

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA APLICADA

SECCIÓN DEPTAL. DE CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN



**EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS Y  
SÍNTESIS ENZIMÁTICA PARA LA OBTENCIÓN DE  
LÍPIDOS FUNCIONALES**

**LUIS VÁZQUEZ DE FRUTOS**

TESIS DOCTORAL

Madrid, 2008

*Gracias...*

*Quiero agradecer al Dr. Guillermo Reglero Rada, que me aceptase en su grupo de investigación, su confianza en mí y su enorme calidad profesional y como persona.*

*Al Dr. Carlos Torres Olivares por haberme dirigido en la realización de esta tesis y sobre todo por haber trabajado conmigo durante estos años, enseñármelo todo y no perder la paciencia con mis infinitas preguntas. Gracias también por su amistad y por todos los buenos ratos que hemos pasado.*

*Gracias al Dr. Javier Señoráns Rodríguez por su dirección en esta tesis, por haber contado conmigo, por sus buenos consejos, su ayuda permanente y, por supuesto, por su amistad.*

*Quiero dar las gracias a la Dra. Tiziana Fornari Reale por trabajar conmigo, ofrecerme una grandísima ayuda y por su trato.*

*A la Dra. Elena Ibáñez Ezequiel por confiar en mí y porque siempre estuvo ahí cuando la necesité.*

*Le agradezco a D. Francisco Terrón Alfonso, de la empresa MIGASA, y al Dr. Fernando Moreno Egea, de la empresa SOLUTEX, su apuesta por la investigación y su apoyo profesional.*

*A la Comunidad Autónoma de Madrid por concederme la beca de investigación que me ha permitido realizar este trabajo.*

*A todos mis compañeros del grupo de investigación de Ciencias de la Alimentación de la UAM, a los que siguen, a los nuevos y también a algunos que se fueron. Gracias por ayudarme y por el tiempo que hemos pasado juntos.*

*Gracias a mis amigos, sobre todo a mi familia y de forma muy especial a María Eugenia.*

# ÍNDICE

# 1 Índice.

1	Índice.....	2
2	Resumen.....	6
3	Summary.....	7
4	Lista de abreviaturas.....	9
5	Introducción.....	12
5.1	Lípidos Funcionales.....	12
5.1.1	Ácidos grasos y triacilgliceroles de mediana longitud de cadena.....	13
5.1.2	Diacilgliceroles (DAGs).....	13
5.1.3	Fitoesteroles y fitoestanoles.....	14
5.1.4	Ácido Eicosapentaenoico (EPA) y Ácido Docosahexaenoico (DHA).....	17
5.1.5	Ácido linoleico conjugado (CLA).....	19
5.1.6	Éteres lipídicos o alquilgliceroles.....	20
5.1.7	Escualeno.....	24
5.1.8	Tocoferoles y tocotrienoles.....	26
5.1.9	Fosfolípidos (PL).....	27
5.1.10	Otros ácidos grasos funcionales.....	28
5.2	Análisis de lípidos neutros mediante HPLC-ELSD.....	29
5.3	La tecnología de fluidos supercríticos.....	31
5.3.1	Fundamentos.....	31
5.3.2	El CO <sub>2</sub> como fluido supercrítico.....	34
5.3.3	Modelado de procesos de extracción supercrítica.....	39
5.3.4	Aplicaciones industriales de la SFE con CO <sub>2</sub> .....	40
5.3.5	Otras técnicas de extracción: Destilación molecular.....	51
5.3.6	Refinado de aceites mediante SFE con CO <sub>2</sub> .....	52
5.3.7	Recuperación de escualeno, tocoferoles y esteroides a partir de aceites y destilados desodorizados de aceites mediante SFE con CO <sub>2</sub> .....	57
5.4	Modificación química de aceites y grasas.....	62
5.4.1	La transesterificación por alcoholisis como método de producción de biodiésel.....	65
5.5	Triacilgliceroles estructurados.....	67
5.6	Modificación enzimática de aceites y grasas.....	70
5.6.1	Introducción a la biocatálisis.....	71
5.6.2	Lipasas.....	78
5.6.3	Utilización de lipasas para la síntesis de TAGs estructurados.....	80
5.6.4	Procesos de enriquecimiento en PUFAs y CLA.....	87
5.6.5	Otros lípidos estructurados.....	89
6	Objetivos y plan de trabajo.....	94

7	Materiales y métodos.....	97
7.1	Muestras y reactivos.....	97
7.2	Análisis y caracterización de muestras lipídicas de partida, productos de reacción, extractos y refinados.....	99
7.2.1	Preparación de las muestras.....	99
7.2.2	Análisis de lípidos neutros por HPLC-ELSD.....	99
7.2.3	Análisis de FAMES y FAEEs por cromatografía de gases.....	102
7.2.4	Equipo de HPLC-UV/Vis.....	105
7.2.5	Análisis de escualeno por HPLC-UV/Vis.....	106
7.2.6	Análisis de esteroides por HPLC-UV/Vis.....	106
7.2.7	Análisis de ácido oleico mediante valoración con KOH.....	106
7.3	Extracción supercrítica en contracorriente (CC-SFE).....	107
7.4	Reacciones de modificación química o enzimática.....	107
7.4.1	Esterificación y transesterificación química en medio ácido (pretratamiento del destilado desodorizado de aceite de girasol).....	107
7.4.2	Reacción de transesterificación por etanolisis en medio básico de aceite de hígado de tiburón.....	110
7.4.3	Reacción de saponificación de refinado de aceite de hígado de tiburón obtenido en procesos de CC-SFE.....	111
7.4.4	Reacciones de esterificación y transesterificación enzimática.....	111
8	Resultados y discusión.....	114
8.1	Desarrollo de un método de HPLC-ELSD para el análisis de clases de lípidos neutros o no polares.....	114
8.1.1	Fases móviles estudiadas.....	116
8.1.2	Reproducibilidad.....	118
8.1.3	Factores de respuesta.....	120
8.1.4	Cuantificación de muestras comerciales.....	124
8.2	Recuperación de escualeno y desacidificación de aceite de oliva mediante extracción y fraccionamiento supercrítico en planta piloto.....	126
8.2.1	Desacidificación de aceite de oliva lampante.....	129
8.2.2	Recuperación de escualeno.....	136
8.3	Recuperación de escualeno a partir de subproductos de aceite de oliva empleando extracción supercrítica con CO <sub>2</sub> .....	144
8.3.1	Optimización del proceso.....	151
8.4	Extracción supercrítica de lípidos minoritarios a partir de destilados desodorizados de aceite de girasol pretratado.....	154
8.4.1	Cristalización de esteroides durante la formación de FAEEs.....	159

8.5	Procesos de purificación, enriquecimiento y síntesis de lípidos funcionales a partir de aceite de hígado de tiburón.....	161
8.5.1	Fraccionamiento con CO <sub>2</sub> supercrítico de alquilgliceroles no esterificados obtenidos a partir de aceite de hígado de tiburón. ....	162
8.5.2	Preparación de alquilgliceroles ricos en ácido linoleico conjugado y ácido eicosapentaenoico. ....	170
9	Conclusiones.....	182
10	Anexos. ....	186
10.1	ANEXO 1. Equipo de CC-SFE. ....	186
10.1.1	Descripción del equipo. ....	186
10.1.2	Modo de operación.....	192
10.1.3	Protocolo de limpieza de la columna de extracción. ....	196
10.2	ANEXO 2. Modelado de las fases en equilibrio y predicciones de solubilidad. ....	197
11	Lista de tablas. ....	207
12	Lista de figuras.....	210
13	Bibliografía. ....	215
14	Publicaciones.....	244

# RESUMEN

## 2 Resumen.

En este trabajo se presentan los resultados más relevantes obtenidos en el estudio de diferentes procesos para enriquecer, purificar y sintetizar ingredientes lipídicos con propiedades funcionales que tienen un elevado valor añadido y pueden emplearse en la elaboración de alimentos funcionales y nutracéuticos. Las dos principales metodologías utilizadas en la presente tesis son la extracción y fraccionamiento con fluidos supercríticos y la tecnología enzimática, que ofrecen ventajas debido a su alta versatilidad, selectividad, eficacia y respeto con el medio ambiente frente a métodos convencionales, siendo idóneas para la obtención de productos con grado alimentario.

La extracción con fluidos supercríticos ha sido también empleada en procesos de desacidificación de aceites vegetales con distinto grado de acidez, lo que indica que esta herramienta puede reemplazar con gran eficacia a los métodos convencionales de refinación de aceites.

El análisis de las numerosas muestras estudiadas en la presente tesis ha sido solventado mediante el desarrollo de un método rápido de alta versatilidad para el análisis de lípidos no polares por HPLC acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz.

La recuperación de compuestos lipídicos minoritarios como escualeno, fitoesteroles y tocoferoles ha sido abordada partiendo de diversas fuentes naturales, empleando procesos de extracción supercrítica en contracorriente (CC-SFE) combinados, en algunos casos, con transformaciones químicas de los materiales de partida, dando lugar a extractos y refinados de alto valor añadido.

Por otro lado, se fraccionaron otros lípidos con destacada actividad biológica, como ácidos grasos omega-3 y alquilglicerol (análogos estructurales de los acilglicerol), que se emplearon como material de partida en reacciones catalizadas por lipasas permitiendo la obtención de diversos productos de elevada pureza y alto potencial.

Finalmente conviene destacar que los resultados descritos en la presente Tesis han sido obtenidos en su mayoría a escala de planta piloto, lo que les confiere una mayor viabilidad y aplicabilidad en el sector industrial. De este modo, se demuestra el empleo eficaz de diversas herramientas tecnológicamente avanzadas y limpias para el aislamiento, purificación y síntesis de diversos compuestos lipídicos con contrastada actividad biológica y elevado potencial para la producción de ingredientes alimentarios funcionales y nutracéuticos.



### 3 Summary.

The present work describes the most important results obtained throughout the study of processes for enrichment, purification and synthesis of high added value lipid ingredients with functional properties that may be used in nutraceuticals and functional food production. Supercritical fluid extraction and fractionation techniques along with enzymatic technology have been the main methodologies employed within this thesis. These techniques are adequate for the production of food-grade ingredients and offer advantages regarding conventional methods, mainly due to the greener chemistry involved, enhanced versatility, selectivity, and efficiency.

Supercritical fluid extraction has been also used in deacidification processes of vegetable oils with diverse acidity values, showing that this technique can successfully replace standard oil refining methods.

An HPLC method with high versatility coupled to an evaporative light scattering detector was developed for the simultaneous analysis of various non polar lipid species. This method was employed in the analyses of large amount of samples studied in this work.

Minor lipid component recovery like squalene, phytosterols and tocopherols has been scrutinized from diverse natural sources by means of countercurrent supercritical fluid extraction processes (CC-SFE) which, in some cases, resulted in chemical transformation of the starting materials, rendering high added value extracts and raffinates.

In addition, other lipids with important biological activity, such as omega-3 fatty acids and alkylglycerols (structural analogs of acylglycerols), were fractionated and used as a starting material in lipase catalyzed reactions furnishing high added value products with high potential.

Finally, it is noteworthy that almost all the results presented in this work were obtained at a pilot-plant scale, suggesting their prospective viability for further industrial applications. Thus, this Thesis presents an effective use of different advanced and clean technologies for the synthesis, isolation and purification of several lipid compounds with relevant biological activity and high potential, from which functional food ingredient preparations and nutraceuticals production might result.

# LISTA DE ABREVIATURAS

## 4 Lista de abreviaturas.

**CC-SFE:** Extracción con fluidos supercríticos en contracorriente.

**CC-SCCO<sub>2</sub>:** Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente.

**CLA:** Ácido linoleico conjugado.

**CLAEE:** Ácido linoleico conjugado etil éster.

**DOD:** Destilado desodorizado de aceite.

**DAG:** Diacilglicerol.

**DEAG:** Alquilglicerol di-esterificado.

**DHA:** Ácido docosahexaenoico.

**DPA:** Ácido docosapentaenoico.

**ELSD:** Detector evaporativo de dispersión de luz.

**EPA:** Ácido eicosapentaenoico.

**EPAEE:** Ácido eicosapentaenoico etil éster.

**FA:** Ácido graso.

**FFA:** Ácido graso libre.

**FAEE:** Ácido graso etil éster.

**FAME:** Ácido graso metil éster.

**GC:** Cromatografía de gases.

**GC-EoS:** Ecuación de estado de contribución de grupos.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*).

**LCFA:** Ácido graso de longitud de cadena larga.

**MAG:** Monoacilglicerol.

**MCFA:** Ácido graso de longitud de cadena mediana.

**MCT:** Triacilglicerol de mediana longitud de cadena.

**MEAG:** Alquilglicerol mono-esterificado

**NEAG:** Alquilglicerol no esterificado.

**NEDAG:** Dialquilglicerol no esterificado.

**PL:** Fosfolípido.

**Prep-SFC:** Cromatografía con fluidos supercríticos preparativa.

**PUFA:** Ácido graso poliinsaturado.

**S/F:** Relación disolvente/alimentación (*Solvent to Feed*).

**SC-CO<sub>2</sub>:** CO<sub>2</sub> supercrítico.

**SFC:** Cromatografía con fluidos supercríticos.

**SFE:** Extracción con fluidos supercríticos.

**SFF:** Fraccionamiento con fluidos supercríticos.

**SODD:** Destilado desodorizado de aceite de girasol.

**TAG:** Triacilglicerol.

# INTRODUCCIÓN

## 5 Introducción.

### 5.1 Lípidos Funcionales.

En la actualidad las Ciencias de la Alimentación, además de satisfacer las necesidades nutricionales, energéticas, de higiene y de seguridad alimentaria, se preocupan cada vez más por la salud y por el medio ambiente. En los últimos años, ha crecido el interés de los consumidores por conocer la relación entre dieta y salud y por identificar los componentes beneficiosos de la dieta. Esta sensibilización de la población influye en distintos ámbitos como son la investigación y la educación nutricional, y tiene también consecuencias en la industria alimentaria, sobre la producción agrícola y sobre las tecnologías de preparación de los alimentos [1].

Por otra parte, los avances en la investigación en las ciencias de la salud y de la nutrición, tienen cada vez más incidencia en la tecnología alimentaria. Debido a la gran influencia de la dieta en la prevención de ciertas enfermedades, los consumidores cada vez demandan más productos que contengan ingredientes con propiedades funcionales.

Se suelen emplear los términos “alimento funcional” o “nutracéutico” para describir productos cuyo consumo tiene un beneficio adicional en la salud.

Los alimentos funcionales se definen de forma general como alimentos o componentes de la dieta que pueden proporcionar beneficios para la salud o reducción en el riesgo de sufrir enfermedades, además de la función de nutrición básica (Institute of Medicine’s Food and Nutrition Board; IOM/FNB, 1994). El término alimento funcional fue introducido por primera vez en Japón a mediados de los años 80, y se refería a alimentos procesados que contienen ingredientes que ayudan a mejorar determinadas funciones biológicas o corporales, además de tener propiedades nutricionales [2]. Se empleó el término *FOSHU* (**F**ood **O**f **S**pecific **H**ealth **U**se) para referirse a alimentos procesados que podrían tener un efecto fisiológico beneficioso. En Japón los alimentos funcionales surgieron como consecuencia a una serie de directrices que siguió el gobierno para mejorar la salud de la sociedad y disminuir así el gasto sanitario.

Es importante identificar bien, tanto los efectos en la salud como los ingredientes funcionales de este tipo de alimentos, por exigencias de la normativa, y por el interés de los consumidores y la aceptación por parte de los profesionales de la salud.

Los alimentos funcionales o nutracéuticos han emergido de forma clara en la industria alimentaria durante la década de los 90 y tienen un gran interés para el futuro. Los alimentos funcionales que despiertan un mayor interés son los que desempeñan los siguientes efectos beneficiosos:

- ⇒ Potenciación del sistema inmune.
- ⇒ Prevención de diversos tipos de cánceres.
- ⇒ Prevención de enfermedades cardiovasculares.
- ⇒ Disminución de colesterol en sangre.

La percepción general que se tiene acerca de los lípidos o grasas no es muy favorable, ya que se les relaciona frecuentemente con enfermedades o desórdenes crónicos como la obesidad, diabetes, cáncer, y enfermedades cardiovasculares. No obstante, aunque hay verdad en estas connotaciones negativas de los lípidos, no todas las grasas son perjudiciales [3].

Nuestro cuerpo necesita grasas para funcionar correctamente. Los lípidos tienen funciones esenciales, como ser la mayor fuente de energía, ser constituyentes de las membranas celulares y ser precursores de hormonas o análogos que actúan como efectores fisiológicos, como los eicosanoides. Pero además, hay gran cantidad de lípidos que proporcionan un beneficio específico para la salud. Esta actividad funcional de los lípidos influye en el crecimiento y desarrollo del ser humano, especialmente en las etapas de gestación, lactancia e infancia, así como en la prevención y tratamiento de algunas patologías crónicas de base inflamatoria, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades de naturaleza autoinmune, etc. [1].

Entre los principales tipos de lípidos funcionales con efectos biológicos positivos para la salud se pueden destacar:

### **5.1.1 Ácidos grasos y triacilgliceroles de mediana longitud de cadena.**

Los ácidos grasos de mediana longitud de cadena (MCFAs) son componentes minoritarios de la dieta (1%). Su fuente natural es la grasa de mantequilla y en menor medida los aceites de coco y palma. Son una buena fuente de energía y son fácilmente absorbidos y digeridos.

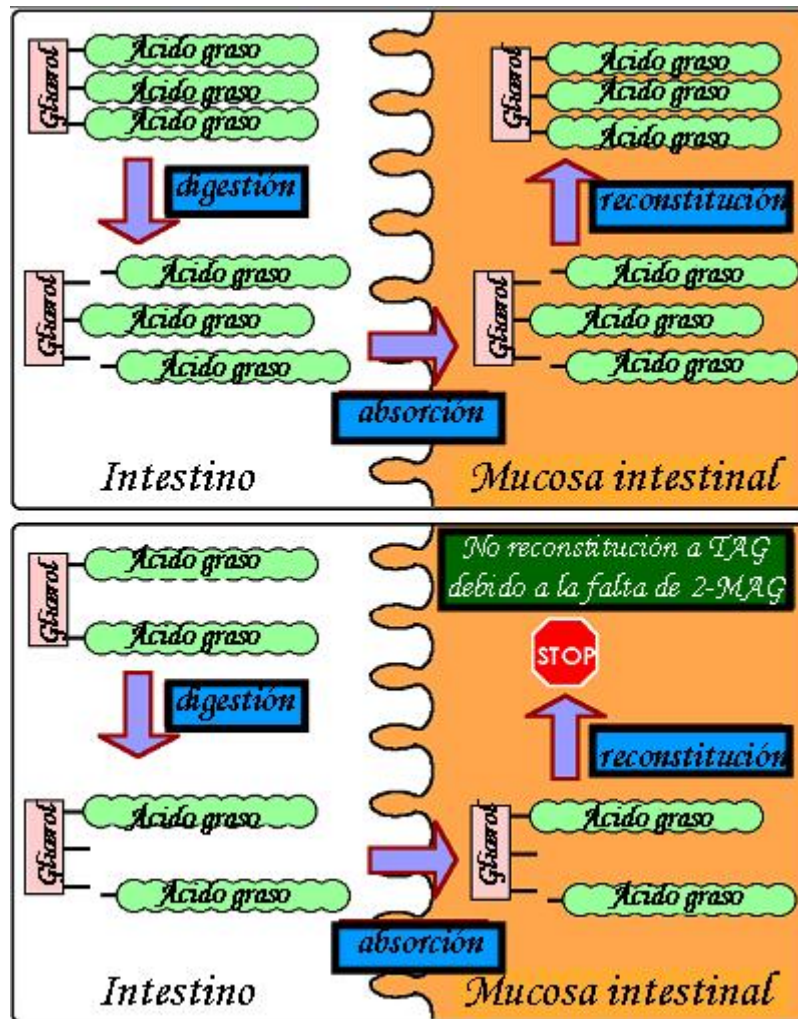
Los triacilgliceroles de mediana longitud de cadena (MCTs) tienen los tres grupos hidroxilos del glicerol esterificados con MCFAs. Los MCTs son mejor tolerados que otros triacilgliceroles en individuos con mala absorción de grasa, empleándose como fuente de energía alternativa. Pueden constituir el 20% de la grasa de dietas líquidas en pacientes con diferentes enfermedades como SIDA, fibrosis quística, cáncer, desórdenes respiratorios, enfermedades hepáticas o renales, etc.

### **5.1.2 Diacilgliceroles (DAGs).**

Una de las mayores preocupaciones de los países desarrollados e industrializados es el incremento de los casos de obesidad. Una de las medidas tomadas es la reducción en la ingesta de grasa, especialmente de la grasa saturada.

Los 1,3-DAG contienen ácidos grasos (FAs) localizados en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del glicerol. Los 1,3-DAG reducen la formación de quilomicrones [4, 5] y reducen el nivel de colesterol en sangre mediante la reducción de la re-esterificación de TGs en el enterocito.

Los 1,3-DAG se metabolizan de manera diferente a los TGs en el intestino. Los monoglicéridos que se forman en el intestino a partir de 1,3-DAGs se reesterifican en el interior del enterocito con mucha dificultad, ralentizándose la absorción de grasas en el intestino y dando lugar a una reducción de la lipemia.



**Figura 1.** Digestión y absorción de TAG (arriba) y 1,3-DAG (abajo) en el intestino animal.

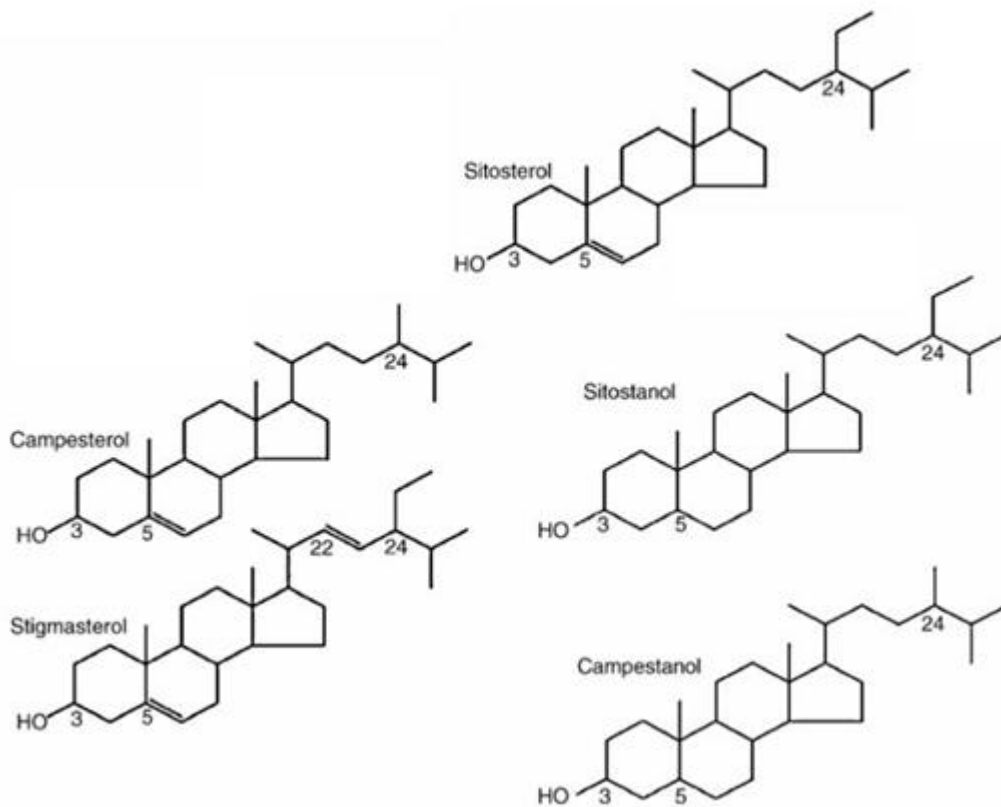
Hay estudios *in vivo* que indican que la sustitución de aceites vegetales convencionales por 1,3-DAGs reduce la grasa corporal [6, 7].

### 5.1.3 Fitoesteroles y fitoestanoles.

Cada año las enfermedades cardiovasculares son una de las primeras causas de muerte en EE.UU. Las enfermedades cardiovasculares son, en gran proporción, consecuencia de la aterosclerosis, que tiene como causa principal un elevado nivel de colesterol en sangre.

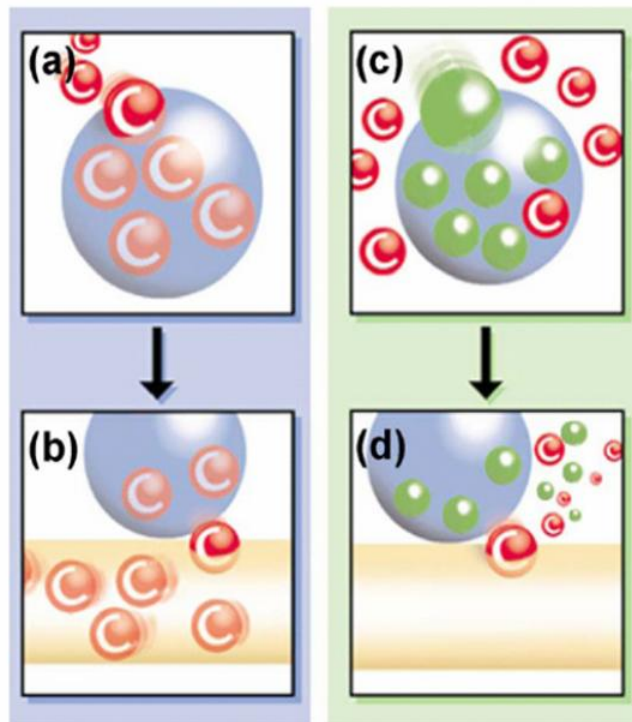
Los fitoesteroles o esteroles de origen vegetal tienen una estructura similar al colesterol, pero presentan ramificaciones en forma de grupos metilo o etilo en la cadena lateral, que les confiere determinadas diferencias que afectan a su absorción y metabolismo.





**Figura 2.** Estructura molecular de los fitoesteroles y fitoestanoles más comunes [8, 9].

La tasa de absorción en el intestino de los fitoesteroles es menor al 10% (algunos autores determinaron tasas de absorción en torno al 2% en el campesterol y del 1% en el sitosterol), mientras que la del colesterol es del 30 al 80% [10]. Los efectos de los esteroles y estanoles se deben a que interfieren en la absorción de colesterol, ya que compiten con éste desplazándolo de las micelas de sales biliares (ver Figura 3), y alteran la acción de las enzimas implicadas en su metabolismo, a pesar de que se puede producir un incremento compensatorio de la síntesis de colesterol endógeno [11].



**Figura 3.** Mecanismo propuesto de solubilización competitiva de colesterol y fitoesterol. (a) El colesterol (biliar y de la dieta) (C) entra en la micela. (b) El colesterol es transferido de la micela a la pared intestinal y al torrente sanguíneo. (c) Los fitoesteroles bloquean la entrada de más colesterol en la micela. (d) El colesterol y fitoesteroles no absorbidos son eliminados del cuerpo [9, 12].

Estudios clínicos indican que incrementando la dosis de fitoesteroles en la dieta hasta un máximo de 2 gramos/día, se consigue reducir en un 10% el nivel en suero de LDL (lipoproteína de colesterol de baja densidad), asociadas a fenómenos de aterosclerosis [13]. También son muy efectivos en combinación con fármacos reductores del colesterol, más que cuando se duplica la dosis del fármaco [14].

Nester y col. demostraron la eficacia en esta disminución también con ésteres de fitoesterol y en fitoestanoles no esterificados provenientes de pan y cereales en individuos con nivel moderadamente alto en colesterol [15]. Además, conviene destacar que los fitoesteroles, debido a su estructura química, tienen una solubilidad muy limitada en el tracto gastro-intestinal, que hace que se necesiten dosis altas de fitoesteroles para reducir de forma eficaz la absorción de colesterol. Para aumentar su solubilidad e incrementar así la biodisponibilidad de estos compuestos, se recurre a su esterificación.

Además, aceites que se llaman “saludables” en determinados países asiáticos también disminuyen el nivel de colesterol, debido a su contenido en orizanol y ésteres de fitoesterol [16, 17].

Un posible efecto adverso asociado al consumo de estos fitoesteroles es la posible disminución de los niveles plasmáticos de carotenoides y tocoferoles, debido a que disminuyen su absorción, aunque no suponen un severo riesgo para la salud [18].

### 5.1.4 Ácido Eicosapentaenoico (EPA) y Ácido Docosahexaenoico (DHA).

EPA y DHA son dos de los principales ácidos poliinsaturados  $\omega$ -3 de cadena larga (PUFAs), que además de disminuir los niveles de TAGs y colesterol en suero sanguíneo, han mostrado tener efecto en la prevención y tratamiento de la hipertensión, artritis, desórdenes inflamatorios, autoinmunes y cáncer [19, 20].

La investigación ha demostrado que ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs) tienen efectos fisiológicos específicos en humanos [21] y los numerosos efectos positivos en la salud de EPA y DHA han sido revisados recientemente [22].

El aceite de pescado es una fuente natural importante de PUFAs, especialmente de ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico (EPA, C20:5) y ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico (DHA, C22:6).

Las actividades biológicas de estos ácidos grasos se basan en dos mecanismos de acción principales:

#### 5.1.4.1 Regulación del metabolismo de ácidos grasos y eicosanoides.

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

Tanto el EPA como el ácido araquidónico son precursores de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Estos ácidos grasos se pueden sintetizar a partir de diferentes ácidos grasos que ingerimos en la dieta.

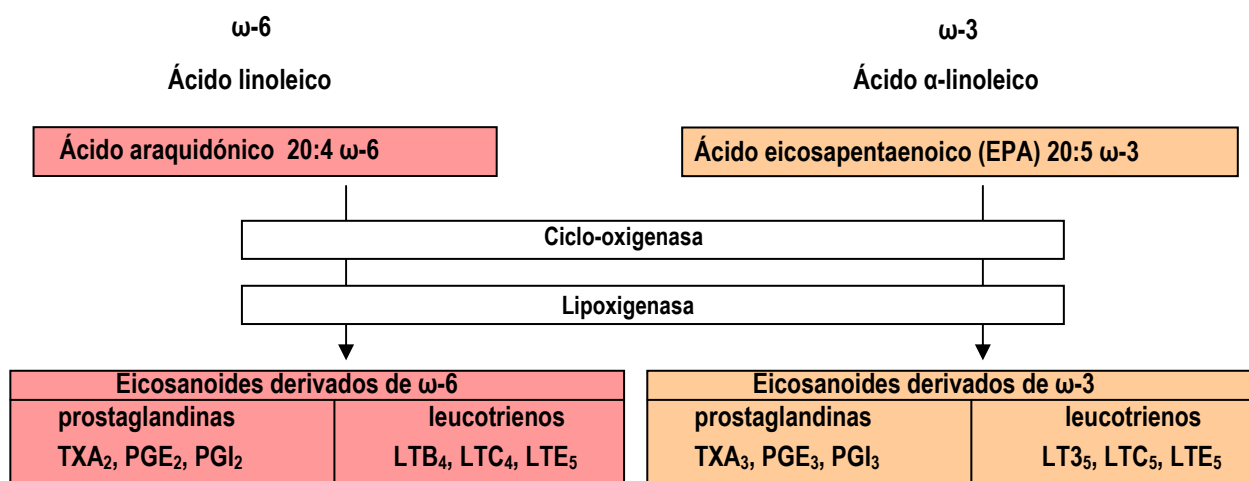


Figura 4. Distintos eicosanoides sintetizados a partir de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6.

EPA y ácido araquidónico son sustratos de las mismas enzimas y por tanto compiten entre sí (ver Figura 4) [23]. 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.

De este modo, el balance de eicosanoides se debe regular para que estos procesos fisiológicos se desarrollen correctamente y por ello se debe controlar la relación entre ácido araquidónico y EPA. El consumo de ciertos alimentos o suplementos de FAs pueden regular este metabolismo, controlar la formación de ácido araquidónico y de este modo, se puede cambiar la producción de eicosanoides para prevenir desequilibrios y ayudar en el control de diversas enfermedades [3].

Estudios epidemiológicos sugieren que una dieta rica en ácidos grasos de origen marino tiene efectos beneficiosos en procesos inflamatorios y artritis reumatoide [24, 25].

Los investigadores muestran que la acción antiinflamatoria del DHA ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares, ya que la inflamación de los vasos sanguíneos tiene un importante papel en la aterosclerosis [26].

Por otro lado, pacientes que recibieron suplementación en PUFAs  $\omega$ -3 (EPA y DHA) experimentaron mejoría en el tratamiento de la colitis ulcerosa [27].

#### 5.1.4.2 Regulación de la fluidez de membranas y de la actividad enzimática ligada a membranas.

Los PUFAs  $\omega$ -3 pueden tener mucha facilidad para incorporarse a las membranas, donde afectan a la fluidez de los fosfolípidos, al empaquetado molecular y a la actividad de las enzimas ancladas a la membrana. La incorporación de DHA aumenta la permeabilidad de las membranas y muchos de los beneficios de los PUFAs  $\omega$ -3 están relacionados con cambios en las membranas celulares [28]. 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 [28].

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 FAs) en la membrana de las células fotorreceptoras (bastones). Una suplementación de DHA en la infancia provoca un mejor desarrollo de la visión [29].

El DHA es esencial para el desarrollo cerebral en niños [30] y para un funcionamiento normal de la función cerebral en adultos. Una insuficiencia en DHA está asociada a un declive en la función cognoscitiva con la edad y a un mayor riesgo de enfermedad de Alzheimer [31]. Pacientes con Alzheimer tienen bajos niveles de DHA en suero sanguíneo y cerebro. El  $\beta$ -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 ésta

molécula es la gran responsable en la cascada de eventos que desencadena esta enfermedad [32, 33]. El DHA aumenta 10 veces la transcripción de la enzima que reduce la producción de  $\beta$ -amilóide, disminuyendo su acumulación y potencial toxicidad [34, 35].

También hay 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 [36, 37].

### **5.1.5 Ácido linoleico conjugado (CLA).**

EL CLA es una mezcla de isómeros geométricos y posicionales de derivados conjugados del ácido linoleico. Tiene dos dobles enlaces localizados predominantemente en las posiciones 9 y 11 ó 10 y 12. Por otro lado, cada doble enlace presenta isómeros geométricos (*cis/trans*). El CLA es un componente natural de productos alimenticios provenientes de rumiantes. Estos isómeros se han localizado en la grasa de la leche, queso y carne de rumiantes [38]. El isómero de CLA *cis*-9, *trans*-11 es un metabolito intermedio en la biohidrogenación del rumen. Este compuesto es el isómero de CLA mayoritario en la grasa láctea, y representa el 80-90% del contenido en CLA total. La concentración total de CLA en productos lácteos se encuentra en el intervalo de 3 a 7 mg/g de grasa [39]. Entre los factores que afectan al contenido en CLA en la grasa láctea, la dieta juega uno de los papeles mas relevantes [40]. No obstante, investigaciones previas han observado variaciones significativas en el contenido de CLA en grasa láctea proveniente de vacas distintas pero que siguieron la misma dieta [41, 42].

En los últimos años, ha aumentado el interés por el CLA por su papel en la atenuación de ciertas enfermedades crónicas [43]. Estudios nutricionales basados en modelos con animales han demostrado gran variedad de efectos beneficiosos en la salud debidos a la ingestión de CLA [44, 45], incluyendo efectos anticarcinogénicos [46], antiaterogénicos, antiobesidad y antidiabéticos, así como potenciación del sistema inmune [47]. Los diversos efectos beneficiosos del CLA pueden estar relacionados con isómeros específicos del CLA, siendo éste un campo activo para la investigación. Ha sido establecido que el isómero de CLA *cis*-9, *trans*-11 es un agente activo anticarcinogénico cuando se incluye como un componente natural en la dieta [48], encontrándose bajo estudio clínico varias funciones biológicas. De todos los isómeros presentes en el CLA, tan solo los isómeros *c*9, *t*11-18:2 y *t*10, *c*12-18:2 poseen una actividad beneficiosa contrastada. [44].

El mecanismo por el que el CLA lleva a cabo su función biológica no se conoce completamente. No obstante, se afirma que regula la función inmune a través de la modificación de la síntesis de eicosanoides [49, 50]. Resultados de estudios previos demostraron que el CLA inhibe significativamente la formación de ácido araquidónico, precursor de varios eicosanoides, mediante la inhibición de la  $\Delta$ 6 y  $\Delta$ 5 desaturasa y elongación de cadena [51-53].

El CLA también ha demostrado inhibir el almacenamiento de grasas y aumentar su oxidación [54, 55], mediante la inhibición de la actividad de la lipoproteína lipasa, y por tanto la absorción de grasa en los adipocitos. El CLA también puede incrementar la actividad de la hormona sensible a

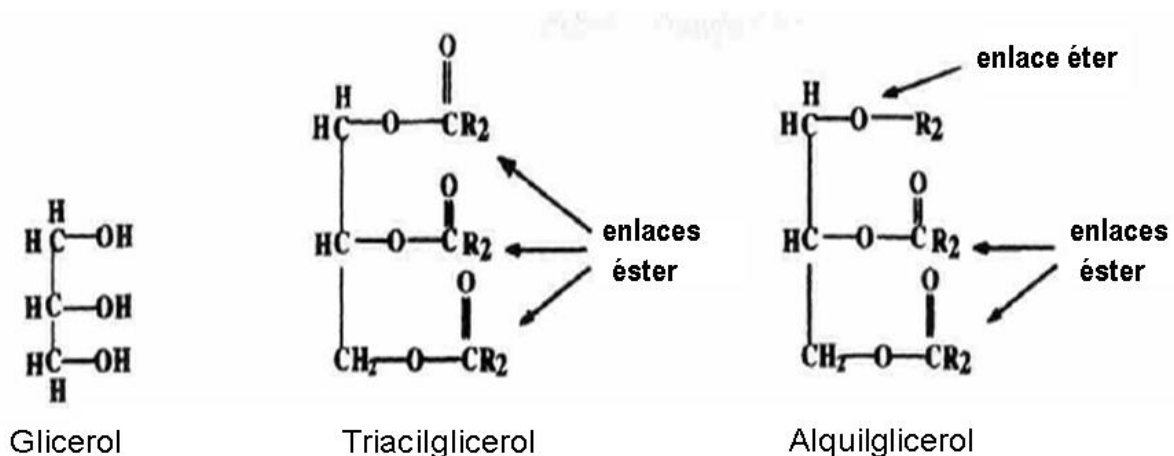
lipasas, enzimas que rompen la grasa almacenada en las células del cuerpo. Se cree que el isómero del CLA  $\omega$ 10,  $c$ 12-18:2 es responsable de la movilización de las reservas lipídicas del cuerpo para obtener energía [56].

En relación a este tema, destacan los resultados de los ensayos clínicos realizados en humanos:

- Reducción de grasa corporal en obesos [57].
- Actividad de los lípidos séricos y grasa corporal [58].
- Reducción del tejido adiposo abdominal en hombres obesos de mediana edad con signos de síndrome metabólico [59].
- Disminución de grasa corporal en individuos sanos y activos [60].

