij}). All pure group and binary group interaction parameters required to the phase equilibria modeling of glyceride mixtures and CO₂ are available in the literature [19] except for the alcohol-ester and alcohol-triglyceride interaction parameters. These parameters were adjusted in this work using phase equilibria data from the literature. The alcohol-ester interaction was regressed using a large set of vapor-liquid equilibrium (VLE) data corresponding to binary 1-alcohol + ester mixtures [24–29], and the alcohol-triglyceride interaction parameters were adjusted using infinite dilution activity coefficient (γ^∞) data of 1-alcohols and 2-alcohols in triglycerides [30–32].

4. Results and Discussion

4.1. Regression of the Alcohol-Ester Binary Interaction Parameters. Table 1 reports the corresponding literature references of the alcohol + ester VLE data employed in the regression of the alcohol (CH₂OH) – ester (CH₂COO and CH₃COO) group interaction parameters. Also given in the table are the experimental temperature and pressure ranges, the number of experimental data points, and the standard deviations obtained in the regression procedure. The objective function was the minimization of the standard deviation of the vapor (y_i) and liquid (x_i) mole fractions; in the case that the alcohol + ester binary mixture exhibits azeotropic behavior, the standard deviation in x_i and the average relative error in the calculation of the equilibrium pressure (P) were minimized (see Table 1).

Figure 1 depicts some examples of the quality of the regression obtained; as can be deduced from Figure 1(b), the parameters obtained can satisfactorily reproduce azeotropic behavior.

Additionally, it should be noticed that no experimental data corresponding to mixtures containing glycerides were employed in the regression of the alcohol-ester interaction parameters. Thus, the application of these parameters in the phase equilibria modeling of the experimental data obtained in this work is carried out in a predictive mode.

4.2. Regression of the Alcohol-TG Binary Interaction Parameters. Table 2 describes the experimental γ^∞ data employed to fit the interaction parameters between the alcohol (CH₂OH, CHOH) and the triglyceride (TG: (CH₂COO)₂CHCOO) functional groups. The standard deviations obtained in the regression procedure are reported in Table 3. Following the procedure described before, the critical parameters and d_c value of triglycerides were calculated in this work. The results obtained are given in Table 4 and correspond to the same values reported by Fornari [19].

As referred previously, Bottini et al. [23] employed experimental γ^∞ data of n-alkanes in triglycerides to estimate the d_c parameter for the triglyceride molecules; the presence of three long hydrocarbon chains in triglyceride molecules makes their mixtures with n-alkanes nearly athermal solutions and thus, phase equilibria modeling is mainly determined by the repulsive term. In this way, realistic values of triglyceride d_c values were determined as can be deduced from Table 4 by comparison of the values regressed from γ^∞ data with the values obtained from the scarce vapor pressure data available in the literature.

4.3. Estimation of Mono- and Diglyceride d_c Parameter. Following the same procedure adopted in the estimation of triglyceride d_c values, the d_c pure component parameter of monopalmitin and dipalmitin were determined by fitting γ^∞ data. Alkanes and alcohols were included in the regression procedure due to the presence of hydroxyl groups in the monoglyceride and diglyceride molecules. The d_c values resulted are reported in Table 4, and the standard deviations obtained in the regression are given in Table 3. As in the case of triglycerides, the monopalmitin d_c value obtained from γ^∞ data is in accordance with the value regressed from a single vapor pressure data (see Table 4). That is, the use of experimental γ^∞ data to fit pure component parameters of high-molecular weight compounds, usually required in EoS phase equilibria modeling, appears as a valid procedure.

Due to the lack of γ^∞ data of n-alkanes or alcohols in mono- and diolein, the d_c values of these glycerides were adjusted using experimental solubility data (weight fractions) in SCCO₂ [1012]; the values resulted are given in Table 4 and the standard deviations ($\text{StD}\% = (100/N) \cdot \sqrt{\sum [(z_i^{\text{exp}} - z_i^{\text{cal}})/z_i^{\text{exp}}]^2}$) obtained were, respectively, 7.7 and 7.9% for monoolein and diolein solubility (see Figure 2).

4.4. Phase Equilibria Simulation of the Countercurrent SCCO₂ Fractionation of a Complex Glyceride Mixture. The different extraction conditions, that is, temperature, pressure, and solvent-to-feed (S/F) ratio, employed in the experimental assays are given in Table 5. Also given in the table are the experimental compositions of monoglycerides (MGs), diglycerides (DGs), and triglycerides (TGs) obtained in the residue (bottom product of the extraction column). The extract (top product) comprises the two liquid fractions recovered in S1 and S2 separator units. The fatty acid ethyl ester (FAEE) yield in the extract (S1 + S2) was higher than 96% for all extractions reported in Table 5. That is, in all experimental assays the FAEE was almost completely removed from

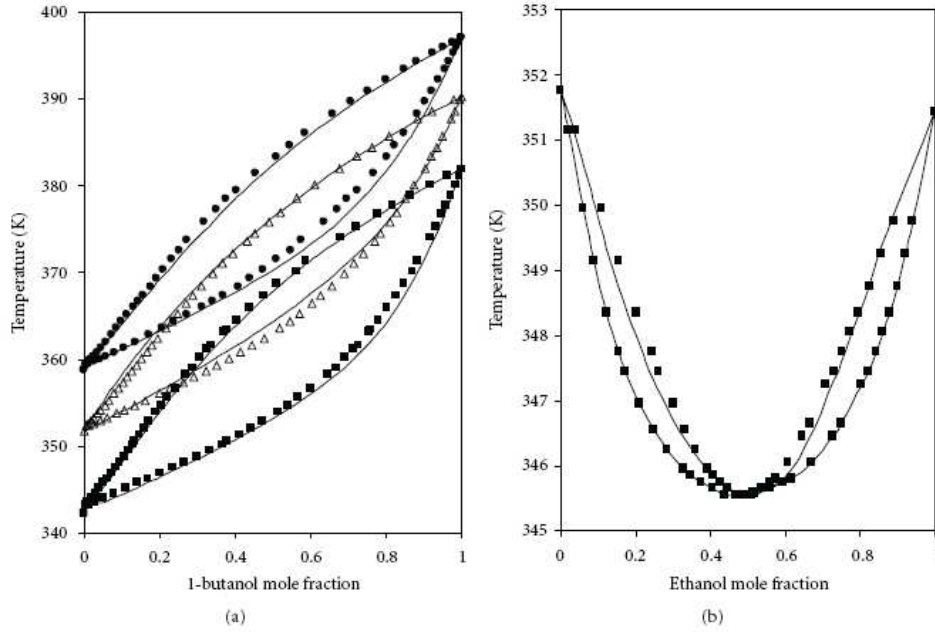


FIGURE 1: Comparison between experimental VLE data and the GC-EoS correlation. (a) 1-butanol + methylpropanoate mixtures [25]: (■) 0.74 bar; (△) 1.01 bar and (●) 1.26 bar. (b) ethanol + methylpropanoate mixtures [27] at 1.01 bar.

TABLE 1: Experimental VLE data and standard deviations obtained in the regression of the alcohol-ester binary group interaction parameters.

| Binary mixture | Data range | | N_{exp} | $\Delta P\%$ ^a | $\Delta y\%$ ^b | $\Delta x\%$ ^b | Ref. |
|--------------------------------|------------|-----------|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------|
| | T (K) | P (bar) | | | | | |
| 1-propanol + methyl propanoate | 328–348 | 0.2–0.8 | 45 | | 8.10 | 7.98 | [24] |
| 1-butanol + methyl propanoate | 348 | 0.2–0.9 | 20 | | 21.51 | 18.36 | [25] |
| ethanol + methyl propanoate | 345–352 | 1.01 | 33 | 3.37 | 6.52 | | [26] |
| 1-propanol + methyl propanoate | 352–367 | 1.01 | 37 | 3.64 | 5.00 | | [26] |
| 1-butanol + methyl propanoate | 342–390 | 1.3–0.8 | 118 | | 13.53 | 11.44 | [26] |
| 1-butanol + ethylacetate | 348–387 | 0.96 | 20 | | 13.92 | 9.56 | [27] |
| ethanol + methyl acetate | 330–351 | 1.01 | 30 | | 9.16 | 11.99 | [28] |
| 1-propanol + methyl acetate | 330–370 | 1.01 | 38 | | 10.16 | 9.01 | [28] |
| ethanol + ethylacetate | 345–350 | 1.01 | 60 | 13.21 | 12.50 | | [29] |

$$^a \Delta P\% = 100 \cdot \sum |(P_i^{cal} - P_i^{exp})/P_i^{exp}|/N.$$

$$^b \Delta z\% = 100 \cdot \sqrt{\sum [(z_i^{exp} - z_i^{cal})/z_i^{exp}]^2}/N.$$

TABLE 2: Experimental γ^∞ data employed in the regression of GC-EoS model parameters. TG: triglyceride group, d_c : critical hard sphere diameter.

| Compounds | T range (K) | P range (MPa) | N | Parameters regressed | Ref. |
|---|---------------|-----------------|-----|-----------------------|------|
| alcohols in triacetin | 314–343 | 0.1 | 12 | TG-alcohol | [30] |
| alcohols in tripalmitin | 354–375 | 0.1 | 15 | TG-alcohol | [31] |
| alcohols in tristearin, triolein, and trilinolein | 323–363 | 0.1 | 40 | TG-alcohol | [32] |
| alkanes and alcohols in monopalmitin | 354–375 | 0.1 | 21 | d_c of monopalmitin | [31] |
| alkanes and alcohols in dipalmitin | 354–375 | 0.1 | 21 | d_c of dipalmitin | [31] |

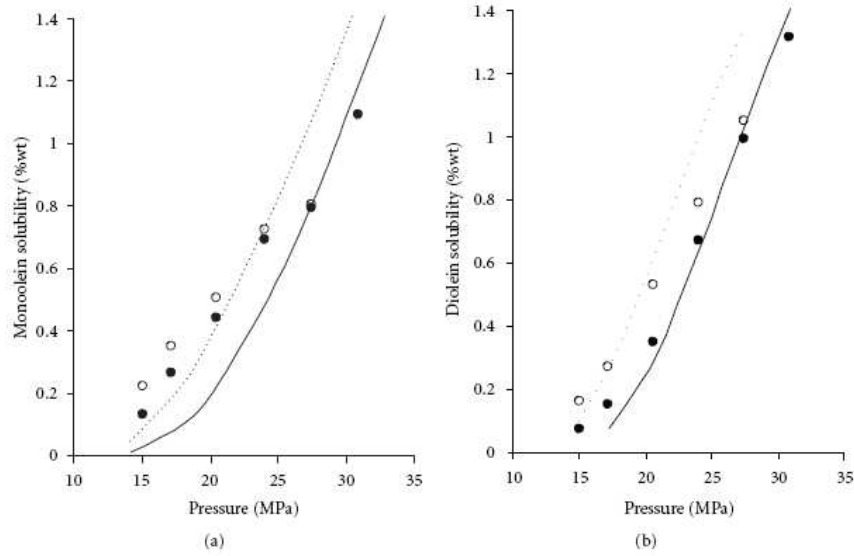


FIGURE 2: Solubility of (a) monoolein and (b) diolein in SCCO_2 . Experimental data [12]: (○) 323 K and (●) 333 K. GC-EoS calculations: (⋯) 323 K and (—) 333 K.

TABLE 3: Standard deviations obtained in the regression of GC-EoS model parameters using γ^∞ data.

| Regression of the alcohol-TG interaction parameters | N | $\Delta\gamma\%$ ^a |
|---|-----|-------------------------------|
| ethanol, 1-propanol, 1-butanol, isopropanol, isobutanol in tripalmitin | 15 | 9.9 |
| ethanol, 1-propanol, 1-butanol in tristearin | 6 | 7.4 |
| ethanol, 1-propanol, 1-butanol in triolein | 9 | 7.1 |
| ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol in trilinolein | 12 | 8.1 |
| Regression of monopalmitin and dipalmitin d_c values | N | $\Delta\gamma\%$ ^a |
| ethanol, 1-propanol, 1-butanol, isopropanol, isobutanol in monopalmitin | 15 | 18.5 |
| n-hexane, n-heptane in monopalmitin | 6 | 11.8 |
| ethanol, 1-propanol, 1-butanol, isopropanol, isobutanol in dipalmitin | 15 | 26.1 |
| n-hexane, n-heptane in dipalmitin | 6 | 11.1 |

$$^a \Delta\gamma\% = 100 \cdot \sqrt{\sum [(\gamma^\infty)_i^{\text{exp}} - (\gamma^\infty)_i^{\text{cal}} / (\gamma^\infty)_i^{\text{exp}}]^2} / N.$$

the mixture. Weight fractions of FAEE in the residue were lower than 0.03; residue compositions in Table 5 are reported on a solvent (CO) and FAEE-free basis.

TABLE 4: Pure component parameters of lipid-type substances.

| | T_c^* (K) | P_c^* (bar) | d_c (cm^3/mol) from γ^∞ data | d_c (cm^3/mol) from vapor pressure data [33] |
|--------------|-------------|---------------|--|--|
| Ethyl oleate | 784.2 | 10.5 | 8.151 | |
| triacetin | 742.8 | 31.1 | 5.969 | 5.617 |
| tripalmitin | 1020.3 | 5.1 | 11.439 | 11.649 |
| tristearin | 1042.3 | 4.5 | 11.986 | 12.677 |
| triolein | 1043.3 | 4.5 | 11.839 | |
| trilinolein | 1044.3 | 4.9 | | 11.640 |
| monopalmitin | 850.7 | 12.7 | 7.935 | 8.077 |
| monoolein | 874.2 | 11.9 | 8.309 ^c | |
| dipalmitin | 942.7 | 8.1 | 9.539 | |
| diolein | 989.8 | 8.8 | 10.493 ^c | |

^aFedors group contribution approach [22].

^bFrom (A.5) of the appendix.

^cFrom solubility data in SCCO_2 [10, 12].

All pure group and binary group interactions parameters employed in the phase equilibria simulations are given in Table 6. As mentioned previously, the alcohol-ester and alcohol-TG parameters were regressed in this work, while the rest of parameters were obtained from the literature [19].

The feed material of the countercurrent SFE experiments (i.e., the product of the ethanolysis of sunflower oil) was represented using appropriate model substances. Since the analysis of the fatty acid profile of this mixture provided

TABLE 5: Supercritical CO₂ fractionation of a glyceride mixture: comparison between the experimental and calculated compositions of MGs, DGs, and TGs in the residue.

| Ext. | S/F | T (K) | P (MPa) | Composition of residue, % weight (fatty acid ethyl esters and CO ₂ -free basis) | | | | | |
|------|-----|-------|---------|--|------|------|-------------------|------|------|
| | | | | Experimental | | | GC-EoS prediction | | |
| | | | | MGs | DGs | TGs | MGs | DGs | TGs |
| 1 | 15 | 333 | 18 | 28.4 | 55.4 | 16.1 | 30.2 | 53.1 | 16.7 |
| 2 | 15 | 333 | 20 | 25.2 | 56.1 | 18.7 | 27.9 | 54.3 | 17.9 |
| 3 | 15 | 333 | 22 | 23.9 | 56.7 | 19.4 | 24.8 | 55.4 | 19.8 |
| 4 | 15 | 313 | 16 | 23.5 | 53.5 | 23.0 | 26.3 | 54.3 | 19.4 |
| 5 | 20 | 313 | 18 | 23.0 | 57.1 | 20.0 | 18.2 | 57.0 | 24.8 |
| 6 | 20 | 333 | 25 | 21.2 | 57.8 | 21.0 | 12.8 | 58.8 | 28.4 |
| 7 | 20 | 353 | 25 | 18.8 | 59.3 | 21.9 | 24.4 | 56.5 | 19.1 |
| 8 | 20 | 368 | 25 | 21.5 | 57.3 | 21.2 | 28.4 | 54.6 | 17.0 |

TABLE 6: GC-EoS pure group and binary interaction parameters used in this work.

| (a) Pure group parameters | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------------|---------|-------|
| | Reference temperature | Group surface area | Pure group energy parameters | | |
| | T^* | q | g | g' | g'' |
| CH ₃ | 600 | 0.848 | 316910 | -0.9274 | 0.0 |
| CH ₂ | 600 | 0.540 | 356080 | -0.8755 | 0.0 |
| CH=CH | 600 | 0.867 | 403590 | -0.7631 | 0.0 |
| CH ₂ COO | 600 | 1.420 | 831400 | -1.0930 | 0.0 |
| CH ₃ COO | 600 | 1.728 | 831400 | -1.0930 | 0.0 |
| TG ^a (triglyceride) | 600 | 3.948 | 346350 | -1.3460 | 0.0 |
| CH ₂ OH | 512.6 | 1.124 | 1207500 | -0.6444 | 0.0 |
| CHOH | 512.6 | 0.908 | 1207500 | -0.6444 | 0.0 |
| CO ₂ | 304.2 | 1.261 | 531890 | -0.5780 | 0.0 |

| (b) Binary group interaction parameters | | | | | |
|---|---|------------------------------|-----------|--------------------------|---------------|
| i | j | Attractive energy parameters | | Nonrandomness parameters | |
| | | k_{ij} | k'_{ij} | α_{ij} | α_{ji} |
| CO ₂ | CH ₃ | 0.898 | 0.0 | 4.683 | 4.683 |
| | CH ₂ | 0.874 | 0.0 | 4.683 | 4.683 |
| | CH=CH | 0.948 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | CH ₂ COO | 1.115 | 0.094 | -1.615 | -1.615 |
| | TG | 1.094 | 0.112 | -1.651 | -1.651 |
| | CH ₂ OH/CHOH | 0.985 | 0.0 | 0.468 | -0.390 |
| TG | CH ₃ /CH ₂ | 0.860 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | CH=CH | 0.883 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | CH ₂ COO/CH ₃ COO | 1.237 | 0.0 | -8.700 | -3.656 |
| | CHOH/CH ₂ OH ^b | 1.079 | -0.029 | -10.53 | -11.23 |
| CH ₂ COO/CH ₃ COO | CH ₃ /CH ₂ | 0.869 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| | CH=CH | 1.006 | 0.0 | -0.876 | -0.876 |
| | CHOH/CH ₂ OH ^b | 0.996 | -0.163 | 0.654 | -2.612 |
| CH ₂ OH/CHOH | CH ₃ | 0.715 | 0.0 | 10.220 | 1.471 |
| | CH ₂ | 0.682 | 0.0 | 10.220 | 1.471 |
| | CH=CH | 0.816 | 0.0 | 3.862 | 2.447 |

^a(CH₃COO)₂CH₂COO.^bParameters regressed in this work.

oleic acid content higher than 80%, the feed raw material was represented as 48.2% ethyl oleate, 17.0% monoolein, 26.5% diolein, and 7.9% triolein (weight basis).

Using the selected representative substance (pure component parameters are given in Table 4) and the parameter matrix given in Table 6, the residue composition was calculated in a completely predictive manner using the GC-EoS model. The SFE process was mathematically solved within a sequential process simulator (FORTRAN language) that includes rigorous models for a high-pressure multistage extractor [34] and a multiphase flash [35].

Table 5 gives the residue composition obtained in the different experimental assays, as predicted by the GC-EoS model. These results are also given on an FAEE-free basis since the weight fraction of FAEE in the residues calculated using the GC-EoS model was lower than 0.02 in all cases. That is, following the experimental observations, the GC-EoS predicted almost a complete removal of FAEE from the feed mixture in all simulated conditions. Furthermore, the GC-EoS prediction of residue composition is very satisfactory, being the standard deviations, respectively, 8.17, 1.14, and 6.49 for MGs, DGs, and TGs weight fractions.

Further inspection of experiments 1 to 3 in Table 5 shows that the increase of pressure at 333 K results in a reduction of MGs concentration and an increase of TGs concentration; the same tendency is predicted by the GC-EoS model.

As mentioned before, differences in vapor pressure between MGs, DGs, and TGs could have great influence on the process selectivity, thus the effect of high extraction temperatures was experimentally studied (extractions 6 to 8 in Table 5). The experimental results show no significant effect of temperature on the residue composition. On the contrary, model predictions clearly show that, with increasing temperature, MGs concentration increases while DGs and TGs concentrations decrease. This discrepancy could be attributed to an overestimation of the increase of MGs vapor pressure with temperature in comparison with DGs and TGs vapor pressures, as predicted by the GC-EoS model.

5. Conclusions

The alcohol-ester and alcohol-triglyceride GC-EoS group interaction parameters were regressed in this work using a large set of VLE data of binary 1-alcohol + ester mixtures, and y^∞ data of 1-alcohols and 2-alcohols in triglycerides.