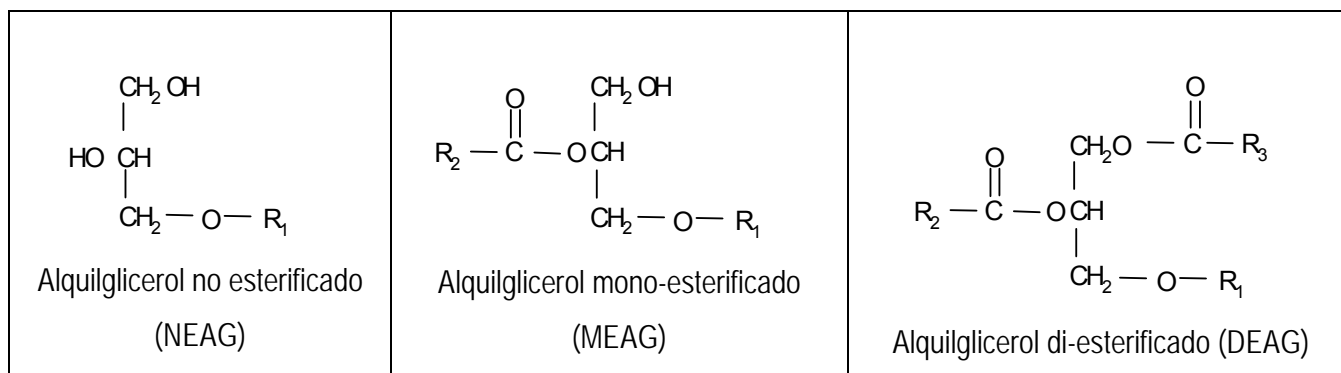
### 5.1.6 Éteres lipídicos o alquilglicerol.

Los éteres lipídicos no polares del tipo 1-O-alkil-2,3-diacil-*sn*-glicerol o alquilglicerol (también llamados frecuentemente alcoxiglicerol) son un grupo de glicerol 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.



**Figura 5.** Diferencias estructurales entre TAG y alquilglicerol (ambos tienen en su estructura una molécula de glicerol).

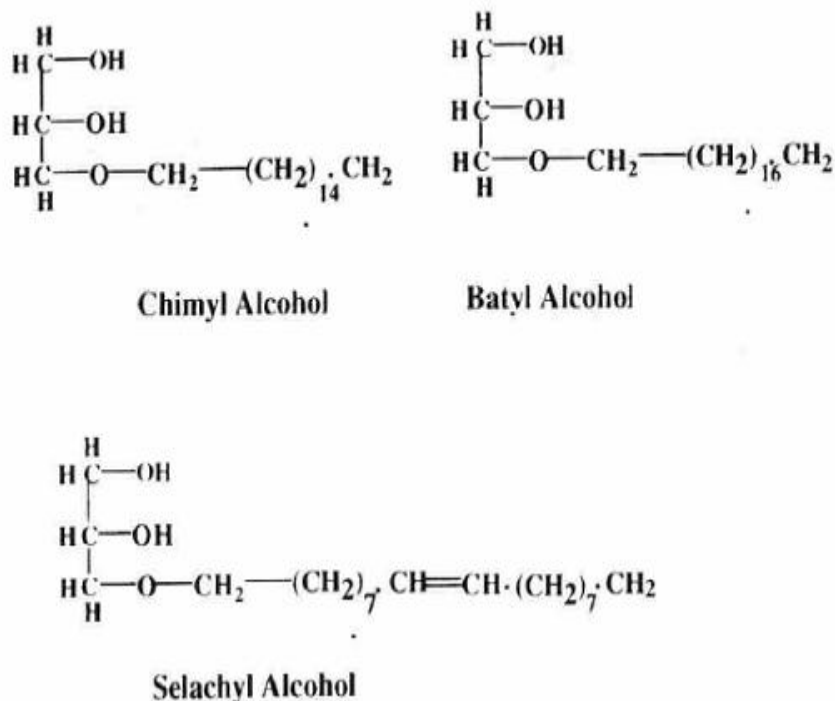
Los alquilglicerol pueden contener distintos ácidos grasos en su estructura, esterificando los grupos hidroxilo restantes de la molécula de glicerina (ver Figura 6).



**Figura 6.** Estructura química de alquilgliceroles no esterificados, monesterificados y diesterificados.

Estos compuestos son el constituyente mayoritario del aceite del hígado de diversas especies de tiburones y otras especies de peces elasmobranquios [61, 62]. El aceite de hígado de tiburón ha sido utilizado durante más de 40 años como un agente terapéutico y preventivo de ciertas enfermedades, siendo los alquilgliceroles, sus principales ingredientes activos.

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.



**Figura 7.** Principales tipos de alquilgliceroles.

Los éteres lipídicos o alquilgliceroles han sido objeto de mucha atención debido a sus especiales propiedades fisiológicas en humanos. Estudios realizados en los últimos 30 años han mostrado que los alquilgliceroles son multifuncionales [63]. Los 1-*O*-alquil-*sn*-gliceroles tienen una estructura similar a factores de activación plaquetaria que manifiestan diferentes efectos beneficiosos en la salud humana [64, 65], como la prevención de enfermedades como asma, psoriasis, artritis y eliminación rápida de metales pesados del cuerpo [63, 66]. 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 [67]. Firshein describió un incremento de la sensibilidad de los tumores frente a los agentes empleados en quimioterapia cuando se administran junto a alquilgliceroles [68].

A la ingestión en la dieta de estas sustancias se le han atribuido propiedades anticarcinogénicas [69-71]. 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 protein 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 protein quinasa C. Los análogos del 1,2-DAG de tipo alquil (con algún enlace éter en su estructura), como el 1-*O*-decil-2-*O*-decanoilglicerol, 1-*O*-decanoil-2-*O*-decilglicerol, 1,2-*O*-didecilglicerol, 1-*O*-hexadecil-2-*O*-acetilglicerol y 1-*O*-decil-2-*O*-acetilglicerol, pueden también regular competitivamente la protein quinasa C. 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].

Hay estudios sobre la acción inmunoestimuladora de los alquilgliceroles [74], que sugieren una primera acción sobre los macrófagos [75-79], y también en linfocitos de tipo B y T [80, 81]. El proceso de activación de macrófagos ha sido demostrado con alquilgliceroles naturales, sintéticos y también con derivados de tipo alquil de lisofosfolípidos. Esta activación de macrófagos desarrolla un incremento en la capacidad fagocítica y además aumenta los efectos citotóxicos en células tumorales in vivo [69, 78, 82-84]. El dodecilglicerol (DDG), es uno de los más potentes activadores de macrófagos conocidos, aunque el uso de 3-*sn*-octadecilglicerol, o batyl alcohol (procedente del aceite de hígado de tiburón), produce el mismo efecto que el DDG [63]. Los alquilgliceroles se encuentran localizados en el cuerpo humano, mayoritariamente en las células del sistema inmune y en dosis relativamente altas en la leche materna [85]. En algunas circunstancias, la síntesis endógena de estos compuestos es reducida y se recomienda la administración oral de alquilgliceroles. Otro efecto de estimulación inmunológica atribuido a estos compuestos es la producción de anticuerpos [86], principalmente de inmunoglobulina G y M [63]. Yu patentó comida

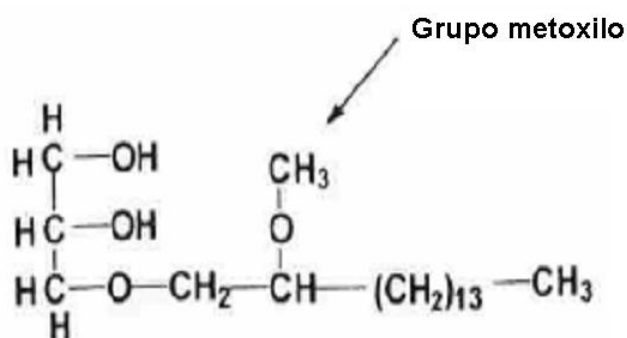


para bebés, basada en leche modificada que contenía alquilgliceroles, con el objetivo de estimular el sistema inmune [87].

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) de tipo 1 [88, 89]. 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 [90].

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 [63].

Los alquilgliceroles sustituidos con un grupo metoxilo (Figura 8), presentes en el aceite de hígado de tiburón en una proporción en torno al 3% del total de los alquilgliceroles, tienen también una importante actividad biológica como estimulador del sistema inmune y agente anticancerígeno [63, 91].



**Figura 8.** Estructura de un alquilglicerol sustituido con un grupo metoxilo.

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 anfifílicas, 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 [92].

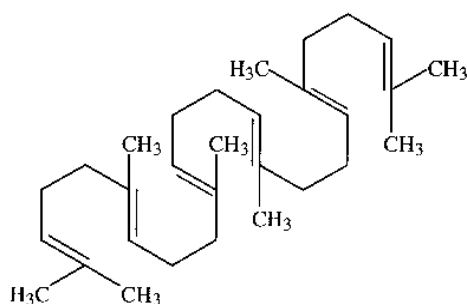
Otras propiedades funcionales atribuidas a los 1-O-alquilgliceroles, son el aumento de la movilidad de espermatozoides y la mejora de la fertilidad [93, 94], y la estimulación de la hematopoyesis [95].

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 3 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 [63].

### 5.1.7 Escualeno.

El escualeno (2, 6, 10, 15, 19, 23 – Hexametil - 2, 6, 10, 14, 18, 22 -tetracosahexaeno) es un hidrocarburo insaturado, triterpeno con 6 enlaces dobles. Su fórmula es  $C_{30}H_{50}$ , y es un producto intermedio de la ruta biosintética del colesterol. Su estructura molecular se indica en la Figura 3.



**Figura 9.** Estructura molecular del escualeno.

El escualeno es un hidrocarburo isoprenoide de cadena abierta altamente insaturado (contiene 6 dobles enlaces). Es un líquido aceitoso, incoloro, insípido y sin olor. Es soluble en éter, acetona, tetracloruro de carbono, y es poco soluble en alcohol y ácido acético. Además, es insoluble en agua.

El escualeno fue descubierto a principios del siglo XX en el aceite de hígado de tiburones de la familia *Squalidae*, que viven entre 300 y 1500 metros de profundidad. El hígado puede representar del 25 al 50% del total del peso corporal, y del aceite que se produce a partir del hígado, el escualeno se encuentra en una concentración del 40–75% en peso de aceite en algunas especies [96]. Además, estos tiburones presentan una cierta inmunidad a determinadas enfermedades y una menor propensión al desarrollo de cánceres. Se cree que el escualeno es la clave del empleo eficiente del oxígeno por parte de estos tiburones de alta profundidad. Hernández-Pérez y col. comprobaron que tiburones capturados en aguas profundas de Canarias contenían grandes cantidades de escualeno [97]. Aunque la principal fuente natural de escualeno se encuentra en animales marinos, este compuesto también puede encontrarse en cantidades variables en otras fuentes, tanto de origen vegetal [98, 99] como animal [100].

El escualeno tiene importantes aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica, empleándose como base de productos cosméticos, en la fabricación de fármacos, en la

fabricación de colorantes orgánicos, etc. Al tener un bajo punto de congelación, y un alto punto de ebullición, el escualeno presenta una alta resistencia al calor y a la fricción, por lo que también se emplea como lubricante en automóviles y máquinas, colorantes orgánicos, gomas, etc.

La bioquímica del escualeno ha sido ampliamente estudiada [101-105]. Su interés en el campo cosmético-dermatológico y médico aumentó cuando se descubrió en las secreciones sebáceas humanas, como un precursor del colesterol, y cuando se describió su posible efecto anticarcinogénico [106, 107].

El escualeno constituye más del 11% del total de la grasa cutánea, encontrándose en el cerumen, la grasa del pelo, y en las secreciones sebáceas, teniendo el papel de dotar a la piel de flexibilidad, y de formar un recubrimiento que sirve de protección contra bacterias y hongos. Además, este recubrimiento graso ayuda a mantener la humedad de la superficie cutánea, por lo que en la industria cosmética se usa como base en cosméticos rejuvenecedores y en cremas no aceitosas.

Su mayor interés reside en la posibilidad de su empleo para la producción de alimentos funcionales, dado que existen diversos estudios que demuestran su impacto positivo en la salud humana [108]. Destaca su capacidad antioxidante, además de prevenir ciertos tipos de cáncer, especialmente de colon y páncreas, fortalecer el sistema inmunológico y reducir el nivel de colesterol-LDL. Una de sus funciones es la de ser un transportador de oxígeno, jugando un papel en el mantenimiento de la salud [100].

En lo que respecta al efecto anticancerígeno del escualeno, se ha descrito que inhibe la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-COA), impidiendo la expresión del oncogen ras, asociado a la aparición de diversos tipos de cánceres como son el cáncer de mama, colon, pulmón y páncreas [106, 107, 109-113].

También se ha observado que el aceite de oliva, aplicado de forma tópica sobre la piel tras una exposición a radiación ultravioleta, reducía la aparición de cáncer de piel. Esto se atribuyó a la acción conjunta del escualeno y otros antioxidantes presentes en el aceite de oliva, los cuales protegen al DNA de los daños que pudieran ocasionar las especies de oxígeno reactivo [114]. Previamente, en el año 1995, Kohno y col. ya observaron que el escualeno era un potente inhibidor del oxígeno singlete reactivo en la superficie cutánea humana [115].

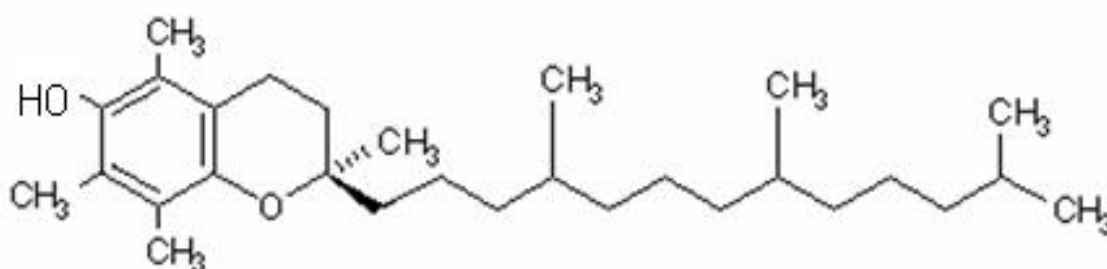
El escualeno en su forma hidrogenada, recibe el nombre de escualano, mucho más estable a la oxidación que el escualeno, y ampliamente utilizado en la industria cosmética, ya que puede incrementar el grado de penetración de agentes tópicos presentes en las cremas y pomadas medicinales.

### 5.1.8 Tocoferoles y tocotrienoles.

Tocoferoles y tocotrienoles engloban un grupo de compuestos liposolubles que reciben el nombre genérico de vitamina E. Aunque Evans y Bishop descubrieron la vitamina E como un factor esencial para la reproducción en 1922 [116], el Consejo de Nutrición y Alimentos (Food and Nutrition Board) no reconoció el carácter esencial de la vitamina E hasta 1968 [117].

Los tocoferoles y tocotrienoles tienen una estructura química similar: ambos tienen una estructura que consiste en dos anillos, uno fenólico y otro heterocíclico, y una cadena lateral de 16 átomos de carbono con tres centros quirales. Los tocoferoles tienen una cadena lateral saturada. Dependiendo del número y la posición de los grupos metil en el anillo fenólico, estos compuestos se designan como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ -tocoferoles. Los tocoferoles se encuentran presentes en semillas oleaginosas, hojas y otras partes verdes de plantas superiores.

El  $\alpha$ -tocoferol es el más abundante y el que mayor actividad antioxidante tiene in vivo [118, 119]. En la naturaleza, solamente los organismos fotosintéticos son capaces de sintetizar  $\alpha$ -tocoferol.



**Figura 10.** Estructura molecular del  $\alpha$ -tocoferol.

Los tocoferoles han atraído mucha atención debido a su uso como antioxidantes naturales. Pueden ser extraídos a partir de fuentes naturales y pueden sustituir a antioxidantes sintéticos como el BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) y el BHA (2-*tert*-butil-4-hidroxianisol) [120].

Como ya se ha mencionado, el  $\alpha$ -tocoferol es el que tiene una mayor actividad biológica, si se compara con el  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -tocoferol, que tienen una actividad reducida [121-123].

Actualmente, el  $\alpha$ -tocoferol se produce de manera sintética, teniendo de este modo, una aceptación más limitada. Industrialmente, los tocoferoles se producen llevando cabo gran cantidad de reacciones químicas complejas, pero su extracción a partir de fuentes naturales, como destilados desodorizados de aceites, es una buena alternativa [124].

Los tocoferoles obtenidos a partir de fuentes naturales tienen una gran aceptación en la industria alimentaria y en Estados Unidos son regulados por la Food and Drug Administration (FDA). Se permiten 300 ppm en grasas animales y también su combinación con otros tipos de antioxidantes. En Europa están autorizados con el código E-306, referido a extractos de origen natural ricos en

tocoferoles. Además, muchos países como Canadá, Japón, Korea y Australia permiten el uso de tocoferoles en diferentes tipos de alimentos [125].

Su principal función en las células es la protección de las membranas ante el daño o deterioro oxidativo [126, 127]. En humanos, el  $\alpha$ -tocoferol juega un papel protector de la piel [128] y de los ojos [129] ante patologías provocadas por acción de la luz y también actúa previniendo desórdenes degenerativos como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y cáncer [130-132]. Por esta razón, se ha sugerido que su uso como suplemento o nutracéutico puede tener un impacto positivo en la salud. Otras aplicaciones industriales del  $\alpha$ -tocoferol son la conservación de alimentos [133], cosméticos y protectores solares [134, 135] y como aditivo en comida animal, para aumentar la salud del animal y mejorar la calidad de la carne [136, 137]. Se estima que la dosis diaria recomendada de vitamina E es de 10 a 20 mg al día, dependiendo de las características y circunstancias del individuo [138].

La principal diferencia estructural entre tocoferoles y tocotrienoles se encuentra en la saturación de la cadena lateral. Los tocotrienoles tienen una triple insaturación en la cadena lateral. Recientemente se ha sugerido que los tocotrienoles son mejores antioxidantes que los tocoferoles. Las propiedades hipocolesterolemiantes, antitrombóticas, y antitumorales de tocotrienoles han sugerido que estos compuestos pueden ser agentes efectivos en la dieta para la prevención y/o tratamiento de muchas enfermedades [139]. Al contrario que los tocoferoles, los tocotrienoles no se encuentran en las partes verdes de plantas, sino en el germen y en la fracción de salvado de ciertas semillas y cereales, siendo también abundantes en el aceite de palma y grasa de palmiste.

### **5.1.9 Fosfolípidos (PL).**

Los fosfolípidos contienen dos ácidos grasos que esterifican la molécula de glicerina. El tercer grupo hidroxilo del glicerol se enlaza con compuestos alifáticos que contienen ácido fosfórico y residuos de nitrógeno. Los fosfolípidos son importantes emulsionantes naturales empleados en alimentos, fármacos y productos industriales. Son constituyentes esenciales de las células y se encuentran en abundancia en yema de huevo (8-10%), mantequilla (0.5-1.2%), y aceites vegetales (0.5-3.7%). Su principal fuente comercial es la lecitina de soja, que es una mezcla de fosfolípidos y TAGs. Debido a la tendencia natural de los PL a formar dispersiones moleculares ultra finas, pueden emplearse para mejorar la biodisponibilidad de nutrientes lipofílicos [140]. La fosfatidilcolina es un tipo de PL que tiene efectos terapéuticos en diversos desórdenes metabólicos, como la reducción de los niveles de colesterol, en tratamiento de desórdenes neurológicos, mejora del aprendizaje y la memoria en humanos y animales [117, 141]. La fosfatidilserina es otro PL que tiene efectos positivos en funciones cerebrales y del conocimiento [142]. Los lisofosfolípidos son una variedad de PLs en los que se ha perdido un ácido graso. Estos

compuestos y análogos suyos están implicados en procesos de activación de macrófagos y apoptosis de células tumorales [77, 78, 143].

## 5.1.10 Otros ácidos grasos funcionales.

### 5.1.10.1 Ácido oleico (C18:1).

El ácido oleico o ácido *cis*-9-octadecenoico es un ácido graso omega-9 monoinsaturado que se encuentra en varias fuentes animales y vegetales. El ácido oleico es el principal componente del aceite de oliva constituyendo un 55-80% del total. El aceite de semilla de uva y el aceite de Espino cerval de mar (*Hippophae rhamnoides*) también tienen una considerable proporción de ácido oleico (15-20 % del total) [144].

Numerosos estudios epidemiológicos demuestran que la sustitución en la dieta de grasas saturadas por grasas monoinsaturadas, como el ácido oleico, provocan una disminución en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [145], ya que estas dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados disminuyen la concentración de colesterol y triacilglicérols en sangre [146, 147].

Además, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ricas en ácido oleico tienen una menor modificación oxidativa, lo que supone una disminución en el riesgo de aterosclerosis [148].

### 5.1.10.2 Ácido $\alpha$ -linolénico (C18:3).

El ácido  $\alpha$ -linolénico (omega 3) o ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico se encuentra presente principalmente en fuentes como el lino, colza y nueces de nogal. Los beneficios en la salud asociados al consumo de aceite de lino se deben principalmente al contenido en  $\alpha$ -linolénico. El ácido  $\alpha$ -linolénico es precursor de EPA y DHA y altera la producción de diferentes eicosanoides, reduce la presión arterial en individuos hipertensos, y disminuye los triacilglicérols y el colesterol en sangre [149]. Según Johnston, el  $\alpha$ -linolénico en la dieta retrasa el crecimiento tumoral [150]. Se ha sugerido que el  $\alpha$ -linolénico en la dieta es esencial para un desarrollo neuronal óptimo durante los periodos de crecimiento fetal y postnatal [151].

### 5.1.10.3 Ácido $\gamma$ -linolénico (C18:3).

El ácido  $\gamma$ -linolénico (omega 6) o ácido *cis,cis,cis*-6,9,12-octadecatrienoico tiene un importante papel en determinados procesos fisiológicos humanos. Se encuentra en la leche materna y en diversos vegetales y semillas. Se produce a partir del ácido linoleico por acción de la enzima  $\Delta 6$  desaturasa, pero esta enzima suele tener poca actividad en el cuerpo humano por deficiencias nutricionales en vitaminas y minerales. Tiene efectos antiinflamatorios [152], actividad anticarcinogénica [153-158], mejora los estímulos nerviosos en diabéticos y mejora la circulación sanguínea reduciendo el hormigueo en extremidades [159, 160].

#### 5.1.10.4 Ácido pinolénico (C18:3).

El ácido pinolénico (omega 6) o ácido *cis,cis,cis*-5,9,12-octadecatrienoico es un isómero del  $\gamma$ -linolénico se encuentra en la semilla del pino siberiano. Hay estudios que muestran su actividad funcional en el cuerpo humano: disminuye los lípidos, aumenta los niveles de HDL o “colesterol bueno” (lipoproteínas de encargadas de llevar el colesterol hasta el hígado para su posterior excreción) y de prostaglandinas, y disminuye la tensión arterial y la agregación plaquetaria. Matsuo y col. [161] revelaron que el ácido pinolénico tenía efectos en los linfocitos CD4, y también se han descrito propiedades inflamatorias [162].

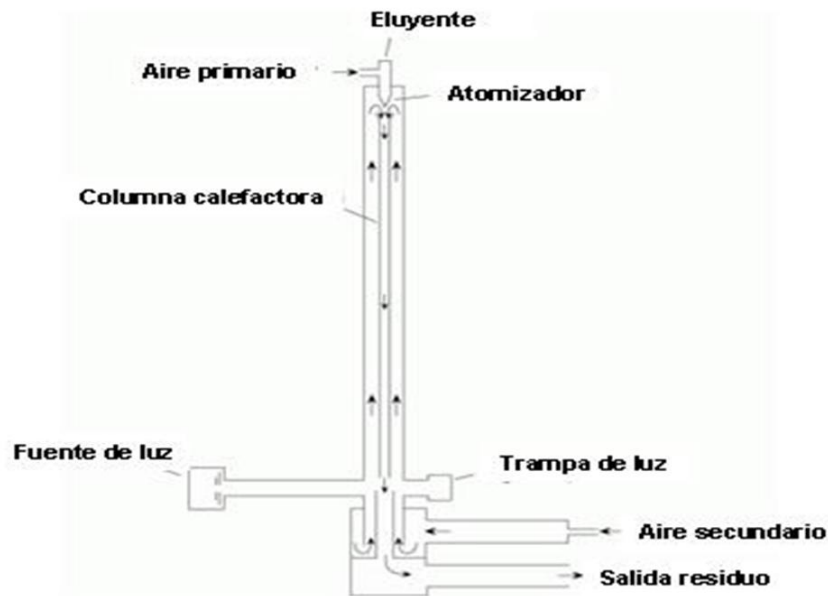
## 5.2 Análisis de lípidos neutros mediante HPLC-ELSD.

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 o *High performance liquid chromatography* (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 o *Normal phase HPLC* (NP-HPLC) 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 hidrofóbicos. 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 [163]. Este tipo de detector trabaja mediante la dispersión de la luz de 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 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 que 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 [164, 165]. El detector evaporativo de dispersión de luz en HPLC de lípidos puede ser usado para todos los solutos que tienen una volatilidad inferior que 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 11.** Diagrama del detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD).

Se han descrito varios métodos de HPLC para el análisis de clases de lípidos en lo que se han utilizado detectores evaporativos de dispersión de luz (ELSD). Algunos de estos métodos utilizan columnas cianopropil [166]. Otros métodos han empleado columnas dihidroxipropil que permiten la separación de hasta nueve clases de lípidos no polares, empleando un alto flujo (3 mL/min en una columna de 4 mm) y varios gradientes de fase móvil [167]. En otros casos se ha utilizado una fase estacionaria enriquecida en grupos hidroxilo, también llamada columna diol, para conseguir analizar más de 12 clases de lípidos diferentes simultáneamente [168].

Se han descrito algunos métodos para la separación de clases de lípidos no polares usando como fase estacionaria alúmina [169, 170]. Schaefer y col. separaron con éxito ceras, ésteres de esterol y ácidos grasos metil ésteres en una columna diol, aunque se observó desdoblamiento de picos de algunas clases de lípidos, debido principalmente al diferente grado de saturación de los residuos de ácido graso presentes en el lípido [168].

Una de las dificultades de estos métodos de HPLC en fase normal es la separación simultánea de hidrocarburos (como escualeno), ésteres de esterol y ácidos grasos metil o etil ésteres, de otros

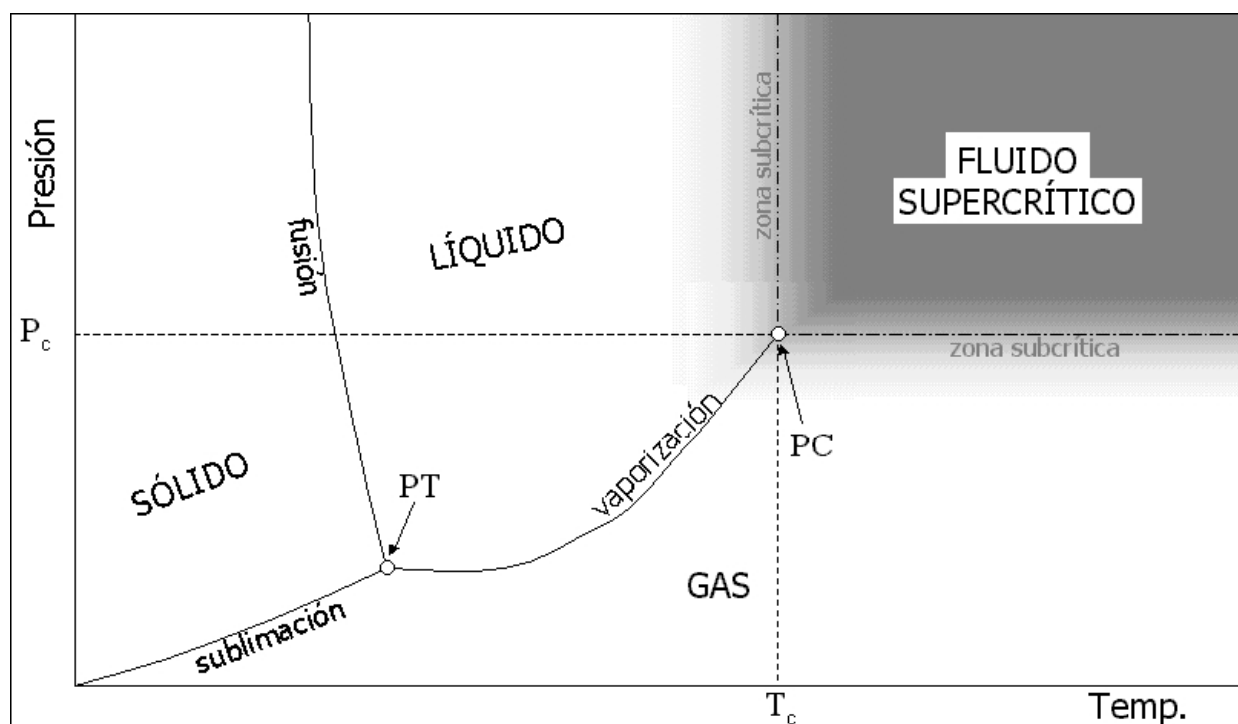


lípidos polares, combinados con una buena resolución en el mismo análisis. Otra dificultad en el análisis de lípidos neutros es la separación de alquilgliceroles di-esterificados (DEAG) y TAGs, ya que estos compuestos tienen una estructura y polaridad muy similar, y por esta razón, pueden co-eluir en el análisis de HPLC.

## 5.3 La tecnología de fluidos supercríticos.

### 5.3.1 Fundamentos.

Un fluido supercrítico es definido como una sustancia que se encuentra por encima de su temperatura crítica ( $T_c$ ) y su presión crítica ( $P_c$ ), tal como se indica en el diagrama de fases de la Figura 12.



**Figura 12.** Diagrama de fases sólido/líquido/gas. PT: punto triple, PC: punto crítico,  $P_c$ : presión crítica,  $T_c$ : Temperatura crítica.

Este diagrama presenta la relación de los estados sólido, líquido y gaseoso en función de la temperatura y la presión. En el punto triple coexisten las tres fases. La temperatura crítica y la presión crítica definen el punto crítico de una sustancia, y en este punto todavía coexisten en equilibrio el líquido y su vapor. 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, se comporta como un gas, 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 [171].

También puede definirse como un gas denso con poder disolvente controlable, o bien como una forma de la materia en la que los estados líquido y gaseoso son indistinguibles entre sí.

Se entiende que a mayor presión, mayor densidad y por lo tanto mayor solubilidad. El parámetro de solubilidad ( $\delta$ ) se puede correlacionar con la presión crítica de la siguiente manera:

$$\delta = 1.25 P_c^{1/2} (\rho_{r,g} / \rho_{r,l})$$

donde  $P_c$  es la presión crítica del fluido,  $\rho_{r,g}$  la densidad reducida del gas y  $\rho_{r,l}$  la correspondiente al estado líquido.

La ecuación anterior es particularmente útil cuando se pretenden establecer las condiciones de extracción que permitan obtener el mayor poder de solubilización de un grupo de compuestos.

Las propiedades reducidas ( $P_r$ ,  $T_r$ ,  $\rho_r$ ) se calculan a partir del valor de una propiedad a unas condiciones dadas y el valor correspondiente a las críticas, así:

$$P_r = P / P_c \quad T_r = T / T_c \quad \rho_r = \rho / \rho_c$$

El aumento de la densidad provoca un aumento en el parámetro de solubilidad, que puede dar lugar a una disminución de la selectividad del proceso de extracción.

El comportamiento de la densidad, así como otras funciones termodinámicas que dependen de la presión y la temperatura, pueden ser también modeladas mediante ecuaciones de estado, siendo la más empleada en el campo de los fluidos supercríticos la de Peng-Robinson [172].

En la

Tabla 1 se indican diferentes sustancias que pueden ser usadas como fluidos supercríticos, con sus correspondientes valores de temperatura crítica ( $T_c$ ), presión crítica ( $P_c$ ), densidad crítica ( $\rho_c$ ) y parámetro de solubilidad ( $\delta$ ).

**Tabla 1.** Condiciones críticas de distintos fluidos.

	$T_c$ (°C)	$P_c$ (atm)	$\rho_c$ (g cm <sup>-3</sup> )	$\delta$ (cal <sup>1/2</sup> cm <sup>-3/2</sup> )
<b>Helio</b>	-268	2,2	0,070	1,0
<b>Hidrógeno</b>	-240	12,8	0,031	2,6
<b>Nitrógeno</b>	-147	33,5	0,313	4,7

Xenón	16,6	57,6	1,113	6,1
Dióxido de Carbono	31	72,9	0,466	7,5
Etano	32,2	48,2	0,203	5,8
Óxido Nitroso	36,4	71,5	0,452	7,2
Hexafluoruro de azufre	45,5	37,1	0,738	5,5
Amoniaco	132,4	111,3	0,235	9,3
n-Butano	152	37,5	0,228	5,3
Dióxido de nitrógeno	158,3	100	0,271	11,0
n-Pentano	196,5	33,3	0,237	5,1
n-Hexano	234,2	29,3	0,233	4,9
Metanol	239,4	79,9	0,272	8,9
Acetonitrilo	274,8	47,7	0,253	6,3
Agua	374,1	217,6	0,322	13,5

En la Tabla 2 se indican de manera comparativa el orden de magnitud de las propiedades físicas como viscosidad, difusividad y densidad de los fluidos supercríticos, respecto a las de los líquidos y gases.

**Tabla 2.** Orden de magnitud de las propiedades físicas de los fluidos supercríticos, gases y líquidos.

	Densidad (g/ml)	Viscosidad (g/cm·s)	Difusividad (cm <sup>2</sup> /s)
Gas	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup>
Líquido	1	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-6</sup>
Fluido supercrítico	0,2-0,9	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>

Básicamente, las propiedades físicas como la viscosidad, la difusividad y la densidad, son las que más interesan cuando se llevan a cabo algunas de sus aplicaciones y estas propiedades se pueden controlar modificando las condiciones de presión y temperatura. Esto hace que los fluidos supercríticos tengan características muy buenas como disolventes, básicamente por su poder de solvatación, la posibilidad de modular este poder de solvatación y sus buenas propiedades de transferencia de materia:

- 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 más 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) [173].
- 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.
- Tienen valores de coeficientes de difusión intermedios entre los líquidos y los gases. Debido a estos mayores coeficientes de difusión (difusividad) junto a un menor valor de la viscosidad, los fluidos supercríticos son capaces de penetrar y difundir a través de matrices de muy diverso tipo, lo que les permite tener 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 más rápidos. En general, la difusividad en un fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>) aumenta con la temperatura y disminuye con la presión, y 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 [174].

### **5.3.2 El CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico.**

Además de todas las propiedades mencionaban anteriormente, un fluido debe poseer otras para que pueda ser empleado como disolvente en la industria y, especialmente, 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:

- ⇒ No es tóxico.
- ⇒ Es incoloro.
- ⇒ Es inodoro.
- ⇒ No es inflamable.
- ⇒ No es corrosivo (aunque sí lo son sus mezclas con agua).
- ⇒ No oxidante.
- ⇒ Su costo es relativamente bajo.
- ⇒ Es fácilmente eliminable.

- ⇒ Prácticamente no deja residuo.
- ⇒ Baja tensión superficial.
- ⇒ Sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar.
- ⇒ Posee una densidad relativamente alta en el punto crítico, y por ello, un poder de solvatación también alto (7.5 en la escala del parámetro de solubilidad).
- ⇒ Es comercial y se consigue con diferentes grados de pureza.
- ⇒ Está admitido como un disolvente seguro (GRAS), dentro de las buenas prácticas de elaboración (GMP).

Generalmente, los disolventes polares tienen más capacidad disolvente que los disolventes apolares y pueden solubilizar una variedad de compuestos de polaridad más amplia. Una limitación que presenta el dióxido de carbono como fluido supercrítico es su carácter apolar, que le hace un disolvente poco adecuado para compuestos polares.

Además, la solubilidad del CO<sub>2</sub> también va siendo menor a medida que aumenta el peso molecular de los compuestos a disolver. Pero esta característica puede no ser una desventaja, ya que confiere una mayor selectividad en la extracción de compuestos y más posibilidades en el fraccionamiento de los mismos. Moyler estudió la solubilidad de diferentes ingredientes botánicos en CO<sub>2</sub> supercrítico [175, 176].

Como todas las sustancias, el CO<sub>2</sub> es susceptible de ser polarizado al variar la densidad, es decir, al variar la presión y la temperatura. Pero la polarizabilidad del CO<sub>2</sub> es mucho menor que la de los hidrocarburos, por ejemplo, para conseguir una polarizabilidad por unidad de volumen que sea comparable a la del ciclohexano líquido se necesita una presión de 2700 bar y 45 °C [177].

Existe una alternativa al uso de condiciones tan extremas que consiste en la adición de pequeñas cantidades (<10%) de modificadores. Son sustancias polares que, al ser añadidas junto con el CO<sub>2</sub>, varían enormemente la polaridad del fluido extractante.

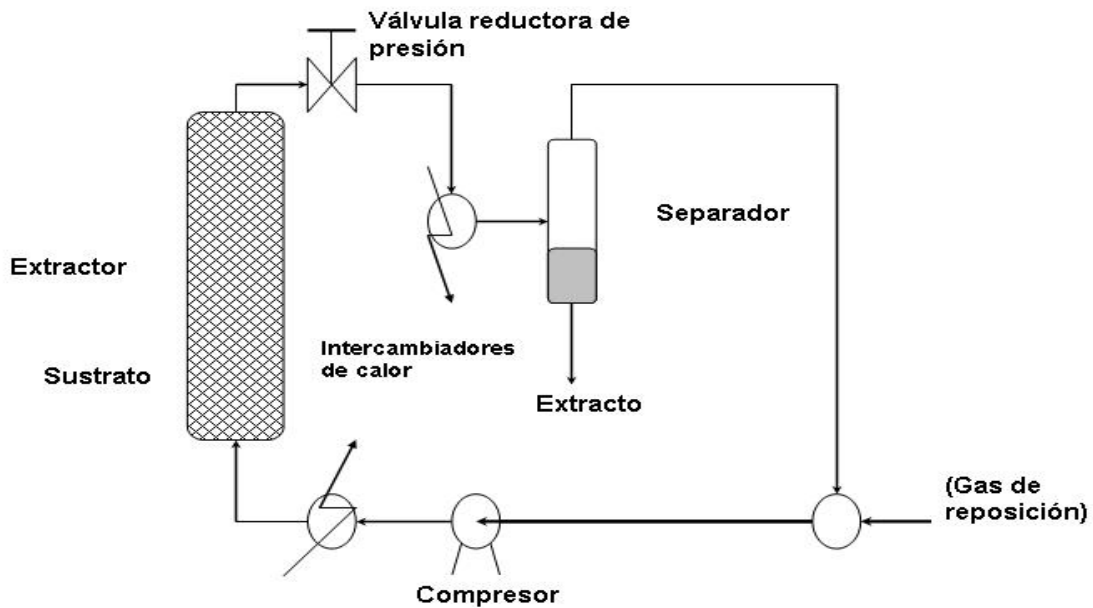
Los disolventes más frecuentemente usados como modificadores en tecnología de alimentos son el etanol, metanol y la acetona. Los inconvenientes del uso de modificadores son, en principio, los atribuibles al uso de disolventes orgánicos. Sin embargo, la baja cantidad en que intervienen y su solubilidad en el fluido supercrítico hacen que sus residuos en el extracto sean prácticamente inapreciables. No obstante, en tecnología de alimentos se tiende a evitar su uso o restringirlo al etanol.

#### 5.3.2.1 Características de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en procesos industriales.

Las aplicaciones de la SFE con CO<sub>2</sub> supercrítico en procesos industriales tienen que ver, en resumen, con las siguientes ventajas frente a otras técnicas convencionales:

- Muy buenas características disolventes, en cuanto a solubilidad y transferencia de materia. Hay una rápida difusividad de los compuestos en el fluido (difusión y viscosidad parecida a la de los gases), y alto poder de solvatación del fluido (densidad similar a la de los líquidos).
- La baja tensión superficial del CO<sub>2</sub> le permite una gran penetrabilidad a través de sólidos porosos y lechos empaquetados.
- Estas características hacen que pueda aplicarse a matrices muy heterogéneas, y le confieren gran versatilidad para operar con diferentes materias primas.
- Carácter no tóxico y no inflamable del CO<sub>2</sub>. Es una tecnología rápida, selectiva, limpia y segura [178].
- También hacen que sea mínimo o nulo el empleo de disolventes orgánicos. Tecnología limpia.
- Hay una fácil eliminación del fluido utilizado, y una ausencia casi total de residuos al final del proceso, que refuerzan la SFE como tecnología limpia. "Solvent-Free".
- Además, las extracciones con CO<sub>2</sub> supercrítico, permiten recirculación del fluido para su reutilización [179].
- Posibilidad de optimizar la selectividad de la extracción variando la densidad del fluido mediante el control de las variables de presión y temperatura.
- El control de la densidad del CO<sub>2</sub> hace posible el fraccionamiento de los compuestos extraídos mediante una despresurización en distintas etapas (en cascada). De este modo podemos precipitar compuestos selectivamente.
- Sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar, lo que se traduce en un bajo consumo energético. Al trabajar a baja temperatura es posible la separación, aislamiento, fraccionamiento o enriquecimiento de compuestos termolábiles.
- Al conferir un ambiente no oxidante, también posibilita la separación, aislamiento, fraccionamiento o enriquecimiento de compuestos fácilmente oxidables.

En la Figura 13 se muestra un proceso de extracción típico con fluidos supercríticos.



**Figura 13.** Proceso de separación típico al usar un fluido supercrítico como agente extractante.

Estas características han hecho que la SFE sea una poderosa alternativa a las extracciones con disolventes líquidos como la extracción Soxhlet, extracción ultrasónica, destilación, extracción de sólidos con disolventes líquidos, etc. La SFE puede ser un proceso limpio y menos peligroso que las extracciones convencionales ya que se pueden usar fluidos no tóxicos y además no inflamables. Además, puede ser mucho más rápida que las técnicas de extracción convencionales.

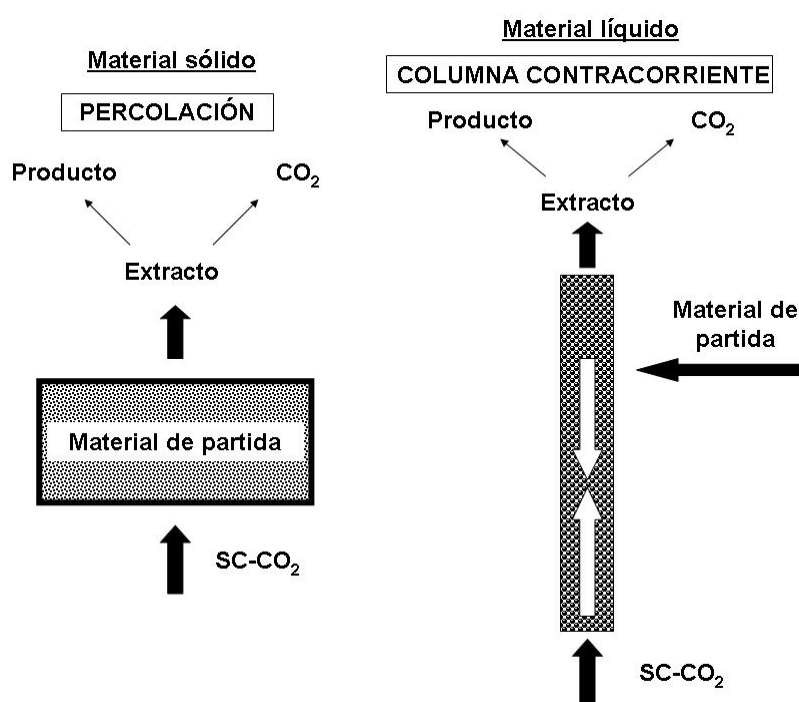
El desarrollo de procesos con fluidos supercríticos es una tecnología relativamente nueva y ventajosa frente a otras tecnologías existentes. Cubre un amplio campo de aplicaciones en diferentes sectores industriales, como la industria farmacéutica, química, electrónica, petroquímica, medio ambiente, de tratamiento de agua, de polímeros, y también se aplica a diversos procesos alimentarios.

### 5.3.2.2 Diseño de procesos de extracción supercrítica.

Como sucede con otras operaciones de extracción, la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico es un proceso de separación que depende básicamente de dos factores: transferencia de materia y equilibrio de fases [180].

El tipo de extracción depende del tipo de material de partida que se emplee. De este modo, puede haber distintas posibilidades: solutos 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 CO<sub>2</sub> supercrítico a través de la matriz sólida. En cambio, cuando el material que se quiere procesar es líquido o es un semisólido bombeable, el proceso que se lleva a cabo es una extracción en columna en contracorriente, en el que el CO<sub>2</sub> 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 forma continua, lo que supone una ventaja comercial [181]. En este tipo de procesos, se obtiene de este modo, un extracto con CO<sub>2</sub>, en la parte superior de la columna, y una mezcla de compuestos no extraídos por el CO<sub>2</sub> supercrítico, en la parte inferior de la columna, que recibe el nombre de refinado.



**Figura 14.** Procesos de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de muestras sólidas y líquidas.

La solubilidad de los compuestos en el CO<sub>2</sub> supercrítico depende básicamente de la presión y la temperatura, que van a determinar la densidad del fluido, y de la preparación de la muestra. La transferencia de materia también depende de la preparación de la muestra, especialmente del tamaño de partícula o la estructura del material de partida si es un sólido, o del flujo de muestra cuando el material de partida es un líquido. La transferencia de materia también depende de otros factores como la presión y temperatura del CO<sub>2</sub>, el flujo del CO<sub>2</sub>, y el material de relleno de la columna y el punto de introducción de muestra cuando se trate de un proceso de extracción en columna en contracorriente [181]. La relación entre el flujo de CO<sub>2</sub> y el flujo de muestra de alimentación se denomina relación disolvente/alimentación, ó S/F (*Solvent to Feed*). 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.

Controlando estos factores se pueden optimizar las condiciones de solubilidad y transferencia de materia, y de este modo diseñar procesos de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico eficaces.

### **5.3.3 Modelado de procesos de extracción supercrítica.**

El cálculo de equilibrio vapor-líquido (VLE) tiene gran importancia en el estudio de diversos procesos de separación, tales como la evaporación, destilación, extracción, etc. En particular, existe un creciente interés científico en el desarrollo de modelos termodinámicos capaces de representar el equilibrio entre fases asociado a procesos de extracción con disolventes supercríticos. El progreso de estos modelos permite el desarrollo de herramientas asistidas por ordenador para el diseño, simulación y optimización de tales procesos.

El factor clave en la extracción supercrítica (SFE) es la posibilidad de ajustar el poder disolvente, basado en la densidad, a través de pequeñas variaciones en las condiciones de operación, como la temperatura, presión, o empleo de co-solventes. El conocimiento de las composiciones en el equilibrio es esencial para evaluar la viabilidad de los procesos de separación y, por lo tanto, las mediciones experimentales del equilibrio entre fases y los modelos termodinámicos han recibido una considerable atención en la literatura durante las últimas dos décadas [182-185].

En muchas aplicaciones industriales de la SFE, el material de partida procesado es un producto natural, es decir, una mezcla multicomponente que generalmente contiene compuestos de elevado peso molecular y estructuras complejas. Por otro lado, el disolvente utilizado con mayor frecuencia es, sin duda, el CO<sub>2</sub>, y los co-solventes más empleados son etanol, agua, acetona, etc. [186, 187]. En estos sistemas complejos, los modelos termodinámicos no sólo deben ser capaces de representar el equilibrio entre fases a alta presión, sino que además lo deben hacer con mezclas heterogéneas, que pueden presentar importantes interacciones entre las sustancias que constituyen el material de partida o con los modificadores utilizados.

Particularmente, la teoría de contribución de grupos permite representar una amplia variedad de sustancias utilizando un número reducido de grupos funcionales. De este modo, los modelos basados en la estrategia de contribución de grupos presentan la ventaja de tener capacidad predictiva, siempre que los parámetros de los grupos que constituyen la mezcla estén disponibles.

La ecuación de estado de contribución de grupos (GC-EoS) [188, 189] fue desarrollada originalmente para componentes polares y no polares. Se basa en la función de partición de van der Waals generalizada y emplea las reglas de mezclado de composición local. La GC-EoS

proporciona una herramienta versátil para el cálculo de equilibrios de fase en mezclas con distinto número de componentes.

El método requiere conocer ciertas propiedades (fácilmente accesibles) de los componentes de la mezcla, tales como temperatura y presión crítica y composición de grupos de cada sustancia considerada. La GC-EoS, en principio, podría aplicarse arbitrariamente hasta valores altos de presión. Sin embargo, la tabla original de parámetros ha demostrado proporcionar una representación satisfactoria del equilibrio entre fases de diversas mezclas en un amplio intervalo de temperaturas pero con presiones inferiores a ~ 25 MPa.

Se han llevado a cabo revisiones recientes de la tabla de parámetros, para incluir compuestos de alto peso molecular, lo que ha permitido extender la representación apropiada del equilibrio entre fases por encima de 40 MPa [190, 191] para los sistemas considerados en estas revisiones.

Desde que se desarrolló el modelo GC-EoS, varios autores han ajustado y publicado nuevos parámetros, extendiendo considerablemente el número y tipo de sistemas que pueden ser representados. Por ejemplo, los parámetros para grupos alquenos fueron dados por Pusch y Schmelzer [192]. Schmelzer y col. [193] describieron los parámetros de grupo puro y parámetros de interacción binaria para el grupo fenol ACOH. Espinosa y col. [190] extendieron el modelo para incluir el grupo éster  $\text{CH}_2\text{COO}$ , el grupo éter  $\text{CH}_2\text{O}$ , el grupo triglicérido  $(\text{CH}_2\text{COO})_2\text{CHCOO}$ , etc. De este modo, la tabla de parámetros del modelo GC-EoS se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Una revisión que resume todos los parámetros disponibles hasta este momento ha sido recientemente publicada por Fornari [194].

Las ecuaciones y parámetros que describen el modelo GC-EoS se detallan en el ANEXO 2.

### **5.3.4 Aplicaciones industriales de la SFE con $\text{CO}_2$ .**

En este sentido, la SFE es la principal aplicación de los fluidos supercríticos y ha tenido un gran desarrollo en los últimos años cubriendo una amplia gama de aplicaciones que se basan en la capacidad para controlar las propiedades disolventes mediante la compresión o expansión del disolvente, teniendo básicamente dos objetivos:

- ⇒ Recuperar compuestos de interés o valor añadido a partir de matrices de diverso origen.
- ⇒ Eliminar compuestos no deseables de matrices que se quieren purificar o refinar (Por ejemplo: desacidificación de aceites [195, 196], eliminación de hexano de diversas sustancias [197], procesos de descafeinización [198, 199], etc.).

Ejemplos de aplicaciones industriales actuales de la extracción con fluidos supercríticos [174]:

- Esencias de especias y oleorresinas.
- Aceites esenciales: aromas y fragancias.
- Medicinas naturales.
- Plaguicidas naturales.
- Colorantes y conservantes.
- Tabaco libre de nicotina.
- Café y té descafeinados.
- Productos libres de colesterol.
- Tratamiento de residuos orgánicos industriales.
- Fraccionamiento de aceites y grasas.
- Desodorización de aceites y grasas.
- Extracción de aceites vegetales de semillas y granos.
- Extracción de lúpulo.
- Estabilización de zumos de frutas.

Del Valle y Aguilera también 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, fraccionamientos de grasas y aceites y descafeinización del café [200].

Aunque las propiedades disolventes de los fluidos supercríticos fueron inicialmente observadas por Hannay y Hogarth, en el año 1879 [201], es en el año 1974 cuando se presentan las primeras patentes de descafeinización del café por extracción con fluidos supercríticos [198, 199], y es entonces cuando la extracción con fluidos supercríticos despierta un interés en la tecnología de alimentos como técnica de procesado. Posteriormente se desarrollaron nuevos procesos de descafeinización tanto del café [202] como del té [203, 204] y otras plantas [205].

En otros casos el objetivo de la SFE será la extracción y aislamiento de metabolitos secundarios producidos en el metabolismo de las plantas, para después ser añadidos a los alimentos. De este modo, pueden cumplir funciones específicas como aromatizantes [206], saborizantes [207, 208], edulcorantes, colorantes [209, 210], fungicidas [211], bactericidas y antioxidantes naturales [212, 213].

En la actualidad existen numerosas plantas comerciales de extracción con fluidos supercríticos, por ejemplo, en Alemania (Flavex), Francia (Pfizer y Separex), Estados Unidos (US Nutra), Gran Bretaña (Universal Flavors), Suiza (Givaudan-Roure), Austria (Natex), India (SMS Natural

Products), Corea (IL WA), etc. En España, la compañía Solutex es pionera en la extracción y fraccionamiento supercrítico para la obtención ingredientes alimentarios funcionales. Son plantas que en general poseen extractores de 100-500 L, que operan en modo discontinuo o continuo, y que trabajan con diferentes materias primas [200]. Algunos grupos como el Instituto de procesos térmicos e Ingeniería ambiental (de TU Graz) o la compañía Natex obtienen con CO<sub>2</sub> supercrítico extractos a partir de materias primas estimulantes, hierbas medicinales o especias, para su posterior comercialización [214].

#### 5.3.4.1 Aplicaciones industriales de SFE con CO<sub>2</sub> en columna en contracorriente.

A continuación se detallan algunos ejemplos de procesos de SFE con CO<sub>2</sub> en contracorriente aplicados en la industria alimentaria con diferentes finalidades.

**Tabla 3.** Resumen de aplicaciones destacables de la extracción con fluidos supercríticos con columna rellena en contracorriente [215].

Aplicación	Autores	Año	Longitud columna extracción (m)	Diámetro interno columna (mm)	Tipo de relleno	Condiciones de extracción
Fraccionamiento de aceites de cítricos	Goto y col.	1997	2.4	20	Anillos Dixon, 3 mm d.i. ss	T <sup>a</sup> = 333 K P = 88 y 98 bar
Fraccionamiento de ésteres etílicos de ácidos grasos	Fleck y col.	1998	13.6	35	Estructurado (Sulzer)	T <sup>a</sup> = 333 K P = 145 bar
Fraccionamiento de aceites de cítricos	Sato y col.	1998	2.4	20	Anillos Dixon, 3 mm d.i., ss	T <sup>a</sup> = 313 y 333 K P = 88 bar
Fraccionamiento de aceites de cítricos	Budich y col.	1999	2	25	EX (estructurado)	T <sup>a</sup> = 323, 333 y 343 K P = 70 -130 bar
Desterpenación de aceites de cítricos	Budich y col.	1999	4	25	EX (estructurado)	T <sup>a</sup> = 323 y 343 K P = 80 bar
Separación de ésteres etílicos de aceite de pescado	Riha y Brunner	2000	12	68	Sulzer CY	T <sup>a</sup> = 313 - 353 K P = 65 – 195 bar

Fraccionamiento de aceites de pescado	Catchpole y col.	2000	1.92	203	Relleno al azar	$T^a = 313 - 333 \text{ K}$ $P = 200 - 300 \text{ bar}$
Fraccionamiento de aceite de limón	Kondo y col.	2002	2.4	20	Anillos Dixon, 3 mm d.i., SS	$T^a = 313 - 333 \text{ K}$ $P = 88 \text{ bar}$
Extracción de compuestos fenólicos de matrices acuosas	Persson y col.	2002	1.1	25	Estructurado (Sulzer)	$T^a = 313 \text{ y } 343 \text{ K}$ $P = 150 \text{ y } 200 \text{ bar}$
Extracción de etanol de soluciones acuosas	Budich y Brunner	2003	1.5	35	Relleno de malla SS	$T^a = 333 \text{ K}$ $P = 100 \text{ bar}$
Desacidificación de aceite de salvado de arroz	Dunford y col.	2003	1.66	44.5	Pro-Pak (SS 0,16 pulgadas)	$T^a = 353 \text{ K}$ $P = 138 \text{ bar}$
Extracción de aceite de oliva	Hurtado-Benavides y col.	2004	1.8	17.6	Anillos Raschig, Fenske y Dixon, y bolas de vidrio	$T^a = 313 \text{ K}$ $P = 200 \text{ bar}$

#### 5.3.4.2 Otras aplicaciones de los fluidos supercríticos.

Como se ha descrito anteriormente, la principal aplicación de los fluidos supercríticos es su empleo como técnica de extracción y fraccionamiento, pero además, los fluidos en condiciones sub- y supercríticas pueden tener otras aplicaciones en diferentes campos:

- Se pueden emplear en el tratamiento con altas presiones para garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos, como medio de esterilización de esporas y microorganismos [216].
- Se emplean en procesos de extrusión, en los que se aplican a los fluidos supercríticos altas presiones de extrusión para la producción de nuevos alimentos. Además, esta nueva modalidad de extrusión permite el uso de ingredientes termolábiles como proteínas del suero, vitaminas o compuestos aromáticos [217].

- Una de las aplicaciones con mayor desarrollo de los fluidos supercríticos es la **cromatografía supercrítica (SFC)**, como técnica analítica y de purificación. La SFC es un tipo de cromatografía en la que la fase móvil es un fluido supercrítico, generalmente CO<sub>2</sub>. Las propiedades disolventes de los fluidos supercríticos permiten la disolución selectiva de los analitos al variar la densidad del fluido supercrítico, determinada por su presión y temperatura. La mayoría de las separaciones se llevan a cabo por modificación de la densidad. La fuerza disolvente de la fase móvil puede también modificarse mediante la adición de un segundo eluyente o modificador.

La SFC ha tenido un mayor desarrollo es en el ámbito farmacéutico, donde se emplea a escala analítica y preparativa (Prep-SFC), y permite de manera eficaz la obtención de compuestos puros. El interés de la Prep-SFC se basa en la facilidad de recuperar los compuestos aislados mediante una simple descompresión en la que se elimina espontáneamente la fase móvil [218]. Además, la posibilidad de obtener productos exentos de disolventes y su carácter limpio y no contaminante, potencian el interés de la Prep-SFC. La SFC ha sido objeto de atención en aplicaciones en tecnología de los alimentos y más concretamente en purificación de compuestos lipídicos, como la purificación de ésteres de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de aceite de atún [219] o la separación de componentes de aceite crudo de palma (TAGs, DAGs, FFAs, carotenos, tocoferoles y tocotrienoles) [220].

Debido a las limitaciones que presentan técnicas como HPLC o cromatografía de gases (GC) [221] para el análisis de algunos compuestos lipídicos, tanto simples como complejos, la SFC se presenta como una alternativa muy prometedora [222]. Se han desarrollado métodos analíticos basados en la SFC de TAGs de aceites de pescado [223] y de aceites vegetales [224], de lípidos insaponificables [225], de ésteres metílicos de ácidos grasos saturados e insaturados [226], y ácidos grasos en alimentos [227].

Una ventaja que presenta la SFC es su posible acoplamiento a otras técnicas de extracción como la SFE. Por ejemplo, el acoplamiento SFE-SFC fue empleado por Ibáñez y col. para la determinación de tocoferoles [228].

- Los fluidos supercríticos se pueden utilizar también en la preparación de aerogeles, ya que, debido a su baja tensión superficial, permiten el secado del gel manteniendo su estructura [229]. Estas estructuras se pueden usar para la inmovilización de diferentes catalizadores. Se emplean en catálisis orgánica, inorgánica y enzimática [230].

- Uno de los nuevos usos de los fluidos supercríticos es la cristalización supercrítica, técnica que se emplea en el diseño de partículas sobre todo en la industria farmacéutica. Hay diferentes métodos para llevarla a cabo, como son la RESS (rapid expansion of a supercritical solution) [231], SAS (solvent-antisolvent) [232, 233], atomización supercrítica o la encapsulación supercrítica [234, 235].

- La utilización de fluidos supercríticos como **medio de reacción** en síntesis orgánica de diversos productos ha demostrado ventajas frente al empleo de disolventes tradicionales [236]. En el ámbito de los aceites y grasas, King y col. describieron un proceso de hidrogenación de aceites vegetales utilizando mezclas de CO<sub>2</sub> supercrítico e hidrógeno. Este proceso se llevó a cabo con presiones superiores a 2000 psi y temperaturas de 120-140 °C y un catalizador convencional de Ni [237].

Se han llevado a cabo procesos de transesterificación de aceite de colza [238] y de soja [239] para la producción de biodiésel en metanol supercrítico.

El uso de CO<sub>2</sub> supercrítico como medio de reacción ha tenido un rápido crecimiento en los últimos años [240-244]. Las propiedades solventes del CO<sub>2</sub> supercrítico se pueden regular ajustando la presión y la temperatura. La difusividad de los sustratos en CO<sub>2</sub> es mayor que en otros disolventes orgánicos y permite una excelente transferencia de materia [245]. Además, el CO<sub>2</sub> se puede eliminar fácilmente de los productos de reacción, minimizando los costes de limpieza, y tiene la ventaja adicional de ser respetuoso con el medio ambiente [245, 246].

#### 5.3.4.3 Extracción y fraccionamiento de aceites y grasas con CO<sub>2</sub> supercrítico.

La extracción y fraccionamiento de grasas y aceites, tanto de origen vegetal como de origen animal, es un importante campo de aplicación de la SFE, donde destacan las ventajas que ofrece esta técnica frente a otras metodologías convencionales.

Dentro de los posibles procesos de extracción y fraccionamiento de grasas y aceites están la destilación, la extracción con disolventes y la extracción con fluidos supercríticos.

- ⇒ El uso de la destilación resulta poco conveniente para aceites vegetales debido a la presencia de triglicéridos, que pueden romperse a las altas temperaturas de operación necesarias.
- ⇒ La extracción con disolventes siempre deja un residuo inherente en el aceite, particularmente de hexano que es el más comúnmente usado, pero que actualmente resulta cada vez más inaceptable en productos para el consumo humano, y además su inflamabilidad lo hace poco deseable en el ámbito industrial.
- ⇒ La extracción con fluidos supercríticos, específicamente con dióxido de carbono, resulta una alternativa interesante para la extracción y fraccionamiento de aceites vegetales.

Mangold señala que las ventajas de la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico con respecto a la extracción con disolventes orgánicos, en función de la calidad del aceite obtenido, son las siguientes [247]:

- Aceites prácticamente libres de fosfolípidos y glicolípidos. Los aceites convencionales contienen hasta un 1–3 % de lípidos polares.

- Menor contenido de hierro y gosispol.
- Aceites más claros y desodorizados.
- Menores pérdidas por refinación y menor requerimiento de sosa cáustica.

Brunner afirma que la separación de ácidos grasos libres mediante destilación a vacío es eficaz, pero usando CO<sub>2</sub> supercrítico, dicha separación se puede llevar a cabo a temperaturas mucho más bajas [248].

Molero Gómez y Martínez de la Ossa compararon la extracción de germen de trigo con CO<sub>2</sub> supercrítico y 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 [249].

Friederich y List compararon la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico y con hexano de aceite de soja, comprobando que se obtenían rendimientos similares (en torno al 20%) y la misma composición en FAs [250].

Debido a sus condiciones suaves de extracción y la atmósfera no oxidante que proporciona, la SFE con CO<sub>2</sub> supercrítico es una herramienta ideal para la extracción de antioxidantes lipídicos [251]. No obstante, también se ha comprobado que a veces la estabilidad oxidativa de los aceites de nuez [252-254] y de girasol [255] extraídos por SFE con CO<sub>2</sub> es menor que en el aceite obtenido a través de métodos mecánicos. Se piensa que estas diferencias se podrían deber a contenido en O<sub>2</sub> que podría tener el CO<sub>2</sub> supercrítico empleado en estos estudios. Esta inestabilidad es mayor cuando se tratan aceites refinados con CO<sub>2</sub> supercrítico, ya que el contenido de tocoferoles de partida es menor, pudiéndose mejorar añadiendo trazas de ácido ascórbico [255].

Cheung y col. compararon la extracción de lípidos a partir de algas pardas (*Sargassum hemiphyllum*) mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico y extracción Soxhlet. Se estudiaron presiones de 24.1-37.9 MPa y temperaturas de 40-50 °C. Con presión de 37.9 MPa, tanto con 40 como con 50 °C, se obtuvieron altos rendimientos, comparables a la extracción Soxhlet. Además, en estas condiciones se obtuvieron cantidades de FAs ω-3 significativamente superiores mediante SFE [256].

Se debe valorar también las diferencias en composición que se pueden apreciar en los extractos obtenidos mediante diferentes técnicas de extracción. Díaz-Maroto y col. estudiaron las diferencias de composición entre extractos de hinojo (*Foeniculum vulgare Mill.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) obtenidos por SFE y por destilación simultánea (SDE) [257].



A continuación se describen algunos trabajos publicados referentes a extracción y fraccionamiento de aceites y grasas con CO<sub>2</sub> supercrítico:

- Se han publicado muchos trabajos que se centran en la extracción y fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico de lípidos a partir de diferentes tipos de aceites:

- ⇒ Concentrado en tocoferoles y tocotrienoles a partir de aceite de palma rojo [258] y extracción, fraccionamiento [259, 260] y modelado [261] de lípidos a partir de aceite de palma.
- ⇒ Tocoferoles [262] y otros lípidos [263] a partir de aceite de germen de trigo.
- ⇒ Lípidos a partir de aceite de jojoba [264], de piel de aceituna [265, 266], de madera de cedro [267], etc.
- ⇒ Hansen y Artz estudiaron el fraccionamiento de aceite de canola oxidado por calor. En este trabajo se fraccionaron los productos de degradación de los TAGs [268].
- ⇒ Fraccionamiento y purificación de aceite de fritura con CO<sub>2</sub> supercrítico. El mejor rendimiento se obtuvo a 35 MPa y 55° C [269].
- ⇒ Reglero y col. estudiaron la extracción de compuestos minoritarios del aceite de oliva mediante extracción supercrítica en columna en contracorriente, evaluando diversos tipos de relleno [270, 271].
- ⇒ Dobarganes-Nodar y col. desarrollan un proceso de extracción y caracterización por fluidos supercríticos del aceite de soja [272].

- En el campo de los aceites esenciales hay también numerosas aplicaciones de la tecnología supercrítica. Reverchon llevó a cabo una revisión de la extracción y fraccionamiento supercrítico de aceites esenciales y productos similares a partir de diferentes semillas, hojas, flores, frutas, hierbas, vainas, raíces y bayas [273].

- Se han realizado numerosos estudios de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de aceites y grasas a partir de semillas vegetales [274, 275]. De este modo se estudió la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de lípidos a partir de semillas de lino [276], sésamo [277], algodón [278, 279], nuez [253, 280], soja [281].

Ya desde los primeros trabajos de extracción de grasas y aceites mediante SFE a partir de semillas vegetales, se comprobó que una buena transferencia de materia en el proceso y por tanto, el rendimiento, dependían del tamaño de partícula del material de partida [282, 283].

- Cabe destacar el gran número de trabajos publicados acerca de la extracción y fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico de lípidos a partir de salvado o fibra vegetal de distinto origen:

- ⇒ Lípidos a partir de salvado de centeno [284].
- ⇒ Lípidos a partir de salvado de arroz [285, 286].
  - Se puede destacar un estudio en el que se pretendió extraer material graso y ceras a partir de salvado de arroz. En este trabajo, a 28 MPa y 70 °C se obtienen mejores rendimientos que en la extracción con hexano. Con SFE el extracto tiene menos color, más ceras y más FAs de cadena larga [287].
  - Hernández y col. también proponen extraer lípidos a partir de salvado de arroz con CO<sub>2</sub> y propano supercrítico en vez de emplear hexano [288].
  - Xu y Godber extraen el  $\gamma$ -orizanól a partir de salvado de arroz [289].
- ⇒ Acoplamiento de SFE y SFC para la extracción de esteroides y ésteres de esterol a partir de salvado de maíz [290].

- Hannigan extrajo la grasa de las patatas fritas con CO<sub>2</sub> supercrítico, obteniendo patatas fritas light y manteniendo intactos los carbohidratos y las proteínas [291]. Neff y col. determinaron la composición de los aceites extraídos de patatas fritas por SFE [292].

- Se puede destacar una patente pionera sobre un proceso de extracción de materia grasa vegetal en el que el material desgrasado se empleaba en la fermentación alcohólica de bebidas [293].

- Otro importante campo de estudio ha sido la extracción de lípidos a partir de carne [294], de grasa animal [295, 296] y de extracción y fraccionamiento de colesterol del sebo de la carne de vaca [297]. Cabe destacar una patente de un proceso de refinado de grasas animales por SFE en la que al final del proceso estas grasas no sufrían ningún tipo de modificación química [298].

- Una aplicación sobre la que se han realizado numerosos estudios es el fraccionamiento [299, 300] y solubilidad [301] en CO<sub>2</sub> supercrítico de la grasa de la leche.

- Otra aplicación de la SFE que ha sido objeto de numerosas publicaciones y patentes ha sido la extracción de colesterol a partir de diferentes matrices, como la yema de huevo [302], grasa para elaborar salsas [303], grasa de la leche [304] u otros alimentos como carne, huevos, productos lácteos y grasas animales [305].

- En numerosos trabajos se han empleado productos marinos también como material de partida en procesos de SFE para el aislamiento de lípidos, especialmente FAs insaturados. Los productos de partida pueden ser diversos: vísceras de calamar [306], vísceras de caballa [307], algas marinas [308]. También hay estudios de fraccionamiento de FAEEs de aceite de Menhaden con CO<sub>2</sub> supercrítico [309].

Perretti y col. fraccionaron FAEEs de aceite de pescado con CO<sub>2</sub> supercrítico con el objetivo de obtener una fracción lipídica rica en FAs ω-3. Este estudio se llevó a cabo con un gradiente de temperaturas en tres secciones de la columna de extracción (40/50/60 °C). Se observó que incrementando la presión (150 bar) y el flujo de CO<sub>2</sub> (5 kg/h) aumentaba la concentración de EPA+DHA en la parte inferior de la columna [310].

Las microalgas marinas son una importante fuente renovable de lípidos bioactivos con una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Por esta razón, estos organismos se han utilizado frecuentemente como material de partida en procesos de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico [311, 312].

En este sentido, Andrich y col. emplearon *Nannochloropsis sp.*, una microalga comúnmente utilizada en acuicultura y con un elevado contenido en PUFAs, en procesos de SFE [313]. En este estudio se destacó la mayor seguridad de esta tecnología comparada con la extracción con hexano, un impacto medioambiental despreciable, un tiempo más corto de extracción y unos productos finales de mayor calidad.

Mendiola y col. emplearon extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico para obtener extractos lipídicos con actividad antimicrobiana a partir de la microalga *Chaetoceros muelleri*. Esta actividad antimicrobiana estaba relacionada con el contenido en TAG y DPA de los extractos [314].

Del mismo modo, Cheung extrajo ácidos grasos ω-3 C18, C20 y C22 a partir del alga roja subtropical *Hypnea charoides*, empleando temperaturas de 40-50 °C y presiones de 24.1-37.9 MPa [315].

- En relación con este campo se debe destacar un método patentado para la obtención de ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos, preferiblemente FAEEs insaturados, a partir de diferentes fuentes biológicas. Este método tiene lugar de una forma continua y combina una reacción con alcoholes de bajo peso molecular en la que los ácidos grasos se transesterifican, extracción con CO<sub>2</sub> comprimido y cromatografía [316].

También es destacable una patente sobre un método en el que se combinó SFE y SFC en presencia de un modificador (alcohol) en una columna de sílice recubierta con nitrato de plata, para purificar DHA y EPA metil ésteres a partir de aceite de pescado. La purificación de estos compuestos tuvo lugar en unas condiciones más suaves que mediante destilación o cromatografía de líquidos, en las cuales los dobles enlaces pueden degradarse por efecto del calor y el oxígeno [317].

En otras patentes los PUFAs se concentraron previamente a los procesos de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, mediante una reacción en la que parte de los ácidos grasos saturados presentes en la mezcla forman aductos con urea [318].

- Walker y col. llevaron a cabo procesos de SFE con CO<sub>2</sub> para extraer PUFAs con valor terapéutico a partir de hongos como el *Pythium irregulare*, empleando condiciones de temperatura de 40-60 °C y presión de 13.7 a 27.5 MPa [319].

- Se han optimizado procesos de extracción de lípidos mediante SFE a partir de diferentes matrices como aceites de hongos usando CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CHF<sub>3</sub> y SF<sub>3</sub> [320], aceites de productos encapsulados [321], lípidos de la yema de huevo [322], TAGs a partir de la grasa de la mantequilla [323], etc.

También hay trabajos sobre extracción y fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico de aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis*) [324], oleoresina de pimentón [325], aceite de hinojo [326], licopenos [327, 328] y principales carotenoides [329, 330] a partir de tomate, y sesquiterpenos, alquenos y alcanos a partir de aceite de oliva virgen [331].

Un estudio de extracción a partir laurel obtiene rendimientos similares con SFE y con éter de petróleo 14-28% [332].

McLean y Drake revisaron los métodos existentes para la determinación de grasas y aceites incluyendo a la SFE [333].

Señoráns y Markides realizaron un acoplamiento “on line” entre la SFE-SFC para el análisis de vitaminas liposolubles y otros lípidos en muestras acuosas [334].

- Se han publicado trabajos en los que se estudia si el empleo de etanol como modificador mejora la extracción [259, 279, 335], especialmente cuando el objetivo es extraer lípidos polares, por ejemplo fosfolípidos [336]. En este sentido, otro estudio en el que se pretendían extraer lípidos a partir de semillas de girasol demostró que con etanol mejoraba la extracción de fosfolípidos y la de FAs (con potencial en la desacidificación de aceites) [337].

- Para la optimización de los procesos de extracción y fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico para compuestos lipídicos, se debe tener en cuenta el estudio de los parámetros de solubilidad de estos compuestos en el CO<sub>2</sub> supercrítico. Hay estudios de solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico de mezclas de TAGs [338], de mezclas de FAs, ésteres y TAGs [339], de FAs [340], y de FAEEs en CO<sub>2</sub> sub- y supercrítico [341].

- Brunner ha estudiado ampliamente el fraccionamiento de grasas y aceites con CO<sub>2</sub> supercrítico en columna en contracorriente para la desacidificación de aceites mediante la extracción de ácidos grasos libres, la separación de metil oleato y escualeno, la extracción de tocoferoles del aceite, la separación de escualeno de los tocoferoles y esteroides, la extracción de carotenoides del aceite de palma, y la separación de ésteres de ácidos grasos poliinsaturados del aceite de pescado, entre otros [248].

### 5.3.5 Otras técnicas de extracción: Destilación molecular.

Existen otras tecnologías que también pueden ser adecuadas para la extracción de diferentes tipos de compuestos, entre los que se encuentran los compuestos lipídicos, como es el caso de la destilación molecular. Esta tecnología consiste en la separación por destilación, de forma continua y mediante alto vacío. Se distingue de la destilación convencional por el alto vacío, la menor temperatura, el menor tiempo de residencia y la baja concentración de oxígeno, a los que son sometidos los materiales. Las variables que son objeto de estudio son la temperatura de evaporación, temperatura de condensación, flujo de alimentación, temperatura de alimentación, presión de operación, etc).

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, química, farmacéutica, del plástico, aceites minerales, cosmética y perfumería.

Se han descrito procesos de destilación molecular aplicados a:

- ⇒ Recuperación de compuestos de alto valor añadido (esteroles y tocoferoles) a partir de destilados desodorizados [342-344].
- ⇒ Refinación física de aceites vegetales [345].
- ⇒ Concentración de monoglicéridos [346].
- ⇒ Recuperación de antioxidantes naturales a partir de diversas fuentes vegetales [347].
- ⇒ Recuperación de carotenoides a partir de aceite de palma [348].

Pietsch y Jaeger optimizaron un proceso de concentración de escualeno a partir de aceite de hígado de tiburón mediante destilación molecular y compararon estos resultados con los obtenidos mediante otras técnicas alternativas como la SFE. Obtuvieron un producto con una pureza de escualeno superior al 97%, y encontraron las mejores condiciones para el proceso empleando un flujo de alimentación de 4 kg/h, temperaturas entre 215 y 230 °C y presión de 0,1 mbar. Estos autores indican que la extracción con fluidos supercríticos presenta algunas ventajas frente a la destilación molecular, ya que, con SFE, se consiguen mejores resultados de pureza y rendimiento de escualeno empleando temperaturas más suaves que no afectan la estructura del escualeno (termolábil). Las principales desventajas de la SFE son los costes de infraestructura y energía superiores a los correspondientes a la destilación molecular (2 kW/kg frente a 9kW/kg) [349].

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.

### 5.3.6 Refinado de aceites mediante SFE con CO<sub>2</sub>.

La refinación de aceites comestibles tiene como objetivo la eliminación de compuestos que no sean TAGs, incluyendo FFAs, fosfoacilgliceroles, esteroides, pigmentos, glucósidos, ceras, hidrocarburos y otros compuestos indeseables bien por su toxicidad, porque comunican características de color, olor y sabor no agradables al consumidor, o bien porque afectan a la estabilidad oxidativa del producto [350]. Este es el caso de los aceites lampantes, es decir, aceites que por sus propiedades físico-químicas o sensoriales no son aptos para el consumo humano. El objetivo del proceso de refinación es obtener un aceite o grasa suave, casi insípida, muy ligeramente coloreada y estable.

Los dos principales sistemas de refinado son el refinado alcalino y el refinado físico (arrastre de vapor o neutralización destilativa), que se emplean para extraer los ácidos grasos libres.