The validity of the parameters regressed was tested using the GC-EoS model to predict the fractionation of a complex glyceride mixture, obtained from the lipase-catalyzed ethanolsis of sunflower oil. Countercurrent SFE assays were carried out in this work using a 100 cm packed column, at pressures ranging from 16 to 25 MPa and temperatures from 313 to 368 K.

The simulation of the extraction processes was supported by an appropriate selection of model substances to represent the product of the ethanolsis reaction (feed raw material of the countercurrent SFE experiments). Satisfactory agreement between experimental and simulated data was in general observed. Main discrepancies between experimental and predicted results were observed at high extraction temper-

atures (353–368 K), that is when the model is extrapolated to a temperature range not employed in the regression of parameters.

Appendix

The residual Helmholtz energy in the GC-EoS model is described by two terms: a repulsive, or free volume term, and a contribution from attractive intermolecular forces:

$$A^r = A_{fv}^r + A_{att}^r. \quad (\text{A.1})$$

The free volume contribution is modeled assuming hard sphere behavior for the molecules, characterizing each substance i by a temperature-dependent hard sphere diameter d_i . A Carnahan-Starling type of hard sphere expression for mixtures is adopted:

$$\frac{A_{fv}^r}{RT} = 3 \left(\frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_3} \right) (Y - 1) + \left(\frac{\lambda_2^3}{\lambda_3^2} \right) (-Y + Y^2 - \ln Y) + n \ln Y, \quad (\text{A.2})$$

where

$$Y = \left(1 - \frac{\pi \lambda_3}{6V} \right)^{-1}, \quad \lambda_k = \sum_i^{NC} n_i d_i^k, \quad (\text{A.3})$$

NC is the number of components, n_i is the number of moles of component i , and V is the total volume. The following temperature-dependent generalized expression is assumed for d_i :

$$d_i = 1.065655 d_{ci} \left\{ 1 - 0.12 \exp \left[\frac{-2T_{ci}}{(3T)} \right] \right\}, \quad (\text{A.4})$$

where d_{ci} is the pure component critical hard sphere diameter (a parameter related with molecular size), which is calculated as

$$d_{ci} = \left(\frac{0.08943 RT_{ci}}{P_{ci}} \right)^{1/3} \quad (\text{A.5})$$

when the compound coincides with a group (e.g., H₂O, CO₂, H₂, etc.). For the remaining cases, d_{ci} is fitted to a point of the pure component vapor pressure curve, usually the normal boiling point.

For the evaluation of the attractive contribution to the Helmholtz energy, a group contribution version of a density-dependent NRTL-type expression is derived:

$$\frac{A_{att}^r}{RT} = -\frac{z}{2} \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^j q_j \sum_k^{NG} \frac{\theta_k g_{kj} \tilde{q} \tau_{kj}}{\sum_l^{NG} \theta_l \tau_{lj}}, \quad (\text{A.6})$$

where

$$\theta_j = \left(\frac{q_j}{\tilde{q}} \right) \sum_i^{NC} n_i v_i^j, \quad \tilde{q} = \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^j q_j, \quad (\text{A.7})$$

$$\tau_{ij} = \exp \left[\frac{\alpha_{ij} \Delta g_{ij} \tilde{q}}{(RTV)} \right],$$

$$\Delta g_{ij} = g_{ij} - g_{jj},$$

NG is the number of groups, z is the number of nearest neighbors to any segment (set to 10), v_j^i the number of groups type j in molecule i , q_j the number of surface segments assigned to group j , θ_k the surface fraction of group k , \tilde{q} the total number of surface segments, g_{ij} the attraction energy parameter for interactions between groups i and j , and α_{ij} the NRTL nonrandomness parameter ($\alpha_{ij} \neq \alpha_{ji}$). The interactions between unlike groups are calculated from:

$$g_{ij} = k_{ij} (g_{ii} g_{jj})^{1/2}, \quad (k_{ij} = k_{ji}) \quad (\text{A.8})$$

with the following temperature dependences for the interaction parameters:

$$g_{ij} = g_{ij}^* \left(1 + g'_{ij} \left(\frac{T}{T_j^*} - 1 \right) + g''_{ij} \ln \left(\frac{T}{T_j^*} \right) \right),$$

$$k_{ij} = k_{ij}^* \left[1 + k'_{ij} \ln \left[\frac{2T}{(T_i^* + T_j^*)} \right] \right], \quad (\text{A.9})$$

where g_{ij}^* is the interaction parameter for reference temperature T_j^* .

Acknowledgments

This work has been financed by project ALIBIRD (S2009-AGR-1469) from the Comunidad Autónoma de Madrid and project FUN-C-FOOD (CSD2007-00063, CONSOLIDER-INGENIO 2010).

References

- [1] L. L. M. Van Deenen and G. H. De Haas, "The substrate specificity of phospholipase A," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 70, no. C, pp. 538–553, 1963.
- [2] F. U. Ahmed, "Efficient synthesis of fatty monoglyceride sulfates from fatty acids and fatty acid methyl esters," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 67, no. 1, pp. 8–14, 1990.
- [3] F. Hamam and S. M. Budge, "Structured and specialty lipids in continuous packed column reactors: comparison of production using one and two enzyme beds," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 87, no. 4, pp. 385–394, 2010.
- [4] H. Birnbaum, "The monoglycerides: manufacture, concentration, derivatives and applications," *Bakers Digest*, vol. 55, pp. 6–16, 1981.
- [5] Y. Katsuragi, T. Yasukawa, N. Matsuo, B. D. Flickinger, I. Tokimitsu, and M. G. Matlock, *Diacylglycerol Oil*, AOCS Press, 2004.
- [6] F. Sahena, I. S. M. Zaidul, S. Jinap et al., "Application of supercritical CO₂ in lipid extraction—a review," *Journal of Food Engineering*, vol. 95, no. 2, pp. 240–253, 2009.
- [7] J. W. King, E. Sahle-Demessie, F. Temelli, and J. A. Teel, "Thermal gradient fractionation of glyceride mixtures under supercritical fluid conditions," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 10, no. 2, pp. 127–137, 1997.
- [8] Ö. Güçlü-Üstündağ and F. Temelli, "Correlating the solubility behavior of fatty acids, mono-, di-, and triglycerides, and fatty acid esters in supercritical carbon dioxide," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 39, no. 12, pp. 4756–4766, 2000.
- [9] Ö. Güçlü-Üstündağ and F. Temelli, "Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 31, no. 3, pp. 235–253, 2004.
- [10] I. Ashour and H. Hammam, "Equilibrium solubility of pure mono-, di-, and trilaurin in supercritical carbon dioxide experimental measurements and model prediction," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 6, no. 1, pp. 3–8, 1993.
- [11] H. Hammam, "Solubilities of pure lipids in supercritical carbon dioxide," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 5, no. 2, pp. 101–106, 1992.
- [12] W. B. Nilsson, E. J. Gauglitz, and J. K. Hudson, "Solubilities of methyl oleate, oleic acid, oleyl glycerols, and oleyl glycerol mixtures in supercritical carbon dioxide," *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 68, no. 2, pp. 87–91, 1991.
- [13] S. Skjold-Jørgensen, "Group contribution equation of state (GC-EOS): a predictive method for phase equilibrium computations over wide ranges of temperature and pressures up to 30 MPa," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 27, no. 1, pp. 110–118, 1988.
- [14] S. Skjold-Jørgensen, "Gas solubility calculations. II. Application of a new group-contribution equation of state," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 16, no. 3, pp. 317–351, 1984.
- [15] S. Espinosa, S. Diaz, and E. A. Brignole, "Thermodynamic modeling and process optimization of supercritical fluid fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 41, no. 6, pp. 1516–1527, 2002.
- [16] L. Vázquez, C. E. Torres, T. Fornari, F. J. Señoráns, and G. Reglero, "Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical carbon dioxide extraction," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 40, no. 1, pp. 59–66, 2007.
- [17] L. Vázquez, A. M. Hurtado-Benavides, G. Reglero, T. Fornari, E. Ibáñez, and F. J. Señoráns, "Deacidification of olive oil by countercurrent supercritical carbon dioxide extraction: experimental and thermodynamic modeling," *Journal of Food Engineering*, vol. 90, no. 4, pp. 463–470, 2009.
- [18] T. Fornari, C. E. Torres, F. J. Señoráns, and G. Reglero, "Simulation and optimization of supercritical fluid purification of phytosterol esters," *AIChE Journal*, vol. 55, no. 4, pp. 1023–1028, 2009.
- [19] T. Fornari, "Revision and summary of the group contribution equation of state parameter table: application to edible oil constituents," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 262, no. 1–2, pp. 187–209, 2007.
- [20] C. E. Torres, T. Fornari, D. Tenllado, F. J. Señoráns, and G. Reglero, "A predictive kinetic study of lipase-catalyzed ethanolysis reactions for the optimal reutilization of the biocatalyst," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 42, no. 2, pp. 105–110, 2008.
- [21] C. E. Torres, L. Vázquez, F. J. Señoráns, and G. Reglero, "Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector," *Journal of Chromatography A*, vol. 1078, no. 1–2, pp. 28–34, 2005.
- [22] R. F. Fedors, "A relationship between chemical structure and the critical temperature," *Chemical Engineering Communications*, vol. 16, pp. 149–151, 1982.
- [23] S. B. Bottini, T. Fornari, and E. A. Brignole, "Phase equilibrium modelling of triglycerides with near critical solvents," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 158–160, pp. 211–218, 1999.
- [24] J. Fernandez, C. Berro, and M. I. Paz Andrade, "Excess thermodynamics functions of 1-propanol + methyl propanoate and 1-propanol + methyl butanoate systems," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 20, pp. 145–153, 1985.

- [25] J. Fernández, C. Berro, and A. Pénélox, "Excess Gibbs energies and excess volumes of some alcohol-methyl ester binary mixtures," *Journal of Chemical and Engineering Data*, vol. 32, no. 1, pp. 17–22, 1987.
- [26] P. Susial, J. Ortega, C. De Alfonso, and C. Alonso, "Vapor-liquid equilibrium measurements for methyl propanoate-ethanol and methyl propanoate-propan-1-ol at 101.32 kPa," *Journal of Chemical and Engineering Data*, vol. 34, no. 2, pp. 247–250, 1989.
- [27] J. Gmehling, U. Onken, and W. Arlt, *Vapour-Liquid Equilibrium Data Collection*, DECHEMA, Frankfurt, Germany, 1979.
- [28] J. Ortega, P. Susial, and C. De Alfonso, "Vapor-liquid equilibrium measurements at 101.32 kPa for binary mixtures of methyl acetate + ethanol or 1-propanol," *Journal of Chemical and Engineering Data*, vol. 35, no. 3, pp. 350–352, 1990.
- [29] J. Ortega, J. A. Peña, and C. De Alfonso, "Isobaric vapor-liquid equilibria of ethyl acetate + ethanol mixtures at 760 ± 0.5 mmHg," *Journal of Chemical and Engineering Data*, vol. 31, no. 3, pp. 339–342, 1986.
- [30] C. Din, G. Foco, T. Fornari, E. A. Brignole, and S. B. Bottini, "Infinite dilution activity coefficients in triglycerides," *Latin American Applied Research*, vol. 25, pp. 243–247, 1995.
- [31] G. Foco, A. Bermudez, and S. Bottini, "Infinite dilution activity coefficients in mono-, di-, and tripalmitin and palmitic acid," *Journal of Chemical and Engineering Data*, vol. 41, no. 5, pp. 1071–1074, 1996.
- [32] G. M. Foco, A. M. Bermúdez, and S. B. Bottini, "Characterization of high molecular weight compounds by infinite dilution activity coefficients," in *Proceedings of the (EQUIFASE '99)*, J. Tojo and A. Arce, Eds., pp. 268–273, Vigo, Spain, June 1999.
- [33] E. S. Perry, W. H. Weber, and B. F. Daubert, "Vapor pressures of phlegmatic liquids. I. Simple and mixed triglycerides," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 71, no. 11, pp. 3720–3726, 1949.
- [34] E. A. Brignole, P. M. Andersen, and A. Fredenslund, "Super-critical fluid extraction of alcohols from water," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 26, no. 2, pp. 254–261, 1987.
- [35] M. L. Michelsen, "The isothermal flash problem. Part II. Phase-split calculation," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 9, no. 1, pp. 21–40, 1982.
-
-



A combined procedure of supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil

Daniel Tenllado, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres*

CIAL – Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid, Calle Nicolás Cabrera nº9, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2011

Received in revised form 1 September 2011

Accepted 2 September 2011

Available online 21 September 2011

Keywords:

Alkylglycerol

Ethanolysis

Shark liver oil

Supercritical carbon dioxide extraction

Wiped film short-path distillation

ABSTRACT

Ethanolysis of squalene free shark liver oil was carried out to obtain a product mixture comprised mainly of fatty acid ethyl esters and non-esterified alkylglycerols. Purification of non-esterified alkylglycerols from this product mixture via supercritical fluid extraction and short-path distillation has been compared. The effect of temperature and mass flow in a sequential distillation strategy was evaluated. In addition, combination of supercritical fluid extraction and short-path distillation to obtain a product highly enriched in alkylglycerols readily for human consumption was also studied.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Shark liver oil is a natural source of diesterified alkylglycerols (DEAKG), squalene, and triacylglycerols. Alkylglycerols have been the subject of much attention because of their special physiological functions in humans [1,2]. Anticarcinogenic and immune stimulating properties have been attributed to dietary ingestion of these substances [3]. They are located in the human body mainly in the cells of the immune system and in higher doses in human breast milk. In some circumstances, the endogenous synthesis is reduced and the oral administration of alkylglycerols is recommended [4,5]. Non-esterified alkylglycerols (NEAKG) can be obtained from commercial shark liver oil via saponification or ethanolysis reactions. Our research group has been able to isolate NEAKG via saponification of shark liver oil [6].

Separation and purification technology has been pursued in the food industry for many years in search of ever-diversifying consumer markets. In particular, in recent decades, the food industries worldwide including many developing countries have evolved in an attempt to seek a better utilization of the local resources by producing 'higher value' or 'added value' products. To achieve this, separation and purification technology is crucial. These days, nutraceuticals are being introduced into the food industry and

are likely to appear in the diets of modern consumers. Nutraceutical product requires the separation and purification of health promoting compounds [7] and the withdrawal of undesired material, obtaining a health promoting product ready for consumption.

In order to obtain a product rich in alkylglycerols, squalene needs to be removed from the original shark liver oil previous to the saponification or ethanolysis reaction. For this matter, supercritical fluid technology [8,9] and short path distillation [10] has shown very interesting capabilities. Saponification or ethanolysis reactions of shark liver oil are also necessary because of the presence of both triacylglycerols and DEAKGs could interfere in the purification of alkylglycerols. The ethanolysis reaction converts triacylglycerols and DEAKG to the corresponding fatty acid ethyl esters (FAEE) plus NEAKG together with minor amounts of monoesterified alkylglycerols (MEAKG) and lower glycerides. Methanolysis of shark liver oil has been also reported [11]. Then, these NEAKG can be re-esterified via enzymatic processes using health-promoting PUFAs, and thus high value ether lipids can be designed [4,6].

The fatty acid composition of shark liver oil has been previously reported [12,13]. Shark liver oil contains relatively high amount of long chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) residues (ca. 10% of fatty acid residues are PUFA), especially 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic (EPA, C20:5), 7,10,13,16,19-docosapentaenoic (DPA, C22:5), and 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic (DHA, C22:6) acids. The numerous health-promoting effects of EPA and DHA in human subjects have been recently reviewed [14,15]. Since the polyunsaturated EPA and DHA are thermolabile compounds, alterations in these substances caused by the distillation temperature should

Abbreviations: FAEE, fatty acid ethyl ester; DEAKG, diesterified alkylglycerol; MEAKG, monoesterified alkylglycerol; NEAKG, non-esterified alkylglycerol.

* Corresponding author. Tel.: +34 607079971.

E-mail address: carlos.torres@uam.es (C.F. Torres).

1383-5866/\$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.seppur.2011.09.013

be taken into consideration. In a previous study, the thermal change of EPA ethyl ester from 432 to 479 K and DHA ethyl ester from 439 to 490 K have been reported [16]. These studies showed that the geometrical isomers of EPA were formed during prolonged heating at 493 K. Although the residence time on the evaporating surface is as short as 10–15 s, it is still suggested that the distillation temperature should not exceed the thermal change temperature of EPA ethyl ester.

In addition, fish oils storage may also result in autoxidation reactions [17–19]. Lipids are also labile when exposed to heat, air, and light [20–22]. It has been found that different types of reactions take place when oil is heated at higher temperatures in the presence of air. These reactions are thermal polymerization through Diels–Alder reaction [23], oxidative polymerization [24], ester interchange, cyclization, etc. Upon heating the viscosity rises in a characteristic manner, which may be caused by molecular growth [25]. The polymerization process essentially consists of the intermolecular coupling of radicals originated by decomposition of the relatively unstable peroxide groups, with formation of cross-linked structures. Polymers are formed in fats and oils by processes which may be described as either thermal polymerization or oxidative polymerization. Thermal polymerizations proceed in the absence of oxygen. They involve primarily Diels–Alder addition of the double bond system at the 1,4-position of a conjugated diene structure to form hydroaromatic cyclic compounds. On the other hand, oxidative polymerizations occur by free-radical mechanisms. Hydroperoxides, formed initially at low temperatures, decompose on heating to form principally dimeric products whose monomeric units are linked through carbon [26]. All these oxidation and polymerization compounds must be eliminated from the final product for human consumption.

In this work, shark liver oil (squalene free) was firstly transesterified with ethanol to produce a mixture that mainly contains FAEEs, NEAKGs, MEAKGs, and lower glycerides. Ethanolysis of fish oils have been extensively used to produce FAEEs rich in PUFAs [27]. Then, countercurrent supercritical fluid extraction (CC-SFE) was employed to eliminate FAEE from the mixture, thus concentrating NEAKGs and MEAKGs in the residue product, as our research group has recently published [28].

The present study also focuses on molecular distillation of the ethanolysis reaction as an alternative to CC-SFE to obtain a product highly concentrated in NEAKG with negligible amounts of unidentified material that may come in part, from undesired oxidation and/or polymerization reactions. It should be indicated that by this methodology volatile oxidation products are readily removed from the mixture in a first degassing step (pre-distillation step).

Finally, the present study also combines CC-SFE and wiped film-short path distillation to obtain a distillate with higher NEAKGs concentration than that obtained by each purification technique separately and also with negligible concentration of unidentified material.

These NEAKGs attained in the present research could have enormous potential [1] as functional ingredients or as precursors for structured alkylglycerols.

2. Experimental

2.1. Shark liver oil ethanolysis

Shark liver oil (squalene free) was purchased from Lysi (Reykjavik, Iceland). The ethanolysis reaction was carried out in our laboratory as described in a previous work [6]. Shark liver oil was mixed with sodium ethoxide (5.25% w/v, purchased from Sigma–Aldrich St. Louis, MO, USA) in absolute ethanol at a ratio of 4:1 (v:v). The mixture was allowed to stand for 30 min at 333 K while

being stirred at 200 rpm. Two washings were done after the ethanolysis reaction: first with a sodium chloride solution (0.5 M), and second with distillate water. The washes were performed at 323 K in order to improve the separation of the oily and aqueous phases. The volume utilized in these two washings was half of the volume of shark liver oil utilized. The first washing was performed in less than 5 min in order to minimize undesired side reactions caused by sodium hydroxide produced from sodium ethoxide after addition of sodium chloride solution (0.5 M) to the ethanolysis product mixture. Oily and aqueous phases were spontaneously separated by decantation. Then a second washing on the oily phase recovered was carried out followed by centrifugation at 585g. Finally, the ethanolysis reaction product was dried in a rotary evaporator at 333 K and 7×10^2 Pa until constant weight was attained. Free fatty acid percentage in the final product was below detection limit of our HPLC equipment and was only noticeable in some residues obtained after CC-SFE and short path distillation of the ethanolysis product from shark liver oil, which indicates that hydrolysis of fatty acid ethyl esters to free fatty acids can be assumed as negligible during washing procedure previously described.

2.2. Glycerol colorimetric determination

A simple colorimetric procedure based on the formation of formaldehyde during the periodate oxidation of glycerol was used to determine glycerol content in the product from ethanolysis reaction. Two reagents were used: first periodate reagent (65 mg NaIO_4 in 90 ml of water, 10 ml acetic acid, and 7.7 g ammonium acetate) and second acetylacetone reagent (2.5 ml of acetylacetone to 247.5 ml of isopropanol). The procedure consists of dissolving an aliquot from the ethanolysis reaction in isopropanol (2 mg/ml). Then four aliquots (50 μl , 100 μl , 250 μl , 500 μl) are mixed with 1 ml of periodate reagent each and kept 5 min at room temperature. Finally 2.5 ml of acetylacetone reagent was added to the previously prepared solutions. The mixture was heated 20 min at 323 K. A blank reagent was utilized to correct the absorbance measured at 410 nm. Simultaneously a calibration curve with known amounts of glycerol was used to determine the glycerol percentage in the product from ethanolysis reaction.