#### 5.3.6.1 Refinado alcalino.

El método clásico de refinado alcalino comprende normalmente las etapas que se exponen en la Tabla 4:

**Tabla 4.** Etapas del proceso de refinado alcalino de aceite.

<i>1ª etapa</i>	Desgomado con agua para eliminar los fosfolípidos fácilmente hidratables.
<i>2ª etapa</i>	Adición de pequeñas cantidades de ácido fosfórico o cítrico para convertir los restantes fosfolípidos no hidratables (sales de Ca, Mg) en fosfolípidos hidratables y eliminar metales.
<i>3ª etapa</i>	Neutralización de los ácidos grasos libres con un ligero exceso de solución de hidróxido sódico, seguida de la eliminación por lavado y centrifugación de los jabones y de los fosfolípidos hidratados, y de un secado del aceite.
<i>4ª etapa</i>	Blanqueo con tierras minerales naturales o activadas con ácido para adsorber los compuestos coloreados y para descomponer los hidroperóxidos.
<i>5ª etapa</i>	Desodorización para eliminar los compuestos volátiles, principalmente aldehídos y cetonas, con bajos umbrales de detección por el gusto y el olfato. La desodorización es fundamentalmente un proceso de destilación con vapor que se lleva a cabo a bajas presiones (2-6 mbares) y elevadas temperaturas (180-220 °C).

En algunos casos es conveniente añadir también una etapa de winterización, que tiene por objeto eliminar aquellos compuestos que cristalizan a temperaturas bajas, como son las ceras y triglicéridos saturados, que enturbian el aceite refinado final y provocan rechazo del consumidor [351].

La neutralización está considerada como la etapa de mayor impacto económico. Es en esta etapa el rendimiento es relativamente bajo, y es donde se producen las mayores pérdidas en el proceso, ya que una pequeña cantidad de aceite neutro queda englobado en el subproducto o “pastas de refinación”. Además, se añade un exceso de 10-20% de la cantidad estequiométrica de sosa requerida, para favorecer la saponificación, lo que origina una serie de reacciones secundarias, como son la saponificación de una pequeña parte de los triglicéridos [352].

Por otra parte en la neutralización, la introducción de una fase polar hace que se elimine una cantidad significativa de compuestos minoritarios de interés, principalmente esteroides y tocoferoles [353, 354].

También se genera una cantidad considerable de efluente líquido. Los jabones de las pastas de refinación se disocian generalmente con ácido sulfúrico, recuperándose los ácidos grasos libres junto con sulfato sódico y vapor de agua ácida que contiene grasa.

#### 5.3.6.2 Refinado físico.

En el refinado físico, los ácidos grasos se eliminan mediante un procedimiento de destilación al vapor (arrastre) similar a la desodorización. Aunque la volatilidad de los ácidos grasos libres es baja (depende de la longitud de la cadena), este proceso requiere temperaturas más elevadas que las requeridas sólo para la desodorización.

En la práctica, una temperatura máxima de 240-250 °C es suficiente para reducir el contenido de ácidos grasos libres a niveles de alrededor del 0,05-0,1 por ciento.

Hoy en día, se trata de excluir el oxígeno del proceso, ya que la oxidación es la responsable de los peores efectos del deterioro de la calidad del aceite. Por esta razón, se intenta sustituir el vapor de arrastre por nitrógeno [355]. Sin embargo, la desodorización y blanqueado de carotenoides también se lleva a cabo con arrastre de vapor.

Generalmente, se prefiere el refinado físico a los procesos químicos [350] por su contribución a simplificar el proceso global. La refinación física es más complicada desde el punto de vista técnico, pero simplifica el número de etapas y de separaciones de fases.

El aceite idóneo para la refinación física no debe tener un contenido en ácidos grasos libres muy superior al 2% [356, 357].

Cabe la posibilidad de neutralizar los aceites con reactivos químicos hasta una acidez que pueda ser eliminada mediante destilación. Es lo que se denomina “refinación mixta”, y tiene por objeto minimizar pérdidas y defectos en el aceite.

### 5.3.6.3 Posibles reacciones secundarias durante el procesamiento a alta temperatura.

La posibilidad de que las elevadas temperaturas de la desodorización y arrastre tengan efectos negativos ha sido motivo de preocupación. Hay una fuerte dependencia de la estabilidad del aceite con la relación de tiempo/temperatura de desodorización, debido fundamentalmente a la pérdida de antioxidantes naturales [358].

Ya en 1967-79, la Sociedad Alemana de Investigación sobre las Grasas (DGF) definió los límites superiores de las condiciones de desodorización (240 °C para 2 horas, 270 °C para 30 min).

Durante estos procesos pueden tener lugar las siguientes reacciones adversas:

- Isomerización *cis-trans*.

Durante la desodorización/refinación física del aceite de oliva, el contenido en ácidos grasos *trans* depende tanto de la relación temperatura-tiempo de tratamiento, como del flujo del gas de arrastre y del espesor de la capa del aceite del desodorizador [359].

- Dimerización y polimerización.

La temperatura de tratamiento tiene una importancia fundamental en la formación de compuestos de polimerización. La formación de estos compuestos puede contribuir a modificar las propiedades nutricionales de los aceites [360].

- Conjugación de dobles enlaces.

- Acil-migración de los ácidos grasos en el triglicérido.

El aceite de oliva contiene ácido oleico (monoinsaturado) principalmente en la posición *sn-2* de la molécula de glicerina. Si la temperatura de desodorización es elevada los ácidos grasos saturados, originalmente situados en posición *sn-1* y *sn-3* del aceite, van a migrar a la posición *sn-2*, produciéndose así, un incremento significativo en el porcentaje de ácidos grasos saturados en esta posición [356, 357] lo que conlleva una reducción en el valor nutricional del aceite.

- Pérdidas físicas.

Algunas pérdidas físicas ocasionadas en estos procesos son muy convenientes, tales como la eliminación de los malos olores, plaguicidas y compuestos aromáticos policíclicos. En cambio, otras pérdidas de compuestos con valor nutritivo, como tocoferoles y esteroides, son indeseables. La mayor disminución en el contenido de esteroides se registra durante la neutralización y la desodorización [354]. El aceite de soja refinado contiene un 25-32% menos de fitoesteroides que el aceite crudo. Aunque el aceite de salvado de arroz crudo es rico en orizanol (~1.5%), no se detecta orizanol en este tipo de aceite después de su refinado [361]. Además, también se producen alteraciones en la estructura del beta-sitosterol [362].

La disminución es muy acusada en el caso de los tocoferoles [363]. Aproximadamente el 32% de los tocoferoles presentes en el aceite se pierden durante el refinado debido a su volatilidad y parcial degradación [361]. También se eliminan, especialmente durante



la desodorización, compuestos clorofílicos [364] e hidrocarburos de diversa naturaleza, como el escualeno.

En conclusión, se puede observar que durante los procesos tradicionales de refinado del aceite se producen reacciones no deseadas. En la práctica, estos efectos se intentan minimizar mediante el trabajo a unas condiciones de temperatura que sean lo más moderadas posibles, generalmente no superiores a 250 °C. No obstante, estas etapas de refinado tradicionales pueden reducir el valor nutritivo de las grasas y aceites mediante la eliminación o alteración química de algunos componentes [117].

#### 5.3.6.4 Procesos alternativos de refinado de aceites.

En los procesos de refinado tradicionales de aceites además de trabajar con reactivos químicos tóxicos y peligrosos, se producen y descargan varios tipos de residuos y hay emisiones a controlar como son los vertidos de aguas y sólidos, emisiones gaseosas, etc.

En este sentido, la tecnología supercrítica sería una metodología mucho más limpia para la refinación del aceite. Además, se minimizarían las reacciones secundarias no deseadas producidas en los métodos tradicionales.

También se han descrito procesos alternativos de refinado de aceites, como la extracción líquido-líquido con 98% de metanol [350] o la destilación sin ayuda de arrastre de vapor [365].

Zosel describió la desodorización de aceite comestible con CO<sub>2</sub> a temperaturas de 50-250 °C y presiones de 10-25 MPa en un mecanismo continuo en contracorriente [366].

Nikolov y col. estudiaron la potencial aplicación de CO<sub>2</sub> supercrítico para desacidificar aceite vegetal y eliminar componentes responsables del aroma en harina de soja [367].

Ziegler y Liaw proponen un método para desodorizar y desacidificar aceites comestibles con CO<sub>2</sub> denso. Se partió de un aceite crudo de cacahuete tostado y se logró una desodorización y desacidificación eficiente a 47 °C y 20 MPa. En este estudio comprobaron que la solubilidad de los FAs en CO<sub>2</sub> era inversamente proporcional a la longitud de cadena en la región supercrítica, y que a igual longitud de cadena, era directamente proporcional al grado de insaturaciones. También comprobaron que la solubilidad de pirazina y sus derivados (responsables el aroma de este tipo de aceite tostado) en CO<sub>2</sub> supercrítico, era inversamente proporcional a su grado de sustitución de grupos metil (peso molecular). Llegaron a la conclusión de que la SFE con CO<sub>2</sub> puede ser muy útil para desacidificar aceites y grasas caras, especialmente cuando tienen un alto grado de acidez inicial o cuando la calidad y pureza de los componentes extraídos es importante [368].

Se han llevado a cabo procesos de refinado con CO<sub>2</sub> supercrítico en aceite de palma [369], aceite de soja [370] y aceite de germen de trigo [371].

En un proceso de desacidificación de aceite crudo de salvado de arroz se comprobó que la utilización de un gradiente de temperatura en la columna mejoró la eliminación de los FAs evitando pérdidas de TAGs en el extracto [372].

Danielski y col. desacidificaron salvado de arroz de manera eficaz con CO<sub>2</sub> supercrítico a 250 bar y 67 °C, obteniendo aceite de arroz refinado [373].

La desacidificación mediante SFE con CO<sub>2</sub> ha sido estudiada en profundidad en el aceite de oliva: Brunetti y col. estudiaron este proceso a partir de muestras con diferente contenido en FAs empleando CO<sub>2</sub> a 20-30 MPa y a 40-60 °C. Demostraron la viabilidad en el uso de CO<sub>2</sub> supercrítico para la desacidificación del aceite de oliva, especialmente cuando contiene un alto contenido en FAs (<10%) [195].

Bondioli y col. optimizaron el proceso de desacidificación de aceite de oliva mediante SFE, concluyendo que las mejores condiciones para este proceso eran presiones superiores a 130 bares, relación de flujo no superior a 100 kg CO<sub>2</sub>/Kg aceite (por encima de este valor aumentan las pérdidas de rendimiento del proceso y no aumenta considerablemente la eliminación de FAs), gradiente de temperatura en la columna 50/40/30 °C y punto medio de introducción de aceite en la columna [374].

Briones y col. probaron también que los ácidos grasos se podían eliminar a partir de destilados desodorizados de aceites mediante SFE con CO<sub>2</sub> a 25 °C y 121 bares [375].

#### 5.3.6.5 Aprovechamiento de subproductos de la refinación de aceites.

La Normativa española mediante el Real Decreto 308/1983, de 25 de Enero (BOE n. 44 de 21/2/1983) [376] por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de aceites vegetales comestibles, obliga a las industrias (almazareros, extractores, refinadores, envasadores, etc.) a someter a los aceites de semillas oleaginosas a refinación completa previa su utilización como aceites para consumo humano. De acuerdo con este Real Decreto, los distintos tipos de aceite de oliva también deben someterse a procesos de refinación, con la excepción del aceite de oliva que ha sido extraído del fruto del olivo únicamente mediante métodos mecánicos o físicos (aceite de oliva virgen).

La industria química, la cosmética y la farmacéutica se abastecen con regularidad de los subproductos obtenidos de la industria del aceite, para elaborar jabones, detergentes, cremas, ceras para la madera, velas, pinturas, barnices, lubricantes, glicerina, piensos animales, abonos y carburantes ecológicos (biodiésel) entre otras sustancias.

Conviene destacar que la industria de aceites vegetales genera grandes cantidades de estos subproductos en los que se concentran componentes minoritarios como esteroides, escualeno y tocoferoles. Estos compuestos tienen gran interés como productos de alto valor añadido, ya que debido a su actividad funcional, pueden emplearse en la elaboración de alimentos funcionales y nutracéuticos. De este modo, estos compuestos pueden incrementar el valor de aceites de baja calidad y de subproductos de la industria del aceite. Por ejemplo, los destilados desodorizados de aceites (DOD) son subproductos que se generan en los procesos de refinado de diferentes aceites vegetales como el girasol, oliva, canola, y soja. Los destilados DOD son complejas mezclas con una composición variable, dependiendo del tipo de aceite vegetal que ha sido procesado y de las condiciones de refinado.

Los procesos convencionales de aislamiento de esteroides se basan en operaciones como extracción líquido/líquido, trans- e interesterificación, destilación molecular y cristalización [361].

La SFE y SFF de aceites vegetales usando CO<sub>2</sub> representa actualmente una herramienta interesante para recuperar estos compuestos de interés, alternativa a otros procesos de separación.

Existen numerosos estudios que demuestran las aplicaciones y el interés de la SFE y SFF en la obtención de productos con mayor valor nutricional y con un aumento en las propiedades funcionales. En ocasiones los productos de partida son aceite de oliva [270, 271, 374], de palma [377, 378] o semillas, germen y fibras vegetales [117, 361, 372, 379]. En otras ocasiones, los materiales de partida pueden ser subproductos del refinado de los aceites [380, 381]. La recuperación de compuestos lipídicos minoritarios a partir de DOD mediante SFE ha sido investigada en profundidad por varios investigadores en las dos últimas décadas. El equilibrio de fases de los diferentes DOD + CO<sub>2</sub> ha sido medido experimentalmente [382-386] y los datos experimentales [387, 388] se muestran en la literatura.

Además, es posible transformar, mediante reacciones químicas, algunas de las especies químicas presentes en los DOD en otros compuestos más fáciles de eliminar. Estas transformaciones se pueden dirigir a formar compuestos que tengan una mayor volatilidad o solubilidad en CO<sub>2</sub> que los compuestos que originalmente se encontraban presentes en el material de partida. Por ejemplo, la separación de ácidos grasos mediante SFE, se puede facilitar mediante su conversión en sus correspondientes FAMES o FAEEs.

### **5.3.7 Recuperación de escualeno, tocoferoles y esteroides a partir de aceites y destilados desodorizados de aceites mediante SFE con CO<sub>2</sub>.**

Los destilados desodorizados de aceites (DOD) que se generan durante la desodorización, blanqueado y refinado de los aceites, son ricos en compuestos que tienen valor funcional, como los tocoferoles (vitamina E), escualeno y esteroides. Los DOD constituyen una de las principales

fuentes para la producción de vitamina E natural. Los productos enriquecidos en fitoesteroles se pueden fabricar utilizando fitoesteroles aislados a partir de DOD. Los DOD contienen fitoesteroles libres, cuya solubilidad en matrices alimentarias es baja. Para aumentar esta solubilidad, después de su aislamiento a partir de DOD, los esteroles libres se pueden convertir en ésteres de esteroles.

La composición típica de los DOD suele ser:

- ⇒ Vitamina E 9-11%.
- ⇒ Escualeno 3-6%.
- ⇒ Ácidos grasos 79%.
- ⇒ Esteroles 2-5%.

También pueden tener en su composición ésteres de esteroles, hidrocarburos y productos de descomposición de ácidos grasos, acilglicéridos, aldehídos y cetonas [389].

Aunque vitaminas y esteroles se pueden producir de forma sintética, actualmente ha aumentado el interés para aislar este tipo de compuestos a partir de fuentes naturales. En términos de mercado, los tocoferoles se pueden vender como vitamina E si tienen un mínimo de pureza del 60%, siendo su precio proporcional a esta concentración [388].

Se han publicado diversos estudios en los que se desarrollan procesos de SFE y SFF para concentrar vitamina E (tocoferol) presente en DOD. El interés en la concentración de tocoferoles mediante fluidos supercríticos comenzó con los trabajos de Lee y col. [390], a los que siguieron los de Brunner y col. [391, 392]. Las condiciones empleadas variaron de 35 a 90 °C y de 200 a 400 bares, utilizando extractores o columnas en contracorriente. Estos trabajos concluyeron que los ácidos grasos son extraídos inicialmente y los tocoferoles son enriquecidos en el interior del extractor. Los resultados también indicaron que la solubilidad de los tocoferoles es intermedia si se compara con las solubilidades de escualeno y esteroles.

Hay muchos estudios experimentales que prueban la eficacia de la extracción de vitamina E a partir de diferentes mezclas sintéticas que representan el destilado desodorizado, aunque no se llega a una conclusión única sobre las condiciones y el equipo que se debe emplear para optimizar la concentración de tocoferoles [381, 393-395].

La extracción de esteroles a partir de destilados desodorizados, en cambio, no ha sido tan ampliamente descrita. No obstante, la solubilidad de estos compuestos en CO<sub>2</sub> supercrítico considerando distintas variables que afectan a sus procesos de extracción han sido estudiadas en profundidad [184]. Su extracción es muy común a partir de plantas medicinales en condiciones de operación que varían de 35 a 60 °C y de 100 a 300 bares [388]. Dunford y King desarrollaron procesos de enriquecimiento de fitoesteroles a partir de aceite de salvado de arroz utilizando tecnología de fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico con una columna rellena a alta presión [361,

372]. Estos autores también llevaron a cabo procesos con CO<sub>2</sub> supercrítico a alta presión para extraer ésteres de fitoesterol, especialmente orizanol, a partir de fibra de maíz [396].

Fang y col. defendieron la viabilidad del fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico como técnica para concentrar tocoferoles naturales a partir de destilados desodorizados de aceite de soja metilados. Desarrollaron un proceso semi-continuo en contracorriente con CO<sub>2</sub> supercrítico empleando una columna de fraccionamiento con una altura de 2.4 metros, un diámetro interno de 20 mm, y un volumen total de 750 mL. Estudiaron diferentes variables de operación como la presión, temperatura de la columna y relación S/F. Los resultados experimentales indicaron que el CO<sub>2</sub> supercrítico extrae de manera eficaz los FAMES con una presión de 16 MPa y un gradiente de temperaturas de 313-348 K. Incrementando la presión, se pueden obtener tocoferoles con pureza superior al 50% con unos rendimientos superiores al 80% [397].

Mendes y col. estudiaron la simulación y el modelado termodinámico de la extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> de tocoferoles de una mezcla sintética de tocoferol, escualeno y ácidos grasos, que simulaba la composición del destilado desodorizado resultante del procesado del aceite de soja [398].

En otro trabajo, Mendes y col. estudiaron procesos en semi-batch con CO<sub>2</sub> supercrítico para concentrar vitamina E a partir de DOD, variando la presión de 90 a 350 bares y la temperatura de 40 a 80 °C. En estos estudios también se simuló un material de partida mezclando tocoferol, escualeno, ácido linoleico y estigmasterol y se propuso un proceso de separación en diferentes etapas con extractores en serie. La temperatura de 40 °C fue la mejor para separar todos los componentes de la mezcla, pero fueron necesarias diferentes condiciones de presión para separar el ácido linoleico (90 bar), estigmasterol (250 bar) y el escualeno (350 bar) del tocoferol, siendo la separación entre estigmasterol y escualeno la más difícil [388].

Brunner y col., estudiaron la purificación de tocoferoles y tocotrienoles a partir de dos muestras diferentes: aceite de palma crudo y destilado desodorizado de aceite de soja. En este estudio se comprobó que la SFE ofrecía ventajas frente a otras técnicas convencionales como la destilación a vacío, obteniéndose productos libres de disolvente en condiciones de temperatura moderadas.

Los experimentos con aceite crudo de palma se realizaron a temperaturas de 340-370 K, presiones de 20-30 MPa y relaciones S/F de 25-65. Se observó que introduciendo parte del extracto obtenido en el interior de la columna (reflujo), se mejoraba notablemente la calidad de los productos, incrementando 10 veces la pureza en tocoferoles y tocotrienoles.

Los experimentos con DOD se realizaron a temperaturas de 353-363 K, presiones de 23-26 MPa, relaciones S/F de 33-171 y reflujo de 1.0-38.0. El escualeno se enriqueció de un 3.1% a un 18.8% en la fase superior de la columna. Los esteroides se enriquecieron en la parte inferior de la columna, en ocasiones hasta concentraciones superiores a un 50%. En estas concentraciones los

productos llegaban a ser tan viscosos que atascaban la columna. Con el objetivo de mejorar el proceso de separación, la fase superior de la columna se volvió a someter a un nuevo proceso de extracción. Con este material libre de esteroides, la separación entre escualeno y tocoferoles y tocotrienoles fue posible. Esta separación se llevó a cabo a 23 MPa, 353 K, relación S/F de 110 y relación de reflujo de 4.6.

Generalmente, un incremento en la relación de reflujo conlleva una disminución en el número de etapas de separación. Esto es una ventaja en cuanto al diseño de la columna de extracción, ya que permite que el proceso se lleve a cabo en una columna más corta. No obstante, una relación de reflujo más alta implica una relación S/F más alta, que hace que se incrementen los costes operacionales que conlleva la recompresión del CO<sub>2</sub> supercrítico [399].

Mendes y col. realizaron una evaluación económica basada en un estudio experimental para concentrar vitamina E a partir de DOD de aceite de soja empleando CO<sub>2</sub> supercrítico. En este estudio se exploraron temperaturas de 40, 60 y 80 °C y presiones de 90 y 170 bares. La mayor eficacia del proceso se obtuvo en las condiciones más bajas de presión y temperatura y concluyeron que este proceso es técnica y económicamente viable [400], frente a la alternativa a la SFE y SFF con CO<sub>2</sub> para la separación y concentración de los compuestos presentes en DOD, que es la destilación molecular [389, 401, 402].

Una estrategia muy utilizada para facilitar la separación y fraccionamiento de diferentes compuestos a partir de muestras heterogéneas como son los destilados desodorizados de aceites, es la previa transformación química o enzimática de los componentes de la muestra de partida. El objetivo es aumentar significativamente las diferencias en cuanto a:

- ⇒ Puntos de ebullición de las especies que se quieren separar, en el caso de fraccionar la muestra mediante destilación molecular [402].
- ⇒ Solubilidad en CO<sub>2</sub> de las especies que se quieren separar, en el caso de fraccionar la muestra mediante extracción o fraccionamiento supercrítico [378].

En el caso de los DOD, si se convierten los esteroides en ésteres de esteroles y los FFAs en FAMES, la purificación de tocoferoles y ésteres de esteroles mediante destilación molecular se facilita considerablemente, ya que los puntos de ebullición de FAMES, tocoferoles y ésteres de esteroles son significativamente diferentes [402].

### 5.3.7.1 El escualeno y la tecnología de fluidos supercríticos.

Catchpole y col. fraccionaron un amplio rango de aceites de pescado mediante extracción supercrítica en contracorriente empleando CO<sub>2</sub> con y sin etanol como modificador. Uno de los aceites empleados fue aceite de hígado de tiburón para la extracción de escualeno. Frente a los métodos clásicos de extracción –destilación molecular, alto vacío y destilación a alta temperatura-, los autores proponen la extracción supercrítica en contracorriente como una alternativa potencial a esos métodos, obteniendo unos extractos con una pureza del 97%, en una planta a escala de demostración con una columna de 203 mm de diámetro interno, con relleno de anillos Fenske (15 mm). En este trabajo se estudió la solubilidad del aceite de pescado y del escualeno utilizando mezclas de CO<sub>2</sub> + etanol a 333 K, concentraciones de etanol de 0-12% y presiones de 200-300 bar. Se observó que la solubilidad de todos los aceites y del escualeno aumenta exponencialmente según se aumenta linealmente la concentración de etanol y la solubilidad de los compuestos polares aumenta de forma más rápida que la de los compuestos apolares [335].

Con el fin de proteger especies marinas en vías de extinción como es el caso de algunos tiburones de altas profundidades cuyo hígado es rico en escualeno, se han propuesto fuentes alternativas de origen vegetal para la producción industrial de escualeno como son los aceites de oliva, maíz, cacahuete, colza, soja y girasol, y los desodorizados obtenidos como subproductos de la refinación de los distintos tipos de aceites, los cuales contienen escualeno en un rango de concentración de 10 - 30% en peso.

Distintos autores han extraído escualeno mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de diferentes fuentes de origen vegetal:

- ⇒ Ko y colaboradores extrajeron escualeno de las hojas y semillas de la planta *Terminalia catappa* L. mediante CO<sub>2</sub> supercrítico a 40 °C y 300 atmósferas de presión [403].
- ⇒ Corke y col. emplearon la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico para la obtención de aceite y escualeno de los granos de amaranto. Los mayores rendimientos en escualeno (0.31g/100g de grano) se obtuvieron a 50 °C y 200 bar [98, 99].
- ⇒ Hyung-Jin-Kim y col., emplearon la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico para la extracción de aceite de salvado de arroz, quedando un residuo no extraído rico en escualeno [404].

El escualeno es el hidrocarburo más importante del aceite de oliva y es el principal constituyente de la fracción insaponificable del aceite de oliva (hasta un 50%). Además, el aceite de oliva es el aceite que lo posee en mayor proporción [405].

El grupo español SOS patentó un método de obtención de escualeno procedente del aceite de oliva mediante el cual se obtiene un producto con un grado de concentración de escualeno del 85%. En el año 2002, esta compañía logró obtener 210 toneladas de este producto, que vendió a

multinacionales farmacéuticas y de cosmética japonesas, generando unos beneficios de 1.62 millones de euros [406]. El titular de la patente es el grupo Koipe, S.A., filial de SOS, y el proceso para la purificación de escualeno comprende las siguientes etapas [407]:

- ⇒ Extracción de los ácidos grasos de refinación física con agua, un disolvente apolar y otro polar, para obtener dos micelas: una polar y otra no polar.
- ⇒ Descomposición de la micela polar para producir dos micelas, una de alcohol/agua y la otra de alcohol/disolvente polar/ácidos grasos.
- ⇒ Recuperación de los disolventes de las citadas micelas para obtener un concentrado de escualeno a partir de la micela no polar.
- ⇒ Destilación fraccionada del concentrado de escualeno así obtenido, para obtener tres fracciones: una ligera, otra de escualeno y otra pesada.
- ⇒ Enfriamiento de la fracción de escualeno para su purificación.

Ruivo y col. simularon la composición de un destilado desodorizado procedente de un proceso de refinación del aceite de oliva mezclando escualeno y oleato de metilo. En estos trabajos se estudió el fraccionamiento de esta mezcla [408] y el equilibrio de fases del sistema ternario metil oleato / escualeno / CO<sub>2</sub> en condiciones de alta presión [409].

Bondioli y col. estudiaron la recuperación de escualeno a partir de aceite de oliva lampante [374] y de los destilados desodorizados del aceite de oliva, usando CO<sub>2</sub> supercrítico [380, 410].

Estos estudios se basaron en el diseño de un proceso en el que, en una primera etapa, se transformaron los ácidos grasos libres y los metil y etil ésteres de ácidos grasos que contenía el desodorizado en sus correspondientes triglicéridos. Posteriormente, fueron sometidos a extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, obteniendo un extracto enriquecido en escualeno. El proceso fue llevado a cabo en una planta a escala piloto con una columna operando en contracorriente. Este proceso dio lugar a fracciones de alta pureza en escualeno, con un rendimiento del 90 % [380, 410].

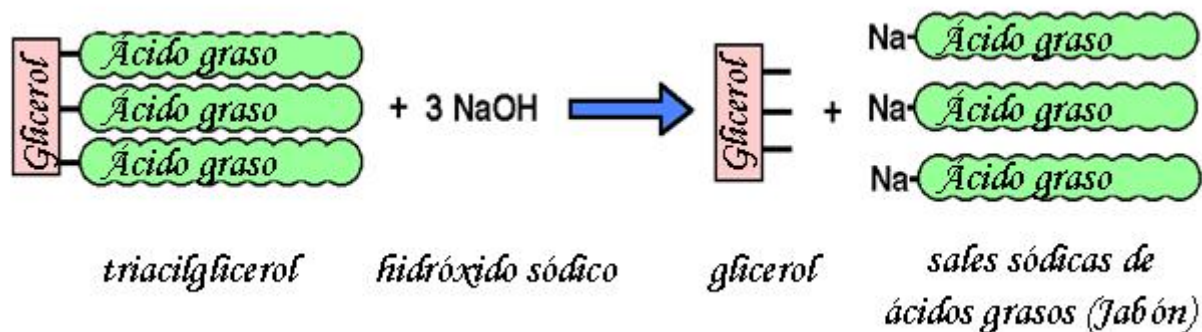
## **5.4 Modificación química de aceites y grasas.**

En ocasiones no es posible usar directamente los aceites y grasas obtenidos a partir de fuentes naturales o inmediatamente después de un refinado. En estos casos es necesario recurrir a determinadas modificaciones que permiten alterar sus propiedades químicas (como su composición en FAs) o físicas (como el punto de fusión). Además, esta estrategia puede ser utilizada para facilitar la separación y fraccionamiento de diferentes compuestos a partir de muestras heterogéneas.



A continuación se enumeran las principales modificaciones químicas de aceites y grasas:

- Hidrólisis alcalina:

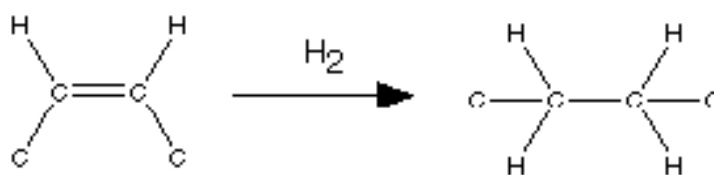


**Figura 15.** Hidrólisis alcalina (saponificación) de aceite para formar jabones.

El método más conocido de hidrólisis de triacilgliceroles es la hidrólisis alcalina. Se calientan los triacilgliceroles a unos 100 °C en una mezcla acuosa de hidróxido sódico o potásico, formándose como productos glicerol y sales alcalinas de ácidos grasos (jabón). Este proceso también se llama saponificación debido a la formación de jabón.

- Hidrogenación:

El número de dobles enlaces o insaturaciones de los aceites y grasas afecta a sus propiedades nutricionales y a sus propiedades físicas, como el punto de fusión o la cristalinidad. Los dobles enlaces generalmente reducen el punto de fusión de las grasas. Estos procesos pretenden hidrogenar átomos que forman dobles enlaces, para transformar aceites líquidos en grasas sólidas o semi-sólidas.



**Figura 16.** Hidrogenación.

Un proceso típico de hidrogenación es la formación de margarina a partir de aceites vegetales. El aceite es hidrogenado mediante H<sub>2</sub> gaseoso en presencia de un catalizador metálico (normalmente níquel). Suelen tener interés las grasas parcialmente hidrogenadas, ya que son las que tienen propiedades físicas más apropiadas. Estas grasas tienen el inconveniente de presentar posibles isomerizaciones en sus dobles enlaces, sufren cambios a posiciones no naturales, y se

generan ácidos grasos *trans* o grasas *trans*, que provocan un aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

- Transesterificación:

La transesterificación incluye reacciones químicas donde un éster reacciona con un alcohol (alcoholisis), un ácido (acidolisis) u otro éster (interesterificación) para generar un nuevo éster (ver Figura 17).

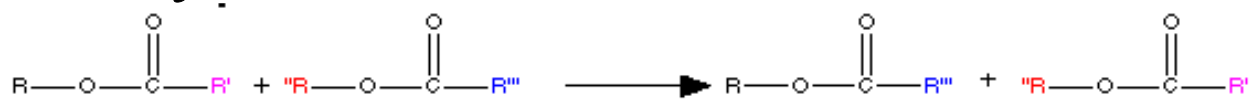
### *alcoholisis*



### *acidolisis*



### *interesterificación*



**Figura 17.** Distintos tipos de transesterificación.

Cuando se emplea metanol o etanol en la alcoholisis, la reacción se llama metanolisis o etanolisis respectivamente. En esta reacción se generan ácidos grasos metil ésteres (FAMEs) o etil ésteres (FAEEs) y glicerol. Estos ésteres de ácidos grasos pueden ser usados como combustible en motores diésel. Su empleo ofrece ventajas desde el punto de vista medioambiental, ya que reduce la emisión de CO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub> y otras partículas.

Otro ejemplo de alcoholisis es la glicerolisis, en la que el triacilglicerol (TAG) reacciona con el glicerol en presencia de un catalizador alcalino para formar glicéridos parcialmente esterificados como el monoacilglicerol (MAG). La mezcla de triacilglicerol y glicerol se calienta a 200-250 °C en presencia de hidróxido sódico. El monoacilglicerol resultante debe ser purificado mediante técnicas como la destilación molecular normalmente o por SFE.

La interesterificación se utiliza para cambiar la composición molecular de los aceites. Las grasas y aceites son mezclas de triacilgliceroles que tienen diferente distribución posicional de ácidos grasos. Tratando los aceites con metóxido sódico a 80 °C se consigue un intercambio

intermolecular de ácidos grasos en las moléculas de triacilglicerol. Para que se produzca este intercambio aleatorio de residuos, en este tipo de procesos se suele emplear metóxido o etóxido sódico como catalizador y es necesaria la ausencia de metanol o etanol en el medio, ya que la presencia de estos compuestos daría lugar a reacciones de transesterificación por metanolisis o etanolisis del aceite [411, 412]. La interesterificación es una interesante alternativa a los procesos de hidrogenación, ya que de este modo, se pueden modificar las propiedades físicas de las grasas, como la consistencia o el punto de fusión, evitando la isomerización trans [413, 414].

### 5.4.1 La transesterificación por alcoholisis como método de producción de biodiésel.

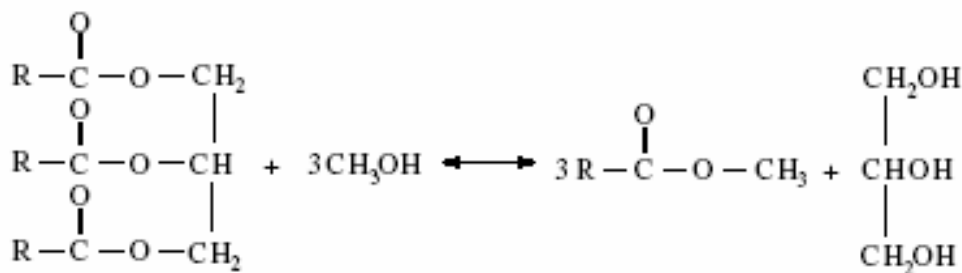
La producción de biodiésel ha despertado gran interés en los últimos tiempos, debido al beneficio de su uso para el medio ambiente y a su producción a partir de fuentes renovables. El coste del biodiésel ha sido el mayor obstáculo para su comercialización. No obstante, el empleo de aceites de cocina usados como material de partida, la optimización de los procesos de transesterificación y la recuperación de glicerol de alta pureza como co-producto, han hecho que el coste de biodiésel haya disminuido [415].

Hay cuatro vías principales para la producción de biodiésel:

- ⇒ Uso directo de grasas vegetales y mezcla con combustible diésel [416, 417].
- ⇒ Microemulsiones [418-420].
- ⇒ Ruptura térmica (pirólisis) [421-423].
- ⇒ Transesterificación [419, 424-431].

La transesterificación de aceites y grasas es el método más comúnmente usado para la producción de biodiésel.

La transesterificación por alcoholisis es la reacción de una grasa o aceite con un alcohol para formar ésteres de ácidos grasos y glicerol [432].



**Figura 18.** Transesterificación de TAGs con alcohol.

La reacción de transesterificación se ve afectada por los siguientes factores:

- ⇒ Relación molar entre glicéridos y alcohol.
- ⇒ Catalizador.
- ⇒ Temperatura de reacción.
- ⇒ Tiempo de reacción.
- ⇒ Contenido en agua y FFAs de las grasas y aceites.

Los alcoholes más usados en este proceso de transesterificación son el metanol, etanol, propanol, butanol y amil alcohol. Los que se usan más frecuentemente son el metanol y el etanol, especialmente el metanol, debido a su bajo precio y a sus ventajas físicas y químicas. Al ser polar y tener la cadena más corta, reacciona fácilmente con los TAGs y el NaOH se disuelve fácilmente en él. El etanol tiene la ventaja de no ser tóxico. Para completar una transesterificación en condiciones estequiométricas, se necesita una relación molar de alcohol: TAGs de 3:1. Al ser una reacción reversible, en la práctica esta relación molar debe ser mayor, para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos y obtener el máximo rendimiento de ésteres [415].

La reacción puede ser catalizada por bases, ácidos o enzimas. Las bases pueden ser NaOH, KOH, carbonatos y los correspondientes alcóxidos de sodio o potasio, como metóxido sódico, etóxido sódico, propóxido sódico, butóxido sódico, etc. Los catalizadores ácidos suelen ser ácido sulfúrico, ácido sulfónico, o ácido clorhídrico. Las lipasas también pueden emplearse como biocatalizadores en reacciones de transesterificación por alcoholisis, para la obtención de biodiésel [433-437], o para obtener mezclas de mayor interés [436, 437].

La transesterificación catalizada por una base es mucho más rápida que la catalizada por un ácido, y es más utilizada comercialmente. Para la transesterificación catalizada por una base, los glicéridos y el alcohol deben ser sustancialmente anhidros [438], debido a que esta reacción puede cambiar a saponificación, produciéndose jabón. El jabón disminuye el rendimiento de ésteres y hace difícil la separación de los ésteres del glicerol y del agua de lavado.

La transesterificación catalizada por una base también necesita que el contenido en ácidos grasos libres (FFAs) sea bajo. Si hay más cantidad de agua y FFAs en el medio, es más adecuado que la transesterificación sea catalizada por un ácido [439].

Es posible que la obtención de ésteres puros no sea fácil y la transesterificación de TAGs no sea completa. En este caso, el producto de la reacción es una mezcla de ésteres, glicerol, alcohol, catalizador y tri-, di- y monoacilglicerol. Como material de partida para la obtención de biodiésel, son más adecuados los aceites vegetales que las grasas animales. Los ésteres de ácidos grasos saturados provenientes de las grasas animales (casi 50% w/w) empeoran las propiedades del biodiésel ya que aumentan su punto de fusión, pero pueden tener valor añadido para aplicaciones en cosméticos, detergentes y cosméticos [428].

El glicerol que se genera como producto de la transesterificación por alcoholisis, debe ser recuperado y tiene valor industrial. El glicerol se recupera del medio por decantación o centrifugación.

## 5.5 Triacilgliceroles estructurados.

Los triacilgliceroles estructurados se definen como TAGs que han sido modificados química o enzimáticamente para cambiar su composición en ácidos grasos y/o su distribución posicional en la molécula de glicerol. Los TAGs estructurados tienen una composición en ácidos grasos determinada en posiciones específicas, que es diferente a la que tenían en los aceites de partida.

La estructura molecular de los TAGs influye tanto en su digestión y absorción, y por tanto en su metabolismo, como en sus propiedades físicas (punto de fusión y de cristalización). Por estas razones, diseñando la estructura química de los TAGs podemos controlar su comportamiento y mejorar sus propiedades nutricionales y actividades biológicas. Así, TAGs estructurados se emplean en nutrición y medicina y en la producción de alimentos para determinados pacientes o consumidores. En este sentido, se debe mencionar la patente de un método de terapia nutricional para tratamiento de cáncer, basado en la administración de lípidos estructurados que contienen ácidos grasos  $\omega$ -3 y ácidos grasos de mediana longitud de cadena [440].

Es importante destacar que cuando la funcionalidad de los TAGs estructurados depende principalmente de la posición específica en la que se encuentran los ácidos grasos de la molécula, es frecuente llevar a cabo estas reacciones en presencia de lipasas específicas. Dada la alta especificidad de estas enzimas es posible esterificar selectivamente un FA en una determinada posición de la molécula de glicerol. Así, se pueden obtener nuevos triglicéridos que no solo tienen una distinta composición en ácidos grasos sino que además, poseen una distribución posicional de estos ácidos grasos diferente a la del aceite de partida.

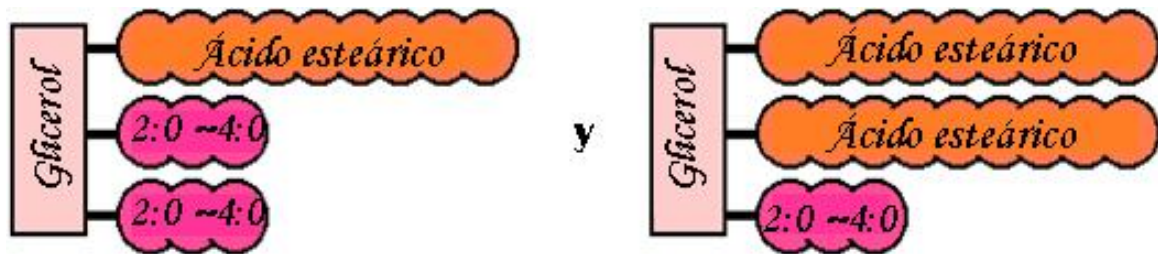
Por el contrario cuando la funcionalidad de las grasas depende más de su composición en ácidos grasos que de la posición de los mismos en el TAG, su producción se suele llevar a cabo mediante reacciones químicas y no enzimáticas.

A continuación se describen algunas aplicaciones de los TAGs estructurados:

- Grasas hipocalóricas:

Los ácidos grasos saturados de cadena larga tienen elevados puntos de fusión y en el intestino tienden a formar sales de calcio que no son absorbidas y son excretadas en las heces. Por ello, los TAGs ricos en ácidos grasos saturados de cadena larga tienen un muy limitado uso en alimentación.

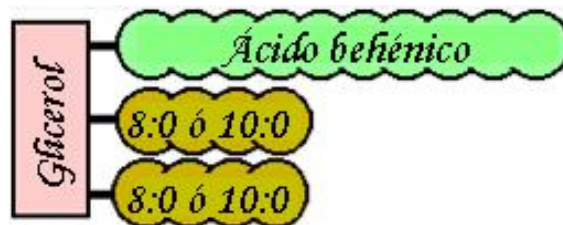
Uniendo FAs de cadena larga y corta o de cadena larga y mediana en la molécula de glicerol, se obtienen TAGs hipocalóricos y con consistencia apropiada. Algunos ejemplos comerciales de este tipo de grasas son Salatrim y Caprenin, que tienen en torno a 5 kcal/g, mientras que el aceite de cocina normal tiene 9 kcal/g.



**Figura 19.** Salatrim.

Salatrim se produce industrialmente mediante interesterificación química entre TAGs de corta cadena (triacetil-, tripropionil- o tributil-) y TAGs de cadena larga saturada (aceite vegetal hidrogenado). Salatrim (**short and long acyl triglyceride molecule**) fue patentado [441] y ha sido desarrollado por Pfizer y Nabisco.

Caprenin<sup>TM</sup> se produce industrialmente por acilación química de 1-MAG que contiene ácido behénico con los ácidos grasos de cadena mediana.



**Figura 20.** Caprenin.

Caprenin<sup>TM</sup> fue patentado [442] y ha sido desarrollado por Procter and Gamble (P&G).

- Lípidos de fácil absorción:



**Figura 21.** TAG estructurado tipo MLM.

Los TAGs estructurados del tipo MLM son considerados de fácil absorción. Están constituidos por FAs de cadena mediana (10-14 carbonos) en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 y FAs esenciales o con una destacada actividad biológica en la posición *sn*-2 de la glicerina.

La lipasa pancreática de mamíferos es específica para posiciones *sn*-1 y *sn*-3 dando lugar a 2-MAGs fácilmente absorbibles por la mucosa intestinal.

Por esta razón, estos TAGs estructurados son empleados como eficaces transportadores de FAs, especialmente de aquellos que tienen propiedades funcionales como los PUFAs.

El método convencional de síntesis de glicéridos de cadena mediana (MCTs) consiste en la esterificación directa de glicerol y ácidos grasos de cadena mediana a altas temperaturas y altas presiones, seguida de un lavado alcalino, un refinado con vapor, destilación molecular y ultrafiltración para purificar los productos. Este proceso implica elevados costes energéticos debido a las drásticas condiciones de reacción. Ghosh y col. estudiaron diferencias en el proceso de síntesis de MCTs por vía química y mediante lipasas [443]. Kwon y col. emplearon diferentes lipasas comerciales para sintetizar MCTs a partir de glicerol y ácido cáprico en presencia de isooctano [444].

- Grasas especiales para niños:



**Figura 22.** Betapol™.

En niños, la absorción de ácidos grasos saturados a partir de la leche materna es mejor que a partir de aceites vegetales con similar contenido en FAs. Se debe a que en la leche materna, la

mayoría de los ácidos grasos saturados (sobre todo ácido palmítico) se localizan en la posición *sn-2*.

El Betapol™ es un TAG estructurado análogo a los TAGs que se encuentran en la leche materna. Contiene FAs insaturados (sobre todo ácido oleico en posiciones *sn-1* y *sn-3*, y un FA saturado (principalmente ácido palmítico) en la posición *sn-2* del glicerol. Este producto ha sido desarrollado por Unilever y se emplea en fórmulas infantiles (leche artificial para bebés).

- Grasas especiales para fabricación de chocolate:

El objetivo de estos TAGs estructurados es controlar las propiedades físicas (puntos de fusión y cristalización) de aceites y grasas.



**Figura 23.** Equivalente de grasa de cacao (CBE, “Cocoa Butter Equivalents”).

Las grasas de cacao, a partir de las cuales se fabrica el chocolate, son ricas en TAGs con ácidos grasos saturados (sobre todo esteárico y en menor proporción palmítico) en las posiciones *sn-1* y *sn-3* y un FA insaturado (sobre todo oleico) en la posición *sn-2*. Las propiedades físicas del chocolate se deben a estos TAGs. Los equivalentes de grasas de cacao (CBE) imitan la composición en ácidos grasos de la grasa de cacao y se producen a partir de aceite de palma y el ácido graso apropiado.

Otro ejemplo de TAGs estructurados que se emplean en la fabricación de chocolate es el BOB (1,3-behénico 2-oleoilglicerol). BOB fue desarrollado por Fuji Oil. Se emplea para evitar el “bloom”, que es el fenómeno en el que la superficie del chocolate se cubre de un material blanquecino. Sucede por la parcial fusión y recristalización de las grasas y reduce el valor comercial del chocolate.

## 5.6 Modificación enzimática de aceites y grasas.

Como se ha mencionado anteriormente, las modificaciones químicas de los aceites y grasas están asociadas en muchos casos al empleo de altas presiones y temperaturas que pueden degradarlas e introducir impurezas. Sin embargo el uso de enzimas permite llevar a cabo estos procesos en



condiciones suaves de presión y temperatura y dada su alta especificidad, convierten a estos biocatalizadores en una herramienta muy útil y versátil para la modificación de aceites y grasas.

## **5.6.1 Introducción a la biocatálisis.**

En los últimos años, el descubrimiento de gran cantidad de nuevas enzimas mediante tecnología de DNA recombinante ha permitido el desarrollo de procesos de biocatálisis con mayor productividad, estabilidad y nuevos procesos en los que uno o todos los pasos se llevan a cabo mediante rutas biocatalíticas. En este sentido, el diseño de procesos biocatalíticos ha mejorado notablemente en cuanto a precisión y facilidad de uso. Hoy en día, se pueden encontrar cada vez más enzimas que pueden catalizar casi cualquier reacción de química orgánica [445].

En este sentido, los trabajos publicados por Rozzell, 1999; Bommarius, 2001 y Rasor, 2001 analizan y refutan, desde el punto de vista de la nueva tecnología catalítica emergente, las críticas que venía sufriendo la biocatálisis en los últimos años [446-448].

Comparada con otros tipos de catálisis, la tecnología enzimática presenta las siguientes ventajas y desventajas.

### **5.6.1.1 Ventajas de la biocatálisis.**

- ⇒ Enantioselectividad muy alta.
- ⇒ Regioselectividad muy alta.
- ⇒ Llevan a cabo transformaciones en condiciones suaves.
- ⇒ Frecuentemente el disolvente empleado es agua.

La mayor ventaja que ofrecen las enzimas es su insuperable selectividad. Las enzimas se emplean para incrementar la selectividad química o regioselectividad de la reacción y son capaces de diferenciar sustratos enantioméricos. Su importancia crece cada vez más en la síntesis farmacéutica [449], ya que este es uno de los campos donde se requiere una mayor selectividad en los procesos.

El hecho de que las enzimas sean activas en condiciones de pH y temperatura ambientales o suaves y preferentemente en presencia de agua hace que actualmente esto sea más una ventaja que una desventaja. Los objetivos presentes del procesado industrial son conseguir una “química verde”, “desarrollo sostenible” y “procesos respetuosos con el medio ambiente”. Estas condiciones son cada vez más importantes y rigen la actividad industrial en una gran parte del mundo. Estos objetivos son mucho más difíciles de lograr sin la disponibilidad de la biocatálisis, que tolera y requiere estas condiciones o premisas [445].

La biocatálisis es capaz de catalizar un abanico cada vez más amplio de reacciones, que hace que cada vez sea mayor el número de sus aplicaciones a escala industrial [450-453].

Por otro lado, la biocatálisis no es una tecnología excluyente, ya que se puede combinar con la catálisis química o ser empleada en otros procesos biotecnológicos.

### 5.6.1.2 Desventajas de la biocatálisis.

La biocatálisis se enfrenta en la actualidad a básicamente tres desventajas:

- Los biocatalizadores no son suficientemente estables en determinados medios de reacción.

Éste es todavía el principal inconveniente de la biocatálisis. Incluso cambios en la conformación de la enzima inferiores a un Ångstrom pueden provocar una radical disminución en la actividad de la molécula [454]. Mantener la actividad es el criterio para mantener la integridad de la proteína. Las enzimas se pueden desactivar por múltiples causas: condiciones extremas de pH o temperatura, fuerzas mecánicas como cavitación de bombas o interfases fase acuosa-fase orgánica o gas-liquido [455], o por determinadas interacciones covalentes [456-458].

Suelen requerir temperatura ambiente (15-50 °C), valores de pH cercano al neutro (pH 5-9) y una determinada cantidad de agua.

- No existen enzimas suficientes que catalicen todas las reacciones deseadas a partir de sustratos disponibles.

Se observa que la demanda de enzimas es muy superior a la oferta disponible. No obstante, actualmente hay más de 4000 enzimas conocidas que pueden catalizar casi cualquier reacción. Pero sucede que muchas veces no están bien caracterizadas, registradas o no están comercialmente disponibles. La tecnología del DNA recombinante descubierta en 1978 por Cohen and Boyer (Stanford University, Palo Alto, USA) ha permitido que se produzcan enzimas de forma barata y con una mayor eficacia [459]. En este sentido, la tecnología biocatalítica mejora a ritmo constante y se espera un rápido progreso en este campo.

- Los ciclos de reacción son en algunos casos demasiado largos.

Muchas veces las enzimas tienen poca actividad y la duración de las reacciones que catalizan es superior a la deseada. Una de las razones es el conocimiento incompleto que hay aun en las bases de esta tecnología. Por otro lado, hay estudios, como los de Ryori Noyori (Nagoya University, Nagoya, Japan) o K. Barry Sharpless (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA) que compartieron el premio Nobel de 2001, que revelan que la situación no es muy diferente en procesos industriales que se llevan a cabo mediante catálisis química homogénea quiral [445].

Otra desventaja puede ser que en ocasiones las enzimas necesitan determinados cofactores. Esta necesidad ha sido a veces un desafío tecnológico, pero no supone un coste grave como se suponía anteriormente.

### 5.6.1.3 La biocatálisis como herramienta para la química del futuro.

La biotecnología y la biocatálisis no solamente presentan diferencias frente a los procesos convencionales en cuanto al tipo de catálisis, sino que también constituyen unas nuevas bases tecnológicas.

Hay dos factores que impulsan el desarrollo de la industria química del futuro:

- ⇒ Conseguir unos costes competitivos para una economía de mercado cada vez más abierta.
- ⇒ Llevar a cabo procesos industriales limpios y respetuosos con el medio ambiente, o en la medida de lo posible, que contaminen menos (Química verde o procesos GRAS: *Generally Recognized As Safe*).

Se atribuye el término GRAS o “Química Verde” a productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y generación de sustancias peligrosas.

“La Química verde puede tener un enfoque aplicable a todos los aspectos de la química” [460].

El marco de la química verde se constituye en 12 principios [461]:

1. Prevenir la formación de residuos antes de tratarlos o limpiarlos después de su formación.
2. Los métodos de síntesis se deben diseñar para maximizar la incorporación de todos los materiales usados en el proceso en el producto final.
3. En la medida de lo posible, los métodos de síntesis se deben elegir para usar y generar sustancias que tengan baja o nula toxicidad para la salud humana y el medio ambiente.
4. Los productos químicos se deben elegir para mantener la eficacia de su función mientras se reduce la toxicidad.
5. Se debe evitar en la medida de lo posible el uso de sustancias adicionales (disolventes, agentes de separación, etc.) y deben ser inocuas cuando sea necesario su uso.
6. Los requerimientos energéticos de los procesos deben ser minimizados. Los métodos de síntesis se deben llevar a cabo en condiciones de presión y temperatura ambiente.
7. Los materiales de partida deben ser renovables cuando sea técnica y económicamente posible.
8. Deben evitarse, cuando sea posible, procesos de derivatización (bloqueo de grupos, protección/desprotección o modificaciones temporales de procesos químico-físicos).
9. Los reactivos catalíticos (lo más selectivos posibles) son mejores que los reactivos estequiométricos.
10. Los productos químicos deben ser elegidos para que al finalizar su función no permanezcan en el medio ambiente y no afecten a la degradación inocua de los productos.

11. Los métodos analíticos deben permitir la supervisión de los procesos en tiempo real, para que exista control antes de que se produzcan sustancias peligrosas.
12. Las sustancias empleadas en los procesos químicos no deben tener peligro potencial para provocar accidentes como escapes de gas, explosiones o fuego.

La biocatálisis ofrece una serie de ventajas para seguir una Química Verde: gran selectividad de los procesos, condiciones suaves (bajas temperaturas y presiones), etc., y teniendo en cuenta las premisas anteriores el desarrollo la biocatálisis pretende conseguir:

- ⇒ Menor número de etapas en el proceso.
- ⇒ Procesos más cortos.
- ⇒ Mayores rendimientos en cada etapa.
- ⇒ Menores costes materiales y energéticos.
- ⇒ Evitar el empleo de metales y disolventes orgánicos.
- ⇒ Menor cantidad de residuos y disminución de los costes de su tratamiento.

Estas soluciones se deben evaluar teniendo en cuenta diferentes factores, como son el rendimiento del producto, selectividad, productividad, estabilidad biocatalítica y el tiempo de reacción. Se debe valorar si la biocatálisis supera las ventajas que ofrecen otras tecnologías para ser empleada por la industria.

La biotecnología y biocatálisis en muchas ocasiones ofrecen una solución para conseguir los objetivos mencionados y actúan como “*enabling technologies*” o tecnologías disponibles.

Como se mencionaba anteriormente, los avances técnicos son dependientes siempre de los factores económicos, para determinar el éxito de un proceso industrial.

La situación en la que se encuentra la industria química y farmacéutica en la actualidad explica que haya habido un rápido crecimiento y expansión en el uso de enzimas y microorganismos en los últimos años. Este crecimiento ha afectado significativamente al campo de los alimentos y los cosméticos.

Se debe tener en cuenta que el éxito comercial se consigue cuando un producto consigue una firme ventaja en el mercado respecto a sus directos competidores.

Este valor añadido muchas veces viene determinado por:

- ⇒ La propia demanda de mercado.
- ⇒ Los requerimientos en el procesado o manufacturación del producto, que están regulados por leyes que cambian en el tiempo.
- ⇒ Seguridad del producto.
- ⇒ Valor y eficacia funcional del producto.
- ⇒ Precio del producto.

En la industria alimentaria y otras industrias similares estas demandas de mercado son las que muchas veces promueven los avances técnicos, y por tanto el crecimiento y expansión de la biocatálisis y los bioprocesos se debe también a las necesidades de los consumidores. La biocatálisis se emplea cuando las enzimas son baratas, activas y fáciles de usar, lo que permite que los costes del proceso sean asumibles [462].

Otros factores que influyen en la decisión de emplear o no enzimas y microorganismos como biocatalizadores [462] son:

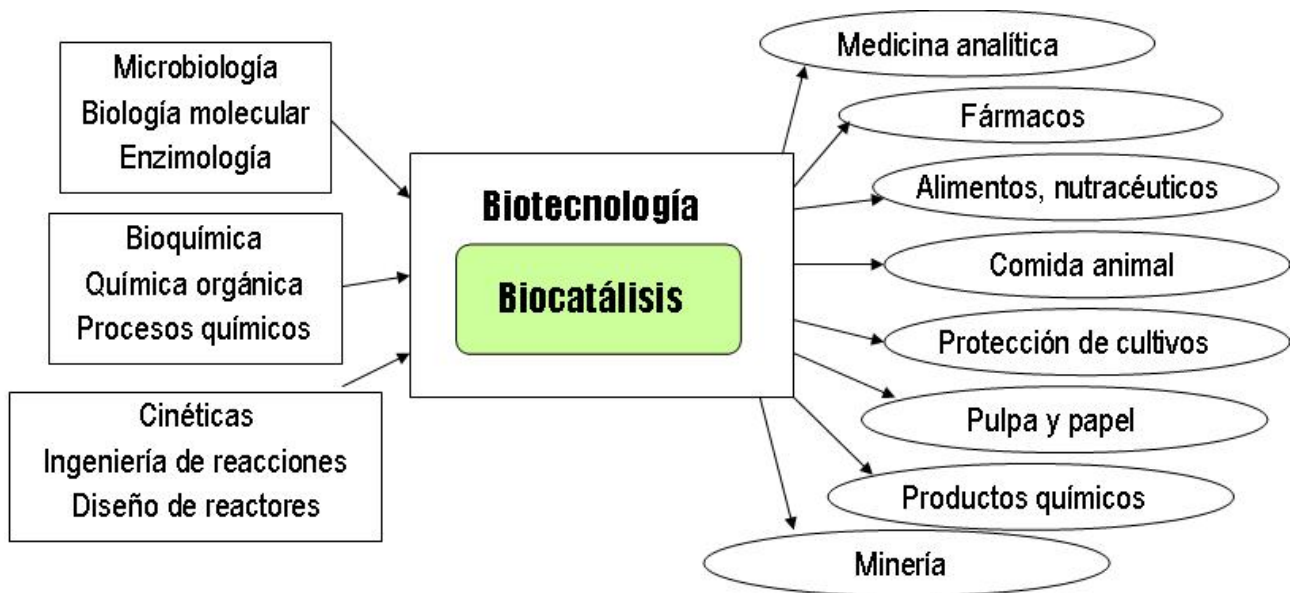
- ⇒ Si trabajan mejor ante determinadas exigencias específicas de los procesos, teniendo en cuenta que la biocatálisis puede necesitar termoestabilidad y resistencia a disolventes orgánicos.
- ⇒ Si tienen una fácil disponibilidad y buena estabilidad.
- ⇒ Si son seguros y están regulados.
- ⇒ Planificación y logística de los procesos. Por ejemplo: las fermentaciones tienen tiempos bastante largos y son difíciles de llevar a cabo si se requiere un proceso en continuo, mientras que las enzimas inmovilizadas pueden ser usadas fácilmente en procesos continuos.
- ⇒ Costes de operación. Por ejemplo: la **inmovilización** permite la reutilización enzimática cuando el proceso catalítico sea caro.
- ⇒ Costes de inversión. En muchas ocasiones la biocatálisis requiere un equipamiento más caro que en procesos convencionales.
- ⇒ Compatibilidad con otras tecnologías.

#### 5.6.1.4 Áreas de aplicación de la biocatálisis.

Uno de los principales usos en los que se emplea la biocatálisis es en procesos de biotransformación, en los que determinados compuestos de partida se transforman en otros compuestos químicamente definidos. Se lleva a cabo sobre todo en la industria química y farmacéutica. Otras veces, la biocatálisis se emplea en procesos en los que el material es modificado químicamente y físicamente para mejorar su sabor, solubilidad, viscosidad o distintas propiedades prácticas.

Se aplica a fármacos, alimentos, química fina, química básica, pastas, papel, agricultura, medicina, producción de energía, industria minera, etc.

También se utiliza la biocatálisis en métodos de análisis y diagnóstico, especialmente en medicina y en protección y reconstrucción medioambiental.



**Figura 24.** La biocatálisis y la biotecnología como herramientas interdisciplinarias de diferentes ciencias y sus múltiples usos industriales.

Ejemplos de aplicaciones de las enzimas [462]:

- Aumentar rendimientos y mejorar la calidad en procesos de extracción.  
Ejemplo: Glicosidasas en zumos de frutas.
- Mejorar las características del procesado de los materiales de partida.  
Ejemplo:  $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -amilasa en la elaboración de cerveza o en la cocción de pan y pasteles.
- Mejorar la calidad nutricional.  
Ejemplo: Adición de enzimas a comida animal.
- Mejorar las características físico-químicas funcionales de alimentos y bebidas.  
Ejemplo: Quimosina en el tratamiento de la leche.
- Eliminar compuestos no deseados.  
Ejemplo: Uso de catalasa en la leche tratada con  $H_2O_2$ .
- Reducir costes en el procesado.  
Ejemplo: Uso de glucoamilasa para azucarar almidón.
- Fabricar análogos naturales de ingredientes.  
Ejemplo: Compuestos químicos naturales con determinado sabor:  $\delta$ -decalactona y vainillina.
- Fabricar ingredientes no disponibles como compuestos químicos puros.  
Ejemplo: L-carnitina.
- Permitir la producción de compuestos que no se puede realizar empleando la química o tecnologías de extracción.  
Ejemplo: Trehalosa.

- Hacer posible la fabricación de productos considerablemente más puros.  
Ejemplo: Isopropilmiristato.
- Suavizar condiciones de reacción, permitiendo la producción de moléculas lábiles.  
Ejemplo: Ácido pantoténico.
- Permitir que reaccionen sustancias que se encuentran presentes en el medio en muy diversas concentraciones.  
Ejemplo: Eliminación de urea y  $\alpha$ -acetolactato del vino y la cerveza respectivamente.
- Permitir la reacción selectiva de sustancias presentes en mezclas complejas, incluyendo la presencia de diferentes formas isoméricas del mismo material.  
Ejemplo: Producción de L-metionina a partir de mezclas racémicas de ésteres.

#### 5.6.1.5 Medios en los que tienen lugar las reacciones enzimáticas.

Generalmente, las enzimas trabajan en condiciones fisiológicas, es decir, en medio acuoso. Pero algunas enzimas mantienen su actividad en otros medios. En la mitad de los años 80 el Profesor Klibanov en USA y el Profesor Fukui en Japón defendieron la explotación del uso enzimático en medios orgánicos. El uso de las enzimas en medios orgánicos en vez de acuosos presenta algunas ventajas [463]:

- ⇒ Cambio del equilibrio termodinámico que favorece la síntesis en vez de la hidrólisis [464-466].
- ⇒ Reducción de las reacciones dependientes de agua.
- ⇒ Eliminación de contaminación microbiana.
- ⇒ Es apropiado cuando los sustratos son insolubles y/o inestables en agua.

A su vez, las reacciones enzimáticas que tienen lugar en medios orgánicos pueden ser de dos tipos:

- ⇒ Sistemas con disolventes orgánicos.
- ⇒ Sistemas libres de disolventes.

Los sistemas libres de disolventes, por ejemplo una reacción que se produzca solamente a partir de sustratos líquidos (aceites), sin ningún disolvente, presentan cuando son posibles, una serie de ventajas económicas y de ejecución frente a los sistemas con disolventes orgánicos, sobre todo a escala industrial. También es preferible no usar disolventes orgánicos desde el punto de vista de las regulaciones de seguridad que requieren los productos de grado alimentario, ya que solamente algunos disolventes, son permitidos en la industria alimentaria [467], entre los cuales hexano, acetona y etanol son los más ampliamente utilizados.

Hay medios de muy diversa naturaleza en los que pueden tener lugar procesos biocatalíticos [468]. Como se describió en el apartado 3.4.2 titulado: otras aplicaciones de los fluidos supercríticos, en los últimos años han tenido un gran desarrollo los procesos biocatalíticos en medio supercrítico. Este tipo de reacciones pueden ser una alternativa ventajosa con un enorme potencial futuro. En el campo de los aceites y grasas se han realizado numerosos estudios que llevan a cabo reacciones catalizadas por lipasas en medio supercrítico. Se han descrito reacciones de hidrólisis de aceite de girasol empleando una lipasa de *Aspergillus niger* [469], de glicerolisis de aceite de soja [470, 471], metanolisis de *cis*-vaccénico en aceites de semillas catalizada por *Candida antarctica* [472], etc. También se han descrito reacciones de esterificación entre alcoholes y ácidos grasos en CO<sub>2</sub> supercrítico [473, 474].

Un problema que puede asociarse a este tipo de reacciones y sobre el que hay diversos estudios [475] es la pérdida de actividad catalítica de las lipasas en el medio supercrítico. Shishikura y col. describieron un proceso de incorporación de EPA y DHA a MCTs en CO<sub>2</sub> supercrítico, en el que la lipasa empleada, *Rhizomucor miehei* inmovilizada, mantenía su estabilidad después de 180 horas a 60 °C y 100 kg/cm<sup>2</sup> [476].

### 5.6.2 Lipasas.

Las lipasas o triacilglicerolhidrolasas son un tipo de carboxi esterases. En condiciones fisiológicas, estas enzimas catalizan la hidrólisis de aceites y grasas, puesto que su función biológica es la del metabolismo de los lípidos. En condiciones controladas, las lipasas pueden catalizar otras reacciones además de la hidrólisis. Esta capacidad hace que las lipasas sean muy utilizadas como biocatalizadores en la modificación de grasas y aceites y otras reacciones de síntesis química.

La acción de las lipasas es reversible, es decir, catalizan la hidrólisis en sistemas acuosos, pero también catalizan la esterificación (reacción inversa a la hidrólisis) en sistemas con reducido contenido en agua.

Las lipasas tienen también capacidad para catalizar reacciones de transesterificación: alcoholisis, acidolisis, interesterificación y aminolisis.

Hay grandes diferencias entre las reacciones químicas y las reacciones catalizadas por lipasas:

- Las reacciones catalizadas por lipasas se llevan a cabo en condiciones más suaves que las reacciones enzimáticas. Esto por un lado es una ventaja, ya que se evitan reacciones no deseadas, como la degradación por calor. Por otro lado, es una desventaja, ya que estas condiciones de trabajo suaves suponen una limitación, es decir, la catálisis mediante lipasas es mucho más delicada que la catálisis química.
- Otro punto a tener en cuenta es que las reacciones catalizadas por lipasas son específicas o selectivas para determinados grupos acilo, determinadas posiciones de los sustratos o

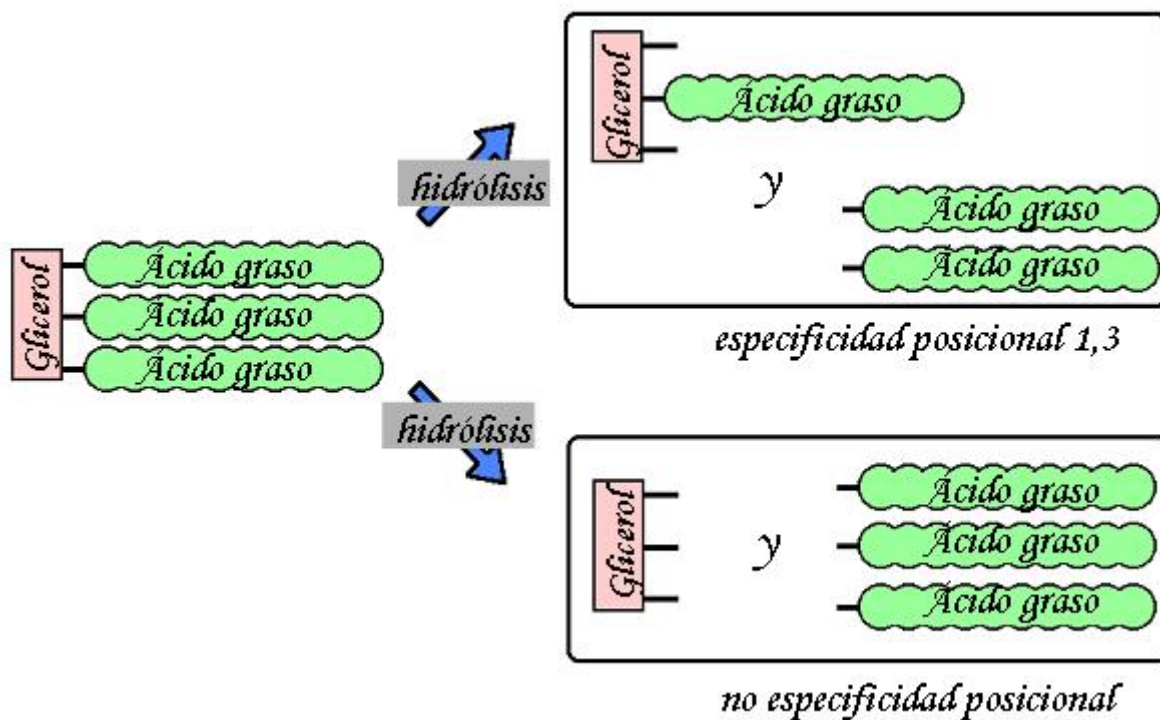


determinados estereoisómeros. Esta especificidad hace que estas reacciones estén más controladas que por la vía química.

### 5.6.2.1 Especificidad de las lipasas.

- Especificidad posicional.

Las lipasas pueden clasificarse en dos grupos según su especificidad posicional: las lipasas pancreáticas y fúngicas son específicas en posición 1,3, mientras que las lipasas de levaduras y bacterias son no específicas posicionalmente o débilmente específicas en posición 1,3. No obstante, esta distinción no es categórica, ya que las lipasas pueden ser específicas posicionalmente en mayor o menor medida.

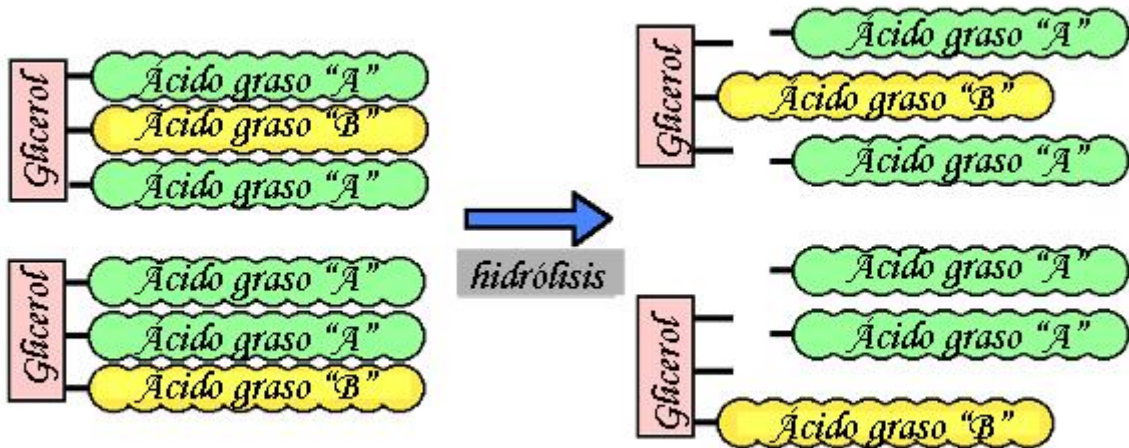


**Figura 25.** Especificidad posicional de las lipasas en triacilgliceroles.

Un factor que hay que tener en cuenta y que complica el estudio de esta especificidad posicional de las lipasas es la migración no enzimática de grupos acilo, de la posición *sn*-2 a las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de mono- y diacilgliceroles. Esta migración es espontánea y aumenta bajo determinados factores como pH ácido, básico o calor.

- Especificidad por ácido graso.

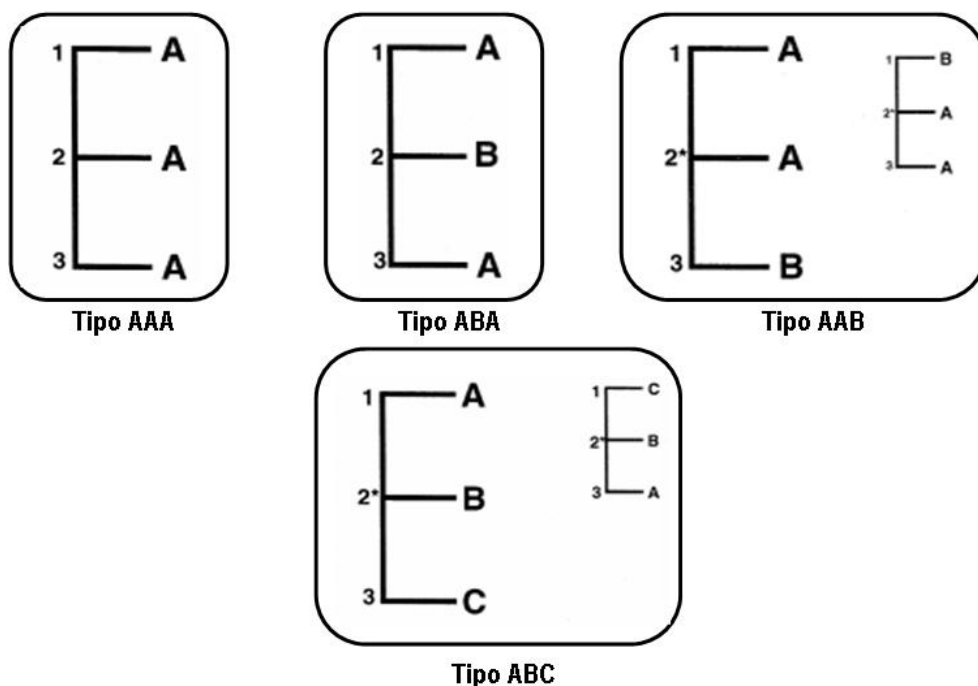
Las lipasas también pueden ser específicas para determinados ácidos grasos. Esta especificidad no es muy estricta y se determina comparando la diferente tasa de hidrólisis relativa de distintos ésteres de ácidos grasos con diferentes grupos acilo.



**Figura 26.** Especificidad por diferentes ácidos grasos de las lipasas. En este caso el “ácido graso A” se hidroliza mejor que el “ácido graso B”, que resiste la acción de lipasa.

### 5.6.3 Utilización de lipasas para la síntesis de TAGs estructurados.

Las lipasas son una poderosa herramienta para la síntesis de lípidos estructurados. La Figura 27 muestra esquemáticamente los diferentes tipos de TAGs estructurados que se pueden sintetizar, dependiendo de su estructura.



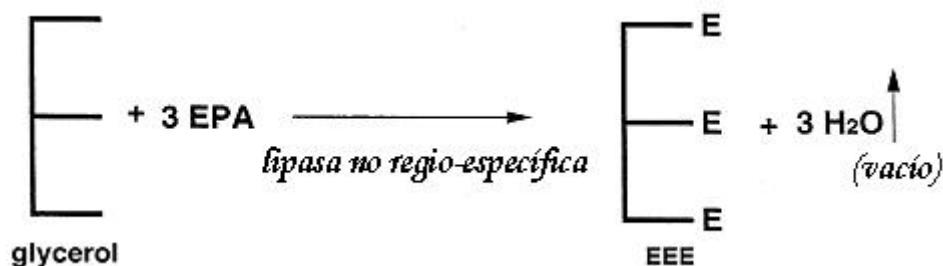
**Figura 27.** Clasificación de los diferentes tipos de TAGs dependiendo de su estructura. Las letras “A”, “B” y “C” simbolizan distintos tipos de ácidos grasos. Los tipos AAB y ABC tienen centros quirales en la posición *sn*-2 y se indican con asteriscos. Los posibles isómeros ópticos se muestran en los esquemas de menor tamaño.

El grupo de Yamane comparó la síntesis de TAGs estructurados mediante lipasas siguiendo diferentes vías o estrategias [477]:

### 5.6.3.1 Síntesis de TAGs tipo AAA.

Se pueden sintetizar a partir de glicerol y FAs tanto por vía química como enzimática. Esta reacción no necesita especificidad.

El grupo de Yamane sintetizó triecosapentaenoilglicerol (EEE) a partir de EPA y glicerol con la lipasa *Candida antarctica* (Novozyme™) (inmovilizada y no regioespecífica) [478]. En esta reacción se eliminó agua mediante vacío para favorecer la esterificación y se consiguió un rendimiento del 98% con una relación estequiométrica de glicerol:EPA = 1:3.



**Figura 28.** Síntesis enzimática de TAGs estructurados del tipo EEE.

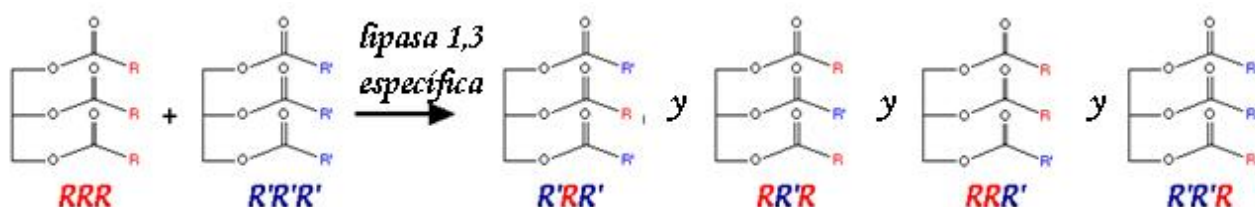
### 5.6.3.2 Síntesis de TAGs tipo ABA.

Para la síntesis de este tipo de TAGs podemos seguir diferentes métodos:

- Interesterificación entre dos TAGs distintos catalizada por lipasa específica para posiciones  $\gamma$ -1 y  $\text{sn}$ -3.

El producto es una fracción de TAGs que se recupera fácilmente eliminando el catalizador. No obstante, este método presenta una desventaja, ya que la reacción produce una compleja mezcla de especies de TAGs, que no son fáciles de aislar por separado.