2.3. HPLC analysis

The neutral lipids composition was determined on a kromasil silica 60 column (250 \times 4.6 mm, Análisis Vínicos, Tomelloso, Spain) coupled to a CTO 10A VP 2 oven, a LC-10AD VP pump, a gradient module FCV-10AL VP, a DGU-14A degasser, and an evaporative light scattering detector ELSD-LT from Shimadzu (Izasa, Spain). The ELSD conditions were 2×10^5 Pa, 308 K, and a gain value of 3. The flow rate was 2 mL/min. A splitter valve was used after the column, and only 50% of the mobile phase was directed through the detector. The column temperature was maintained at 308 K. The mobile phase utilized has been previously reported by Torres et al. [29]. This methodology permits one to analyze up to 18 different neutral lipids classes including NEAKG, MEAKG, DEAKG, sterols, tocopherols, and mono-, di-, and triacylglycerols. All solvents used were HPLC grade from Laboratory-Scan (Dublin, Ireland).

HPLC analysis quantification was based on calibration curves carried out with appropriate standards purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Batyl-alcohol purchased from Nikko Chemical (Tokyo, Japan) was used as standard for NEAKGs. 1,2-Di-O-hexadecyl-rac-glycerol was used to quantify MEAKGs because this substance has similar retention time and response than that of MEAKGs in the previously described analysis method. Salmon oil and 1,2-dipalmitoyl-3-O-Hexadecyl-rac-glycerol

Table 1

FAEE composition of transestylated shark liver oil and that after ethanolysis reaction. All values are expressed as a weight percentage of the total fatty acids ethyl esters.

| % w/w | Initial | After ethanolysis |
|-------|---------|-------------------|
| C14:0 | 2 | 2 |
| C16:0 | 17 | 17 |
| C16:1 | 1 | 1 |
| C16:2 | 6 | 6 |
| C16:3 | 1 | 1 |
| C18:0 | 3 | 3 |
| C18:1 | 34 | 35 |
| C18:2 | 1 | <1 |
| C18:3 | 1 | 1 |
| C20:1 | 10 | 10 |
| C18:4 | <1 | <1 |
| C20:4 | <1 | <1 |
| C22:1 | 10 | 10 |
| C20:5 | 2 | 2 |
| C24:1 | 4 | 4 |
| C22:5 | 1 | 1 |
| C22:6 | 7 | 8 |

(Sigma–Aldrich) were used to quantify TAGs and DEAKGs, respectively.

Although the mentioned methodology is also able to identify and quantify FAEE (as a single lipid class), standard gas chromatography was selected as the preferred methodology for FAEE analysis.

2.4. Gas chromatography, FAEE analysis

1 μ L of the diluted sample was injected into an Agilent (Avondale, PA) gas chromatograph (6890N Network GC System) coupled to an autosampler (Agilent 7683B). The capillary column was a 30 m HP-88 (Avondale, Pennsylvania) (0.25 mm i.d.). A 20:1 split ratio was utilized. The injector and detector temperatures were 493 and 523 K, respectively. The temperature program was as follows: starting at 373 K and then heating to 453 K at 293 K/min, followed by heating from 453 to 293 K at 288 K/min. The final temperature (293 K) was held for 30 min. Identification of the various fatty acids was based on the retention times and relative area percentages of a PUFA No. 3 standard (#4–7085) obtained from Supelco. These retention times and areas percentages were compared with those obtained when shark liver oil was properly transestylated. Quantification was effected via an external standard of hexadecane. Table 1 shows initial FAEE composition of shark liver oil used in this work in comparison with that attained after ethanolysis reaction.

2.5. Supercritical fluid extraction equipment and method

The CC-SFE pilot plant used in this work is shown in Fig. 1. Carbon dioxide (99.98%) was purchased from AL Air–Líquide España S. A. (Madrid, Spain). The CC-SFE equipment is a homemade device and comprises a countercurrent extraction column (316 stainless steel), two cascade separator cells (270 mL capacity), and a cryogenic trap at atmospheric pressure. The extraction column is 3 m height, 17 mm of internal diameter, and is packed with Fenske rings (3 \times 0.5 mm). The extract can be fractionated by a cascade decompression in the two separator cells. All different parts are thermostated. The packed column has three different feeding levels (top, middle, and bottom). In this work, the liquid material was fed through the middle point, with an effective packed height (from the introduction point of the liquid sample to the CO₂ feeding point) of 1.8 m. Both CO₂ and liquid feeding material were preheated at the exit of their respective pumps (Dosapro Milton Roy, France) before introduction into the extraction column. The pilot plant has computerized PLC (Programmable Logic Controllers)

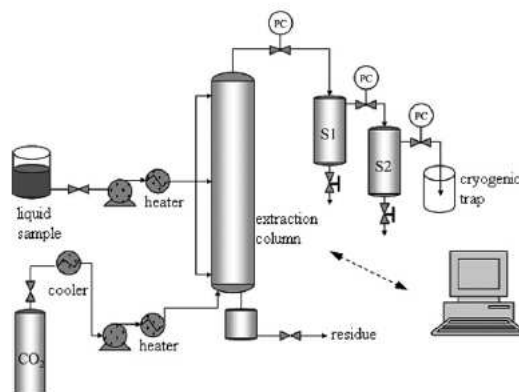


Fig. 1. Experimental CC-SFE device.

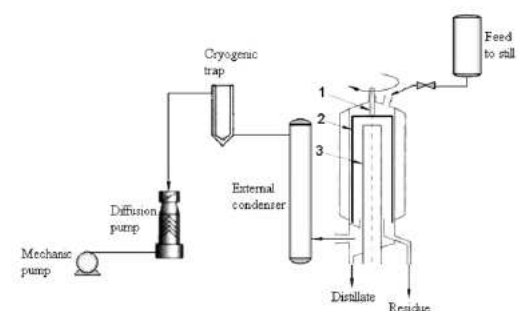


Fig. 2. Scheme of a wiped film molecular evaporator: 1 wiper frame, 2 wiper, 3 condenser.

based instrumentation and a control system with several safety devices including valves and alarms.

During the extraction, a continuous flow of CO₂ was introduced at a rate of 3 L/h into the column through the bottom. When the operating pressure and temperature were stabilized, the liquid sample was pumped at 0.3 L/h during the entire extraction time (60 min) which corresponds to a solvent/feed (S/F) ratio of 10. When the extraction was finished, CO₂ was pumped for another 30 min. The extraction column conditions (2×10^7 Pa and 333 K) were different from those reported before [28]. The modification consisted of increasing the extraction temperature preserving the same optimum CO₂ density previously reported (687.59 Kg/m³). In the present study higher temperatures than those previously reported were utilized to prevent possible solidifications inside the SFE column. The first separator cell (S1) was maintained at pressure 1×10^7 Pa and temperature of 323 K, whereas the second separator cell (S2) was maintained at low pressure ($<2 \times 10^6$ Pa) to guarantee the complete recovery of all the remaining extracted material in this cell. The residue and liquid fractions collected in the separators were weighed and analyzed via HPLC and GC. The mass balance closed in all experiments with an inaccuracy lower than 5%.

2.6. Wiped film–short path distillation equipment and method

The molecular distiller pilot plant used in this project was acquired from POPE Scientific Inc. (Saukville, USA). A scheme of the

Table 2

Composition (weight percentage) of shark liver oil before and after the ethanolysis reaction. n.d.: not detected. The balance of original shark liver oil closed with small percentages of cholesterol and squalene.

| % w/w | Before ethanolysis | After ethanolysis |
|-----------------------|--------------------|-------------------|
| FAEE | n.d. | 70.7 |
| DEAKG | 44.6 | n.d. |
| TAG | 53.4 | n.d. |
| MEAKG | n.d. | 3.9 |
| NEAKG | n.d. | 9.9 |
| Unidentified material | – | 15.1 |

molecular evaporator used is shown in Fig. 2. The equipment consists of a four inches distiller coupled to a mechanical vacuum pump (1×10^2 Pa) and a diffusion pump (1 Pa) both from Edwards Limited (Crawley, UK). An external condenser and a cryogenic trap was installed immediately downstream of the still. The condensable low molecular weight compounds are collected in the cryogenic trap upstream of vacuum system.

The operation conditions of the short-path distillation are represented by temperature, pressure, and feed mass flow. These parameters need to be optimized in order to obtain the highest possible yield at acceptable concentrations of NEAKG. Temperatures from 373 to 513 K and pressures from 20 to 1 Pa were studied. The feed rate, unless otherwise is indicated, was always 1 L/h (0.9 kg/h) and the engine speed was 300 rpm. The temperature of the internal condenser was 333 K to avoid solidifications of alkylglycerols allowing a constant flow of the distillate to the collector container. The cryogenic trap was filled with liquid nitrogen to prevent volatile compounds could reach the vacuum system. According to the vendor specifications, the mean residence time of the oil within the hot zone is below 1 min., which is estimated from the laminar film flow on the vertical surfaces. In each distillation, once the desired temperature and vacuum had been reached degassed sample was fed. The beginning of the molecular distillation was established when the first drop of distillate was attained and then 300 mL of the degassed sample were fed by gravity. The feed rate was maintained at desired levels using a manual valve to increase/decrease the flow of raw material in order to consume ca. 1000 mL/h.

3. Results and discussion

3.1. Ethanolysis reaction

Composition of the raw material before and after ethanolysis reaction is given in Table 2. The unidentified material may indicate apparition of undesired oxidation and/or polymerization compounds after chemical ethanolysis of shark liver oil. Other authors have described the apparition of unwanted oxidation compounds and oligomers during chemical transesterification of fish oil [30]. It can be speculated that probably the oxidation level of the starting shark liver oil may have contributed negatively in the ethanolysis reaction to initiate the undesired oxidation and/or polymerization processes. In addition, relatively low content of NEAKGs 9.9% (w/w) instead of the expected 20% (w/w) could also point out possible partial degradation of the product mixture.

On the other hand inaccuracies from HPLC quantification of the different compounds could also contribute to the percentage of unidentified material. In addition, this unidentified material could be also comprised of small amounts of residual glycerol, salts, and water coming from the ethanolysis reaction and subsequent washes. In order to determine the contribution of glycerol to the unidentified material a colorimetric analysis of this compound was carried out on the product attained after ethanolysis reaction. The glycerol weight percentage in this product was 0.93%.

3.2. Supercritical fluid extraction

The composition of the final mixture of the residues attained after CC-SFE is shown in Table 3. It should be noted that the percentage of FAEE reduced from 70% to 16% w/w. As it can be observed in the mentioned Table 3, extraction with supercritical CO₂ is an excellent way to remove most of the FAEE produced during chemical ethanolysis. Table 2 indicates that DEAKG and FFA could not be detected in the product after ethanolysis. However, in Table 3 DEAKG and FFA appear in the residue as a result of the concentration of these compounds in the non-extracted fraction. This fact indicates that they are below detection limit of the HPLC equipment in the ethanolysis product but no in the residues after removing most of the fatty acid ethyl esters via CC-SFE. It should be noted that in order to produce enough material for further experiments up to 28 extractions (ca. 9 Kg of the mixture of ethanolysis products) at the same extraction conditions were carried out. Table 3 also shows the results of two of the 28 CC-SFE carried out (extractions 7 and 10). Composition fluctuations of the residues observed in Table 3 were caused by the increased viscosity of these fractionation products hindering its adequate flow along the extraction column once most of the FAEE were removed from the feed material. The composition of the mixture of residues obtained by SFE and standard deviation (SD) regarding to the composition of all residues obtained are also shown in Table 3.

Visual inspection of the residues and the percentage of unidentified material in the subsequent analyses indicated that, in addition of NEAKGs and MEAKGs, other unidentified compounds were accumulated in this non-extracted fraction. The final mixture of SFE residues obtained (ca. 4 Kg) had 25.8% of unidentified material that may come from undesired polymerization [31] or autoxidation [32] processes occurred during storage [13], heating treatment [20], light [20–22], chemical ethanolysis [30], and washings. In addition, the presence of compounds such as DAG and DEAKG in the residue obtained at the bottom of the column reveals that the ethanolysis did not proceed completely. However a compromise between apparition of undesired compounds and reaction conversion should be reached in terms of temperature, time, and sodium ethoxide concentration. As an example, if ethanolysis reaction is carried out at lower temperatures it would require longer reaction times or higher concentration of sodium ethoxide in order to have efficient conversion of fatty acid residues to their corresponding ethyl esters. These two variables could have also a negative effect on the apparition of unidentified material. For this reason the mentioned balance between temperature, reaction time, and reactant concentrations should be reached. Finally, it should be indicated that a possible source for the percentage of FFA detected in the residues may be hydrolysis reactions of the fatty acid ethyl esters via sodium hydroxide generated from sodium ethoxide through the washing procedure.

The presence of acylglycerols, MEAKG, FFA, and unidentified material in the residue products requires a second stage of fractionation in order to obtain a product readily for human consumption. For that reason, purification of these CC-SFE residues by molecular distillation was investigated.

3.3. Molecular distillation of the product obtained after chemical ethanolysis of shark liver oil squalene free

A fractionation study of the product obtained after chemical ethanolysis (ca. 3 kg) of squalene free shark liver oil via molecular distillation was also effected in order to directly compare supercritical CO₂ extraction and short path distillation for fractionation of NEAKGs.

In this study several stages of distillation were carried out. The results are shown in Fig. 3. First, the ethanolysis product, was

Table 3

Composition (weight percentage) of the samples obtained during extractions 7 and 10 and total residue mixture obtained. S1: extract from first separator cell, S2: extract from second separator cell. n.d.: not detected.

| % w/w | Extraction 7 | | | Extraction 10 | | | Mixed residues | |
|-----------------------|--------------|------|------|---------------|------|------|----------------|-------------|
| | Residue | S1 | S2 | Residue | S1 | S2 | Composition | Residues SD |
| FAEE | 16.2 | 79.7 | 83.7 | 8.0 | 78.4 | 83.0 | 16.4 | 4.5 |
| DEAKG | <1 | n.d. | n.d. | 1.1 | n.d. | n.d. | <1 | 0.4 |
| FFA | 4.7 | n.d. | n.d. | 6.7 | n.d. | n.d. | 3.4 | 1.5 |
| MEAKG | 12.8 | <1 | <1 | 17.5 | 1.4 | <1 | 14.6 | 1.4 |
| DAG | 4.0 | n.d. | n.d. | 8.1 | n.d. | n.d. | 2.9 | 2.6 |
| NEAKG | 29.2 | 7.0 | 6.0 | 38.5 | 8.0 | 6.4 | 35.3 | 2.7 |
| Unidentified material | 31.4 | 12.6 | 9.5 | 17.6 | 11.9 | 9.8 | 25.8 | 3.5 |

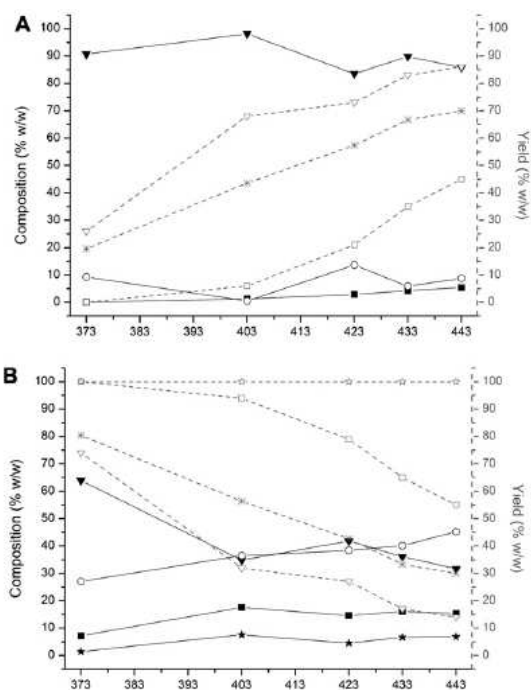


Fig. 3. Composition (weight percentage) of the distillations performed at 373, 403, 423, 433 and 443 K, (A) distillates, (B) residues. ∇ — FAEE, \blacksquare — NEAKG, \star — MEAKG, \circ — Unidentified material, ∇ — FAEE yield, \square — NEAKG yield, \star — MEAKG yield, \ast — Total yield. The % yields in this figure are expressed as the weight percentage of the studied compounds divided between distillate and residue, considering as the total amount (100%) the grams of each compound in the starting material. The mass balance closed in the residues with little amounts (less than 1%) of DAG and FFA.

pre-distilled at 373 K and 20 Pa to eliminate remaining water, glycerol, and minor volatile compounds, as other authors have previously reported [33]. These volatile compounds must be removed because their vapor pressure can prevent the maximum level of vacuum to be reached. Then several distillation at different temperatures were studied with the pre-distilled residue (403, 423, 433, and 443 K) based on previous reported studies [34–36].

In Fig. 3 it can be observed that residues from the different distillations assayed contain higher concentration of unidentified material. For this reason it can be indicated that the mentioned unidentified material should have higher molecular weight and lower volatility than those of the distilled material. For this reason residues obtained were again distilled in order to obtain a product

highly enriched NEAKG as a distillate, free from these unidentified material. It should be also indicated that the material to be fed, in some occasions, experienced increased viscosity, turbidity, and partial solidification probably related to the high proportion of the mentioned unidentified material, as it has been observed by other author previously [10]. For this reason, feed material was vacuum filtered in order to remove possible suspension material in subsequent distillations.

The results shown in Fig. 3A reveal that at 403 K, more than 50% of the starting FAEE distillate without noticeable distillation of NEAKGs. Moreover, the NEAKG yield of the distillation residue at 403 K is ca. 90%. Therefore this temperature was selected to remove the maximum amount of FAEE in the pre-distilled ethanoly-sis product.

In order to improve the distillation of FAEE at 403 K the feed rate was reduced from 1 to 0.5 L/h maintaining the operating conditions of temperature, vacuum, and rotor speed. This change increases the residence time of the sample in the still, facilitating vaporization of FAEE. Hence 1.3 Kg of the pre-distilled ethanoly-sis product were first distilled at 403 K at a feed rate of 0.5 L/h and then, the residue (ca. 463 g) of this distillation was distilled at 493 K in order to obtain a distillate (ca. 267 g) highly enriched in NEAKGs. The results of these distillations are shown in Fig. 4.

Yields of different distillations carried out are shown in Figs. 3 and 4. The distillation effected at 403 K eliminated ca. 70% of total FAEE and only 6% of NEAKGs from the distillation residue. It can be concluded that 403 K is an excellent temperature to concentrate NEAKG in the distillation residues. However, besides the concentration of NEAKG in the residue at 403 K, high concentration of unidentified material was also observed. Therefore, a new distillation to obtain a distillate free from unidentified material was carried out. It should be also noted that although at 423, 433, and 443 K higher percentages of FAEE are distilled, increasing percentages of NEAKG are also extracted, reducing the yield of this product in the residues. For this reason temperatures higher than 403 K were discarded for distillation of FAEE. Also, as it was stated before, utilization of high temperatures in the distillation process should be avoided as much as possible to minimize formation of undesired compounds in the products.

Fig. 4A indicates that the yield of NEAKG in the distillate at 493 K is 85%. This distillate is free from unidentified material and corresponds to 73.5% of the starting NEAKGs in the feed material. It should be also noted that this distillate at 493 K is free of MEAKGs.

Table 4 shows that the composition in FAEE in the 493 K distillate is comprised mainly of C22:1, C20:5, C22:5, and C22:6, because other FAEE with lower molecular weight were distilled at previous stages such as the degassing and distillation at 403 K, as stated before by other authors [34,35]. In order to compare the results of FAEE analysis, the data in Table 4 are presented as relative percentages of total FAEE from each sample. Mass balance for FAEE

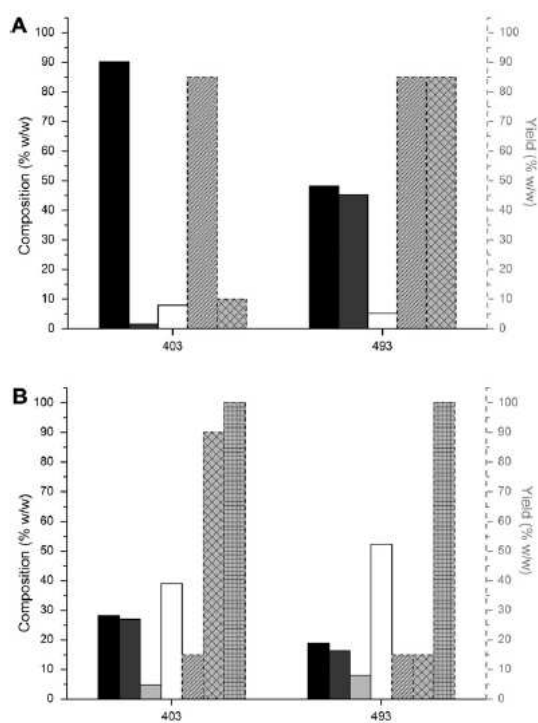


Fig. 4. Composition (weight percentage) of the distillations performed at 403 and 493 K, (A) distillates, (B) residues. ■ FFAE, ■ NEAKG, □ MEAKG, □ Unidentified material, ■ FFAE yield, ■ NEAKG yield, ■ MEAKG yield. The yields in this figure are expressed as the weight percentage of the studied compounds divided between distillate and residue, considering as the total amount (100%) the grams of each compound in the starting material. The mass balance closed in the residues with little amounts (less than 1%) of DAG and FFA.

Table 4

FAEE composition of the distillations performed at 403 and 493 K. All values are expressed as a percentage of the total fatty acids ethyl esters.

| % w/w | 403 K | | 493 K | |
|-------|------------|---------|------------|---------|
| | Distillate | Residue | Distillate | Residue |
| C14:0 | 1 | <1 | <1 | 1 |
| C16:0 | 14 | 1 | 1 | 2 |
| C16:1 | 1 | <1 | <1 | <1 |
| C16:2 | 5 | 1 | 1 | 1 |
| C16:3 | 2 | <1 | <1 | 1 |
| C18:0 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| C18:1 | 37 | 5 | 5 | 3 |
| C18:2 | 2 | <1 | <1 | <1 |
| C18:3 | 1 | 1 | <1 | <1 |
| C20:1 | 11 | 8 | 8 | 7 |
| C18:4 | 2 | 1 | <1 | <1 |
| C20:4 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| C22:1 | 7 | 32 | 30 | 31 |
| C20:5 | 3 | 5 | 5 | 8 |
| C24:1 | 2 | 26 | 28 | 28 |
| C22:5 | <1 | 1 | 1 | 2 |
| C22:6 | 7 | 17 | 16 | 13 |

and total omega-3 was also calculated for the distillations shown in Figs. 3 and 4. The mentioned mass balance closed in all experiments with an inaccuracy lower than 10% and 8% for FAEE and total omega-3, respectively.

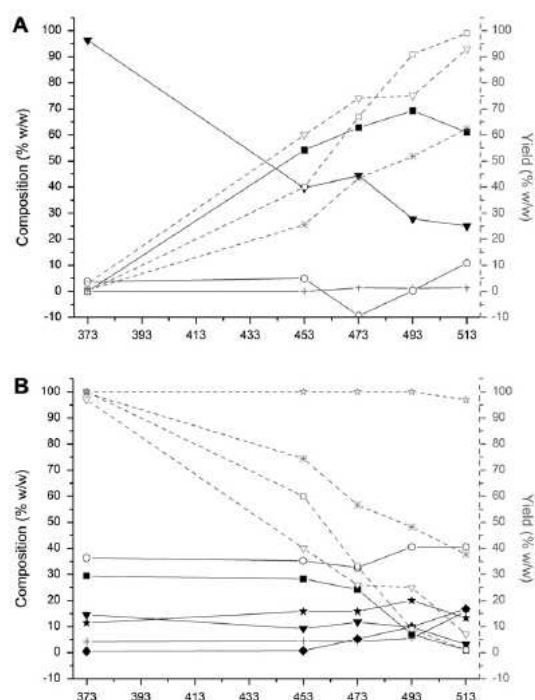


Fig. 5. Composition (weight percentage) of the distillations performed at 373, 453, 473, 493, and 513 K, taking as starting material the mixture of the residues obtained during the supercritical fluid extraction. (A) distillates, (B) residues. ■ FFAE, ■ NEAKG, □ MEAKG, □ Unidentified material, ■ FFAE yield, ■ NEAKG yield, ■ MEAKG yield, ■ Total yield. The yields in this figure are expressed as the weight percentage of the studied compounds divided between distillate and residue, considering as the total amount (100%) the grams of each compound in the starting material. The mass balance closed in the residues with little amounts of DAG.

3.4. Molecular distillation of the mixture residues from the supercritical CO₂ extraction

The mixture of the residues obtained after SFE was distilled to study the effect of the combination of supercritical fluid extraction and molecular distillation techniques in the purification of NEAKGs, similarly to the results reported by other authors related to the purification of 1,2-diacylglycerols from vegetable oil [37]. The molecular distillation study was performed to obtain a distillate rich in NEAKGs, with negligible concentration of unidentified material. For that matter the lowest possible temperature at the highest feasible feed mass flow were utilized.

The first step of the molecular distillation consisted of a pre-distillation step at 373 K and 20 Pa to eliminate volatile compounds in the material, and then the residue attained was re-fed in the subsequent distillations at different temperatures. The aims of the molecular distillation fractionation were to establish the fractionation conditions between NEAKGs and MEAKGs and to obtain a distillate free from unidentified compounds. It should be pointed out, as it was observed in Figs. 3 and 4, molecular distillation residues accumulate most of the unidentified material and distillates, on the contrary, are almost free of unidentified material.

Hence, distillations at 453, 473, 493, and 513 K were carried out in order to obtain a distillate with a high concentration of NEAKGs and a low concentration of unidentified material. These temperatures were chosen based on the results from the literature for

distillation of molecules similar to NEAKGs such as monoacylglycerols [33,38,39].

Fig. 5 shows that the percentage of unidentified material is much higher in residues than in distillates. Distillation at 493 K produced a distillate which contains mainly NEAKGs and FAEE, leaving in the residue some FAEE, DEAKGs, MEAKGs, and all unidentified compounds. It should be indicated that this distillation temperature exceeds the thermal change temperature of EPA and DHA ethyl esters, as stated before by other authors [16,35,40], but it must be effected in this manner because the objective in this work was to distill the NEAKG which have a higher boiling point than that of EPA and DHA ethyl esters. The distillate obtained was a white color solid at room temperature and even at 313 K; for this reason the internal condenser was kept at 333 K.

Distillation at 513 K resulted in a darker colored distillate compared to that at 493 K. In addition, this distillate had a percentage of unidentified material of 10% and it was also possible to detect the apparition of MEAKGs. For these reasons the distillate obtained at 513 K was discarded.

The percentage yields of these distillations are also shown in Fig. 5. At 493 K more than 90% of total NEAKGs were distilled. Unfortunately at this temperature ca. 75% of the FAEE were also distilled.

4. Conclusions

Fractionation of a product from ethanolsis of squalene free shark liver oil via CC-SFE, molecular distillation and by the combination of both techniques has been studied.

CC-SFE is an excellent methodology for removing selectively FAEE from the chemical ethanolsis product mixtures. However, the residues obtained contained high percentage of unidentified material. A product at the bottom of the SFE column (residue) containing ca. 35% of NEAKGs and 16% of FAEE with ca. 25% of unidentified material was obtained by this methodology.

Several stages of molecular distillation with the product from ethanolsis of a squalene free shark liver oil were also effected. In the final stage carried out at 493 K a distillate that contains ca. 50% of FAEE and ca. 50% of NEAKG can be obtained.

Finally combination of CC-SFE and molecular distillation permits one to obtain a distillate that contains ca. 70% of NEAKG with ca. 30% of FAEE and negligible amounts of unidentified material.

In conclusion, this study demonstrates the advantages of combining supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil.

Acknowledgments

This work was supported by Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD, Project number S2009/AGR-1469) and Consolider-Ingenio FUN-C-FOOD (CSD2007-00063). A predoctoral contract (Personal investigador de apoyo) for Daniel Tenllado van der Reijden was provided by Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid (Spain) and by the European Social Fund (ESF).

References

- [1] T. Iannitti, B. Palmieri, An update on the therapeutic role of alkylglycerols, *Mar. Drugs* 8 (2010) 2267–2300.
- [2] A. Brohult, J. Brohult, S. Brohult, I. Joelsson, Effect of alkoxyglycerols on the frequency of fistulas following radiation-therapy for carcinoma of the uterine cervix, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 58 (1979) 203–207.
- [3] J. Palmblad, J. Samuelsson, J. Brohult, Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50 (1990) 363–370.
- [4] R. Mitre, M. Etienne, S. Martinais, H. Salmon, P. Alloume, P. Legrand, A.B. Legrand, Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation in sows and offspring by oral supply of shark-liver oil to mothers during gestation and lactation, *Br. J. Nutr.* 94 (2005) 753–762.
- [5] P.T. Pugliese, K. Jordan, H. Cederberg, J. Brohult, Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil, *J. Altern. Complement. Med.* 4 (1998) 87–99.
- [6] C. Torres, L. Vázquez, F. Señoráns, G. Reglero, An efficient methodology for the preparation of alkoxyglycerols rich in conjugated linoleic acid and eicosapentaenoic acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84 (2007) 443–448.
- [7] X.D. Chen, Separation and purification in the food industry, *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 93–93.
- [8] L. Vázquez, C.F. Torres, T. Fornari, F.J. Señoráns, G. Reglero, Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical carbon dioxide extraction, *J. Supercrit. Fluids* 40 (2007) 59–66.
- [9] O.J. Catchpole, J.B. Grey, K.A. Noermark, Fractionation of fish oils using supercritical CO₂ and CO₂+ethanol mixtures, *J. Supercrit. Fluids* 19 (2000) 25–37.
- [10] A. Pietsch, P. Jaeger, Concentration of squalene from shark liver oil by short-path distillation, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109 (2007) 1077–1082.
- [11] G.G. Haraldsson, A. Thorarensen, The generation of glyceryl ether lipids highly enriched with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 7681–7684.
- [12] M.J. Bakes, P.D. Nichols, Lipid fatty acid and squalene composition of liver oil from six species of deep-sea sharks collected in southern Australian waters, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 110 (1995) 267–275.
- [13] L.H. Schaufler, R. Sigler, M. Hulbert, L. Fatty acid composition of sleeper shark (*Somniosus pacificus*) liver and muscle reveals nutritional dependence on planktivores, International Council for the Exploration of the Sea. Theme Session on Elasmobranch Fisheries Science, (2005).
- [14] E. Lopez-Huertas, Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies, *Pharmacol. Res.* 61 (2010) 200–207.
- [15] W.S. Harris, Fish oil supplementation: evidence for health benefits, *Cleve. Clin. J. Med.* 71 (2004) 208.
- [16] R. Wijesundera, W. Ratnayake, R. Ackman, Eicosapentaenoic acid geometrical isomer artifacts in heated fish oil esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 66 (1989) 1822–1830.
- [17] G. Boran, H. Karaçam, M. Boran, Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time, *Food Chem.* 98 (2006) 693–698.
- [18] I. Jaswir, F. Osman, A. Khatib, A.J.K. Chowdhury, Storage stability of fish oil from Langkawi Island, Malaysia, *Food Sci. Technol. Res.* 15 (2009) 591–598.
- [19] G. Navarro-García, J.C. Ramírez-Suárez, E. Cota-Quifones, F. Márquez-Farías, L. Bringas-Alvarado, Storage stability of liver oil from two ray (*Rhinoptera bonasus* and *Aetobatus narinari*) species from the Gulf of Mexico, *Food Chem.* 119 (2010) 1578–1583.
- [20] W. Sang, Z.T. Jin, Lipid oxidation of fish liver oil as affected by light, antioxidants and temperature, *J. Food Process. Preserv.* 28 (2004) 1–10.
- [21] D. Carlsson, T. Suprunchuk, D. Wiles, Photooxidation of unsaturated oils: effects of singlet oxygen quenchers, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53 (1976) 656–660.
- [22] H. Chan, Photo-sensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters. The identification of different pathways, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54 (1977) 100–104.
- [23] R. Sims, Possible mechanisms in thermal polymerization of drying oils. I. Catalysis and inhibition studies, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 32 (1955) 94–98.
- [24] R. Korus, T. Moussetis, Polymerization of safflower and rapeseed oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (1984) 537–540.
- [25] C. Hoeve, D. Sutton, The chemistry of polymerized oils. VI. The molecular weight distribution of thermally polymerized oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 33 (1956) 312–314.
- [26] D. Firestone, The determination of polymers in fats and oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 40 (1963) 247–255.
- [27] G. Perretti, A. Motori, E. Bravi, F. Favati, L. Montanari, P. Fantozzi, Supercritical carbon dioxide fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters, *J. Supercrit. Fluids* 40 (2007) 349–353.
- [28] L. Vázquez, T. Fornari, F.J. Señoráns, G. Reglero, C.F. Torres, Supercritical carbon dioxide fractionation of nonesterified alkoxyglycerols obtained from shark liver oil, *J. Agric. Food. Chem.* 56 (2008) 1078–1083.
- [29] C.F. Torres, L. Vázquez, F.J. Señoráns, G. Reglero, Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector, *J. Chromatogr. A* 1078 (2005) 28–34.
- [30] R. Armenta, M. Vinatoru, A. Burja, J. Kralovec, C. Barrow, Transesterification of fish oil to produce fatty acid ethyl esters using ultrasonic energy, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84 (2007) 1045–1052.
- [31] E. Choe, D.B. Min, Chemistry of deep-fat frying oils, *J. Food Sci.* 72 (2007) R77–R86.
- [32] N. Yanishlieva, H. Becker, H.K. Mangold, Autoxidation of alkoxylipids I. Alkylglycerols, dialkylglycerols and trialkylglycerols, *Chem. Phys. Lipids* 17 (1976) 393–397.
- [33] P. Fregolente, G. Pinto, M. Wolf-Maciell, R. Filho, Monoglyceride and diglyceride production through lipase-catalyzed glycerolysis and molecular distillation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160 (2010) 1879–1887.
- [34] L. Vázquez, C. Akoh, fractionation of short and medium chain fatty acid ethyl esters from a blend of oils via ethanolsis and short-path distillation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*
- [35] J.-H. Liang, L. Hwang, Fractionation of squid visceral oil ethyl esters by short-path distillation, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 773–777.
- [36] J.H. Liang, Separation and concentration of n-3 polyunsaturated fatty acid ethyl esters from squid visceral oil by molecular distillation and supercritical

- carbon dioxide extraction, Ph.D. Dissertation, National Taiwan University, Taiwan, (1991) 77, 78.
- [37] D.L. Compton, J.A. Laszlo, F.J. Eller, S.L. Taylor, Purification of 1,2-diacylglycerols from vegetable oils: comparison of molecular distillation and liquid CO₂ extraction, *Ind. Crops Prod.* 28 (2008) 113–121.
- [38] T. Yang, H. Zhang, H. Mu, A. Sinclair, X. Xu, Diacylglycerols from butterfat: production by glycerolysis and short-path distillation and analysis of physical properties, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 979–987.
- [39] L.V. Fregolente, P.B.L. Fregolente, A.M. Chicuta, C.B. Batistella, R. Maciel Filho, M.R. Wolf-Maciel, Effect of operating conditions on the concentration of monoglycerides using molecular distillation, *Chem. Eng. Res. Des.* 85 (2007) 1524–1528.
- [40] V. Fournier, F. Destailhats, P. Juanéda, F. Dionisi, P. Lambelet, J.-L. Sébédio, O. Berdeaux, Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108 (2006) 33–42.
-

ORIGINAL ARTICLE

Immobilized lipases from *Candida antarctica* for producing tyrosyl oleate in solvent-free medium

ÓSCAR FERNÁNDEZ¹, DANIEL TENLLADO³, DIANA MARTÍN¹, ROSA M. BLANCO², FRANCISCO J. SEÑORÁNS⁴, GUILLERMO REGLERO¹ & CARLOS F. TORRES¹

¹Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera, 9, Campus de la Universidad Autónoma de Madrid Madrid, ²Instituto de Catálisis y Petroleoquímica. CSIC. Marie Curie, 2, Madrid, Spain, ³Critical Enzymes S.L. Fundación Parque Científico de Madrid. Faraday, 7 Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid and ⁴Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

Abstract

Two immobilized lipases from *Candida antarctica* have been compared for the direct esterification of tyrosol with oleic acid in equimolar conditions and in the absence of organic solvent. *Candida antarctica* lipase B was immobilized on octyl-silica agglomerates and compared with commercial Novozym 435. Reduction of tyrosol particle size to 0.1 mm significantly increased the reaction rate with both immobilized lipases, and reduced pressure improved the final tyrosyl oleate yield up to 95% (w/w) in both cases. Immobilized lipases were recovered and reutilized in three consecutive trials with negligible inactivation. Under optimum conditions, a product mixture comprising more than 95% of tyrosyl oleate (w/w) was attained in less than 2 hours. Finally, the index of antioxidant activity obtained, according to the Rancimat method, indicated that tyrosyl oleate was slightly more effective than tyrosol as an antioxidant in a low polar matrix.

Keywords: tyrosol, lipase, phenolics, antioxidant, lipophilic

Introduction

Phenolic compounds, the biggest group of natural antioxidants, have attracted much attention due to their known and wide-ranging biological activities, as well as to their health effects (Mateos et al. 2008). It has been well established that tyrosol has a significantly lower antioxidant activity than hydroxytyrosol, due to the absence of the ortho-diphenolic group in its chemical structure (Mateos et al. 2003, 2008). However, despite its weak antioxidative efficacy, recent studies suggest that tyrosol exerts a powerful protective effect against oxidative injuries in cell systems (Giovannini et al. 1999) and improves the intracellular antioxidant defence systems (Di Benedetto et al. 2007).

Tyrosol is a major compound of extra virgin olive oil, the typical added fat of the Mediterranean diet, which has general health benefits including reducing the incidence of risk factors for coronary

heart disease (Harwood & Yaqoob 2002). Tyrosol showed the most potent activity against glutamate-induced neurotoxicity. The potency of the tyrosol is similar to that of MK-801 (dizocilpine maleate) or CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), two of the most common positive controls used in neurotoxicity (Choong et al. 2009).

In addition, tyrosol inhibits cell-mediated oxidation of low density lipoprotein and preserves cellular activities of antioxidative enzymes such as glutathione peroxidase and glutathione reductase which are reduced in cells incubated with low density lipoprotein. Tyrosol inhibits production of reactive oxygen species in cells during cell mediated oxidation of low-density lipoprotein (LDL) (Di Benedetto et al. 2007).

At present, the cellular and molecular mechanisms that underlie the action of tyrosol are not fully understood. However, some reports indicate that

Correspondence: Óscar Fernández, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid, Spain. Tel: +0034-910017977. Fax: +0034-910017905. E-mail: oscar.fernandez@uam.es

(Received 18 July 2011; revised 20 September 2011; accepted 5 February 2012)

ISSN 1024-2422 print/ISSN 1029-2446 online © 2012 Informa UK, Ltd.
DOI: 10.3109/10242422.2012.664817

tyrosol significantly protects primary cultured neuronal cells against glutamate-induced oxidative stress via antioxidative activities. Therefore, it might offer useful therapeutic choice in treatment of neurodegenerative disorders caused by excitotoxicity (Stamatis et al. 2001).

However, it should be noted that the effectiveness of tyrosol in some biological systems tightly correlates with its capability to penetrate the cells (Weitkamp et al. 2008). Moreover, in pharmaceuticals as well as in food preparations, limitations occur due to its weak solubility and stability in a lipophilic environment. Hence, lipophilic derivatives of flavonoids, produced by esterification of the hydroxyl functions with aliphatic molecules can improve their intestinal absorption and cell permeability (Fragopoulou et al. 2007). Similarly, esterification of hydroxytyrosol could improve oxidative stability, bioavailability and cell diffusion.

Additionally, some studies have shown that the antioxidant effect of phenolic-based antioxidants in oil matrices can be improved by their lipophilization (Torres de Pinedo et al. 2007), although this has not always been observed (Gordon et al. 2001; Mateos et al. 2003; Trujillo et al. 2006). Thus, lipophilic derivatives of tyrosol might satisfy the current demand for antioxidants with nutritional or additional bioactive properties in order to give added-value to foods (Moure et al. 2001).

The esterification of tyrosol and hydroxytyrosol with organic acids has been previously described (Stamatis et al. 2001). However, all these approaches utilize organic solvents or molar excess of the acylating reactant. Recently, fatty acid esters of hydroxyphenylethanol were prepared by esterification and transesterification of fatty acids and their methyl esters, respectively, at equimolar ratios under vacuum at moderate temperatures and in the absence of solvents (Weitkamp et al. 2008). However, these studies were carried out at milligram scale, 80°C and without paying attention to the re-utilization of the biocatalyst.