Aunque este método es muy empleado, no es la mejor manera para sintetizar un único TAG estructurado deseado. Esta estrategia es adecuada cuando se pretende obtener una mezcla de TAGs que contenga el TAG estructurado objetivo, de una manera simple y económica [477].



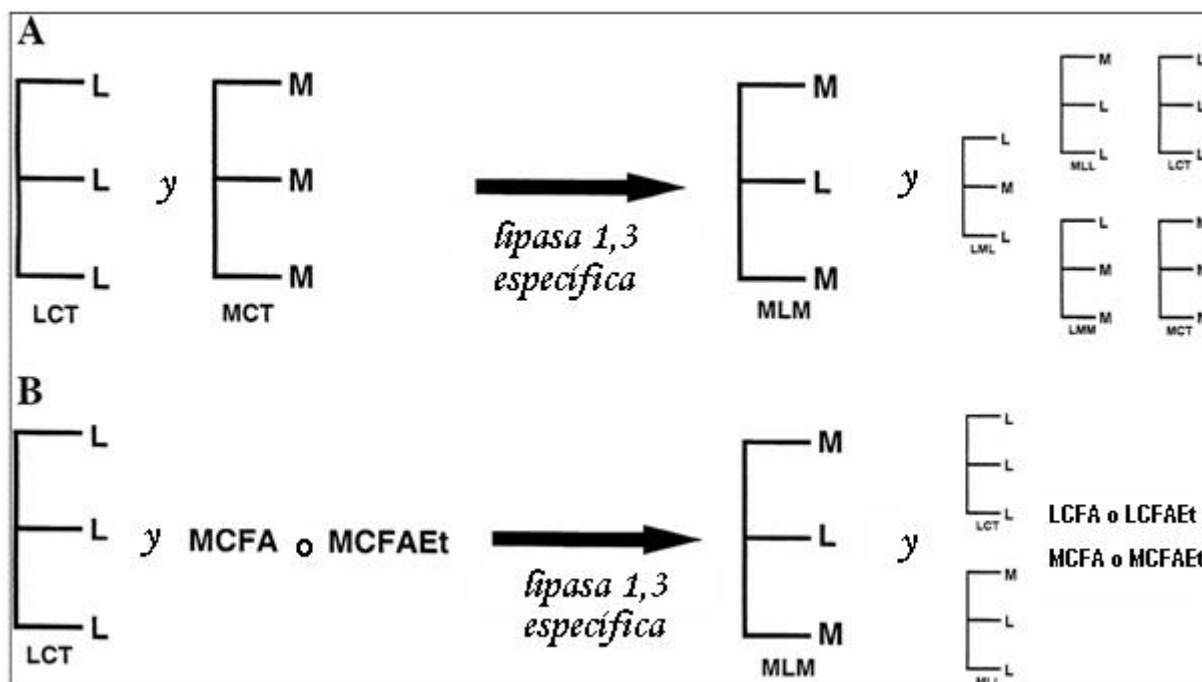
**Figura 29.** Síntesis de TAGs estructurados simétricos por interesterificación enzimática de dos TAGs monoácidos, RRR y R'R'R'.

Este método ha sido muy utilizado en la síntesis de MCTs y LCTs. Así se obtienen mezclas con distintos TAGs: MLM, LML, LMM, etc. en las que se pretende alterar las propiedades físicas de la mezcla de MCTs y LCTs [479, 480].

El grupo de Akoh llevó a cabo interesterificaciones de tricaproilglicerol (C10:0) y trilinoleilglicerol (C18:2) [479], o tricapriloilglicerol (C6:0) y trioleoilglicerol (C18:1) [480] como sustratos, resultando mezclas de TAGs con combinaciones de ácido caproico y linoléico o ácido caproico y oleico.

- Acidolisis entre un TAG y FAs o interesterificación entre un TAG y FAEEs, catalizada por lipasa específica para posiciones  $\text{sn}$ -1 y  $\text{sn}$ -3.

Estas reacciones producen mezclas de TAGs que contienen el TAG estructurado objetivo y FAs o FAEEs. En este tipo de reacción se suele emplear un exceso de FAs o FAEEs. Estos FAs o FAEEs que forman parte del producto de reacción deben eliminarse posteriormente mediante destilación molecular [481], SFE [482] o extracción alcalina [483]. De este modo se obtienen TAGs estructurados de elevada pureza. Con este método se sintetizan la mayoría de los productos industriales descritos con anterioridad (MLM, Betapol<sup>TM</sup>, CBE, BOB).



**Figura 30.** Estrategias para sintetizar por vía enzimática TAGs estructurados del tipo MLM.

El grupo de Akoh llevó a cabo reacciones de acidólisis con *Rhizomucor miehei* entre diferentes tipos de aceites y distintos MCFAs:

- ⇒ Aceite de oliva y ácido caprílico [484].
- ⇒ Aceite de pescado y ácido cáprico [485].
- ⇒ Aceite de palma y ácido caprílico [486].
- ⇒ Aceite de salvado de arroz y ácido cáprico [487].

Senanayake y Shahidi llevaron a cabo reacciones de acidólisis de grasa de foca con ácido laúrico [488] y cáprico [489], empleando la lipasa *Rhizomucor miehei*.

Shimada y col. también realizaron reacciones de acidólisis [490, 491] de distintos aceites con ácido caprílico empleando la lipasa *Rhizomucor delamar* inmovilizada en un soporte cerámico. Cabe destacar que esta enzima mantuvo su actividad, ya que se repitió el ciclo 3 veces y posteriormente catalizó modificaciones de aceites que contenían FAs esenciales [491],  $\gamma$ -linoleico [490], y araquidónico [492].

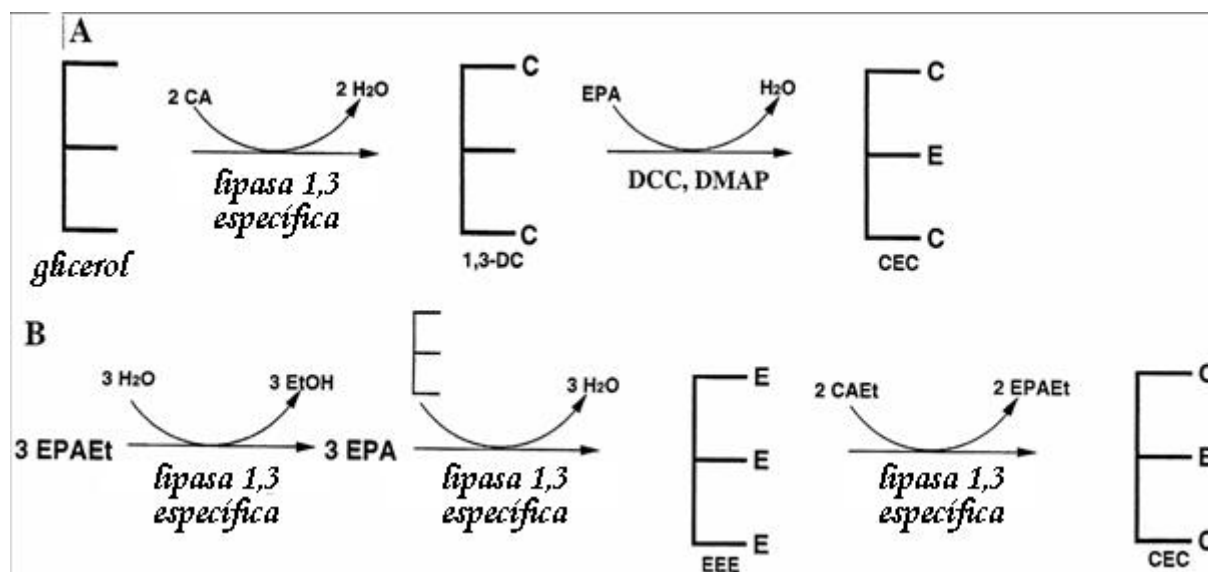
Pese a la gran versatilidad de las lipasas, hay sustratos que son más resistentes que otros a su acción. Este es el caso del DHA que contienen ciertos aceites como el aceite de atún [493], y también el ácido docosapentaenoico (DPA) frente a diversas enzimas fúngicas muy comunes. Se ha comprobado que la lipasa *Rhizomucor miehei* (lipozyme RM IM) es 1,3 específica y poco activa frente a residuos de DHA y DPA, mientras que la lipasa *Pseudomonas* tiene una menor

especificidad espacial en reacciones de acidólisis, pero es algo más activa frente a residuos de DHA y DPA [477].

Torres y col. estudiaron la actividad relativa de diferentes lipasas (*Pseudomonas cepacia*, *Penicillium camemberti*, *Candida antarctica* y lipasa de *Rhizomucor miehei*) con distintos FAS, en un estudio de esterificación de glicerol con CLA y ácidos grasos de cadena larga de aceite de pescado [494].

- Acilación de glicerol con FAs catalizada por lipasa específica para posiciones *sn*-1 y *sn*-3, seguida de una acilación química de la posición *sn*-2 del 1,3-diacilglicerol.

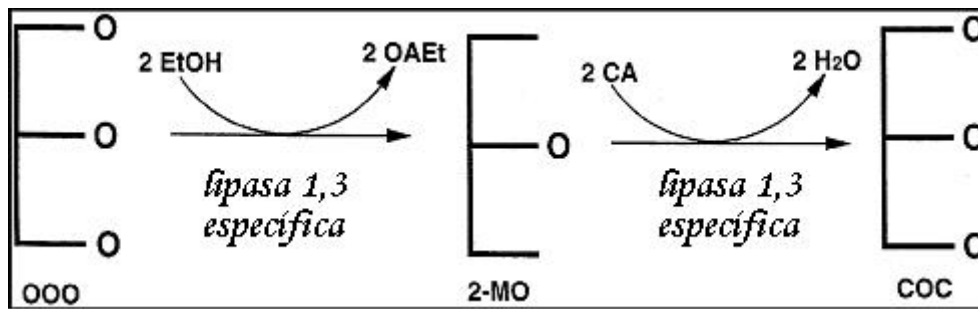
De este modo, el grupo de Yamane sintetizó 1,3-dicapriiloil-2-eicosapentaenoilglicerol (CEC), a partir de glicerol, CA o CAEE y EPA o EPAEE. En la síntesis del 1,3-DAG es importante eliminar el agua o el etanol generados durante la reacción, mediante vacío o borboteo de N<sub>2</sub>. Después de purificar el producto en una columna de silica gel y se lleva a cabo la esterificación química del 1,3-DAG con EPA. Se produce en presencia de diciclohexilcarbodiimida como agente de condensación y dimetioaminopiridina como catalizador. La esterificación del 1,3-DAG con EPA también se intentó llevar a cabo empleando una lipasa, pero en este caso fue insatisfactoria por la formación de varios productos secundarios [477].



**Figura 31.** Dos rutas diferentes para sintetizar TAGs del tipo CEC.

- Otros métodos:

Por ejemplo, Soumanou y col. emplean una reacción con dos etapas para la síntesis de 1,3-dicapriiloil-2-oleoil glicerol (COC). Primero se sintetiza 2-monooileoilglicerol (2-MO) a partir de trioleoilglicerol (OOO) mediante una enzima 1,3 específica. El 2-MO resultante fue aislado por recristalización a baja temperatura [495, 496].



**Figura 32.** Ruta enzimática para sintetizar TAGs estructurados del tipo COC.

En la segunda etapa el 2-MO se esterifica con ácido caprílico (CA). Un problema que presenta esta metodología es la posible migración del grupo acilo del 2-MO para formar 1-MO en ambas etapas. Esta isomerización se puede minimizar llevando a cabo alcoholisis del OOO en vez de hidrólisis, empleando metil-*tert*-butiléter como disolvente y lipasas fúngicas inmovilizadas en Celita. Mediante un proceso similar estos autores sintetizaron 1,3-dioleoil-2-palmitoilglicerol (OPO), principal componente del Betapol™ [497]. Otra desventaja de este método es que la recrystalización del 2-MO a baja temperatura no se puede aplicar en 2-MAGs con puntos de fusión muy bajos, como es el caso de los 2-MAGs que contienen PUFAs.

Irimescu y col. sintetizaron 1,3-dicapriloil-2-docosahexaenoil glicerol realizando una etanolisis de tridocosahexaenoil glicerol con *Candida antarctica* (Novozym 435) inmovilizada para formar 2-monoglicerido (2-MAG). Posteriormente se re-esterificó el 2-MAG con etilcaprilato en presencia de la lipasa *Rhizomucor miehei* como catalizador. Se empleó un exceso de etanol y se obtuvo un rendimiento entorno al 85% [498]. Del mismo modo, estos autores realizaron una etanolisis regioespecífica de trioleína empleando *Candida antarctica* inmovilizada. En este proceso se incrementó el rendimiento y la regioespecificidad de la enzima usando un exceso de etanol. Posteriormente el 2-MAG se re-esterificó con ácido caprílico [499].

### 5.6.3.3 Síntesis de TAGs tipo AAB.

Este tipo de TAG estructurado se sintetiza empleando una lipasa que catalice la sustitución única de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de un TAG con un FA o un FAEE, evitando la sustitución doble.

El grupo de Yamane sintetizó 1,2 (2,3)-dicapriloil-3(1)-eicosapentaenoil-*sn*-glicerol (CCE) a partir de tricapriloilglicerol (CCC) y EPAEE mediante una transesterificación catalizada por lipasa [500, 501].

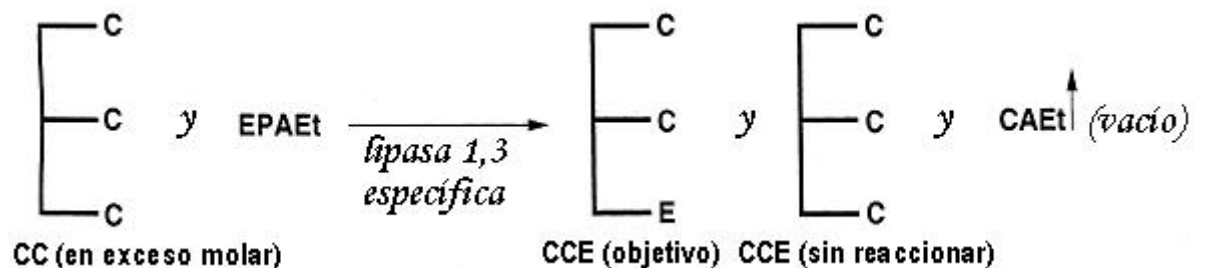


Figura 33. Estrategia para sintetizar TAGs estructurados del tipo CCE.

Se evitó la formación de 1,3-dieicosapentaenoil-2-capriloil-*sn*-glicerol (ECE) empleando un exceso de CCC en la reacción (CCC:EPAEE = 3:1). En este trabajo, el CCC que queda al final de la reacción se separa del producto por destilación molecular. El CAEE que se forma durante la reacción se elimina por vacío, añadiendo una cantidad periódica de agua para mantener la actividad de la enzima.

#### 5.6.3.4 Síntesis de TAGs tipo ABC.

Algunas lipasas presentan una selectividad o preferencia regioespacial por la posición *sn*-1 o por la posición *sn*-3. Estas lipasas permiten la síntesis de TAGs estructurados quirales del tipo AAB o TAGs estructurados del tipo ABC.

Chandler y col. estudiaron la estereoespecificidad de *Rhizomucor miehei* en la síntesis de 1-oleoil-2,3-dipalmitoilglicerol a partir de tripalmitoil glicerol (PPP) y ácido oleico (OA) por acidólisis [502]. Comprobaron que esta lipasa tiene más preferencia por la posición *sn*-1 que por la posición *sn*-3. Esta estereoespecificidad depende de la actividad de agua, longitud de cadena del TAG y el tipo de disolvente

Estos autores siguieron una estrategia similar para la síntesis de TAGs estructurados del tipo ABC. Emplearon una acidólisis parcial de un TAG tipo ABA para con un FA. Utilizaron *Rhizomucor miehei* en la reacción de 1,3-dipalmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol (POP) con ácido esteárico. La cantidad obtenida de SOP fue 4.8 veces mayor que la de POS.

Existen numerosas publicaciones y patentes que estudian la síntesis de lípidos estructurados. Xuebing Xu revisó la síntesis enzimática de TAGs estructurados [503], estudió la interesterificación enzimática para la producción de lípidos estructurados específicos [504] y otros métodos de síntesis de lípidos estructurados [505].

En este campo también cabe destacar una patente de Akoh sobre lípidos estructurados [506].



#### 5.6.4 Procesos de enriquecimiento en PUFAs y CLA.

Las lipasas son biocatalizadores muy adecuados para procesos de esterificación y transesterificación en los que intervengan PUFAs  $\omega$ -3, ya que estos FAs son muy lábiles y las lipasas trabajan en condiciones de reacción suaves [507, 508]. Basándose en la selectividad por FA, las lipasas son muy utilizadas en procesos de enriquecimiento de PUFAs  $\omega$ -3 en aceites de pescado mediante reacciones de hidrólisis, alcoholisis, transesterificación y esterificación [509]. Las lipasas permiten la producción de concentrados de EPA y DHA con gran eficacia. Pueden emplearse para concentrar EPA junto a DHA o incluso las lipasas pueden discriminar entre estos FAs para concentrar EPA y DHA individualmente [510, 511].

Además, las lipasas, debido a su regioselectividad, pueden ser muy buenos biocatalizadores para la producción de TAGs estructurados que contengan PUFA  $\omega$ -3 en la posición central junto con MCFAs en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 [509]. Debido que las lipasas normalmente son específicas para las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula de glicerol, se suelen emplear para introducir distintos FAs en esas posiciones por procesos de esterificación o transesterificación. Del mismo modo, se pueden llevar a cabo hidrólisis o alcoholisis regioselectivas en estas posiciones.

La síntesis de TAGs estructurados tipo MLM ricos en PUFAs  $\omega$ -3 se suele realizar entre TAGs ricos en PUFAs  $\omega$ -3 mediante interesterificación [478, 500, 512, 513] con MCFA etil ésteres o mediante acidolisis con MCFAs [514]. Estos procesos son posibles gracias a la especificidad de las lipasas en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del TAG y a que en el aceite de pescado, los PUFAs  $\omega$ -3 se encuentran preferentemente en la posición central de los TAGs [515, 516].

Torres y col. llevaron a cabo un enriquecimiento de FAs  $\omega$ -3 de un aceite de pescado mediante una etanolisis con la lipasa *Pseudomonas cepacia*. El exceso de FAEEs se separó del producto final mediante destilación molecular. Posteriormente se reesterificaron los acilgliceroles con CLA estudiando diferentes lipasas comerciales. Los mejores resultados se obtuvieron con *Pseudomonas cepacia* y un exceso 5 veces mayor de CLA [481].

Wijesundera revisó y estudió la síntesis de TAGs estructurados ricos en PUFAs  $\omega$ -3, teniendo en cuenta estrategias o métodos puramente químicos, químico-enzimáticos y puramente enzimáticos [517].

Con este objetivo, Rosu y col. sintetizaron 1,3-diacilgliceroles mediante esterificación directa de glicerol con ácidos grasos en un sistema libre de disolventes. En este proceso se utilizaron ácidos grasos con puntos de fusión relativamente bajos (<45 °C), como FAs insaturados y de mediana longitud de cadena (EPA y caprílico) [518].

Rosu y col. también llevaron a cabo reacciones de glicerolisis de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 etil ésteres (65-99% de DHAEE) para la preparación de glicéridos con alto valor nutricional. En este proceso emplearon como catalizador *Pseudomonas*, por su especificidad por DHA, inmovilizadas en polvo de  $\text{CaCO}_3$  y vacío, obteniendo una conversión del 90% [519].

En relación con el enriquecimiento de TAGs con CLA, Kawashima y col. llevaron a cabo reacciones de acidolisis de tricaprilina empleando la lipasa *Rhizomucor miehei* como catalizador. En este proceso se incorporó una mezcla comercial de CLA, que contenía los isómeros 9-*cis*, 11-*trans* y 10-*trans*, 12-*cis*-CLA, en la posición 1(3) del TAG. Los TAGs estructurados obtenidos se purificaron posteriormente mediante destilación molecular, consiguiéndose una pureza del 93,2% y un rendimiento del 52,3% en el proceso [520].

Haraldsson y col. [521] sintetizaron TAGs estructurados tipo MLM ricos en PUFAs  $\omega$ -3 mediante 2 vías:

- Vía puramente enzimática:

En la primera etapa sintetizaron un TAG homogéneo constituido por EPA y DHA usando la lipasa *Candida antarctica* [521]. En la segunda etapa emplearon la misma lipasa para hacer una etanolisis del TAG. Finalmente esterificaron el 2-MO resultante en la etapa anterior con MCFAs utilizando *Rhizomucor miehei* inmovilizada. Para evitar el exceso de PUFAs, etanol y glicerol producido, fue necesario el empleo de disolventes orgánicos.

- Vía químico-enzimática:

En este proceso la regioselectividad de la lipasa (*Candida antarctica*) fue dirigida a sintetizar 1,3-DAG con MCFAs. Posteriormente se introdujo el EPA y DHA en la posición central de la molécula de 1,3-DAG mediante una etapa química. Esta etapa se basa en una optimización del método de Schneider y col. Se usa 1-(3-dimetilaminopropil)-3-hidrocloruro de etilcarbodiimida (EDCI) en diclorometano en presencia de DMAP [522].

La vía puramente enzimática necesita un exceso de EPA o DHA (tres veces), y un gran exceso de MCFAs para obtener buenos rendimientos de pureza y rendimiento en el TAG estructurado final. Su principal ventaja es que es un proceso respetuoso con el medio ambiente, ya que no emplea productos químicos tóxicos ni peligrosos. Para obtener el grado de pureza deseado en los productos obtenidos por esta vía, muchas veces son necesarios tediosos procesos de purificación en los que participan disolventes orgánicos. No obstante, esta purificación se puede llevar a cabo mediante otros procesos como SFE [482] o destilación molecular [433], que ofrecen gran eficacia y son respetuosos con el medio ambiente.

La vía químico-enzimática presenta las siguientes ventajas:

- ⇒ Genera productos química y regioisoméricamente puros.
- ⇒ Requiere únicamente cantidades estequiométricas de los FAs.
- ⇒ El intermedio de reacción 1,3-DAG es más estable que el 2-MAG, y es menos susceptible a la migración de grupos acilo.

Su principal desventaja es el empleo de productos químicos y disolventes orgánicos, que se suelen emplear en síntesis farmacéutica y que ofrece ventajas en términos de pureza.

En esta misma línea de investigación, Haraldsson y col. patentaron la producción de TAGs a partir de glicerol y ácidos grasos poliinsaturados larga longitud de cadena, empleando la lipasa *Candida antarctica* como biocatalizador [523].

### **5.6.5 Otros lípidos estructurados.**

Hay otros lípidos estructurados distintos a los TAGs estructurados que pueden tener propiedades funcionales y uso en elaboración de nutracéuticos y productos alimenticios. Algunos lípidos que se pueden emplear para la síntesis de lípidos estructurados son los fosfolípidos, determinados análogos de fosfolípidos [524] y los alquilgliceroles o éteres lipídicos.

#### **5.6.5.1 Síntesis de fosfolípidos estructurados.**

Es posible producir divergencias estructurales en fosfolípidos mediante la modificación de su grupo polar o de su composición en ácidos grasos. Algunas técnicas empleadas en la modificación de fosfolípidos se basan en métodos que contienen procesos físicos, químicos y enzimáticos [525]. La modificación enzimática presenta ventajas frente a los métodos químicos y físicos, en la preparación de fosfolípidos estructurados para aplicaciones en fármacos, aditivos alimentarios, cosméticos, tecnología de liposomas y terapia génica [526].

El uso de lipasas y fosfolipasas permite la eliminación y sustitución de grupos acilo en las posiciones *sn-1* y *sn-2* de los fosfolípidos, mediante hidrólisis y posterior reesterificación o mediante la interesterificación directa con un donador de grupos acilo [527]. Las lipasas se pueden usar para el intercambio selectivo de FAs en la posición *sn-1* y la fosfolipasa  $A_2$  se puede usar para la reacción de intercambio selectivo de la posición *sn-2* de los fosfolípidos [528]. La fosfolipasa  $A_1$  también es específica para la posición *sn-1*, pero no es muy utilizada en modificaciones de fosfolípidos. La fosfolipasa  $A_2$  se emplea en la síntesis y modificación de fosfolípidos mediante esterificación [529] o acidólisis [530].

Hay trabajos que estudian la incorporación de PUFAs [531-534], MCTs y CLA [535] a fosfolípidos, y reacciones de transesterificación de fosfolípidos con MAG o DAG con diferentes grupos acilo

(C4-C18:3) [536]. Principalmente, se utilizan disolventes orgánicos como medio de reacción [537, 538].

Por otro lado, también pueden obtenerse divergencias estructurales que aporten posibles propiedades funcionales, modificando el grupo polar de los fosfolípidos originales [525]. El grupo polar de los fosfolípidos puede ser modificado empleando reacciones enzimáticas catalizadas por fosfolipasa D (PLD). Mediante la hidrólisis del enlace fosfodiéster [539], se pueden incorporar una gran variedad de grupos [540]. Estas reacciones se suelen llevar a cabo en sistemas bifásicos que contienen una fase acuosa y otra orgánica.

#### 5.6.5.2 Síntesis de alquilglicerolios estructurados.

Los alquilglicerolios o éteres lipídicos también han sido objeto de síntesis de lípidos estructurados con propiedades funcionales. En ocasiones, la extracción de estos compuestos a partir de fuentes naturales es complicada y por este motivo, se utilizan análogos sintéticos de alquilglicerolios [541].

Haraldsson y col. sintetizaron éteres lipídicos estructurados empleando una metodología químico-enzimática. Estos autores tomaron como material de partida 1-O-alquilglicerolios del tipo “chimyl”, “batyl” y “selachyl” sintetizados mediante reacciones de química orgánica. Esta síntesis tuvo lugar en dos etapas. Se partió de isopropilenglicerol racémico. La fracción éter se introdujo mediante alquilación con los correspondientes alquil bromuros, usando hidróxido potásico como base, en presencia de bromuro de tetrametilamonio como catalizador [542]. Los aductos intermedios de 1-O-alquil-2,3-isopropilenglicerol fueron desprotegidos de la fracción de isopropileno bajo condiciones de agua ácida en THF, permitiendo la obtención de “chimyl”, “batyl” y “selachyl” -1-O-alquilglicerolios con rendimientos del 80, 80 y 82%, respectivamente. En este caso, también es relevante la desventaja que supone el uso de compuestos químicos y disolventes orgánicos, que pueden ser tóxicos y/o peligrosos en la producción de nutracéuticos o ingredientes alimentarios funcionales.

Con el objetivo de estudiar la posible combinación de los efectos beneficiosos de los alquilglicerolios con los de los TAGs estructurados de tipo MLM, Haraldsson y col. obtuvieron distintos éteres lipídicos del tipo ALM (alquil-largo-mediano). Se esterificaron 1-O-alquilglicerolios con PUFAs  $\omega$ -3 (EPA y DHA) en la posición *sn*-2 y MCFAs en la posición final, mediante un proceso químico-enzimático similar al descrito con TAGs estructurados. Se estudió esta reacción con “chimyl”, “batyl” y “selachyl” -alcohol. Se estudió primero en compuestos racémicos, después con compuestos ópticamente puros con la configuración natural y finalmente con la configuración opuesta [542].

De la misma manera que en la síntesis de TAGs estructurados, en la primera etapa (enzimática) se utilizó *Candida antarctica* inmovilizada para esterificar la posición final de los tres tipos de 1-O-alkilglicerol con vinil ésteres de MCFAs a 0-4 °C. Se obtuvieron rendimientos del 90-99%, después de purificar el material mediante una recristalización en hexano o éter de petróleo. En estos casos no se observó acil migración y la lipasa no actuó en la posición intermedia. Se apreció una menor tendencia a sufrir acil migración que con 1-MAG y 1,3-DAG [542].

En la segunda etapa (química), se introdujo el PUFA  $\omega$ -3 en la posición intermedia de la molécula empleando EDCI como agente condensante en presencia de DMAP. Los productos se purificaron con buenos rendimientos (>90%) en una columna cromatográfica de sílice [542].

Houte y col. llevaron a cabo procesos de síntesis de lípidos estructurados y éteres lipídicos con compuestos antioxidantes: derivados de ácidos grasos y carotenoides. En estos procesos se emplearon rutas de síntesis químicas y rutas enzimáticas usando *Candida antarctica* [543].

El aislamiento y purificación de alquilglicerol a partir de fuentes naturales, como es el aceite de hígado de tiburón, es además interesante por la cantidad relativamente alta que presentan estos aceites de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (aproximadamente el 10-15% de los ácidos grasos presentes son PUFAs) [544, 545], especialmente de ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico (EPA, C20:5) y ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico (DHA, C22:6).

Un método de obtención alternativo de alquilglicerol no esterificados (NEAG) a partir de aceite de hígado de tiburón es mediante reacciones de saponificación o etanolisis. La reacción de transesterificación por etanolisis convierte los triacilglicerol en sus correspondientes FAEEs y los DEAG en NEAG, junto a una pequeña cantidad de alquilglicerol monoesterificados (MEAG). La etanolisis de aceite de hígado de tiburón ha sido muy utilizada para la producción de ácidos grasos etil ésteres ricos en PUFAs [310]. Otra posible vía para la transformación de los triacilglicerol es la metanolisis de aceite de hígado de tiburón [542]. Los NEAG deben ser purificados mediante procesos de SFE o destilación molecular y pueden ser reesterificados con PUFAs u otros ácidos grasos funcionales para, de este modo, diseñar éteres lipídicos estructurados de alto valor añadido.

Las reacciones catalizadas por lipasas combinadas con la extracción y fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico constituyen las dos principales herramientas empleadas para alcanzar los objetivos del presente trabajo. Son tecnologías que se caracterizan por su carácter no contaminante y respeto medioambiental, ofreciendo además diversas ventajas frente a otros métodos convencionales en términos de versatilidad, selectividad y eficacia, siendo viable además su implantación a escala industrial.

En la presente tesis se pretende combinar procesos de catálisis química con procesos de extracción y fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente para el aislamiento, purificación y enriquecimiento de ingredientes lipídicos funcionales, a partir de fuentes animales o vegetales. Asimismo, en algunos casos se pretende llevar a cabo procesos de catálisis enzimática, mediante lipasas, para transformar los productos lipídicos obtenidos y sintetizar ingredientes lipídicos de elevado valor añadido.

# OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

## 6 Objetivos y plan de trabajo.

1. Desarrollar un método rápido y fiable de análisis de lípidos neutros sin necesidad de tratamiento previo, por HPLC en fase normal con un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), para la separación, detección y cuantificación de diferentes clases de lípidos neutros o no polares. Este método se utilizará en el análisis y caracterización de muestras lipídicas complejas, tales como:
  - Materiales de partida: Aceites, grasas, destilados desodorizados de aceites, etc.
  - Productos de reacción y mezclas lipídicas generadas en procesos químicos y enzimáticos.
  - Refinados y extractos obtenidos en procesos de CC-SFE.
  
2. Considerando las ventajas que ofrece la extracción con fluidos supercríticos frente a tecnologías tradicionales, el siguiente objetivo es emplear la extracción supercrítica en contracorriente (CC-SFE) para el fraccionamiento de distintas materias primas de naturaleza lipídica y, de este modo, obtener extractos con determinados componentes de interés y alto valor añadido, que permitan su uso en la elaboración de alimentos funcionales. Se pretende llevar a cabo procesos de recuperación de ingredientes lipídicos funcionales a partir de aceites y subproductos generados en los procesos de refinación de los mismos. En algunos casos se pretende combinar procesos de CC-SFE con una previa transformación química de las muestras de partida, con objeto de facilitar la recuperación de los compuestos lipídicos de interés.
  - 2.1 Desarrollar y optimizar un proceso de desacidificación y refinado de un aceite de oliva lampante mediante CC-SFE, que tiene lugar de manera simultánea a la recuperación de escualeno a partir de este aceite. En este proceso se utilizará una fuente de escualeno de origen vegetal, alternativa al hígado de especies de tiburones, y presentaría un gran interés para su posible implantación a escala industrial.
  
  - 2.2 Desarrollar procesos de valorización de destilados desodorizados de aceites vegetales mediante extracción supercrítica en contracorriente, combinada en algunos procesos con reacciones de modificación química:
    - 2.2.1 Recuperación de escualeno mediante procesos de CC-SFE a partir de un desodorizado de aceite de oliva y de un subproducto obtenido después de la destilación y la etilación de destilados desodorizados de aceite de oliva.



- 2.2.2 Recuperación de tocoferoles y fitoesteroles mediante transesterificación y esterificación con etanol y CC-SFE a partir de un destilado desodorizado de aceite de girasol.
- 2.3 Dada la elevada presencia de escualeno y otros lípidos funcionales en algunos aceites de origen animal como el aceite de hígado de tiburón, también se pretende llevar a cabo procesos supercríticos combinados con modificaciones químicas, para la recuperación, fraccionamiento y/o purificación de productos de interés:
- 2.3.1 Recuperación de escualeno a partir de aceite de hígado de tiburón mediante CC-SFE.
- 2.3.2 Recuperación de alquilglicerol no esterificados y fraccionamiento de PUFAs omega-3 etil ésteres a partir de aceite de hígado de tiburón mediante transesterificación por etanolisis y CC-SFE.
- 2.3.3 Recuperación de alquilglicerol no esterificados a partir de aceite de hígado de tiburón mediante CC-SFE y reacciones de saponificación.
3. Por último, se sintetizarán alquilglicerol diesterificados a partir alquilglicerol no esterificados y CLA, CLAEE y EPAEE, en diferentes reacciones catalizadas por lipasas. Mediante esta tecnología, se pretende sintetizar nuevos lípidos que contengan en su molécula diferentes estructuras con una actividad biológica beneficiosa para el ser humano, pudiéndose estudiar con posterioridad posibles efectos sinérgicos de estas propiedades funcionales.
4. El objetivo final de llevar a cabo estas investigaciones a nivel de planta piloto es estudiar la aplicabilidad de estos procesos a escala industrial, para la elaboración de nutracéuticos e ingredientes alimentarios funcionales.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 7 Materiales y métodos.

### 7.1 Muestras y reactivos.

Se emplearon como patrones puros: alquilglicerol diesterificado (1-O-palmitil-2,3-dipalmitoil-*rac*-glicerol (DEAG), di-alquilglicerol no esterificado (1,2-Di-O-hexadecil-*rac*-glicerol) (NEDAG), alquilglicerol no esterificado (1-O-dodecil-*rac*-glicerol) (NEAG), trioleína (TAG), 1,3-dioleína (1,3-DAG), 1,2-dioleína (1,2-DAG), 1-monoleína (1-MAG), 2-monoleína (2-MAG), colesterol (esteroles), escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22 tetracosahexeno) (SQ), colesteril oleato (ésteres de esterol), palmitoil palmitato (ceras), ácido oleico (FFA), ácido y ácido linoleico (FFA), suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EEUU). El tamiz molecular, con un tamaño de poro de 4 Å, fue también adquirido a Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EEUU).  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol se obtuvieron de Calbiochem (Darmstadt, Alemania).

El isooctano, MTBE, metanol, hexano, acetonitrilo, isopropanol y cloroformo se adquirieron a Lab Scan Analytical Sciences (Dublín, Irlanda). Todos estos disolventes tenían grado HPLC.

El etanol absoluto (grado PRS), etanol 96% (vol/vol), éter dietílico estabilizado con 6 ppm de BHT (grado PRS), KOH 0,1 M / etanol, ftalato ácido dipotásico, fenoltaleína, sulfato de sodio anhidro 99% y el ácido sulfúrico 95-98% fueron adquiridos a Panreac Química S.A. (Barcelona, España). El ácido fórmico se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania).

El CO<sub>2</sub> fue suministrado por Air Liquide de España S.A. En el proceso de recuperación de escualeno y desacidificación de aceite de oliva, se empleó CO<sub>2</sub> identificado con calidad N-48 (99,998 % de pureza). En el resto de extracciones se utilizó CO<sub>2</sub> identificado con calidad N-38 (99,98 % de pureza). El nitrógeno (con pureza del 99,999%), helio (con pureza del 99,999%), hidrógeno (con pureza del 99,999%) y aire comprimido (con una composición del 20% de O<sub>2</sub> en N<sub>2</sub>) también fueron suministrados por Air Liquide (Madrid, España).

El relleno utilizado en la columna de extracción con fluidos supercríticos fue Anillos Fenske de 3 mm de diámetro, fabricados en vidrio borosilicato (Afora S.A., España).

En el proceso de recuperación de escualeno y desacidificación de aceite de oliva se emplearon 5 aceites de diferente grado de acidez (0,5; 1; 2,5; 3 y 4°) suministrados por el Grupo Empresarial Muela.

En los procesos de recuperación de escualeno a partir de fuentes oleosas vegetales, se empleó como material de partida para los experimentos de CC-SFE, un destilado desodorizado de aceite de oliva modificado, que fue donado por una empresa oleica española. El material de partida empleado en este trabajo contiene gran diversidad de compuestos, pero los constituyentes mayoritarios son escualeno (50-60% en peso) y ácidos grasos alquil ésteres (FAAE). Además, aproximadamente un 3-5% de TAGs se encuentran presentes en la mezcla.

En las extracciones preliminares se empleó un destilado desodorizado de oliva suministrado por Borges S.A. (Lérida, España), que tenía una composición de un 20% en peso de escualeno y un 80% en peso de ácidos grasos libres.

Para la recuperación de otros lípidos minoritarios a partir de fuentes oleosas vegetales, se partió de un destilado desodorizado de aceite de girasol (SODD), que fue suministrado por Borges S.A., cuya composición se detalla en la Tabla 13.

En los procesos de purificación de alquilglicerol y de síntesis de alquilglicerol ricos en ácido linoleico conjugado y ácido eicosapentaenoico se utilizó un aceite de hígado de tiburón, libre de escualeno y cuya composición se detalla en la Tabla 18, que fue suministrado por Lysi (Reykjavik, Islandia). También se utilizaron dos aceites de hígado de tiburón, con un contenido del 46 ó 60% en peso de escualeno, suministrados por Crystalfishing (La Coruña, España).

El ácido linoleico conjugado (CLA, C18:2) (con pureza del 90% en peso) y el ácido linoleico conjugado etil éster (CLAEE) (con pureza del 80% en peso) fueron donados por Natural ASA (Hovdebygda, Noruega).

Según las especificaciones del vendedor, los porcentajes de área de los diferentes isómeros presentes en el CLA fueron: 0,42% de c9c12; 42,73% de c9t11; 44,24% de t10c12; 1,33% de c9c11; 1,35% de c10c12 y 1,19% de (t9t11 + t10t12). El resto de la composición del CLA comercial (8,74%) estaba constituido por otros ácidos grasos (mayoritariamente ácido oleico).

Asimismo y según las especificaciones, los porcentajes de área de los diferentes isómeros presentes en el CLAEE fueron: 40% de c9t11; 39,8% de t10c12; 2,2% de otros isómeros; 2,5% de ácido esteárico y 12,9% de ácido oleico. El resto de la composición estaba constituido por otros ácidos grasos.