The present study focuses on the enzymatic esterification of tyrosol with oleic acid by immobilized lipase from *Candida antarctica*. In a search for alternatives to the commercial Novozym 435, lipase was also immobilized on silica agglomerate beads and both catalysts compared under different reaction conditions.

Materials and methods

Chemical and samples

Oleic acid (USP PRS-CODEX) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Tyrosol (with purity

of 98.0% w/w) was purchased from TCI Europe (Zwijndrecht Belgium). All solvents used were HPLC grade from Lab-Scan (Dublin, Ireland). Novozym 435 (commercial immobilized lipase from *Candida antarctica* B) was a gift from Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Extracts of lipase B from *Candida antarctica* were also generously supplied by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). High-oleic sunflower oil was a gift from Migasa (Sevilla, Spain).

Lipase immobilization

In an attempt to improve on the commercial biocatalyst, lipase from *Candida antarctica* B was immobilized on octyl silica (OS-immobilized) agglomerates following the same procedure as described previously for immobilization on octyl silica particles (Blanco et al. 2007). For this process 100 mg of Octyl silica support was pre-wetted with 1 mL ethanol and left to equilibrate in a closed vial for at least 10 min. Enzyme solution was prepared with 10 mL phosphate buffer, pH 7.0, containing 10 mg enzyme. After assaying the activity of this solution, the support was added and the suspension kept under gentle stirring. The activities of suspension and supernatant were measured at different times and the process terminated when the activity in supernatant had disappeared, meaning that the enzyme had been fully immobilized. A control sample was also tested, and remained fully active during all the process. After completion, the suspension was filtered, washed with phosphate in a sintered glass funnel, and then suspended in 10 mL dry acetone, filtered out and vacuum dried for at least 30 min to ensure a complete drying of the catalyst.

Esterification of oleic acid with butanol was used as a model reaction in order to characterize and compare this catalyst and Novozym 435. For this, 75 mg of oleic acid and 50 mg of butanol were mixed using orbital shaking at 200 rpm and 30°C. Identical amounts of each enzyme preparations were added to the mixture in separate flasks and the reaction allowed to proceed for 5 min. The product was dissolved up to 50 mL of chloroform, and the resulting transparent solution analyzed by HPLC to determine the percentage of oleic acid consumed. Activity units (AU) for Novozym 435 and OS-immobilized lipase were 2425 and 1687, respectively. One activity unit is defined as 1 µmol of oleic acid consumed/min/g of immobilized lipase.

Enzymatic reaction

Oleic acid (3 g, 0.01 mol) and tyrosol (1.5 g, 0.01 mol) were added to a 60 mL flask and mixed by swirling. Then, unless otherwise is indicated, 10% w/w

of immobilized lipase was added. The flask was placed in a thermostated orbital shaker at 200 rpm. In those cases where the reaction was carried out under reduced pressure, the flask was placed in a rotary evaporator (Heidolph instruments, Schwabach, Germany) coupled to a Vac V-512 vacuum pump with a vacuum controller (Büchi, Flawil, Switzerland). Samples of 50 μL were withdrawn periodically and analysed by HPLC.

Tyrosol particle size

In order to determine the original size of commercial tyrosol, the product was sieved through different particle size sieves (from 500 micron to 100 micron). After this procedure, different fractions were collected and weighed. The distribution of particle sizes, in weight percentage, for original tyrosol was: <0.1 mm (0.8%), 0.1–0.25 mm (31%) and 0.25–0.5 mm (68.2%). In order to test the influence of particle size, the esterification between tyrosol and oleic acid was carried out with tyrosol with a particle size below 0.1 mm and with original tyrosol.

Study of tyrosol solubility in the reaction mixture

Tyrosol (500 mg) and oleic acid (3000 mg) were added to a 60 mL flask. The suspensions were incubated for 1 h in an orbital shaker at 40, 50 and 60°C, then the mixture was placed in a 4 mL vial sealed with a cap and kept at these three temperatures until a completely clear oleic liquid phase was observed. Aliquots of the liquid phase were taken at each temperature to determine the percentage of tyrosol dissolved in the oily phase. A similar study was carried out using tyrosol oleate previously synthesized in our lab, instead of oleic acid.

HPLC enzymatic reaction analysis

The analyses were performed on an Agilent Eclipse XDB-C18 column (150 mm \times 4.6 mm, Agilent, USA) coupled to an HPLC Agilent 1200 Series containing a thermostated column compartment, a quaternary pump, an autosampler, a vacuum degasser, evaporative light scattering detector (ELSD) and diode array detector (DAD). The flow rate was 2 mL/min. A splitter valve was placed after the column and 30% of the mobile phase was directed through the detector. The column temperature was maintained at 25°C. The mobile phase consisted of a binary gradient of A: water containing 0.01% (v/v) acetic acid and B: methanol/acetonitrile 90/10 containing 0.01% (v/v) acetic acid. The elution gradient

Table I. Binary gradient utilized in the HPLC analysis.

| Time (minutes) | %A | %B |
|----------------|----|----|
| 0 | 90 | 10 |
| 10 | 70 | 30 |
| 15 | 10 | 90 |
| 30 | 10 | 90 |
| 35 | 90 | 10 |
| 40 | 90 | 10 |

is shown in Table I. Oleic acid was analysed via ELSD and tyrosol and tyrosyl oleate via DAD.

HPLC enzymatic residual activity analysis

The activity of the catalysts was tested by esterification of oleic acid with butanol. Product mixtures were analysed on a Kromasil silica 60 column (250 mm \times 4.6 mm, Análisis Vínicos, Tomelloso, España) coupled to a CTO 10A VP 2 oven, a LC-10AD VP pump, a gradient module FCV-10AL VP, a DGU-14A degasser, and an evaporative light scattering detector ELSD-LT from Shimadzu (IZASA, España). The column temperature was maintained at 35°C. The mobile phase utilized had been previously reported by Torres et al. (2005).

Water content of lipases

Karl-Fischer automatic titrator 870 Titrino Plus (Metrohm, Herisau, Switzerland) using hydranal composite 5 (Sigma) for titration was used to determine water content of both immobilized lipases.

Biocatalyst reutilization

Three consecutive trials with the same batch of immobilized lipase were performed. For each trial, the immobilized lipases were used to catalyse the reaction for 8 h, recovered by filtration under vacuum, washed with chilled acetone and dried under vacuum. The immobilized lipases were maintained refrigerated in a closed vessel with molecular sieves until the next trial.

Antioxidant activity under Rancimat test

High-oleic sunflower oil (3 g) with increased molar concentrations of tyrosol and tyrosyl oleate was subjected to accelerated oxidation in a Metrohm Rancimat model 743 (Herisau, Switzerland) at an airflow rate of 20 L/h and at 90°C. The conductivity measuring cells contained 70 mL of distilled water. The induction time (IT) was automatically determined as the inflection point of the generated plot of conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) of the water versus time (h).

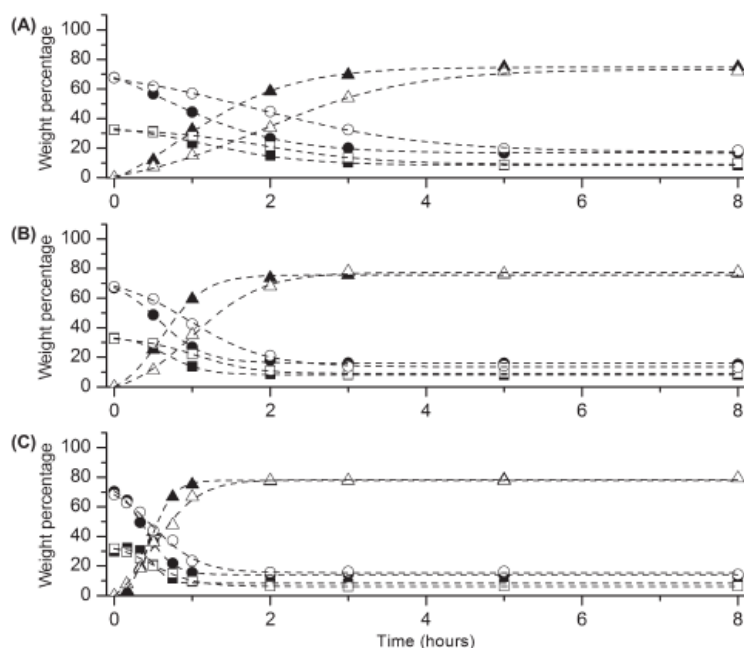


Figure 1. Effect of temperature on the enzymatic esterification of tyrosol with oleic acid. Closed symbols Novozym 435, open symbols OS-immobilized lipase. Circles oleic acid, squares tyrosol, triangles tyrosyl oleate. A 40°C, B 50°C, C 60°C.

Analyses were performed at least in triplicate. The indexes of antioxidant activity (AI) were estimated according to Nwosu et al. (Nwosu et al. 1997) as:

$$AI = IT \text{ with antioxidant} / IT \text{ without antioxidant}$$

Values > 1 mean a protective effect of a compound in the oil, whereas values of 1 means lack of protective effect and values < 1 suggest a pro-oxidant effect.

Results and discussion

Effect of tyrosol particle size

The present study focuses on the esterification of oleic acid with tyrosol under equimolar conditions in a solvent free reaction medium. Tyrosol was not soluble in oleic acid under the conditions assayed, so the rate of dissolution of the tyrosol in the reaction medium could have caused mass transfer limitation (Torres et al. 2003). Hence, the rate of dissolution of tyrosol in the reaction mixture was compared

Table II. Influence of tyrosol particle size on the rate of esterification between oleic acid and tyrosol catalysed by Novozym 435.

| Time (minute) | Tyrosyl oleate (weight percentage) | |
|---------------|------------------------------------|----------------|
| | Sieved tyrosol | Intact tyrosol |
| 0 | 0.0 | 0.0 |
| 60 | 25.3 | 7.9 |
| 90 | 59.4 | 35.8 |
| 120 | 73.6 | 57.5 |
| 180 | 75.7 | 70.4 |
| 300 | 76.0 | 77.1 |
| 480 | 76.7 | 76.1 |

using mixed size-range tyrosol and sieved tyrosol with a particle size smaller than 0.1 mm (Table II).

Table II shows that a faster reaction rate was attained using tyrosol with a particle size smaller than 0.1 mm. It should be noted that at the shortest reaction times (60 and 90 min) the reaction rate with sieved tyrosol was approximately 3- and 2-times faster than that with the original tyrosol. However, a similar final conversion was attained in both cases. Hence, sieved tyrosol was utilized in subsequent experiments.

Effect of temperature

The enzymatic esterification of tyrosol with oleic acid by the two immobilized lipases was carried out at three different temperatures (Figure 1). As expected, the higher the temperature the faster the rate of enzymatic esterification observed. It was also observed that the reaction equilibrium was reached when tyrosyl oleate comprised ca. 73% w/w at 40°C (Figure 1A), 76% w/w at 50°C (Figure 1B) and 79% w/w at 60°C (Figure 1C). The different reaction kinetics observed can be attributed to differences in solubility of tyrosol and water vapour pressure in the reaction mixture at the different temperatures studied.

Hence, the solubility of tyrosol in the reaction mixture was evaluated. Two different tests were performed. First, solubility of tyrosol in oleic acid at 40, 50 and 60°C was compared. Solubility of tyrosol in tyrosyl oleate at 50°C was also determined. The

Table III. Solubility of tyrosol in oleic acid at 40, 50 and 60°C and in tyrosyl oleate at 50°C.

| | Tyrosol (% w/w) |
|------------------------|-----------------|
| Oleic at 40°C | 0.7 |
| Oleic at 50°C | 0.9 |
| Oleic at 60°C | 1.3 |
| Tyrosyl oleate at 50°C | 4.2 |

results in Table III indicate a very low solubility of tyrosol in oleic acid. However, four times higher solubility of tyrosol in tyrosyl oleate was attained. These results indicated that tyrosyl oleate produced in the esterification reaction improved the solubilization of tyrosol in the reaction mixture and thus can make a positive contribution to the reaction rate.

In all cases under study, the rate of esterification was faster in the presence of Novozym 435 than in the presence of the OS-immobilized lipase. The lower activity of the lipase-agglomerate had already been observed in butyl oleate synthesis, probably due to a lower enzyme loading of the aggregated immobilized enzyme.

It is well known that re-utilization of lipase is a key factor in applied biocatalysis. Hence, a balance between rate of reaction and enzymatic stability must be reached. In order to preserve as much as possible the lipase activities and minimize tyrosol degradation and partial volatilization, further experiments were carried out at 50°C.

Effect of lipase quantity

Decreasing the percentage of immobilized lipase added to the reaction mixture has several advantages, such as a reduction in bioprocess cost and the amount of solid material in the reaction mixture, which is especially relevant when the percentage of solid material in the mixture is high. Two different percentages of immobilized lipase were compared in the enzymatic synthesis of tyrosyl oleate namely 5% w/w (Figure 2A) and 10% w/w (Figure 2B). In the present study, at the beginning of the reaction, tyrosol comprised ca. 33% of the reaction mixture. However, reduction in the amount of biocatalyst produced a significant decrease in the rate of the reaction with both immobilized lipases, and 10% by weight of biocatalyst was utilized in further experiments.

Effect of the reduced pressure

In order to shift the equilibrium of the reaction towards the formation of tyrosyl oleate, elimination of the water produced during esterification must be accomplished. Different strategies such as a nitrogen purging, addition of a desiccant or carrying out the reaction under reduced pressure can be effective. Recently, fatty acid esters of hydroxyphenylethanols were prepared by esterification and transesterification of fatty acids and their methyl esters, respectively, at equimolar ratios under vacuum at moderate

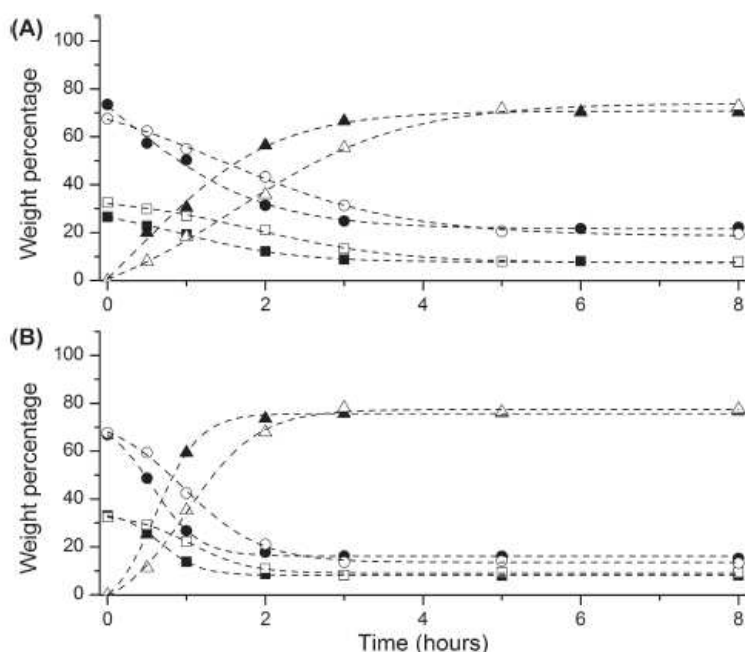


Figure 2. Effect of the amount of lipase on the enzymatic esterification of tyrosol with oleic acid. Symbols are the same as in 5% w/w (Figure 2A) and 10% w/w (Figure 2B). Circles oleic acid, squares tyrosol, triangles tyrosyl oleate.

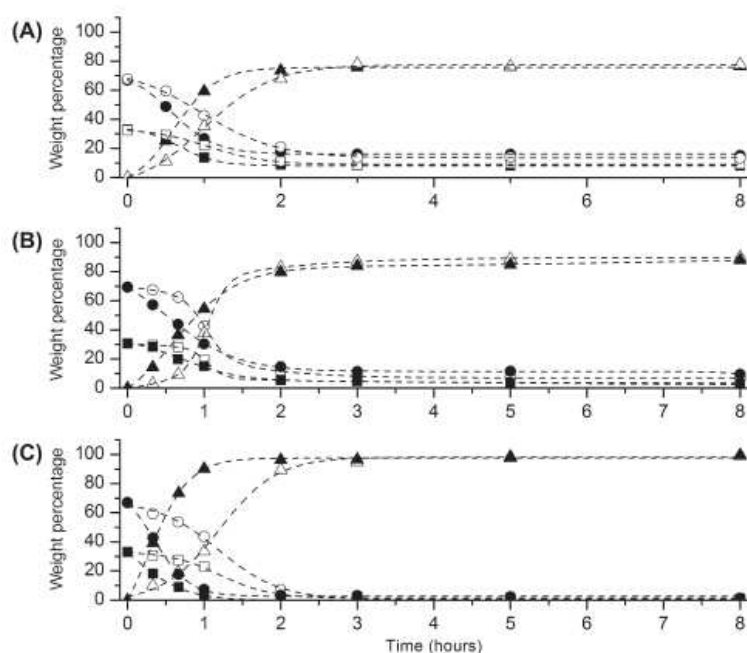


Figure 3. Effect of reduced pressure on the enzymatic esterification of tyrosol with oleic acid. A without vacuum, B 200 mbar, C 10 mbar. Symbols are the same that in Figure 1.

temperatures and in the absence of solvents (Weitkamp et al. 2008). The best results (91 and 90 mol %) were obtained at 80°C after 8 and 24 h with ethyl palmitate and ethyl oleate, respectively

The effect of carrying out the reaction under reduced pressure is shown in Figure 3. All esterification reactions run at atmospheric pressure led to a product mixture comprising tyrosyl oleate and variable amounts of unreacted tyrosol and oleic acid (Figure 3A). Under vacuum (200 mbar) a product mixture comprised of more than 85% of tyrosyl oleate could be obtained in less than 3 h for both Novozym 435 and OS-immobilized lipase (Figure 3B). However, in order to completely remove the water from the reaction mixture higher vacuum was required. Hence, for oleic and tyrosol conversions higher than 85% vacuum of 10 mbar was utilized (Figure 3C). Under these reaction conditions a product mixture comprised of more than 95% of tyrosyl oleate was obtained in 2 h for Novozym 435 and in 3 h for OS-immobilized lipase. The different water content of the enzyme preparations (1.77% for Novozym 435 and 2.17% for OS-immobilized lipase) could also play an important role on the reaction rate observed.

Another important aspect to take into consideration is the partial volatility of tyrosol. Other authors (Trujillo et al. 2006) have reported that excessive vacuum and temperature could lead to

partial distillation of tyrosol. In order to evaluate the partial evaporation of tyrosol a reaction mixture similar to that previously described but without addition of enzyme was placed under vacuum (10 mbar) for 8 h, after which an aliquot of the mixture was analyzed and the content of tyrosol compared with that from the initial mixture. An identical percentage of tyrosol was found in both samples indicating that negligible evaporation of tyrosol occurred under the experimental conditions assayed.

Removing water from the reaction mixture might have two opposing effects: (1) shift the equilibrium of the reaction towards the formation of tyrosyl oleate and (2) dehydrate the immobilized lipase affecting the residual activity of the biocatalyst. In order to check the residual activity of the lipase after the esterification reaction, three consecutive trials reutilizing the same batch of both lipases were studied.

Biocatalyst reutilization

Recovery of the biocatalyst from the reaction mixture is a drawback of enzyme reutilization in batch reactors. One of the main difficulties is the separation of product mixture from the immobilized enzyme. Thus, in the lipase reutilization study, the first trial (Figure 3C) was not directly comparable

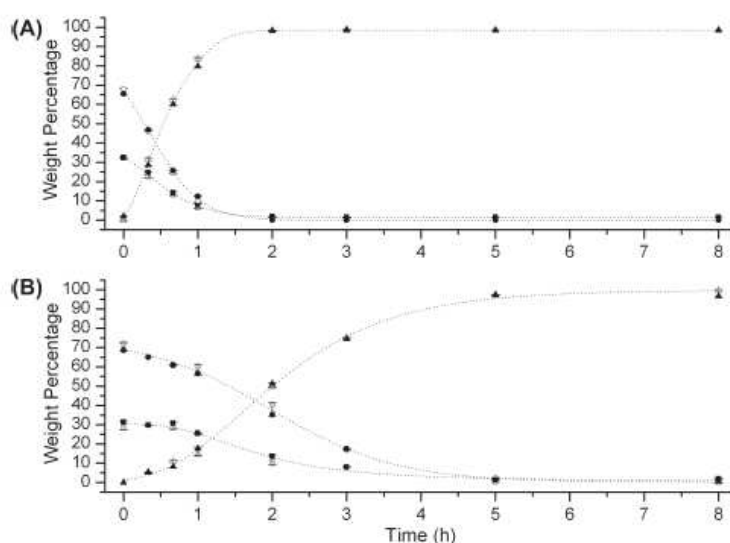


Figure 4. Effect of biocatalyst reutilization in the enzymatic esterification of tyrosol with oleic acid. Closed symbols second trial, open symbols third trial. Circles oleic acid, squares tyrosol, triangles tyrosyl oleate. A: Novozym 435, B: OS-immobilized lipase.

to the second and third trials because the first trial was affected with fresh lipase while subsequent trials were carried out with lipase impregnated with the reaction mixture. One strategy to make the trials comparable would be to submerge fresh lipase in the reaction mixture for 5 minutes and then dry it under vacuum before utilization in consecutive trials. However, this procedure could not be utilized in the current study because the initial reaction mixture contained high proportions of solid tyrosol that could interfere in the recovery of the biocatalyst. However, after 60 min of enzymatic reaction at 50°C and 10 mbar of vacuum, tyrosol was completely dissolved in the mixture and hence recovery of the lipase was feasible at reaction times longer than 1 h.

The time course of the synthesis of tyrosyl oleate for trials 2 and 3 are depicted in Figure 4. Similar reaction rates were observed for trials 2 and 3, which indicate that inactivation was negligible for both immobilized lipases. Trials 2 and 3 were slower than trial 1 (Figure 3C) for both immobilized lipases under study. This can be attributed to higher reactant diffusional limitations when lipase has been previously submerged in the reaction mixture compared to those attained with fresh lipase (trial 1).

Under these reaction conditions, it was possible to obtain a product mixture comprising of more than 95% of tyrosyl oleate in 2 h with Novozym 435 (Figure 4A) and in 5 h with OS-immobilized lipase (Figure 4B). Although the stabilities of both catalysts were similar, the reaction rate achieved was lower with OS-immobilized lipase than with

Novozym 435, so further optimization to achieve a more active biocatalyst or increased enzyme loading is still required.

As inactivation was negligible for both lipases in the second and third trial, the data from the biocatalyst re-utilization study was utilized for statistical purposes. It can be observed (Figure 4) that the standard deviation for tyrosol, oleic acid, and tyrosyl oleate never exceeded 1, 1.6 and 2.6 in the esterification catalyzed by Novozym 435 and 2.6, 3.6 and 2.2 in the esterification catalyzed by OS-immobilized lipase, respectively.

The stability of OS-immobilized lipase in organic medium was also assayed. 300 mg of biocatalyst containing 120 mg lipase per gram were incubated in 10 mL acetonitrile, maintained at 35°C and stirred at 200 rpm in an orbital shaker. After 2 hours incubation, the catalyst was washed three times with acetone, filtered and vacuum dried. The dry biocatalyst was weighed and a portion assayed for tributyrin hydrolysis to evaluate its activity. The remaining biocatalyst was incubated again in acetonitrile. This procedure was repeated 15 times.

The activity of the washed and dried catalyst after 15 trials was also assayed in esterification of oleic acid with butanol. No significant loss in catalytic activity was observed.

Biocatalyst comparison

Finally, esterification of tyrosol with oleic acid was carried out utilizing the same activity units (i.e. 1687

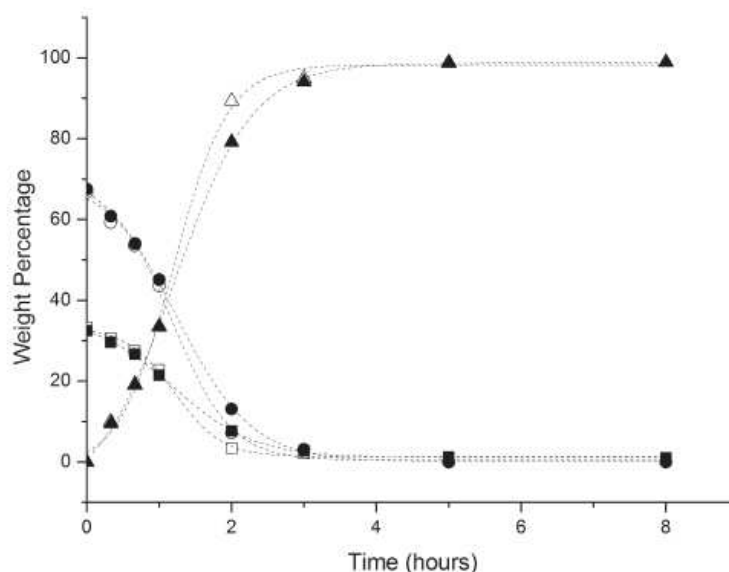


Figure 5. Utilization of the same activity units of biocatalyst in the enzymatic esterification of tyrosol with oleic acid. Symbols are the same as in Figure 1.

AU) of Novozym 435 and OS-immobilized lipase. The results (Figure 5) show that a similar reaction rate was observed with both lipases under study. Thus, no additional mass transfer or diffusion limitation was evident in the OS-immobilized lipase compared to Novozym 435, so the previously observed rate differences can be exclusively attributed to a higher enzyme loading in Novozym 435 compared to OS-immobilized lipase. Thus, further studies should be done in order to improve the capabilities of the new carrier to incorporate higher amounts of enzyme per gram of biocatalyst.

Antioxidant activity under Rancimat test

Antioxidant activity correlates with the number of phenolic hydroxyls, mainly the *ortho*-disubstitution present in some phenolic compounds, but not in tyrosol. This probably explains the low antioxidant activity of tyrosol reported in several studies (Giovannini et al. 1999; Mateos et al. 2003). However, the antioxidant effect of phenolic-based antioxidants in oil matrices can be improved by lipophilization (Torres de Pinedo et al. 2007). The index of antioxidant activity at increasing levels of tyrosol and synthesized tyrosyl oleate added to vegetable oil under Rancimat conditions is shown in Figure 6. A slight, almost linearly concentration dependent, protective effect against oxidation of oil was found with tyrosyl oleate, up to 3.7 mmol/kg (1500 mg/kg), above which the increase in IT slowed, reaching the highest antioxidant activity at 11.2 mmol/kg

(4500 mg/kg). The antioxidant activity seemed to decrease at the highest concentration evaluated (20 mmol/kg). In contrast, tyrosol added at the same molar concentration as tyrosyl oleate did not show any protective effect. Much higher concentrations of tyrosol (90 mmol/kg) were necessary to give evidence of a slight protective effect ($AI > 1$).

Therefore, the current study showed that lipophilization of tyrosol by esterification with oleic acid led to a slight improvement of antioxidant ability in oil. Torres de Pinedo et al. (2007) had previously showed an improved antioxidant effect in oil matrices of lipophilic (palmitate, stearate or oleate) derivatives of phenolic-based antioxidants. However, Mateos et al. (2008) reported that tyrosyl esters, including tyrosyl oleate, had a slightly lower IT than that of free tyrosol, suggesting a lower antioxidant effect of the lipophilic derivatives in oil matrices. This difference might be explained by the different oil matrix used in their study (Mateos et al. 2008), which used extra virgin olive oil. Additionally, the Rancimat conditions and concentrations of antioxidants assayed were different. The different procedures for producing tyrosyl esters might also lead to different final antioxidant activities.

According to the results obtained, the less polar tyrosyl oleate was more effective as an antioxidant in low polarity matrices than tyrosol. This result does not accord with the proposed 'polar paradox' for phenolic antioxidants, where polar antioxidants are more effective in low polar media and low polar antioxidants are more effective in polar media (Frankel et al.

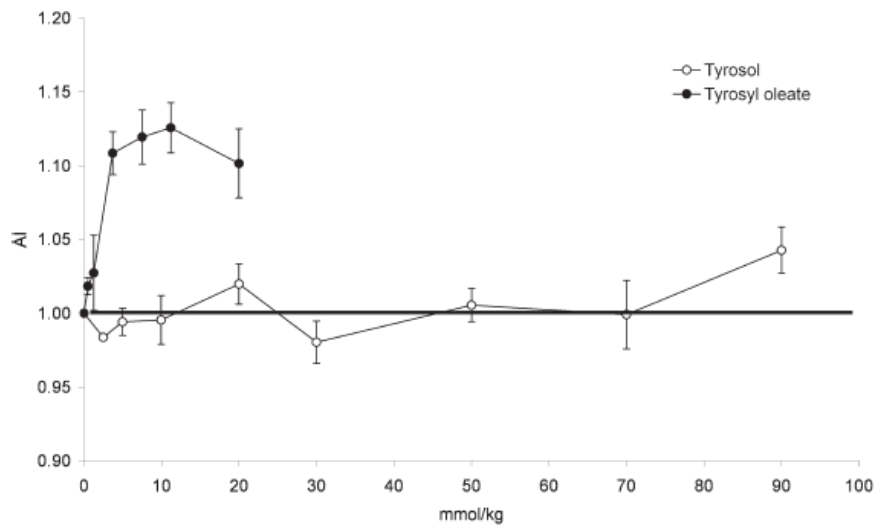


Figure 6. Antioxidant index of tyrosol and tyrosyl oleate added to high-oleic sunflower oil and oxidized under accelerated Rancimat conditions.

1994). In this sense, Mateos et al. (2008) effectively showed that the most polar compound tyrosol was the most effective antioxidant in oil, compared to the tyrosyl ester derivatives. However, it has been suggested that the 'polar paradox' cannot be generalized, since some discrepancies have been also obtained (Lucas et al. 2010; Mateos et al. 2008). Thus, Torres de Pinedo et al. (Torres de Pinedo et al. 2007) found that lipophilic derivatives of phenolic acids, with similar polarities to their hydrophilic analogues, showed either higher IT or lower IT in oil than their analogues, depending on the specific phenolic compound tested. Similarly, Medina et al. (Medina et al. 2009) and Lucas et al. (Lucas et al. 2010) reported an increase in antioxidant effects in oil-in-water emulsions as the chain length of hydroxytyrosol fatty acid esters increased, but only up to a certain length, indicating a non-linear relationship with the polar nature of lipophilic derivatives (Lucas et al. 2010).

The 'polar paradox' has been associated with the affinities of polar antioxidants toward the air-oil interface in oils and of non-polar antioxidants toward the oil-water interface in emulsions (Lucas et al. 2010). Additionally, regardless of the polar paradox, it is generally accepted that location of the antioxidant at the interfaces would inhibit lipid oxidation more efficiently (Heins et al. 2007; Lucas et al. 2010; Medina et al. 2009). Therefore, the better antioxidant effect of tyrosyl ester observed in the current assay might be at least partially explained to its better lipid solubility which might allow better dispersion in the oil, increasing the distribution surface with respect to air-oil interfaces.

Acknowledgements

This work was supported by project AGL2008-05655 by Ministerio de Ciencia (Spain) and also by Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD, project number S2009/AGR-1469) and Consolider-Ingenio FUN-C-FOOD (CSD2007-00063). Diana Martin thanks the Ministerio de Ciencia e Innovación and European Social Fund for funding her postdoctoral 'Juan de la Cierva' contract. A pre-doctoral fellowship for Oscar Fernandez (FPI Ministerio de Ciencia e Innovación) is also acknowledged. Daniel Tenllado acknowledges his contract to Ministerio de Ciencia e Innovación (subprograma Torres Quevedo) co-financed by the European Social Fund.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Blanco RM, Terreros P, Muñoz N, Serra E. 2007. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. *J Mol Catal B Enzym* 47:13-20.
- Choong JM, Kim YC, Sang HS. 2009. Compounds with neuroprotective activity from the medicinal plant *Machilus thunbergii*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24:1117-1121.
- Di Benedetto R, Vari R, Scazzocchio B, Filesi C, Santangelo C, Giovannini C, Matarrese P, D'Archivio M, Masella R. 2007. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 535-545.

- Fragopoulou E, Nomikos T, Karantonis HC, Apostolakis C, Pliakis E, Samiotaki M, Panayotou G, Antonopoulou S. 2007. Biological activity of acetylated phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 55:80–89.
- Frankel EN, Huang S-W, Kanner J, German JB. 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J Agric Food Chem* 42:1054–1059.
- Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M, Malorni W, Masella R. 1999. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J Nutr* 129:1269–1277.
- Gordon MH, Paiva-Martins F, Almeida M. 2001. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J Agric Food Chem* 49:2480–2485.
- Harwood JL, Yaqoob P. 2002. Nutritional and health aspects of olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:685–697.
- Heins A, McPhail D, Sokolowski T, Stöckmann H, Schwarz K. 2007. The location of phenolic antioxidants and radicals at interfaces determines their activity. *Lipids* 42:573–582.
- Lucas R, Comelles F, Alcántara D, Maldonado OS, Curcuroze M, Parra JL, Morales JC. 2010. Surface-active properties of lipophilic antioxidants tyrosol and hydroxytyrosol fatty acid esters: a potential explanation for the nonlinear hypothesis of the antioxidant activity in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 58:8021–8026.
- Mateos R, Domínguez MM, Espartero JL, Cert A. 2003. Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 51:7170–7175.
- Mateos R, Trujillo M, Pereira-Caro G, Madrona AS, Cert A, Espartero JL. 2008. New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *J Agric Food Chem* 56:10960–10966.
- Medina I, Lois S, Alcántara D, Lucas R, Morales JC. 2009. Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 57:9773–9779.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, José Núñez M, Parajó JC. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 72:145–171.
- Nwosu C, Boyd L, Sheldon B. 1997. Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index. *J Am Oil Chem Soc* 74:293–297.
- Stamatis H, Sereti V, Kollis FN. 2001. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J Mol Catal B Enzym* 11:323–328.
- Torres CF, Lessard LP, Hill CG. 2003. Lipase-catalyzed esterification of conjugated linoleic acid with sorbitol: A kinetic study. *Biotechnol Prog* 19:1255–1260.
- Torres CF, Vázquez L, Señoráns FJ, Reglero G. 2005. Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector. *J Chromatogr A* 1078:28–34.
- Torres de Pinedo A, Peñalver P, Pérez-Victoria I, Rondón D, Morales JC. 2007. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. *Food Chem* 105:657–665.
- Trujillo M, Mateos R, Collantes de Teran L, Espartero JL, Cert R, Jover M, Alcudia F, Bautista J, Cert A, Parrado J. 2006. Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *J Agric Food Chem* 54:3779–3785.
- Weitkamp P, Weber N, Vosmann K. 2008. Lipophilic (hydroxy) phenylacetates by solvent-free lipase-catalyzed esterification and transesterification in vacuo. *J Agric Food Chem Am Chem Soc* 56:5083–5090.

3. Resumen global de los resultados obtenidos y su discusión

La síntesis de un lípido estructurado o la vehiculización lipídica de una sustancia con interés biológico necesita apoyarse sobre diversas tecnologías para ser llevada a cabo. Estas tecnologías deben ser escalables industrialmente, baratas y limpias, tanto para el medio ambiente como para obtener un producto final sin impurezas.

Durante el proceso de síntesis es necesario conocer en todo momento la composición de las muestras con las que se trabaja, para lo cual el grupo en el que ha trabajado el doctorando trabajo cuenta con métodos de análisis publicados [1] y con los que se trabaja de forma habitual. Con el objetivo de tener una nueva herramienta de análisis y hacer más robusta la cuantificación de las muestras, se realizó el desarrollo de un nuevo método de cromatografía de gases. Se trataba de dividir la muestra en el cromatógrafo por clases de lípidos y poder cuantificarlos sin necesidad de realizar una preparación previa de la muestra, para lo cual se realizó una inyección directa en la columna. Para la cuantificación de las muestras inyectadas se utilizaron dodecano y hexadecano como patrones internos. Se obtuvo un factor de respuesta para cada uno de los analitos bajo estudio por medio de cinco inyecciones sucesivas de patrones puros a concentraciones conocidas [2]. En todos los casos la resolución de los diferentes picos fue superior a 3.5, lo que indica una separación completa de todos los componentes bajo estudio.

Se estudió la variación en la respuesta al analizar las sustancias tanto entre días diferentes “inter-day”, como dentro de un mismo día “intra-day”. Para determinar la variación inter-day se realizaron seis inyecciones de la mezcla lipídica sometida a estudio durante cinco días diferentes a lo largo de todo un mes. Se obtuvo un alta reproducibilidad en los tiempos de retención y una aceptable precisión en la respuesta. Hay que considerar que la variación inter-day de la respuesta fue menor de 6 excepto para los tocoferoles. Este resultado, junto con la aparición de color en la mezcla sometida a evaluación, indicó que los tocoferoles sufrieron oxidación durante el almacenamiento de la mezcla lipídica bajo estudio. El resto de compuestos fueron estables durante todo el estudio y produjeron una escasa variación en sus respuestas y tiempos de retención. La desviación estándar relativa de la variación intra-day para los tiempos de retención y las áreas nunca fue superior a 1 y 10 respectivamente. Para validar el método cromatográfico desarrollado, se inyectaron diferentes muestras lipídicas obtenidas en el laboratorio, y se cuantificaron utilizando los factores de respuesta obtenidos. Se cuantificó un destilado

desodorización de aceite de soja, una mezcla de ésteres de esteroles producida durante una esterificación enzimática de esteroides con ácidos grasos procedentes de la leche, y un producto intermedio de la alcoholisis química de aceite de hígado de tiburón.

Con el método publicado por Torres-Vázquez [1] es posible conocer la composición de una muestra en clases o familias de lípidos. El método descrito de cromatografía de gases “on column”, en combinación con este, proporciona una herramienta robusta y eficaz para el análisis de muestras lipídicas. El método descrito por Torres-Vázquez, por ejemplo, indica qué concentración de ácidos grasos libres, esteroides y ésteres de esteroides hay en una mezcla concreta. En cambio el método publicado por Torres-Tenllado [3] divide estas familias lipídicas por longitudes de cadena, es decir, indica cuántos ácidos grasos libres hay en la muestra, cuántos esteroides y cuántos ésteres de esteroides. Incluso es posible identificar el ácido graso, el esteroles y el éster de esteroles. Para ilustrar este ejemplo se analizó el producto de una esterificación enzimática de fitoesteroides con grasa láctea en la que se separaron 24 ésteres de esteroles diferentes procedentes de la esterificación. En la muestra existen tres tipos principales de esteroides (campesterol, estigmasterol y sitosterol) y ocho ácidos grasos diferentes, con lo que se pueden formar 24 tipos diferentes de ésteres de esteroles. Mediante la combinación entre el número de esteroides y de ácidos grasos, es posible conocer el número de especies de ésteres de esteroides presentes. Este resultado muestra la versatilidad de este método y lo adecuado del mismo para trabajar junto a otros métodos de análisis como el HPLC y GC split-splitless.

La biocatálisis enzimática ha demostrado ser una herramienta eficaz, selectiva y limpia, tanto para la síntesis como para la catálisis de un lípido. El uso de enzimas en alguna etapa industrial implica un alto coste del proceso, por lo que la reutilización del biocatalizador se hace imprescindible. A su vez la reutilización de la enzima debe hacerse de tal manera que el producto obtenido sea siempre el mismo, no importando el ciclo de reutilización de un mismo lote de biocatalizador. Para esto es necesario modelar la cinética de la reacción enzimática considerando la desactivación de la enzima como uno de los parámetros clave.

Tras diversos ensayos utilizando diferentes enzimas en multitud de condiciones de reacción, se decidió trabajar con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (recientemente reclasificada como *Burkholderia cepacia*) en reacciones de alcoholisis, ya que producía una elevada conversión de triglicéridos (90%) en tiempos reducidos y su reutilización era factible, puesto que su desactivación en reacciones de alcoholisis era muy reducida. Para trabajar con esta lipasa se

puso a punto un método de inmovilización que permitió recuperar la enzima después de cada ciclo de reacción.

Se pudo apreciar cómo las concentraciones de FAEE presentes en la mezcla de reacción variaron durante los ciclos 2°, 5°, 10°, y 15°. La concentración de los FAEE a las 6 horas de reacción en los ciclos 2°, 5°, 10° y 15° fueron de 1104.3, 897.7, 613.9 y 441.8mM respectivamente. Estos resultados indicaron que la desactivación de la lipasa tenía un efecto significativo en la producción de FAEE. Si la desactivación fuese despreciable se habrían obtenido niveles de FAEE similares en los cuatro ciclos bajo estudio. Para describir la pérdida de actividad de la enzima con el tiempo se incorporó un término de desactivación en el modelo cinético. Con el fin de mejorar la calidad del ajuste se utilizó una expresión matemática para describir la desactivación enzimática que consideraba un mecanismo de desactivación irreversible acompañado de forma paralela por un reordenamiento irreversible de la lipasa produciendo una forma estable activa. Los valores obtenidos con este modelo de desactivación enzimática proporcionaron un buen ajuste de los valores obtenidos con los datos experimentales. Este resultado indicó que el mecanismo más probable para la desactivación de la lipasa seguía dos procesos paralelos que conducían a una forma estable y activa de la lipasa, y a otra forma inactiva. Debido a esto este modelo de desactivación fue empleado en la predicción de tiempos de reacción para la reutilización óptima del biocatalizador. La incorporación de este término de desactivación enzimática permitió usar el concepto de pseudo-tiempo de reacción, que transforma los tiempos de reacción de cada ciclo en sus correspondientes nuevos valores, es decir, los que se habrían obtenido si la enzima no hubiera sido parcialmente desactivada.