El ácido eicosapentaenoico etil éster (EPAEE, Incromege E7010) fue donado por Croda (Yorkshire, Inglaterra). La composición de este producto era EPA 75% y DHA 11%. El resto de la composición estaba constituido por otros ácidos grasos etil ésteres, mayoritariamente C20:1 (aproximadamente el 3%).

La lipasa B *Candida antarctica* inmovilizada (Novozym 435) fue donada por Novozymes (Bagsbaerd, Dinamarca).

## **7.2 Análisis y caracterización de muestras lipídicas de partida, productos de reacción, extractos y refinados.**

### **7.2.1 Preparación de las muestras.**

Las muestras lipídicas almacenadas en refrigeración fueron retiradas del frigorífico y atemperadas a temperatura ambiente por un tiempo mínimo de 30 minutos para su homogeneización.

Las muestras lipídicas que presentaban fases sólidas debido a su contenido en lípidos con elevados puntos de fusión fueron calentadas a 50 °C en un baño con agua. Se mantuvieron a 50 °C el tiempo necesario para conseguir la completa homogeneización de la muestra.

Cuando las muestras fueron completamente homogéneas, se tomaron alícuotas de las diferentes muestras de partida, de los productos de las diferentes reacciones químicas y enzimáticas llevadas a cabo, y de los extractos y refinados obtenidos en los procesos de CC-SFE. Las alícuotas se pesaron en una balanza de precisión con un error de  $\pm 0,0001$  g.

Las muestras, a menos que se especifique de otra manera, fueron disueltas en cloroformo/metanol 2:1 (vol/vol). Se llevaron hasta una concentración de 1-4 mg/mL para el análisis por HPLC y de 10-25 mg/mL para los análisis por cromatografía de gases. La elección de la concentración de cada muestra dependió del número de especies químicas presentes en ella, para, de este modo, tener concentraciones dentro de los límites en los que prepararon las curvas de calibrado o factores de respuesta de todos los compuestos.

### **7.2.2 Análisis de lípidos neutros por HPLC-ELSD.**

El análisis de composición de lípidos neutros se efectuó en una columna kromasil silica 60, de 250 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno (Análisis Vínicos, Tomelloso, España) acoplada a un horno CTO 10A VP 2, una bomba LC-10AD VP, un módulo de gradiente FCV-10AL VP, un degasificador DGU-14A, y un detector evaporativo de dispersión de luz ELSD-LT de Shimadzu (IZASA, España). El bucle utilizado para inyectar las muestras era de 20  $\mu$ L.



Figura 34. Equipo de HPLC empleado para el análisis de lípidos neutros.



**Figura 35.** Detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD).



**Figura 36.** Detalle de la cámara de nebulización del ELSD.

La composición de la fase móvil se describe en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Composición del gradiente de la fase móvil (%).

Tiempo (minutos)	Isooctano	Metil-tert-butil éter *	Isopropanol
0	99,5	0,5	0
3	99,5	0,5	0
3,01	98,5	1,5	0
20	89	11	0
30	75	25	0
30,01	71	27	2
50	71	27	2
50,01	75	25	0
60	75	25	0
61	99,5	0,5	0
70	99,5	0,5	0

\* Metil-tert-butil éter contenía 0,01% vol/vol de ácido fórmico

### 7.2.3 Análisis de FAMES y FAEEs por cromatografía de gases.

En el análisis de FAEEs se empleó un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem XL (Norwalk, CT, EEUU), equipado con un inyector programable split/splitless y un detector de ionización de llama (FID). Este sistema está acoplado a un programa de adquisición de datos y control para cromatografía Perkin-Elmer (Turbochrom). Se empleó una columna capilar BTR-Carbowax (Quadrex, Woodbridge, CT, EEUU) de 30 m de largo 0,25 mm de diámetro interno, recubierta con una capa de 0,25  $\mu$ m de polietilenglicol (fase polar resistente a oxígeno).





**Figura 37.** Cromatógrafo de gases de la marca Perkin-Elmer (Norwalk, CT, EEUU).

Para el análisis de FAEEs de las muestras obtenidas en los experimentos de CC-SFE del producto de etanolisis de aceite de hígado de tiburón se empleó un cromatógrafo adquirido recientemente por el grupo de investigación. En estos análisis, se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de una disolución de la muestra en un cromatógrafo de gases (6890N Network GC System) acoplado a un inyector automático (Agilent 7683B), ambos de la marca Agilent (Avondale, PA, EEUU). Se utilizó una columna capilar HP-88 (Avondale, PA, EEUU) de 30 m y 0,25 mm de diámetro interno.



**Figura 38.** Cromatógrafo de gases de la marca Agilent (Avondale, PA, EEUU).

El programa de temperaturas empleado fue el mismo para los dos equipos cromatográficos y se detalla a continuación:

- ⇒ Temperatura inicial: 100 °C.
- ⇒ Se calienta hasta 180 °C a 20 °C/min.
- ⇒ Finalmente se calienta desde 180 hasta 220 °C a 15 °C/min.
- ⇒ La temperatura final de 220 °C se mantiene durante 35 min.

La temperatura del inyector fue de 220 °C y la del detector de 250 °C. La relación de split fue 20:1. Los tiempos de retención de los diversos FAEEs se determinaron mediante la inyección de una disolución de PUFA N°1 de origen marino (#4-7033; Supelco, Bellefonte, PA, EEUU).

La identificación del metil éster del CLA (CLAME) y su tiempo de retención asociado se llevó a cabo por inyección directa de este compuesto, obtenido mediante la reacción del CLA con una disolución de HCl 0,2 M en metanol. En esta reacción se utilizó el CLA comercial del 90% en peso

de pureza donado por Natural ASA (Hovdebygda, Noruega), cuya composición se detalla con anterioridad.

#### 7.2.4 Equipo de HPLC-UV/Vis.

El análisis de determinadas muestras se llevó a cabo por inyección manual en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) (Varian ProStar Series, CA, EE.UU.) isocrático (ProStar 210/215) equipado con un detector UV/Vis (ProStar 320), que permite seleccionar longitudes de onda en un rango de 190–700 nm. Para la adquisición y procesado de datos se empleó un ordenador personal y un programa informático (Varian Workstation, CA, EE.UU.). En la Figura 39 se muestra el equipo de HPLC empleado para el análisis de las muestras.



**Figura 39.** Equipo de HPLC isocrático con detector UV/Vis.

### **7.2.5 Análisis de escualeno por HPLC-UV/Vis.**

En este análisis, la preparación de muestras consistió en la toma de alícuotas de los aceites de diferente acidez, y su disolución en acetona a una concentración de 25 a 28 mg/ml, para su posterior análisis por HPLC. Del mismo modo, se disolvieron en acetona alícuotas de los extractos de los separadores 1 y 2, en unas concentraciones de 7 a 8,5 mg/ml en el caso de los extractos del separador 1 y de 3 a 4,5 mg/ml en el caso de los extractos del separador 2.

Las muestras fueron disueltas en acetona e inyectadas en el equipo de HPLC-UV/Vis. La separación se realizó con una columna Microsorb-MV 100–5 C8 de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro (Varian, CA, EEUU), y 5 µm de diámetro de partícula.

El método utilizado se basó en un método desarrollado previamente por Señoráns [546]. La separación se llevó a cabo en modo isocrático, utilizando como fase móvil 100% metanol durante 30 minutos a un flujo de 1,2 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL. La longitud de onda seleccionada fue 210 nm.

La identificación de escualeno en los aceites y en los extractos se basó en la comparación de su tiempo de retención con el tiempo de retención del patrón de escualeno.

La cuantificación de escualeno se llevó a cabo empleando el método de patrón externo a través una recta de calibrado. La recta de calibrado permite el análisis de muestras en un intervalo de concentraciones de 0,5 a 0,35 mg/ml. El análisis de cada muestra se hizo por duplicado.

### **7.2.6 Análisis de esteroides por HPLC-UV/Vis.**

Los análisis de las distintas clases de esteroides se efectuaron en el equipo de HPLC-UV/Vis. Estos análisis se realizaron en fase reversa, empleando una columna Varian Microsorb-MV 100 C18, de 250 mm de largo, 4,6 mm de diámetro interno y 5 µm de diámetro de partículas (Varian, CA, EEUU), con un bucle de inyección de 20 µl y utilizando una longitud de onda de 208 nm.

La fase móvil fue una mezcla de metanol y acetonitrilo (50:50) + 3% (vol/vol) de agua destilada. El flujo utilizado fue de 2 mL/min.

### **7.2.7 Análisis de ácido oleico mediante valoración con KOH.**

El índice y grado de acidez de los refinados se determinó según el método volumétrico que se describe en el método oficial de análisis de grasas y aceites comestibles [547]. Para disolver las muestras se usó una mezcla de etanol:éter etílico 1:1 y para la valoración se empleó KOH 0,1M / etanol, factorada con ftalato ácido dipotásico para conocer su normalidad exacta, con fenolftaleína como indicador.

El grado de acidez se expresó como % en ácido oleico, ya que éste es el ácido graso mayoritario en el aceite de oliva.

$$\text{Grado de acidez} = \frac{V M N}{10 P} \quad \% \text{ de ácido oleico}$$

V = volumen en ml de disolución etanólica de KOH utilizada.

N = normalidad exacta de la disolución de KOH utilizada.

M = peso molecular de ácido en que se expresa la acidez (PM=282,45).

P = peso en gramos de la muestra utilizada.

### **7.3 Extracción supercrítica en contracorriente (CC-SFE).**

Para llevar a cabo los procesos de SFE con CO<sub>2</sub> se utilizó una planta a escala piloto para extracción de muestras líquidas en contracorriente disponible en las instalaciones de planta piloto del grupo de Investigación en Ciencias de la Alimentación de la UAM. Las características del equipo se describen en el **ANEXO 1**.

### **7.4 Reacciones de modificación química o enzimática.**

A continuación se detalla la metodología empleada durante el desarrollo de la presente tesis para llevar a cabo, con distintas finalidades, reacciones catalizadas química o enzimáticamente a partir de muestras lipídicas de diverso origen.

#### **7.4.1 Esterificación y transesterificación química en medio ácido (pretratamiento del destilado desodorizado de aceite de girasol).**

En esta reacción tiene lugar la transformación de los ácidos grasos libres y de los esterificados en forma de glicéridos, en sus correspondientes FAEEs.

La reacción de pretratamiento del destilado desodorizado de aceite de girasol (SODD) se efectuó en un reactor cilíndrico de 5 L acoplado a una tapa con 5 vías (Afora, España). Se utilizó un motor Heidolph RZR 2021 (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania) acoplado a una hélice para mezclar mecánicamente 1.75 L de SODD con 1.75 L de etanol absoluto con un 5% de ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla fue calentada a 60 °C y se mantuvo con una agitación mecánica de 1000 rpm durante al menos 15 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de 1.4 L de agua destilada, que provocó la separación de la mezcla en dos fases líquidas, que fueron separadas por decantación. Este lavado con agua se repitió dos veces con el objetivo de eliminar completamente el etanol sobrante, la glicerina y otros compuestos polares solubles en agua. Después de la

adición de los segundos 1.4 L de agua destilada, se formó una fase sólida. Esta fase sólida se separó de la mezcla mediante centrifugación y se secó en un horno a 60 °C durante al menos 15 h para su posterior análisis. El contenido en agua de la fase líquida resultante se eliminó mediante la adición de sulfato de sodio anhidro y tamiz molecular a 40 °C durante al menos 15 h. Posteriormente esta fase líquida se filtró y se secó en un rotavapor para garantizar la completa eliminación de agua y/o etanol de la mezcla. La Tabla 13 muestra la composición (% en peso) del SODD etilado, obtenido por este procedimiento.

La fase sólida estuvo constituida mayoritariamente por esteroides y FAEEs. Esta fase sólida fue lavada empleando diferentes disolventes, como etanol y hexano, para incrementar su pureza en esteroides.

El proceso de pretratamiento de SODD descrito anteriormente se repitió tres veces para obtener una cantidad suficiente de SODD etilado (4,64 L), que permitiera el posterior estudio del proceso de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente en la planta a escala piloto.



**Figura 40.** Reactor con tapa de 5 vías y manta térmica (Afora, España), agitador mecánico (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania), controlador para la temperatura (Selecta, Abrera, España) y criostato (Huber, Offenburg, Alemania) que condensa los vapores generados durante la reacción.





**Figura 41.** Detalle del reactor y la tapa de 5 vías (Afora, España).

### **7.4.2 Reacción de transesterificación por etanolisis en medio básico de aceite de hígado de tiburón.**

En esta reacción los FAs que se encuentran esterificados en forma de TAGs y alquilgliceroles di-esterificados se transformaron en sus correspondientes FAEs.

El aceite de hígado de tiburón suministrado por Lysi (Reykjavik, Islandia) se mezcló con una disolución del 5,25% (peso/vol) etóxido sódico en etanol absoluto, en una relación 4:1 (vol:vol). Esta mezcla se mantuvo durante 30 min a 60 °C con agitación. Posteriormente se realizaron dos lavados:

- ⇒ El primero, con una disolución en agua de cloruro sódico (0,5 M) a 50 °C.
- ⇒ El segundo, con agua destilada.



El volumen empleado en estos dos lavados fue la mitad del volumen de aceite de hígado de tiburón utilizado. Después del segundo lavado, la mezcla se centrifugó a 585 x g. Finalmente, el producto de la reacción de etanolisis fue secado y filtrado a vacío.

### **7.4.3 Reacción de saponificación de refinado de aceite de hígado de tiburón obtenido en procesos de CC-SFE.**

En este proceso se tomó como material de partida un refinado con un contenido en escualeno inferior al 3%, obtenido mediante un proceso de CC-SFE a partir del aceite de hígado de tiburón suministrado por Crystalfishing (La Coruña, España).

Se mezclaron 5 gramos de este refinado con 16 mL de una disolución de hidróxido potásico 3,7 N en etanol/agua (50/50 vol/vol) con 15% peso/vol de EDTA. La mezcla fue calentada a 60 °C durante 1 h con agitación de 300 rpm. Tras este periodo, se paró la reacción añadiendo 4 mL de agua y la fracción insaponificable fue extraída de la fase acuosa con tres volúmenes de 20 mL de dietil éter. Posteriormente, la fase de éter se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó bajo nitrógeno para obtener el residuo insaponificable.

### **7.4.4 Reacciones de esterificación y transesterificación enzimática.**

En un vial de 30 mL se añadieron 500 mg del residuo insaponificable y 818 mg de CLAE, 818 mg de CLA ó 1000 mg de EPA, y se mezclaron por agitación. Los viales fueron tapados y depositados en un agitador orbital a 200 rpm y 55 °C. Se recogieron muestras de reacción de 30 µL periódicamente, que se disolvieron en 1 mL de cloroformo/metanol (2/1). Las muestras fueron analizadas por HPLC y cromatografía de gases.

#### **7.4.4.1 Derivatización en medio ácido.**

Para el análisis de los productos de la reacción mediante cromatografía de gases en el caso de la reacción de esterificación de alquilgliceroles con CLA, se llevo a cabo una transesterificación que transforma todos los ácidos grasos de la muestra (libres y esterificados) en sus correspondientes ésteres metílicos. Para ello, a 250 µL de la disolución de la muestra, se le adicionó 1 mL de HCl 0,2 M en metanol. Esta mezcla se mantuvo a 60 °C durante 4 h. Después de la adición de 200 µL de agua, la mezcla fue sometida a 2 procesos de extracción con 1 mL de hexano, secado con sulfato de sodio anhidro y centrifugación.

#### **7.4.4.2 Derivatización en medio básico.**

En el caso de la reacción de esterificación de alquilgliceroles con CLA las muestras también se transesterificaron en medio básico para transformar los ácidos grasos esterificados en sus

correspondientes FAMES. De este modo, a 250  $\mu$ L de la disolución de la muestra, se le adicionó 1 mL de NaOH 0,1 M en metanol. Esta mezcla se mantuvo a 60 °C durante 30 min. Después de la adición de 200  $\mu$ L de agua, la mezcla fue sometida a 2 procesos de extracción con 1 mL de hexano, secado con sulfato de sodio anhidro y centrifugación.

Por diferencia entre el total de los ácidos grasos y los ácidos grasos esterificados a los distintos tiempos de reacción es posible conocer el consumo de ácido graso libre que tiene lugar en el transcurso de la reacción.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 8 Resultados y discusión.

### 8.1 Desarrollo de un método de HPLC-ELSD para el análisis de clases de lípidos neutros o no polares.

El primer objetivo de la presente tesis fue desarrollar un método de análisis de HPLC en fase normal, con columna de sílice, con un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), que permitiese separar, detectar y cuantificar diferentes clases de lípidos neutros o no polares con los que se pretende trabajar, entre ellos los alquilgliceroles y sus productos de hidrólisis.

La finalidad fue conseguir un método de análisis versátil y eficaz, que pudiera ser empleado como herramienta habitual en el análisis y caracterización de muestras lipídicas complejas de diversos orígenes y de los lípidos enriquecidos o modificados a lo largo de la presente Tesis.

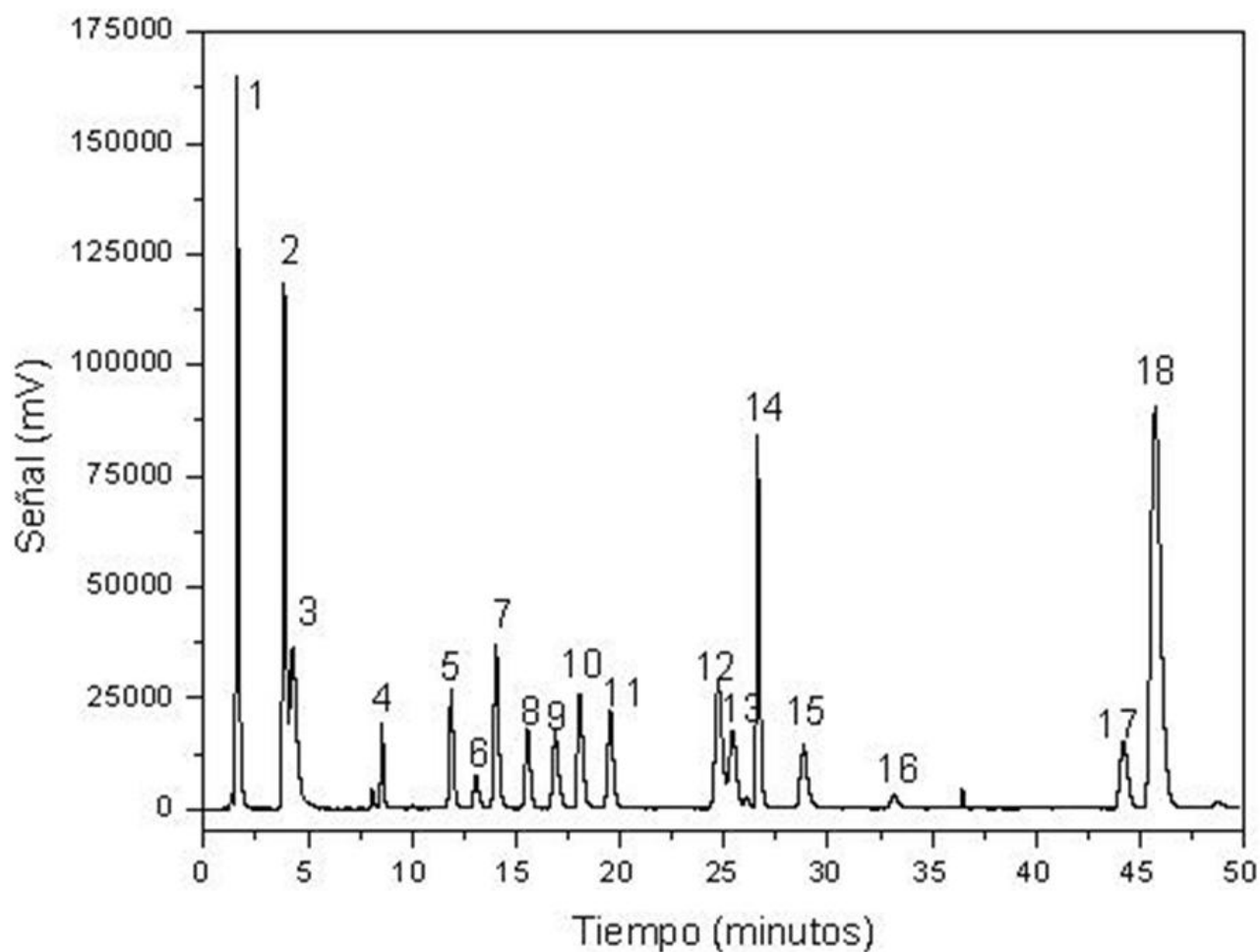
Conviene destacar que algunos autores han descrito falta de reproducibilidad del análisis con fases normales no modificadas [548]. Con objeto de mejorar la estabilidad y reproducibilidad de columnas de sílice como la empleada, se ha descrito que este tipo de columnas se pueden acondicionar con mezclas de hexano/isopropanol [549]. De este modo y basándose en los resultados obtenidos por Schaefer y col. [168], se ensayaron varios gradientes de disolventes que consistieron en diferentes rampas y proporciones de isooctano, MTBE e isopropanol.

El isooctano es el disolvente más apolar, que proporciona unas condiciones iniciales adecuadas para la separación de la mayoría de las clases de lípidos apolares sometidas a estudio (por ejemplo: escualeno, ésteres de esteroles, ceras y ácidos grasos metil ésteres). Otros disolventes de naturaleza apolar, como el hexano, pueden ser también adecuados para este tipo de análisis y permitir llevar a cabo esta separación de compuestos. No obstante, se debe añadir un pequeño porcentaje disolvente más polar para mejorar la solubilidad de algunos compuestos en la fase móvil. Además, el isooctano puro utilizado como condiciones iniciales provoca importantes retrasos en los tiempos de retención de los lípidos más polares estudiados (como por ejemplo monoglicéridos). Por lo tanto, se eligió isooctano con un 0,5% (vol/vol) de metil *tert*-butil éter (MTBE) como condiciones iniciales en nuestro método de HPLC. Sin embargo el MTBE no posee la polaridad suficiente como para eluir los lípidos más polares objeto de estudio. Por ello se tuvo que recurrir al uso de un gradiente ternario con la incorporación de isopropanol. También fueron estudiados porcentajes más altos de isopropanol con objeto de reducir los tiempos de retención de los lípidos más polares sometidos a estudio. Sin embargo, estos porcentajes más altos de isopropanol produjeron la coelución de alquilgliceroles no esterificados y monoacilgliceroles. Por lo tanto, si se pretende separar estos dos tipos de lípidos, se deben emplear porcentajes bajos de

isopropanol. Por ello en el presente estudio no se utilizaron porcentajes de isopropanol superiores al 4%.

El desdoblamiento de picos o *peak splitting* consiste en una separación en la columna cromatográfica de dos o más especies químicas pertenecientes a la misma clase de lípido. En nuestro método, se usó una columna de sílice no modificada para evitar el desdoblamiento de picos de algunas clases de lípidos, fenómeno que ha sido descrito principalmente para columnas polares tipo diol [550].

Aunque el desdoblamiento de picos podría considerarse como una mejora en la resolución cromatográfica, es también un inconveniente para la cuantificación de diferentes clases de lípidos presentes en mezclas lipídicas complejas. Por ejemplo, el desdoblamiento de picos de ácidos grasos presentes en aceites comerciales, subdivide estas especies químicas en varias subclases dependiendo del número de dobles enlaces. Este hecho complica la separación de diferentes clases de lípidos, incrementa el riesgo de solapamiento con otras clases de lípidos y hace difícil encontrar los factores de respuesta adecuados para su cuantificación. Para confirmar que no hubo desdoblamiento de picos en nuestro método, se inyectaron dos mezclas comerciales de ácido linoleico conjugado (FFA) y ácido linoleico conjugado etil éster (FAEE). Este producto contiene varios tipos de ácido graso, como palmítico, oleico, y ácido linoleico conjugado, entre otras especies de FFA o FAEE. En el cromatograma mostrado en la Figura 42 no se observa desdoblamiento de picos.



**Figura 42.** Separación de las diferentes clases de lípidos neutros. **1** escualeno; **2** ésteres de esterol; **3** ceras; **4** ácidos grasos etil ésteres; **5** alquilgliceroles diesterificados; **6**  $\alpha$ -tocoferol; **7** triglicéridos; **8**  $\beta$ -tocoferol; **9**  $\gamma$ -tocoferol; **10** ácidos grasos libres; **11**  $\delta$ -tocoferol; **12** dialquilgliceroles no esterificados; **13** alquilgliceroles monoesterificados; **14** esteroles; **15** 1,3-diglicéridos; **16** 1,2-diglicéridos; **17** alquilgliceroles no esterificados; **18** monoglicéridos. Cantidad de muestra inyectada (10-20 microgramos).

### 8.1.1 Fases móviles estudiadas.

Se ensayaron dos sistemas de elución en gradiente. El Gradiente A se muestra en Tabla 5. El Gradiente B fue similar al Gradiente A, con la diferencia de que el isooctano fue reemplazado por hexano. Los diferentes tiempos de retención y la resolución de los diferentes compuestos estudiados se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Tiempos de retención y resolución de los diferentes compuestos estudiados. FAME: Ácido graso metil éster; DEAG: Alquilglicerol diesterificado; TAG: Triacilglicerol; FFA: Ácido graso libre; NEDAG: Dialquilglicerol no esterificado; MEAG: Alquilglicerol monoesterificado; 1,3-DAG: 1,3-diacilglicerol; 1,2-DAG: 1,2-diacilglicerol; NEAG: Alquilglicerol no esterificado; MAG: Monoacilglicerol.

Compuesto	Gradiente A		Gradiente B	
	R <sub>T</sub>	Resolución	R <sub>T</sub>	Resolución
Escualeno	1,7	1,1	1,6	1,1
Ésteres de esterol	4,0	8,9	3,5	7,4
Ceras	4,4	0,8	3,8	0,9
	8,2	7,5	8,0	9,3
FAME	8,7	2,2	8,4	1,2
			8,8	1,2
DEAG	12,0	11,4	11,9	8,2
$\alpha$ -tocoferol	13,2	3,0	13,0	2,9
TAG	14,2	2,3	14,2	2,8
$\beta$ -tocoferol	15,7	3,7	15,5	3,2
$\gamma$ -tocoferol	17,0	2,9	16,9	3,1
FFA	18,2	2,5	18,2	2,8
$\delta$ -tocoferol	19,7	3,1	19,5	2,8
NEDAG	24,8	9,9	24,5	9,6
MEAG	25,5	1,2	25,4	1,5
Esteroles	26,7	2,6	26,7	2,7
1,3-DAG	28,9	5,0	29,2	5,6
1,2-DAG	33,3	7,0	33,5	6,9
NEAG	44,3	17,2	43,9	16,1
MAG	45,8	2,0	45,7	2,5

Tanto el isooctano como el hexano con un 0.5% de MTBE permiten la separación de escualeno, ésteres de esterol y FAEE en un tiempo de análisis ligeramente superior a 8 min.

La resolución de cada pico ( $R_s$ ) fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{R_{t2} - R_{t1}}{1/2 (w_1 + w_2)}$$

donde  $R_t$  es el tiempo de retención y  $w$  es la anchura de dos picos adyacentes. La anchura de picos utilizada para la determinación de la resolución es la correspondiente a la de la base del pico.

Se obtuvieron tiempos de retención similares con ambos gradientes. No obstante, se observó desdoblamiento de picos y peor resolución para FAEEs con el Gradiente B que con el Gradiente A. Además, el Gradiente B produjo más ruido en la línea base entre los 25 y 35 min, si se compara con el Gradiente A. Por estas razones, se seleccionó el Gradiente A para los posteriores experimentos.

Los resultados de la tabla 2 indican que las ceras y los ésteres de esterol tuvieron una resolución menos adecuada. Se debe tener en cuenta que las mejoras en la resolución de estos dos compuestos llevan asociado un incremento en los tiempos de retención de compuestos como monoacilgliceroles o alquilgliceroles no esterificados, lo que dificulta el análisis simultáneo de todas estas clases de lípidos.

Además, teniendo en cuenta las dificultades descritas previamente para la separación de estos dos compuestos en cromatografía en fase normal, los resultados obtenidos con ambos gradientes son aceptables.

Los resultados de la Tabla 6 también ponen de manifiesto que la resolución entre NEDAG y MEAG es menor que 1,7. No obstante, la resolución obtenida (1,2 con el Gradiente A y 1,5 con el Gradiente B) es suficientemente buena para la separación y cuantificación de estos compuestos.

### **8.1.2 Reproducibilidad.**

Se ha descrito anteriormente que los tiempos de retención relativos son inestables en cromatografía en fase normal. Por esta razón, se recomienda que los tiempos de retención relativos no sean la única herramienta para la identificación de picos. Con este propósito, se deberían emplear patrones o compuestos puros conocidos o métodos alternativos para la identificación química, como la espectrometría de masas.

Debido a la complejidad de método cromatográfico y a la variabilidad del detector se evaluaron variaciones en el mismo día y entre distintos días en los tiempos de retención y en las respuestas de las diferentes clases de lípidos sometidas a estudio. La desviación relativa estándar de las variaciones en el mismo día para tiempos de retención y áreas, nunca excedió de 0,1 y 10, respectivamente. Para determinar las variaciones entre distintos días, se realizaron tres inyecciones de la mezcla de lípidos sometidos a estudio, en tres días separados durante un



periodo total de una semana. Se tomó la desviación relativa estándar (RSD) como medida de precisión. Los resultados de la Tabla 7 indican que hay una buena reproducibilidad, considerando los tiempos de retención, y una precisión aceptable en la respuesta de distintos días.

**Tabla 7.** Desviación estándar relativa (RSD) de la respuesta de distintos días de las diferentes clases de lípidos analizadas.

	Tiempo de retención (RSD)	Área (RSD)
Escualeno	0,9	10,6
Ésteres de esteroles	0,9	8,8
Ceras	1,2	13,1
FAME	0,3	13,8
DEAG	0,4	10,8
TAG	0,4	15,9
FFA	0,3	18,1
MEDAG	0,5	7,6
MEAG	0,4	11,7
Esteroles	0,9	8,7
1,3-DAG	0,4	6,2
1,2-DAG	0,6	6,9
NEAG	1,0	17,4
MAG	1,1	15,3

Se debe señalar que se utilizó la misma muestra para las tres inyecciones, en el periodo de una semana. Este hecho pudo haber provocado una parcial evaporación y/o insolubilización de algunos compuestos presentes en la mezcla, lo que pudo haber incrementado la variación entre diferentes días de la respuesta. Se debe también indicar que la respuesta de los diferentes tocoferoles analizados no pudo ser incluida, ya que se observó una parcial desaparición de estos compuestos con el tiempo.

Para mejorar la reproducibilidad del gradiente cromatográfico, el re-equilibrado del sistema juega un papel crucial. El re-equilibrado consiste en la recuperación o reestablecimiento de las condiciones en que se encuentra la columna al comienzo del análisis cromatográfico, para poder llevar a cabo el siguiente análisis de una forma reproducible. Inicialmente, se ensayaron distintas

modalidades de reacondicionamiento del sistema en una sola etapa. No obstante, se observó falta de reproducibilidad tanto en los tiempos de retención como en las respuestas de los diferentes lípidos estudiados. Se comprobó la importancia que tenía reestablecer las condiciones iniciales de fase móvil de una forma gradual. Por esta razón, el reacondicionamiento del sistema realizado en este estudio, se efectuó en dos etapas consecutivas (ver Tabla 5).

La primera etapa consistió únicamente en la eliminación del isopropanol utilizado en la parte final del gradiente de elución. La segunda etapa permite la recuperación de las condiciones iniciales para un posterior análisis. Este protocolo mejora la reproducibilidad de los tiempos de retención relativos y de las respuestas de las diferentes clases de lípidos estudiadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se podría suponer que reduciendo progresivamente la polaridad de las fases móviles, se puede conseguir un procedimiento eficiente para la recuperación de las condiciones iniciales.

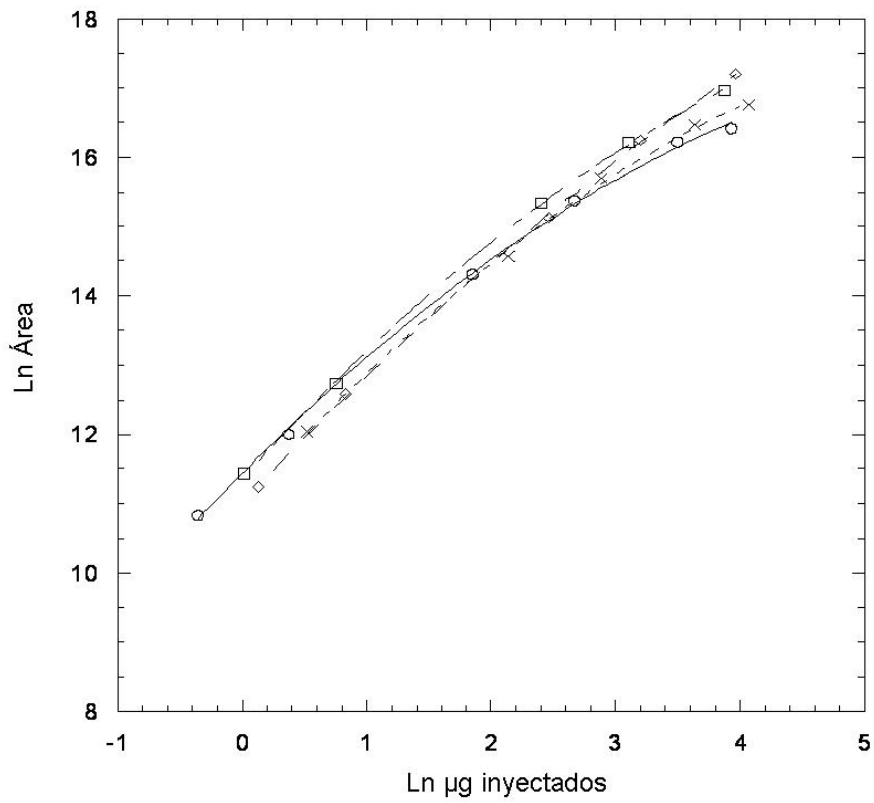
### 8.1.3 Factores de respuesta.

El ELSD es un detector de masa que mide la dispersión de la luz de las partículas sólidas de los solutos que permanecen en la muestra después de la evaporación de la fase móvil. La respuesta del ELSD viene dada por la intensidad de la luz dispersada. Esta intensidad es función de la cantidad de muestra, y esta suele seguir una relación exponencial, la cual se podría expresar mediante la siguiente ecuación:

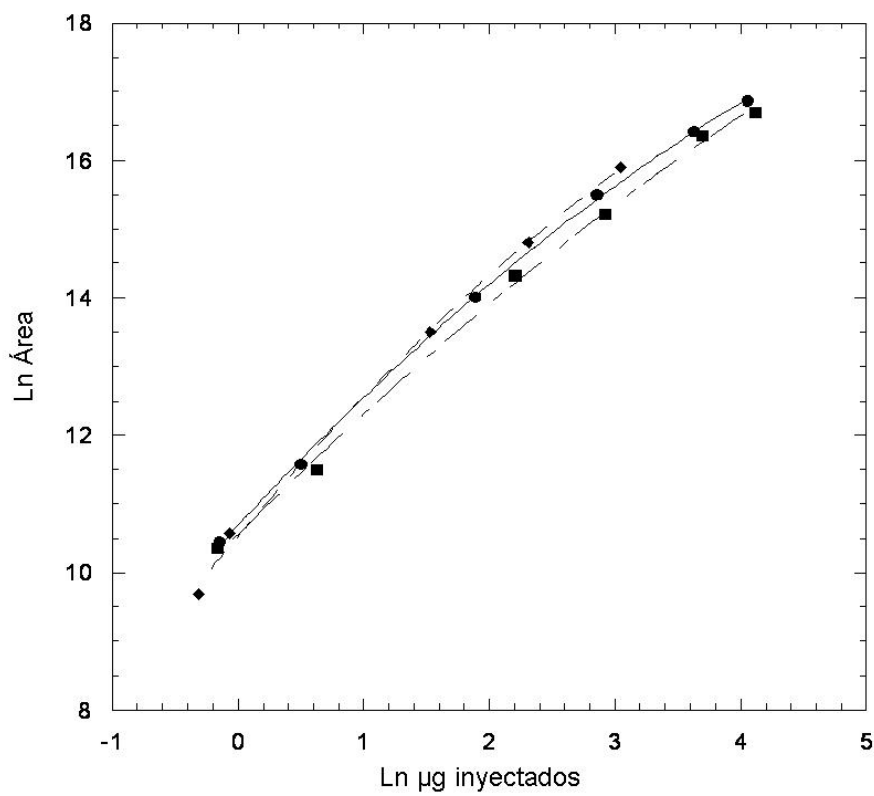
$$I = km^b$$

donde  $I$  es intensidad de la luz,  $m$  la masa total de las partículas dispersadas,  $k$  es el factor de respuesta (constante) y  $b$  la curvatura de la respuesta (constante).

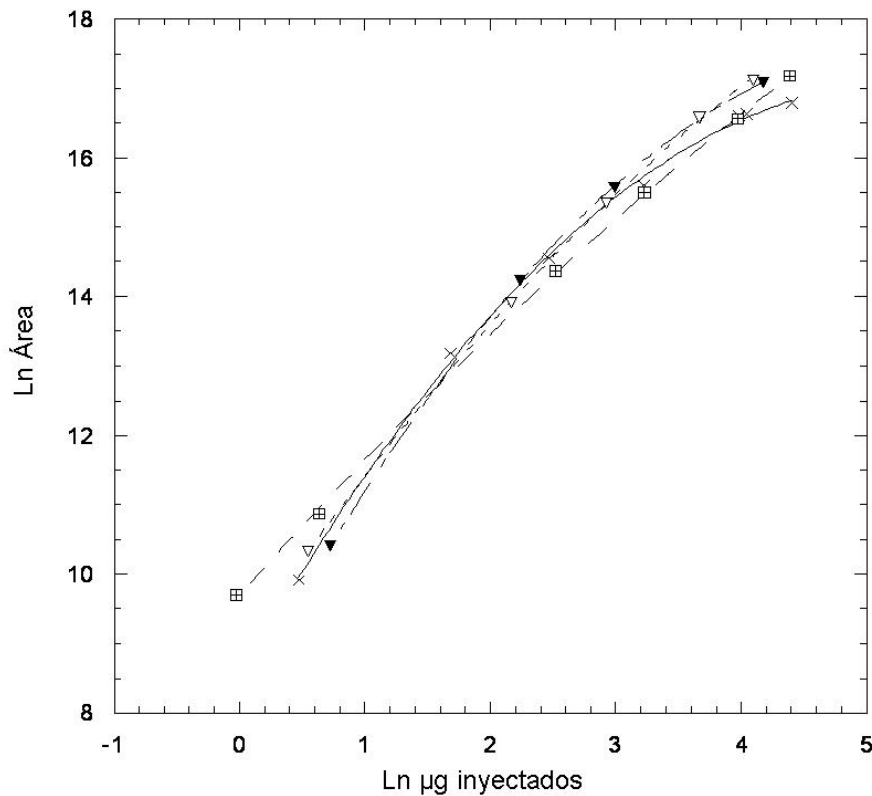
Se han descrito curvas de respuesta lineal para la detección de clases de lípidos por ELSD, aunque solamente para intervalos muy estrechos de cantidad de muestra inyectada. Genge y col. prepararon curvas estándar para lípidos no polares en el intervalo de 1 a 12  $\mu\text{g}$ , y observaron que la relación entre la dispersión de luz y la concentración de solutos era principalmente lineal, pero un análisis de regresión polinomial de segundo orden dio el mejor ajuste [551]. Cuando se tiene una amplia variedad de cantidades estándar o concentraciones, las repuestas tienen un mejor ajuste mediante curvas polinomiales [552]. Se realizaron curvas de calibrado de todas las clases de lípidos estudiados. Estos resultados se muestran en la Figura 43, Figura 44 y Figura 45.