El concepto de pseudo-tiempo de reacción responde a la desactivación de la lipasa y permite el ajuste de los datos cinéticos de las diferentes reacciones llevadas a cabo con el mismo lote de lipasa pero con diferentes grados de desactivación. Una aplicación importante de este concepto fue poder predecir cuánto tiempo más debía permanecer la mezcla de reacción en contacto con la lipasa, para conseguir un determinado grado de alcoholisis, dependiendo del grado de desactivación de la lipasa utilizada.

Se realizó una primera predicción con el mismo lote de la lipasa empleada en los 15 ensayos anteriores. Este lote correspondía a una lipasa inmovilizada que estuvo trabajando en reacciones de alcoholisis durante 90 horas. El objetivo seguía siendo obtener una conversión del 90% de TAGs, lo que producía una concentración de FAEE de 933.7mM, que se fijó como objetivo. Esta

concentración debía alcanzarse sin tener en cuenta la actividad residual de la lipasa utilizada. De acuerdo con el modelo de desactivación propuesto, el pseudo-tiempo de reacción que producía esta concentración de FAEE fue de $t^*=2.772$ h. Finalmente utilizando la ecuación obtenida con el modelo cinético fue posible predecir el tiempo necesario que debía durar el 16° ciclo para obtener la concentración molar de FAEE fijada como objetivo. Este tiempo de reacción resultó ser de 19.7h. Se llevó a cabo experimentalmente el 16° ciclo de alcoholisis durante 19.7h obteniendo una concentración de FAEE de 876.0mM. Este resultado reveló una razonable concordancia entre la conversión experimental y la predicha por el modelo cinético.

Como ejemplo de vehiculización lipídica de una sustancia de interés biológico e industrial se llevó a cabo el estudio de la esterificación de tirosol con ácido graso oleico. Este estudio se centró en conocer el efecto de las distintas variables que intervenían en el proceso. La reacción se llevo a cabo en condiciones equimolares y en un medio de reacción sin disolventes. Se estudiaron los efectos del tamaño de partícula del tirosol, de la temperatura, concentración del biocatalizador y presión reducida. Además se llevaron a cabo estudios de reutilización del biocatalizador así como de actividad antioxidante mediante la prueba del rancimat. Todos estos estudios se realizaron comparando la lipasa de *Candida* antártica inmovilizada en aglomerados de octil-sílice con la lipasa de *Candida* antarctica inmovilizada por Novozym (435).

Cabe señalar que el tirosol no es soluble en ácido oleico en las condiciones de reacción ensayadas, y que una posible limitación en la velocidad de reacción es la velocidad de disolución del tirosol en el medio de reacción. Ha sido descrito con anterioridad que cuanto menor sea el tamaño de partícula de los reactivos, más rápida será la velocidad de reacción [4]. Las limitaciones de transferencia de materia asociadas a la velocidad de disolución del tirosol en la mezcla de reacción, fueron estudiadas usando tirosol comercial y tirosol tamizado con un tamaño de partícula inferior a 0,1 mm. Se logró mayor velocidad de reacción mediante el uso de tirosol con tamaño de partícula inferior a 0,1 mm. Cabe señalar que en los tiempos de reacción cortos (60 y 90 minutos), usando tirosol tamizado, la velocidad de reacción fue aproximadamente 3 y 2 veces más rápida que con el tirosol original. Sin embargo se obtuvo una conversión final similar en los dos casos bajo estudio. En los experimentos posteriores se utilizó el tirosol tamizado como sustrato de la reacción.

Se evaluó la solubilidad del tirosol en la mezcla de reacción para lo que se llevaron a cabo dos pruebas diferentes. En primer lugar se comparó la solubilidad del tirosol en ácido oleico a 40,

50 y 60°C. También se determinó la solubilidad del tirosol en oleato de tirosol a 50°C. Los resultados obtenidos indicaron una muy baja solubilidad del tirosol en ácido oleico, sin embargo la solubilidad del tirosol en oleato de tirosol fue 4 veces superior. Estos resultados indicaron que el oleato de tirosol producido en la reacción de esterificación mejoraba la solubilidad del tirosol en la mezcla de reacción, por lo que este podía contribuir positivamente en la velocidad de reacción de esterificación.

La esterificación enzimática de tirosol con ácido oleico fue estudiada a tres temperaturas diferentes (40, 50 y 60°C) con ambas enzimas. Como era de esperar, cuanto mayor fue la temperatura mayor fue la velocidad de esterificación observada. Se alcanzó el equilibrio de reacción cuando el oleato de tirosol llegó a concentraciones del 73% w/w a 40°C, del 76% w/w a 50°C y del 79% w/w a 60°C. En todos los casos bajo estudio la velocidad de esterificación fue más rápida en presencia de Novozym 435 que en presencia de los aglomerados de octil-sílice de la lipasa *Candida antarctica*. La menor actividad de la lipasa inmovilizada en los aglomerados, en comparación con la comercial, probablemente fue debida a una menor carga de lipasa de *Candida antarctica* en los aglomerados. Con el fin de preservar en lo posible la actividad de la lipasa y minimizar la volatilización y degradación del tirosol, los experimentos en adelante se realizaron a 50°C.

Disminuir el porcentaje de lipasa inmovilizada que se añade a la mezcla de reacción tiene como mayor ventaja la disminución del coste del bioproceso, además de disminuir la cantidad de material sólido en la mezcla de reacción, un hecho que es especialmente relevante cuando el porcentaje de material sólido en la mezcla de reacción es muy alto, se debe tener en cuenta que al comienzo de la reacción el tirosol representa aproximadamente el 33% de la mezcla de reacción. Se compararon dos porcentajes diferentes de lipasa inmovilizada en la síntesis enzimática de oleato de tirosol, 5% y 10% w/w. La reducción de la cantidad de biocatalizador, produjo una disminución significativa en la velocidad de la reacción con las dos lipasas inmovilizadas, por lo tanto se utilizó un 10% en peso de biocatalizador en los experimentos posteriores.

Todas las reacciones de esterificación llevadas a cabo a presión atmosférica condujeron a una mezcla de productos compuesta por oleato de tirosol y cantidades variables de ácido oleico y tirosol sin reaccionar. Con el fin de desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de oleato de tirosol, el agua producida durante la reacción de esterificación debía ser eliminada.

Para alcanzar este objetivo se pueden utilizar diferentes estrategias, tales como el borboteo de nitrógeno, la utilización de un desecante o la realización de la reacción a presión reducida. Al hacer la reacción a vacío (200 mbar) se obtuvo una mezcla de productos compuesta por más de un 85% de oleato de tirosol en menos de 3 horas, tanto con Novozym 435 como con la lipasa de *Candida* antártica inmovilizada en los aglomerados de octil-silice. Sin embargo se necesitó mayor vacío para eliminar por completo el agua de la mezcla de reacción. Por lo tanto, para alcanzar una conversión de ácido oleico y tirosol superior al 85% se utilizó un vacío de 10 mbar. Bajo estas condiciones se obtuvo una mezcla de productos compuesta por más de un 95% de oleato de tirosol, en 2 horas para Novozym 435 y en 3 horas para lipasa de *Candida* antártica inmovilizada en los aglomerados. El distinto contenido en agua de las dos enzimas inmovilizadas (1,77% para Novozym 435 y 2,17% para el aglomerado de octil-silice) también podría desempeñar un papel importante en la velocidad de reacción observada.

Otro aspecto importante a tener en cuenta fue la volatilidad parcial del tirosol. Otros autores [5] habían observado que un vacío y temperatura excesivos podrían conducir a la destilación parcial del tirosol. Con el fin de evaluar la evaporación parcial del tirosol se puso a vacío (10mb) durante 8 horas una mezcla de reacción similar a la descrita anteriormente, pero sin la adición de enzima. Transcurrido este tiempo una parte alícuota de la mezcla fue analizada y el contenido de tirosol fue comparado con el de la mezcla inicial. Se observó un porcentaje idéntico de tirosol en las muestras analizadas, lo que indica que bajo las condiciones experimentales ensayadas, la evaporación del tirosol es despreciable.

Eliminar el agua de la mezcla de reacción puede tener dos efectos contrapuestos: 1) desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación de oleato de tirosol y 2) deshidratar la lipasa inmovilizada, lo que afecta a la actividad residual de los biocatalizadores. Como se ha dicho anteriormente la reutilización de la lipasa es un factor clave en la biocatálisis aplicada. Por lo tanto se debe llegar a un equilibrio entre la velocidad de reacción y la estabilidad enzimática. Con el fin de comprobar la actividad residual de la lipasa después de la reacción de esterificación, se realizaron tres ensayos consecutivos con el mismo lote para ambas lipasas.

La recuperación del biocatalizador es el principal inconveniente para la reutilización de la lipasa en reactores discontinuos. Una de las principales dificultades es la separación del producto de la reacción de la enzima inmovilizada. En un estudio de reutilización del biocatalizador el primer ensayo no es comparable con el segundo y tercero, ya que en el primero

se utiliza enzima fresca y limpia, y en el segundo y tercero la enzima se encuentra impregnada del medio de reacción. Una estrategia para hacer los tres ensayos comparables entre sí es realizar una inmersión de la lipasa fresca en la mezcla de reacción durante cinco minutos para luego secarla a vacío antes de su utilización en los siguientes ensayos. Pero este procedimiento no pudo ser usado en el presente estudio debido a que la mezcla de reacción inicial contenía una alta proporción de material sólido (tirosol no disuelto), que podía interferir negativamente en la recuperación del biocatalizador por filtración a vacío. No obstante debe tenerse en cuenta que, después de 60 minutos de reacción enzimática a 50°C y 10 mbar, el tirosol se encontraba disuelto por completo en la mezcla de reacción y por lo tanto, la recuperación de la lipasa fue factible en los tiempos de reacción de más de 1 hora.

Los ensayos 2 y 3 para la síntesis enzimática de oleato de tirosol (ambos realizados con lipasa impregnada recuperada de la mezcla de reacción del primer ensayo) desarrollaron una velocidad de reacción similar, lo que indica que la inactivación para los dos inmovilizados enzimáticos puede considerarse insignificante. También se pudo observar que, para los dos inmovilizados bajo estudio, los ensayos 2 y 3 fueron más lentos que el primer ensayo. Esto puede atribuirse al aumento de las limitaciones de difusión de los reactivos cuando la lipasa ha sido previamente sumergida en la mezcla de reacción.

Con estas condiciones de reacción fue posible obtener una mezcla de productos compuesta por más de un 95% de oleato de tirosol, en 2 horas con Novozym 435 y en 5 horas con los aglomerados de octil-sílice. A pesar de que la estabilidad de ambos catalizadores fue similar, la velocidad de reacción alcanzada con los aglomerados de octil-sílice fue menor que con Novozym 435. La optimización del inmovilizado por medio de aglomerados de octil-sílice, para la obtención de un biocatalizador más activo y/o con más carga de enzima por gramo de soporte, es necesaria.

Con el objetivo de realizar una comparación de ambos biocatalizadores para la esterificación de tirosol con ácido oleico, ésta se llevó a cabo utilizando las mismas unidades de actividad (1.687 UA) de Novozym 435 y del inmovilizado de la lipasa de *Candida antarctica* en aglomerados de octil-sílice. Los resultados indicaron que la velocidad de reacción fue similar con las dos lipasas bajo estudio. Por tanto, concluyó que la diferencia en la velocidad de reacción no se debió a un aumento de las limitaciones de transferencia de materia o de difusión debido a los aglomerados de octil-sílice y por lo tanto, se pudo afirmar que las diferencias de velocidad de

reacción observadas en los experimentos anteriores se atribuían exclusivamente a una mayor cantidad de miligramos de enzima por gramo de soporte en Novozym 435, en comparación con los de la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en aglomerados de octil-sílice. Por esta razón, es conveniente llevar a cabo nuevos estudios con el fin de mejorar las capacidades de carga del nuevo soporte, pudiendo así incorporar una mayor cantidad de enzima por gramo de biocatalizador.

Con el fin de conocer la actividad antioxidante del oleato de tirosol sintetizado y compararlo con la actividad del tirosol comercial se realizó la prueba del Rancimat. La actividad antioxidante está relacionada con el número de hidroxilos fenólicos, principalmente el orto-disustituido presente en algunos compuestos fenólicos pero no en el tirosol. Esto probablemente puede explicar la baja actividad antioxidante del tirosol descrita en varios estudios [6-7]. Sin embargo, el efecto antioxidante de los compuestos fenólicos en matrices lipídicas puede ser mejorado haciéndolos más lipófilos [8]. Al aumentar la concentración de oleato de tirosol en el aceite se observó un leve efecto protector contra la oxidación, casi linealmente dependiente hasta 3,7 mmol/kg (1,500 mg/kg), llegando a la mayor actividad antioxidante a 11,2 mmol/kg (4500 mg/kg), después la actividad antioxidante pareció disminuir a la mayor concentración evaluada (20 mmol/kg). Por el contrario, tirosol añadido a la misma concentración molar que el oleato de tirosol no mostró ningún efecto protector. De hecho fueron necesarias concentraciones mayores de tirosol (90 mmol/kg) para obtener un leve efecto protector. El estudio mostró que hacer el tirosol más lipófilo, por esterificación con ácido oleico, produce una ligera mejora de su capacidad antioxidante en el aceite. Del mismo modo, Torres de Pinedo y colaboradores [8] mostraron una mejora en el efecto antioxidante de los compuestos fenólicos en matrices lipídicas utilizando derivados de compuestos fenólicos esterificados con palmítico, esteárico y oleico. Por el contrario, Mateos y colaboradores [9] mostraron que los derivados de ésteres de tirosol, incluyendo oleato de tirosol, llevaron a un tiempo de inducción menor que el del tirosol libre, lo que sugiere un efecto antioxidante menor de los derivados lipófilos en matrices lipídicas. Este efecto antioxidante de los derivados lipófilos, contrario al producido por el oleato de tirosol en este trabajo, puede ser explicado por la utilización de una matriz de aceite diferente al del estudio de Mateos y colaboradores [9], realizado en aceite de oliva virgen extra. Por otro lado las condiciones Rancimat y las concentraciones de antioxidantes ensayadas fueron diferentes. Además, el diferente procedimiento para la producción de los ésteres de tirosol, podría conducir a diferentes actividades antioxidantes finales de los compuestos obtenidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos el oleato de tirosol, probablemente menos polar que el tirosol, fue más eficaz como antioxidante en matrices de baja polaridad que el tirosol. Este resultado no está de acuerdo con la propuesta de la "paradoja polar" de los antioxidantes fenólicos, donde los antioxidantes más polares son más efectivos en los medios menos polares y los antioxidantes menos polares son más efectivos en los medios más polares [10]. En este sentido, Mateos y colaboradores [9] demostraron que el compuesto más polar (tirosol) fue el antioxidante más eficaz en el aceite, en comparación con los derivados esterificados del tirosol. Sin embargo, se ha sugerido que el concepto de "paradoja polar" no puede ser generalizado, ya que también se han obtenido algunas discrepancias [9, 11]. Torres de Pinedo y colaboradores [8] encontraron que los derivados lipófilos de ácidos fenólicos mostraron IT mayores o IT menores en matrices oleosas en función de los fenoles ensayados. Del mismo modo, Medina y colaboradores [12] y Lucas y colaboradores [11] describieron un aumento de los efectos antioxidantes en emulsiones de aceite en agua al aumentar la longitud de la cadena del ácido graso esterificado al hidroxitirosol, pero sólo hasta un cierto punto, lo que indica una tendencia no lineal con la naturaleza polar de los derivados lipófilos [11]. La "paradoja polar" se ha asociado con las afinidades de los antioxidantes polares en aceites hacia la interfase aire-aceite y las de los antioxidantes no-polares en emulsiones a la interfase aceite-agua [11]. A pesar de la "paradoja polar", está generalmente aceptado que una mejor localización de los antioxidantes en las interfases inhibe la oxidación de los lípidos de manera más eficiente [11-13]. Por lo tanto, el mejor efecto antioxidante del oleato de tirosol observado en este trabajo, en comparación con el tirosol, podría ser explicado al menos parcialmente, debido a su mayor lipo-solubilidad, que podría permitir su mejor dispersión en el aceite mejorando su localización en la interfase aceite-aire.

La mayor parte de las veces el producto objetivo obtenido mediante reacción química o enzimática se encuentra embebido en una mezcla compleja de sustancias. Estas sustancias que acompañan al producto objetivo suelen ser sustratos que permanecen sin reaccionar, otros componentes del material de partida que no intervienen en la reacción y compuestos de degradación de sustratos y productos. Para obtener un ingrediente funcional de alta pureza o apto para el consumo humano, el compuesto objetivo debe ser concentrado y purificado de la mezcla compleja en la que se encuentre.

Con el objetivo de conocer y estudiar diferentes tecnologías limpias que permiten la purificación y concentración de lípidos, se realizaron estudios de fraccionamiento del producto de alcoholisis química de aceite de hígado de tiburón libre de escualeno. Se estudió el fraccionamiento mediante la extracción con CO₂ supercrítico y mediante la destilación molecular. Se compararon ambas técnicas de fraccionamiento para la obtención de un concentrado de NEAKG totalmente caracterizado. También se realizó el estudio de la combinación de ambas técnicas para conseguir este objetivo.

La reacción de alcoholisis química del aceite de hígado de tiburón dio lugar a un producto compuesto por un 70% de FAEE, 3.9% de MEAKG y un 9.9% w/w de NEAKG. La aparición de material no identificado (15.1%) podía indicar la presencia de compuestos de oxidación y/o polimerización no deseados, causados por la alcoholisis química del aceite de hígado de tiburón. Otros autores han descrito la aparición de compuestos de oxidación y oligómeros no deseados durante la transesterificación química de aceite de pescado [14]. Se puede especular que probablemente el nivel de oxidación del aceite de hígado de tiburón de partida pudo haber contribuido negativamente en la reacción de alcoholisis, iniciando las oxidaciones y/o polimerizaciones no deseadas. Además el contenido relativamente bajo de NEAKGs 9,9% w/w obtenido, en lugar del esperado 20% (w/w), podría indicar una posible degradación parcial del producto.

Se debe tener en cuenta que este material no identificado podía también estar compuesto por pequeñas cantidades de glicerina residual, sales y agua procedentes de la reacción de alcoholisis y de los lavados posteriores. Con el fin de determinar la contribución del glicerol al material no identificado, se realizó un análisis colorimétrico de este compuesto con el producto obtenido después de la reacción de alcoholisis y los lavados. El porcentaje en peso de glicerol en este producto fue de 0,93%.

Con el fin de producir suficiente material para los experimentos posteriores, se realizaron hasta 28 extracciones bajo las mismas condiciones (aprox. 9 Kg del producto de alcoholisis química). El producto objetivo en este caso (NEAKG) se concentraba en el residuo de la extracción, eliminando la mayor parte de los FAEE producidos durante la alcoholisis química. La composición mayoritaria de la mezcla de residuos obtenidos mediante las distintas extracciones con CO₂ supercrítico fue: 16.4% de FAEE, 14.6% de MEAKG y un 35.3% (w/w) de NEAKG. Además se encontraron pequeñas cantidades de DEAKG (<1%), FFA (3.4%) y DAG (2.9%). Por

otro lado los residuos obtenidos al realizar las extracciones con CO₂ supercrítico acumularon todo el material no identificado del producto de la alcoholisis química y por lo tanto la mezcla de estos residuos quedó altamente concentrada en este material de tal forma que constituía el 25.8% de la mezcla.

Cabe destacar que el porcentaje de FAEE se redujo del 70% al 16% w/w por lo que se puede afirmar que la extracción con CO₂ supercrítico es una excelente herramienta para eliminar la mayor parte de los FAEE producidos durante la alcoholisis química. Tras la alcoholisis química no se pudieron detectar DEAKG y FFA en el producto. Sin embargo, en la mezcla de los residuos aparecen DEAKG y FFA como consecuencia de la concentración de estos en la fracción no extraída. Este hecho indica que estos compuestos se encontraban en concentraciones por debajo del límite de detección del equipo de análisis (HPLC) en el producto de la alcoholisis, pero no en los residuos obtenidos tras la extracción de la mayor parte de los FAEE a través de CC-SFE.

La inspección visual de los residuos y el porcentaje de material no identificado en los análisis posteriores indicaron que, además de NEAKGs y MEAKGs, otros compuestos no identificados fueron acumulados en esta fracción no extraída. La mezcla final de los residuos obtenidos por SFE (aprox. 4 Kg.) contenía un 25,8% de material no identificado que podía provenir de polimerizaciones no deseadas [15], auto-oxidación [16], procesos ocurridos durante el almacenamiento [17], tratamiento térmico [18], luz [18-20], alcoholisis química [14] y el lavado. Además, la presencia de compuestos como el DAG y DEAKG en los residuos obtenidos en la parte inferior de la columna revelaba que la alcoholisis no fue completa. Sin embargo, se debía alcanzar un compromiso entre la aparición de compuestos no deseados y la conversión de la reacción en términos de temperatura, tiempo y concentración de etóxido sódico. Por ejemplo, si la reacción de alcoholisis se lleva a cabo a temperaturas más reducidas, se deberá aumentar el tiempo de reacción o añadirse una mayor concentración de etóxido sódico, a fin de que la conversión de residuos de ácidos grasos a sus ésteres etílicos correspondientes siga siendo eficiente. Estas dos variables podrían tener también un efecto negativo sobre la aparición de material no identificado. Por esta razón, el equilibrio mencionado entre la temperatura, el tiempo de reacción y la concentración de reactivo debe ser alcanzado. Por último, cabe indicar que una posible fuente que explique el porcentaje de ácidos grasos libres detectados en los residuos, pudo ser la reacción de hidrólisis de los ésteres etílicos de ácidos grasos llevada a cabo por el

hidróxido sódico generado a partir del etóxido sódico durante los procesos de lavado. La presencia de acilgliceroles, MEAKG, FFA, y material no identificado en los residuos, hace necesaria una segunda etapa de fraccionamiento con el fin de obtener un producto apto para el consumo humano. Debido a esto se realizó el estudio de la purificación de los residuos obtenidos por CC-SFE por medio de la destilación molecular.

Una vez realizado el estudio de la concentración de NEAKG en los residuos de la extracción con CO₂ supercrítico, y con el fin de comparar directamente esta tecnología con la destilación molecular para el fraccionamiento y purificación de NEAKG; se llevó a cabo el estudio de fraccionamiento del producto de alcoholisis química (aprox. 3 kg) mediante destilación molecular. En primer lugar el producto de la alcoholisis se pre-destiló o desgasificó a 100°C y 2x10⁻⁴ bar, con el objetivo de eliminar el agua residual, el glicerol y los compuestos volátiles menores, como otros autores han descrito previamente [21]. Estos compuestos volátiles deben ser retirados de la muestra ya que su presión de vapor puede dificultar que se alcance el nivel máximo de vacío. Teniendo como base diversos estudios previos [22-24], se ensayaron diferentes temperaturas de destilación (130, 150, 160 y 170°C), utilizando en todos los casos el residuo de la desgasificación como material alimentado.

Se observó que los residuos de las diferentes destilaciones ensayadas contenían una mayor concentración de material no identificado, por lo que se puede indicar que el mencionado material no identificado debía tener mayor peso molecular y menor volatilidad que el material obtenido en el destilado. Con el fin de obtener un destilado altamente enriquecido en NEAKG, y libre de estos materiales no identificados, los residuos obtenidos se destilaron de nuevo. Cabe también decir que el material alimentado, en algunas ocasiones, experimentó una solidificación parcial, aumento de la viscosidad y de la turbidez, probablemente relacionados con la alta proporción de los mencionados materiales sin identificar, sucesos ya observados por otros autores [25]. Por esta razón, el material de alimentación se filtró a vacío para eliminar el posible material en suspensión que pudiese perjudicar las destilaciones posteriores.

Los resultados obtenidos revelaron que a 130°C, más del 50% de los FAEE de partida se destilaron sin apenas desaparición de los NEAKGs. Por otra parte, el rendimiento de NEAKG del residuo de destilación a 130°C fue aproximadamente del 90%, por lo que esta temperatura fue seleccionada para eliminar la mayor cantidad de FAEE del producto de la alcoholisis química previamente desgasificado.

Con el fin de mejorar la destilación de FAEE a 130°C la velocidad de alimentación se redujo de 1 a 0.5 L/h manteniendo las condiciones de operación de temperatura, vacío y velocidad del rotor. Este cambio aumenta el tiempo de residencia de la muestra en el destilador, facilitando la vaporización de los FAEE. De esta manera 1,3 Kg del producto de alcoholisis desgasificado se destiló a 130°C con una velocidad de alimentación de 0,5 L/h.

La destilación llevada a cabo a 130°C eliminó aprox. el 70% del total FAEE y sólo el 6% de NEAKGs del residuo de destilación. Se puede concluir que 130°C es una temperatura adecuada para la concentración de NEAKG en los residuos de destilación. Sin embargo al destilar a 130°C, además de la concentración de NEAKG en el residuo, también se observó una alta concentración de material no identificado. Por lo tanto se hacía necesaria una nueva destilación para obtener un destilado libre de material no identificado. Cabe también señalar que, aunque a 150, 160 y 170°C los porcentajes de FAEE destilado fueron mayores, también aumentaron los porcentajes de NEAKG extraído, lo que reduce el rendimiento de este producto en los residuos. Por esta razón temperaturas superiores a 130°C fueron descartadas para la destilación de FAEE. Además la utilización de altas temperaturas en el proceso de destilación se debe evitar tanto como sea posible con el objetivo de minimizar la formación de compuestos no deseados. El residuo obtenido (aprox. 463 g) durante la destilación a 130°C y 0,5 L/h de caudal de alimentación, fue nuevamente destilado a 220°C con el fin de obtener un destilado (aprox. 267 g) altamente enriquecido en NEAKG y libre de material no identificado.

El rendimiento de NEAKG en el destilado a 220°C fue del 85%. Este destilado se encontró libre de material no identificado y correspondía al 73,5% de los NEAKGs presentes en el material de partida. Cabe también señalar que este destilado a 220°C se encontró libre de MEAKG.

Respecto a la composición de los FAEE presentes en el destilado obtenido a 220°C fue C22:1, C20:5, C22:5 y C22:6 debido a que los FAEE de menor peso molecular se destilaron en etapas anteriores, tales como la desgasificación y la destilación a 130°C y como ha sido descrito por otros autores [22-23].

Finalmente con el objetivo de conocer el resultado de la combinación de ambas tecnologías de concentración y purificación, y de forma análoga a los estudios de purificación de 1,2-DAG a partir de aceites vegetales descritos por otros autores [26], se realizaron diferentes ensayos de

destilación utilizando como material de partida la mezcla de los residuos obtenidos mediante la extracción con CO₂ supercrítico. De nuevo el estudio de destilación molecular pretendía obtener un destilado rico en NEAKG con una concentración insignificante de material no identificado. El primer paso de la destilación molecular consistió nuevamente en una pre-destilación o desgasificación a 100°C y 2x10⁻⁴ bar para eliminar los compuestos volátiles del material de partida. El residuo obtenido en este paso previo fue utilizado como material de partida para el estudio de las diferentes temperaturas de destilación.

Se llevaron a cabo destilaciones a 180, 200, 220 y 240°C. Estas temperaturas fueron escogidas en base a los resultados descritos por otros autores para la destilación de moléculas similares a los NEAKG como los MAG [21, 27-28]. En todos los ensayos los residuos de destilación acumularon la mayor parte del material no identificado y los destilados se encontraron casi libres del mismo. La destilación a 220°C produjo un destilado compuesto principalmente por NEAKG y FAEE, dejando en el residuo algunos FAEE, DEAKG, MEAKG y todo el material no identificado. Se debe indicar que esta temperatura de destilación es superior a la temperatura de cambio térmico de los ésteres etílicos de EPA y DHA, como describen otros autores [23, 29-30], pero la destilación debió llevarse a cabo a esta temperatura ya que el objetivo del trabajo fue destilar los NEAKG, que tienen un punto de ebullición mayor que el de los ésteres etílicos de EPA y DHA. El destilado obtenido era sólido a temperatura ambiente, incluso a 40°C, por lo que el condensador interno se mantuvo a 60°C. Al enfriarse el destilado se tornaba blanco y opaco. La destilación a 240°C dio lugar a un destilado de color oscuro que contenía un porcentaje de material no identificado del 10% además de un pequeño porcentaje de MEAKGs. Por ambas razones la destilación a 240°C fue descartada. En cuanto a los rendimientos cabe destacar que a 220°C más del 90% de los NEAKGs totales fueron destilados. A esta temperatura también fueron destilados aprox. el 75% de los FAEE.

3.1 Bibliografía

1. Torres, C.F., L. Vázquez, F.J. Señoráns and G. Reglero, *Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector*. Journal of Chromatography A, 2005. 1078(1-2): p. 28-34.
2. Verleyen, T., R. Verhe, L. Garcia, K. Dewettinck, A. Huyghebaert and W. De Greyt, *Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate*. Journal of Chromatography A, 2001. 921(2): p. 277-285.

3. Torres, C., D. Tenllado, F. Señorans and G. Reglero, *A Versatile GC Method for the Analysis of Alkylglycerols and Other Neutral Lipid Classes*. *Chromatographia*, 2009. 69(7): p. 729-734.
4. Torres, C.F., L.P. Lessard and C.G. Hill, *Lipase-catalyzed esterification of conjugated linoleic acid with sorbitol: A kinetic study*. *Biotechnology Progress*, 2003. 19(4): p. 1255-1260.
5. Trujillo, M., R. Mateos, L. Collantes de Teran, J.L. Espartero, R. Cert, M. Jover, F. Alcudia, J. Bautista, A. Cert and J. Parrado, *Lipophilic Hydroxytyrosyl Esters. Antioxidant Activity in Lipid Matrices and Biological Systems*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(11): p. 3779-3785.
6. Mateos, R., M.M. Domínguez, J.L. Espartero and A. Cert, *Antioxidant Effect of Phenolic Compounds, α -Tocopherol, and Other Minor Components in Virgin Olive Oil*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(24): p. 7170-7175.
7. Giovannini, C., E. Straface, D. Modesti, E. Coni, A. Cantafora, M. De Vincenzi, W. Malorni and R. Masella, *Tyrosol, the Major Olive Oil Biophenol, Protects Against Oxidized-LDL-Induced Injury in Caco-2 Cells*. *The Journal of Nutrition*, 1999. 129(7): p. 1269-1277.
8. Torres de Pinedo, A., P. Peñalver, I. Pérez-Victoria, D. Rondón and J.C. Morales, *Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix*. *Food Chemistry*, 2007. 105(2): p. 657-665.
9. Mateos, R., M. Trujillo, G. Pereira-Caro, A.s. Madrona, A. Cert and J.L. Espartero, *New Lipophilic Tyrosyl Esters. Comparative Antioxidant Evaluation with Hydroxytyrosyl Esters*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. 56(22): p. 10960-10966.
10. Frankel, E.N., S.-W. Huang, J. Kanner and J.B. German, *Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994. 42(5): p. 1054-1059.
11. Lucas, R., F. Comelles, D. Alcántara, O.S. Maldonado, M. Curcuroze, J.L. Parra and J.C. Morales, *Surface-Active Properties of Lipophilic Antioxidants Tyrosol and Hydroxytyrosol Fatty Acid Esters: A Potential Explanation for the Nonlinear Hypothesis of the Antioxidant Activity in Oil-in-Water Emulsions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. 58(13): p. 8021-8026.
12. Medina, I., S. Lois, D. Alcántara, R. Lucas and J.C. Morales, *Effect of Lipophilization of Hydroxytyrosol on Its Antioxidant Activity in Fish Oils and Fish Oil-in-Water Emulsions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009. 57(20): p. 9773-9779.
13. Heins, A., D. McPhail, T. Sokolowski, H. Stöckmann and K. Schwarz, *The Location of Phenolic Antioxidants and Radicals at Interfaces Determines Their Activity*. *Lipids*, 2007. 42(6): p. 573-582.

14. Armenta, R., M. Vinatoru, A. Burja, J. Kralovec and C. Barrow, *Transesterification of Fish Oil to Produce Fatty Acid Ethyl Esters Using Ultrasonic Energy*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007. 84(11): p. 1045-1052.
15. Choe, E. and D.B. Min, *Chemistry of Deep-Fat Frying Oils*. Journal of Food Science, 2007. 72(5): p. R77-R86.
16. Yanishlieva, N., H. Becker and H.K. Mangold, *Autoxidation of alkoxylipids I. Alkylglycerols, dialkylglycerols and trialkylglycerols*. Chemistry and Physics of Lipids, 1976. 17(2-3): p. 393-397.
17. Schaufler, L.H., R.; Sigler, M.; Hulbert, L., *Fatty acid composition of sleeper shark (Somniosus pacificus) liver and muscle reveals nutritional dependence on planktivores*. International Council for the Exploration of the Sea. Theme Session on Elasmobranch Fisheries Science, 2005.
18. Sang, W. and Z.T. Jin, *Lipid oxidation of fish liver oil as affected by light, antioxidants and temperature*. Journal of Food Processing and Preservation, 2004. 28(1): p. 1-10.
19. Carlsson, D., T. Suprunchuk and D. Wiles, *Photooxidation of unsaturated oils: Effects of singlet oxygen quenchers*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1976. 53(10): p. 656-660.
20. Chan, H., *Photo-sensitized oxidation of unsaturated fatty acid methyl esters. The identification of different pathways*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1977. 54(3): p. 100-104.
21. Fregolente, P., G. Pinto, M. Wolf-Maciel and R. Filho, *Monoglyceride and Diglyceride Production Through Lipase-Catalyzed Glycerolysis and Molecular Distillation*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. 160(7): p. 1879-1887.
22. Vázquez, L. and C. Akoh, *Fractionation of Short and Medium Chain Fatty Acid Ethyl Esters from a Blend of Oils via Ethanolysis and Short-Path Distillation*. Journal of the American Oil Chemists' Society.
23. Liang, J.-H. and L. Hwang, *Fractionation of squid visceral oil ethyl esters by short-path distillation*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000. 77(7): p. 773-777.
24. Liang, J.H., *Separation and Concentration of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Ethyl Esters from Squid Visceral Oil by Molecular Distillation and Supercritical Carbon Dioxide Extraction*. Ph.D. Dissertation, National Taiwan University, Taiwan, 1991: p. 77, 78.
25. Pietsch, A. and P. Jaeger, *Concentration of squalene from shark liver oil by short-path distillation*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2007. 109(11): p. 1077-1082.

26. Compton, D.L., J.A. Laszlo, F.J. Eller and S.L. Taylor, *Purification of 1,2-diacylglycerols from vegetable oils: Comparison of molecular distillation and liquid CO₂ extraction*. *Industrial Crops and Products*, 2008. 28(2): p. 113-121.
27. Yang, T., H. Zhang, H. Mu, A. Sinclair and X. Xu, *Diacylglycerols from butterfat: Production by glycerolysis and short-path distillation and analysis of physical properties*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2004. 81(10): p. 979-987.
28. Fregolente, L.V., P.B.L. Fregolente, A.M. Chicuta, C.B. Batistella, R. Maciel Filho and M.R. Wolf-Maciel, *Effect of Operating Conditions on the Concentration of Monoglycerides Using Molecular Distillation*. *Chemical Engineering Research and Design*, 2007. 85(11): p. 1524-1528.
29. Wijesundera, R., W. Ratnayake and R. Ackman, *Eicosapentaenoic acid geometrical isomer artifacts in heated fish oil esters*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1989. 66(12): p. 1822-1830.
30. Fournier, V., F. Destailats, P. Juanéda, F. Dionisi, P. Lambelet, J.-L. Sébédio and O. Berdeaux, *Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006. 108(1): p. 33-42.

4. Conclusiones

- En relación con el Objetivo 1 (Mejorar y fortalecer la metodología de análisis de muestras lipídicas para disponer de una herramienta analítica eficiente y versátil para el seguimiento de las reacciones de transformación de lípidos orientadas a la obtención de portadores de compuestos bioactivos):

El método cromatográfico desarrollado puede ser utilizado para el análisis de numerosas clases de lípidos sin ningún tratamiento previo de la muestra. Proporciona una alta reproducibilidad de los tiempos de retención de las diversas clases de lípidos. Los factores de respuesta calculados pueden ser utilizados para la cuantificación de los componentes mayoritarios y minoritarios de numerosos aceites y grasas. El método analítico cumple su función adecuadamente ya que se ha demostrado que es válido para la monitorización de las cinéticas de reacciones enzimáticas con lipasas en las que están implicados lípidos diversos como esteroides, acilgliceroides y alquilgliceroides.

- En relación con el Objetivo 2 (Disponer un modelo cinético aplicable a reacciones enzimáticas para elucidar expresiones de velocidad de reacción y de la desactivación de la enzima, evaluando el potencial de reutilización de la enzima inmovilizada):

Las expresiones matemáticas obtenidas constituyen un modelo fiable de la cinética de reacciones enzimáticas ya que representan correctamente tanto la tasa de aparición de FAEE como la tasa de desactivación de la lipasa según se ha confirmado en reacciones de alcoholisis de aceite de girasol catalizadas por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*. Esta conclusión se basa concretamente en los siguientes resultados:

- Alta correlación entre los datos predichos de composición de las mezclas de reacción según el tiempo y los resultados experimentales fue obtenida en 15 ciclos de reacción sucesivos con el mismo lote de lipasa y tiempos de 6 horas.

- El tiempo que la enzima requiere para alcanzar la conversión de enlaces éster deseado fue predicho correctamente utilizando la expresión del pseudo-tiempo de reacción que contiene información tanto de la velocidad de reacción como de la velocidad de desactivación lipasa.

- Los tiempos de reacción predichos para alcanzar la formación de un 38% de FAEE fueron verificados experimentalmente mediante la realización de reacciones de alcoholisis sucesivas. La correlación entre la conversión deseada y la obtenida experimentalmente validan la metodología desarrollada para estimar el tiempo de reacción en reacciones enzimáticas de lípidos.

- En relación con el Objetivo 3 (Disponer de un modelo predictivo para optimizar, mediante tecnología de fluidos supercríticos, la separación de las mezclas de monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos que se producen en las reacciones de etanolisis enzimática para poder disponer con suficiente pureza de la molécula de partida para la síntesis de lípidos estructurados):

La aplicación de la Ecuación de Estado de Contribución Grupal (GC.EoS) conduce a la obtención de un modelo predictivo correcto para representar el comportamiento de los equilibrios de fases integradas por mono-, di-, triglicéridos y dióxido de carbono a alta presión ya que los datos obtenidos por predicción tienen un alto grado de coincidencia con los obtenidos experimentalmente. La validez del modelo obtenido fue comprobada mediante la aplicación al fraccionamiento de una mezcla compleja de glicéridos resultante de una reacción de etanolisis de aceite de girasol catalizada por una lipasa.

- En relación con el Objetivo 4 (Conocer el comportamiento de tecnologías de efecto análogo en la separación de mezclas lipídicas con el fin de elegir la opción más conveniente para determinados procesos de obtención de lípidos funcionales):

Los mejores resultados para el fraccionamiento y purificación de mezclas de reacciones de lípidos se obtienen mediante la aplicación combinada de la extracción supercrítica (SFE) y la destilación molecular (SPD) con ventaja en cuanto a la aplicación individual de una u otra tecnología.

A partir de la mezcla resultante de la alcoholisis química de aceite de hígado de tiburón, se trataba de obtener una fracción de alquilglicerol libres, no esterificados (NEAKGs). Mediante SFE solo se consiguió una concentración del 35% de NEAKGs. Mediante SPD la concentración fue del 50%. Cuando se combinaron SFE y SPD la concentración de la fracción de NEAKGs fue del 70%.

- En relación con el Objetivo 5 (Conseguir la esterificación de tirosol y ácido oleico, productos procedentes del aceite de oliva, bajo diferentes condiciones de reacción, para evaluar dichas condiciones y obtener un antioxidante de alta actividad, familiar en el ámbito alimentario como es el tirosol, comunicándole un carácter lipofílico que de manera natural no posee con la consiguiente limitación de solubilidad en el aceite de oliva):

El proceso desarrollado para la síntesis de oleato de tirosol en condiciones equimolares en ausencia de disolventes orgánicos usando como biocatalizador la lipasa de *Candida antarctica* permite obtener oleato de tirosol de una pureza del 95%. Este derivado lipófilo del tirosol muestra una actividad antioxidante superior al tirosol libre en matrices oleosas. El carácter lipídico comunicado al tirosol permitirá la inclusión de cantidades significativas de este compuesto bioactivo en matrices lipídicas con una distribución homogénea.