**Figura 43.** Curvas de calibrado de las siguientes clases de lípidos: —○— Escualeno; —□— FFA; —◇— MEAG; —×— Esteroles.



**Figura 44.** Curvas de calibrado de las siguientes clases de lípidos: —●— TAG; —■— Éster de esterol; —◆— 1,3-DAG.



**Figura 45.** Curvas de calibrado de las siguientes clases de lípidos: ▼—  $\alpha$ -tocoferol; ⊠— MAG; - -▼- - NEAG; - -x- - FAEE.

La cantidad de muestra inyectada estuvo en el intervalo de 1 a 50  $\mu\text{g}$ . Este amplio intervalo de concentraciones estudiadas permite la cuantificación simultánea de los componentes minoritarios de grasas y aceites, en concentraciones menores al 1% en peso del total, y de forma simultánea al resto de lípidos neutros presentes en la muestra. Por lo tanto, esta metodología no solo consigue separar 18 clases de lípidos neutros, sino que también permite la estimación de la proporción relativa en la que se encuentran dentro de un amplio intervalo de concentraciones.

La respuesta del ELSD se linealizó mediante un doble logaritmo. Para la obtención de las curvas de calibrado se utilizó una ecuación de regresión cuadrática con la forma:

$$\text{Ln área} = M_0 + M_1 \times \text{Ln microgramos inyectados} + M_2 \times (\text{Ln microgramos inyectados})^2$$

Los coeficientes de los análisis de regresión cuadrática y los factores de correlación obtenidos se muestran en la Tabla 8. Los resultados de la tabla 4 muestran unos buenos factores de correlación para todas las clases de lípidos estudiados.

**Tabla 8.** Coeficientes de regresión cuadrática para escualeno, FFA, MEAG, esteroides, TAG, ésteres de esterol, 1,3-DAG,  $\alpha$ -tocoferol, FAEE, NEAG, y MAG.

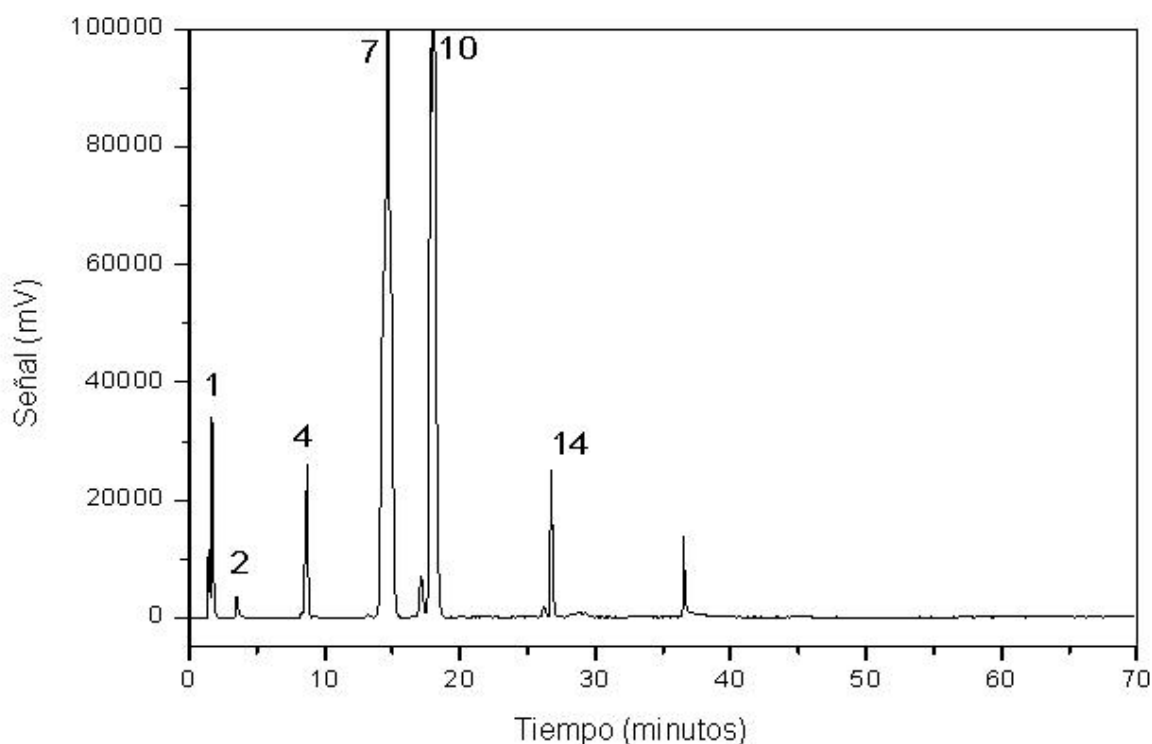
	<b>Escualeno</b>	<b>FFA</b>	<b>MEAG</b>	<b>Esteroides</b>
$M_0$	11,437	11,368	11,021	10,994
$M_1$	1,807	1,970	1,901	2,036
$M_2$	-0,132	-0,134	-0,086	-0,150
$R$	0,999	1,000	1,000	0,999
	<b>TAG</b>	<b>Ésteres de esterol</b>	<b>1,3-DAG</b>	<b>MAG</b>
$M_0$	10,689	10,554	10,528	9,691
$M_1$	1,969	1,833	2,172	2,030
$M_2$	-0,108	-0,078	-0,136	-0,074
$R$	1,000	0,999	0,999	1,000
	<b><math>\alpha</math>-tocoferol</b>	<b>FAEE</b>	<b>NEAG</b>	
$M_0$	8,088	8,499	8,901	
$M_1$	3,411	3,212	2,666	
$M_2$	-0,300	-0,300	-0,159	
$R$	1,000	0,999	1,000	

Se debe señalar que los factores de respuesta se ven afectados principalmente por la volatilidad relativa de los compuestos analizados. De este modo, los dos factores de respuesta que se ven más afectados por este motivo son los correspondientes a FAEEs y FFAs. Por lo tanto, para tener una buena cuantificación en la composición de FFA y FAEE de cada muestra, se debe recurrir a la realización de exhaustivas rectas de calibrado con los mismos ácidos grasos que se pretende analizar o bien recurrir al análisis de estos compuestos mediante técnicas complementarias, como es la cromatografía de gases. De este modo, se pueden elaborar curvas de calibrado individualizadas para estas dos clases de lípidos, utilizando como patrón externo la especie química (por ejemplo, ácido oleico) que se encuentre presente de forma mayoritaria dentro de la clase de lípido que se pretende cuantificar (en este caso, ácido graso). De forma contraria, en otras clases de lípidos neutros, se observan factores de respuesta similares independientemente de la composición de especies químicas incluidas en cada clase de lípido.

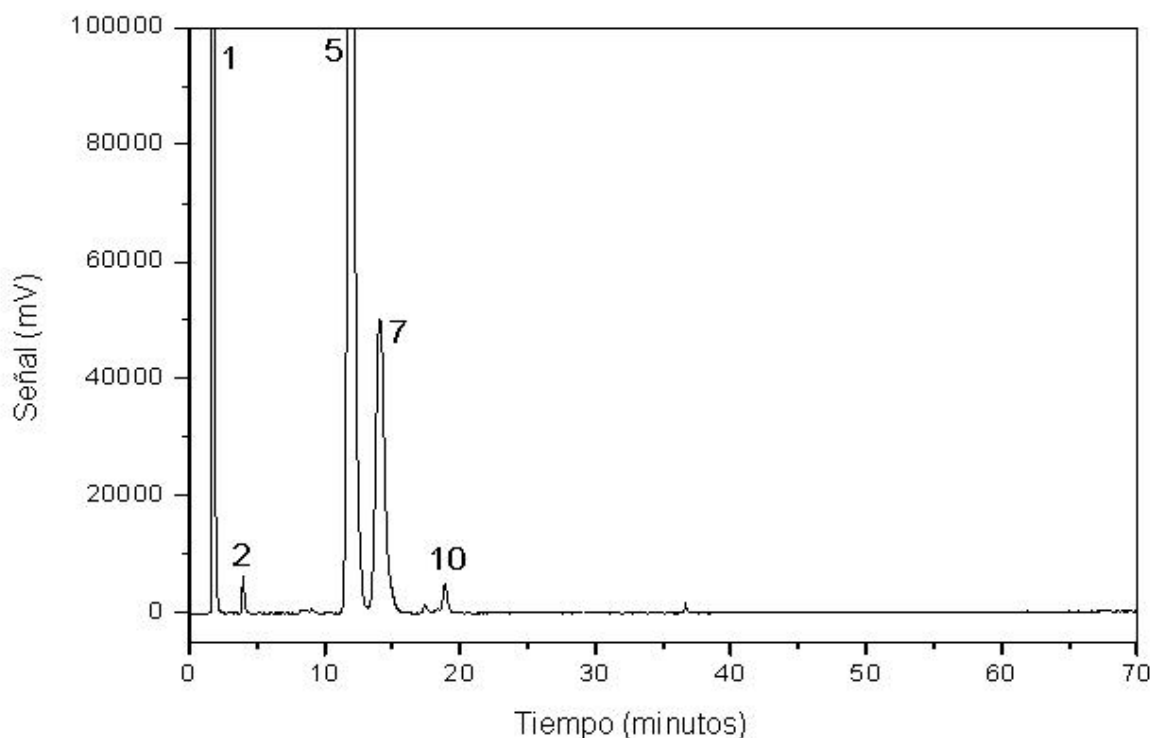
Las curvas de calibrado de las diferentes clases de lípidos fueron agrupadas de acuerdo con su respuesta. Los resultados mostrados en la Tabla 8 permiten determinar las diferencias en la respuesta de las diferentes clases de lípidos estudiadas. De este modo, el término cuadrático responsable de la curvatura de la respuesta, es negativo en todos los casos. El término cuadrático más alto se obtuvo para FAEE y  $\alpha$ -tocoferol, con un valor de -0,300, que indica una importante curvatura en estas dos respuestas, en el intervalo de concentraciones estudiadas. El límite inferior para la detección de todos los lípidos estudiados fue inferior a 1 $\mu$ g.

#### 8.1.4 Cuantificación de muestras comerciales.

Con el objetivo de evaluar la presente metodología, se efectuó el análisis de un destilado desodorizado de aceite de girasol y de un refinado de un proceso de SFE a partir de aceite de hígado de tiburón (Figura 46 y Figura 47). La Figura 46 indica que tanto los constituyentes mayoritarios (FFA y TAG) como los constituyentes minoritarios (escualeno, esteroleos y  $\gamma$ -tocoferol) del destilado desodorizado de aceite de girasol, pueden ser analizados simultáneamente.



**Figura 46.** Análisis por HPLC de un destilado de aceite de girasol. La identificación de los picos es igual a la de la Figura 42.



**Figura 47.** Análisis por HPLC de un aceite de hígado de tiburón. La nomenclatura es igual a la de la Figura 42.

Los cromatogramas mostrados en la Figura 46 y Figura 47 indican que no se observa desdoblamiento de picos para DEAG, TAG y esterol provenientes del destilado desodorizado de aceite de girasol y del refinado a partir aceite de hígado de tiburón. Cada uno de los lípidos de ambas muestras esta constituido por numerosas especies químicas y la ausencia de desdoblamiento de picos, demuestra que esta metodología permite la separación de diferentes clases de lípidos, independientemente del número de especies químicas incluidas en cada uno de ellos. Se debe señalar que se aprecia un ligero desdoblamiento del pico correspondiente a ácidos grasos libres ( $R_t = 18,2$ ). Considerando que este pico está formado por al menos 4 ácidos grasos diferentes (palmítico, esteárico, oleico y linoleico), este desdoblamiento de pico debe considerarse casi insignificante. La Figura 47 muestra la buena separación entre DEAG y TAG, y la presencia de ésteres de colesterol y escualeno en los aceites de hígado de tiburón.

La cuantificación de las diferentes clases de lípidos presentes en el destilado desodorizado de aceite de girasol indica que el porcentaje en peso de escualeno, ésteres de esterol, FAEE, TAGs, FFA y esterol fue aproximadamente de 2,4; 2,5; 14,7; 34,4; 20,1; y 3,3 respectivamente. La cuantificación del refinado a partir de aceite de hígado de tiburón mostró un porcentaje de escualeno, ésteres de esterol, DEAG y TAGs de aproximadamente 3,1; 0,5; 59,4 y 30,9 respectivamente. El resto de constituyentes en estos dos productos consistió en trazas de otros compuestos no detectados mediante esta metodología.

Se puede concluir que la metodología descrita se puede utilizar para el análisis de mezclas de acilgliceroles y alquilgliceroles esterificados y no esterificados. Se puede obtener una excelente reproducibilidad considerando los tiempos de retención y una aceptable reproducibilidad considerando las repuestas, para las diferentes clases de lípidos estudiadas. Cabe destacar la gran versatilidad del método analítico, ya que permite utilizar un amplio intervalo de concentraciones para la cuantificación simultánea de constituyentes mayoritarios y minoritarios de grasas y aceites con distinta composición y diversa naturaleza. Además, esta metodología analítica, permite también llevar a cabo un seguimiento de cinéticas de reacciones catalizadas por lipasas en las que intervienen compuestos como esteroides, alquilgliceroles y acilgliceroles, como se comprobará en próximos capítulos.

## **8.2 Recuperación de escualeno y desacidificación de aceite de oliva mediante extracción y fraccionamiento supercrítico en planta piloto.**

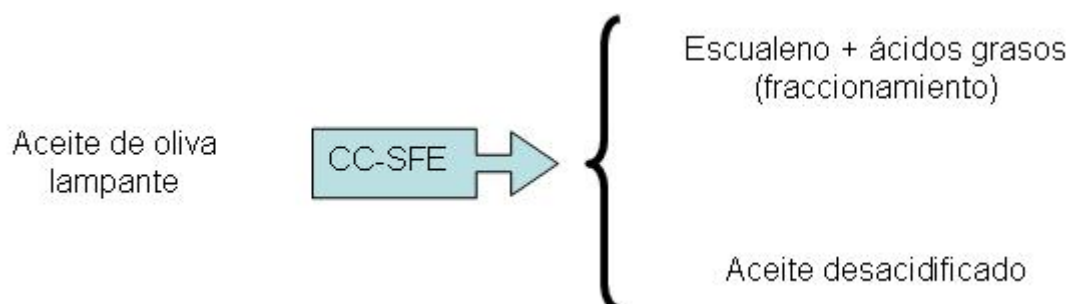
Considerando las ventajas que ofrece la extracción con fluidos supercríticos frente a tecnologías tradicionales para el refinado de aceites y la capacidad de la SFE para extraer y fraccionar distintos compuestos del aceite, un objetivo de la presente tesis fue llevar a cabo un proceso que combinase la desacidificación y refinado de un aceite lampante, junto con el fraccionamiento de este aceite para la obtención de extractos con determinados componentes de interés y alto valor añadido.

La importancia del escualeno en la industria farmacéutica y de cosméticos ha motivado el desarrollo de nuevas tecnologías para su purificación a partir de diversas fuentes. Aunque es bien conocido que la fuente natural mayoritaria de escualeno es el aceite de hígado de tiburón, este compuesto también se puede encontrar de forma minoritaria en otras fuentes de origen vegetal, como es el aceite de oliva.

El escualeno es el hidrocarburo más importante y el principal constituyente de la fracción insaponificable del aceite de oliva (hasta un 50%). Además, el aceite de oliva es el aceite que lo posee en mayor proporción [405]. De este modo, además de utilizar la SFE como una tecnología limpia (sin disolventes orgánicos), se utilizaría una fuente de escualeno de origen vegetal, alternativa al hígado de varias especies de tiburones.



Así, el objetivo de este estudio es obtener a partir de un aceite de oliva lampante, un aceite refinado libre de acidez y desodorizado (desacidificado) y por otro lado una fracción enriquecida en escualeno, de alto valor añadido, que se puede comercializar o emplear para producir o elaborar alimentos funcionales.



El presente capítulo continúa los estudios realizados por el Dr. Hurtado Benavides en el grupo de investigación de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la UAM durante su Tesis doctoral [553]. Hurtado Benavides estudió el proceso de extracción de componentes minoritarios en el aceite de oliva con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente a nivel de planta piloto. Su trabajo se centró en la recuperación de escualeno, esteroides, y tocoferoles a partir de aceite de oliva. En el trabajo llevado a cabo por Hurtado Benavides se estudiaron los parámetros implicados en la transferencia de materia del proceso, comparando la eficacia de distintos materiales de relleno: anillos Raschig, anillos Fenske, anillos Dixon y bolas de vidrio, y la variación en la relación disolvente/alimentación (S/F). Se obtuvieron los mejores resultados con los anillos Fenske y con relaciones S/F entre 20 y 25. Con el relleno que proporcionó los mejores resultados de transferencia de materia se optimizaron las variables implicadas en la extracción de los componentes minoritarios. Se obtuvieron unas condiciones óptimas de 234 bares de presión, 34 °C de temperatura y de 82 mL/h de flujo de muestra de aceite para un flujo de CO<sub>2</sub> de 2000 mL/h.

El presente capítulo ha estudiado la optimización de un proceso de SFE en contracorriente a nivel de planta piloto aplicado a 5 aceites de distinta acidez. Se tomó como respuesta la pureza y rendimiento de escualeno en los separadores (extractos) y la ausencia de ácidos grasos libres en el refinado. Además, este estudio se ha realizado a escala de planta piloto, teniendo en perspectiva su escalado e implantación a escala industrial.

Las investigaciones se basaron en los estudios realizados por Hurtado Benavides para elegir las siguientes variables:

- ⇒ El tipo de relleno para la columna: Anillos Fenske.
- ⇒ La relación disolvente/alimentación (S/F): 20.
- ⇒ Flujo de muestra de aceite: 150 mL/h.
- ⇒ Flujo de CO<sub>2</sub>: 3000 mL/h.
- ⇒ Se mantuvo la relación S/F estudiada anteriormente dentro de las limitaciones de la planta, pero se eligieron flujos de CO<sub>2</sub> y de aceite más altos que los estudiados por Hurtado Benavides. Estos cambios se efectuaron para mejorar la aplicabilidad del proceso y permitir una mayor productividad a escala industrial.
- ⇒ El punto de introducción de la muestra fue el punto medio de la columna, pero con una columna 60 cm más larga que la utilizada en el estudio anterior.
- ⇒ El tiempo de extracción fue de 60 minutos de extracción bombeando muestra líquida y CO<sub>2</sub> + 30 minutos de extracción con CO<sub>2</sub> puro.

La temperatura elegida para todas las extracciones fue de 40 °C, mientras que los estudios de Hurtado Benavides se llevaron a cabo a 34 °C.

Se eligió una temperatura ligeramente más alta con una finalidad de ahorro energético, ya que se pretendió optimizar un proceso de SFE que pudiera ser implantado en un futuro en una industria situada en el sur de España, donde las temperaturas medias son elevadas.

- ⇒ Todas las extracciones se realizaron por duplicado. Cuando fue necesario el cambio de muestra de aceite, se llevaron a cabo 2 extracciones con el nuevo aceite que sirvieron como limpieza e impregnación del relleno de la columna de extracción. Los extractos y refinados provenientes de estas extracciones fueron desechados.

Otros estudios de solubilidad han demostrado una mayor selectividad entre ácidos grasos libres y triglicéridos a temperaturas mayores de 40 °C [195]. Aunque se puede favorecer esta separación, empleando temperaturas más elevadas se necesitarían presiones también más altas, para mantener la misma densidad de CO<sub>2</sub>. Estas condiciones supondrían un mayor gasto energético en cuanto a temperatura y presión.

La optimización consistió en encontrar las mejores condiciones de densidad de CO<sub>2</sub>, manteniendo la temperatura fija (40 °C) y variando únicamente la presión en columna. Se eligieron 3 presiones distintas: 180, 234 y 250 bares.

La elección de este intervalo de presiones además de basarse en el estudio de Hurtado Benavides para extracción de compuestos minoritarios (escualeno), también se basa en el estudio

de desacidificación de aceite de oliva mediante CO<sub>2</sub> supercrítico de Brunetti y col., en el que se trabaja a presiones entre 200 y 300 bares (20 y 30 MPa) [195].

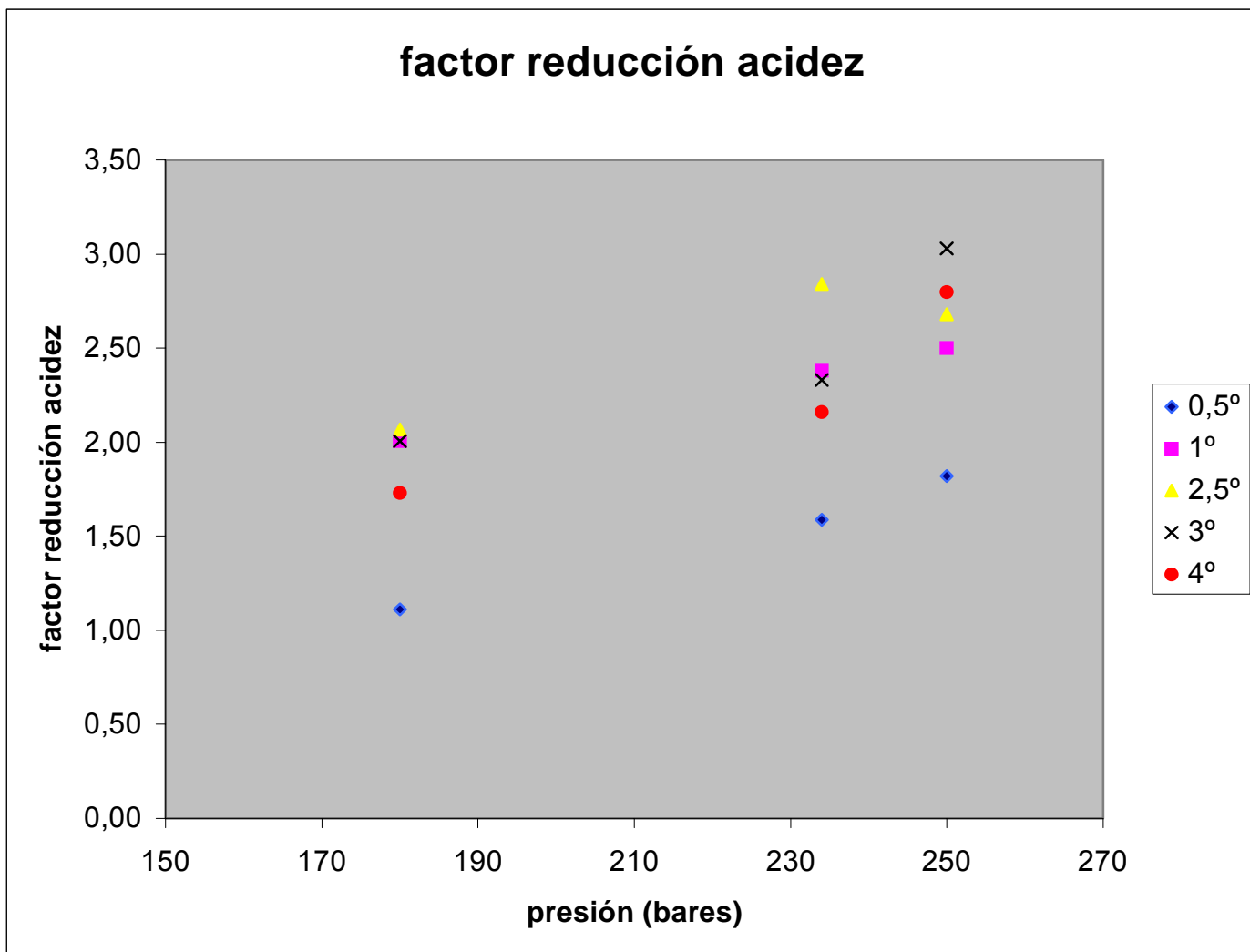
Brunner también realizó estudios de fraccionamiento de lípidos mediante SFE. Para la separación de trioleína y ácidos grasos empleó presiones entre 200 y 300 bares, pero con temperaturas algo más elevadas (57 °C). En algunos casos, Brunner modifica los ácidos grasos transformándolos en metil oleato, que son mucho más solubles en CO<sub>2</sub> supercrítico. Esta modificación hace que la eliminación de los ácidos grasos sea más fácil, permitiendo presiones de extracción menores: 130 - 145 bares [248]. Para el aislamiento de escualeno, Brunner empleó presiones entre 200 y 260 bares [248].

### **8.2.1 Desacidificación de aceite de oliva lampante.**

Para el estudio de desacidificación del aceite se consideraron dos términos:

- Rendimiento de ácidos grasos en los separadores. Representa el % de la cantidad en gramos de ácido oleico (mayoritario en el aceite de oliva) que se extrae en los separadores respecto a la cantidad que se ha introducido en la columna.
- Factor de reducción de acidez, expresado como el grado de acidez del aceite de partida dividido por el grado de acidez del refinado.

De forma general, la Figura 48 expresa el factor de reducción de acidez obtenido en función del grado de acidez del aceite de partida y de la presión utilizada.



**Figura 48.** Diagrama de puntos que representa el factor de reducción de acidez en función de la presión y de la acidez del aceite de partida.

Las diferencias más significativas se obtuvieron comparando el aceite de 0,5° con el resto de aceites estudiados. Los aceites con acidez superior a 0,5° se comportaron de un modo muy similar, sin diferencias significativas. Por el contrario, en el aceite de 0,5 ° el factor de reducción fue mucho menor.

Para aceites con una acidez de 0,5° es posible que el flujo de muestra utilizado en las extracciones sea excesivamente alto. En este caso, el contenido en ácidos grasos es muy bajo en el aceite de partida y no hay una transferencia de materia suficiente para que el CO<sub>2</sub> consiga extraer preferentemente el ácido graso. El proceso de SFE para este tipo de aceites en estas condiciones fue poco eficaz.

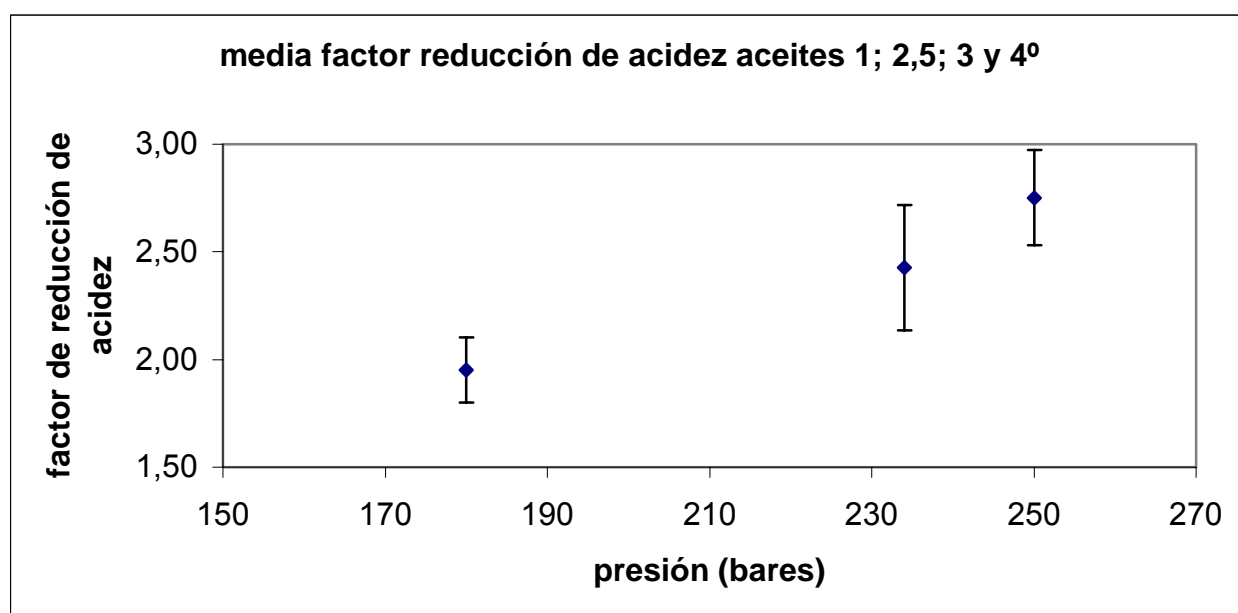
En estos casos convendría mejorar la transferencia de materia del proceso de extracción, por ejemplo:

- Usando un tipo de relleno que proporcione una transferencia de materia más eficaz (por ejemplo, un relleno estructurado).
- Introduciendo la muestra en la columna por el punto superior, para aumentar el número de etapas de equilibrio
- Aumentando la relación S/F, para que haya más cantidad de CO<sub>2</sub> limpio en contacto con el aceite.

Además, en aceites de partida de acidez reducida convendría utilizar presiones de extracción más altas, ya que, de este modo, la densidad del CO<sub>2</sub> sería mayor y sería más fácil extraer el ácido graso de forma eficaz, con el inconveniente de la posible extracción parcial de triacilglicerolos. De este modo, la extracción sería más independiente de otras variables como la relación S/F.

Por otro lado, este hecho tampoco supondría un serio problema, ya que nuestro objetivo es optimizar un proceso de refinado de aceite, en el que normalmente partiremos de un aceite de oliva lampante, es decir, con elevado grado de acidez. Los aceites que tienen 0,5° de acidez no requieren necesariamente un proceso de refinado.

Para ver el efecto que tiene la presión en el factor de reducción de acidez, se excluyó el aceite de 0,5 ° de acidez, ya que se comporta de una manera distinta, y se agruparon el resto, ya que tienen un factor de reducción similar entre ellos.



**Figura 49.** Diagrama de puntos que representa el factor de reducción de acidez en función de la presión.

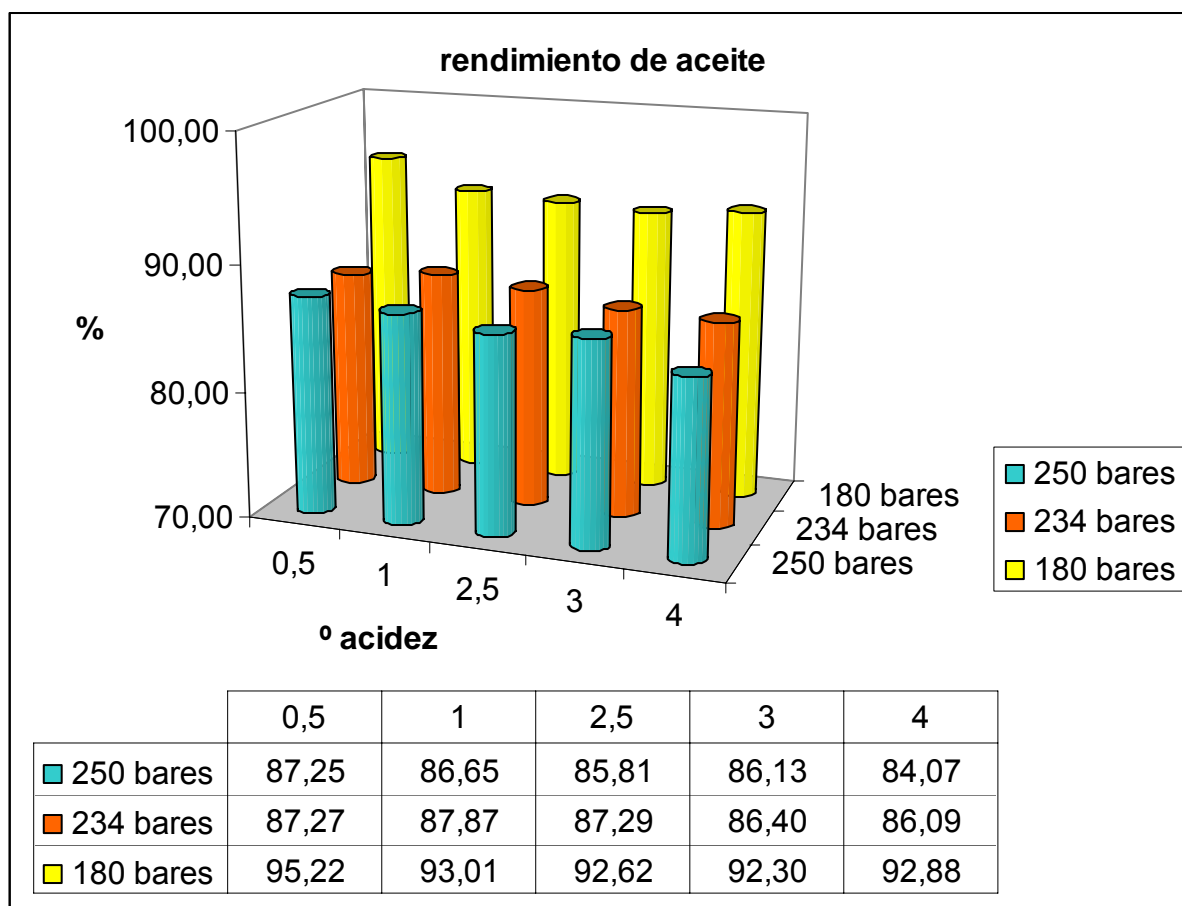
Solamente resultó significativa la diferencia entre 180 bares y el resto de presiones, siendo la desacidificación a 180 bares menor que a 234 y 250 bares.

Para las presiones de 234 y 250 bares no se apreciaron diferencias significativas.

Los datos representan unos rendimientos de desacidificación por encima del 65–70% en presiones de 234 y 250 bares.

La Figura 50 muestra los resultados obtenidos de rendimiento de aceite refinado o desacidificado mediante CC-SFE. Este rendimiento se expresa en % y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{g de aceite obtenidos como refinado}}{\text{g de aceite sometidos a extracción}} \times 100$$



**Figura 50.** Rendimiento obtenido de aceite refinado mediante CC-SFE.

El rendimiento de aceite refinado fue muy aceptable en todos los casos, siendo del 84 al 88% con presiones de 234 y 250 bares y del 92 al 96% con la presión de 180 bares. De este modo, la presencia de triacilglicérols en el extracto fue reducida.

Los resultados de rendimiento fueron similares en presiones de 234 y 250 bares. En cambio, se obtiene un mayor rendimiento de aceite refinado a 180 bares, debido a la menor densidad de CO<sub>2</sub> y, por lo tanto, menor capacidad para extraer triacilglicerolos en estas condiciones.

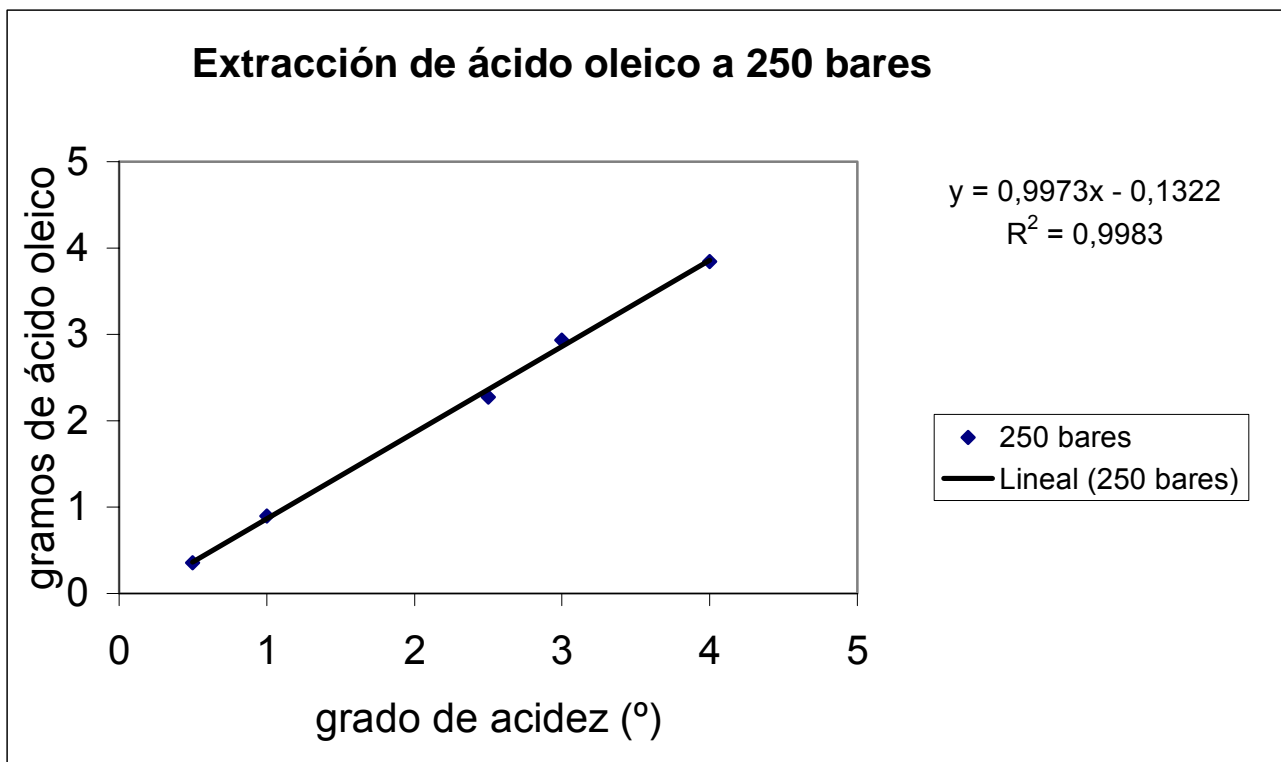
También se puede apreciar una ligera disminución de rendimiento de aceite refinado en función del grado de acidez del aceite de partida, en las tres presiones estudiadas. Esta disminución en los aceites con mayor grado de acidez no se debe a una pérdida de triacilglicerolos en el aceite refinado, sino a la extracción del ácido graso libre.

También se pudo observar la extracción de más cantidad de ácido graso cuanto mayor es la acidez del aceite de partida, aunque se obtengan valores de factor de reducción de la acidez similares. Se obtuvieron valores de reducción de acidez similares debido a que, en esta expresión, el numerador compensa al denominador, ya que, aunque se extrajo más cantidad de ácido graso, en estos casos también se partió de más cantidad, haciendo que la proporción sea similar.

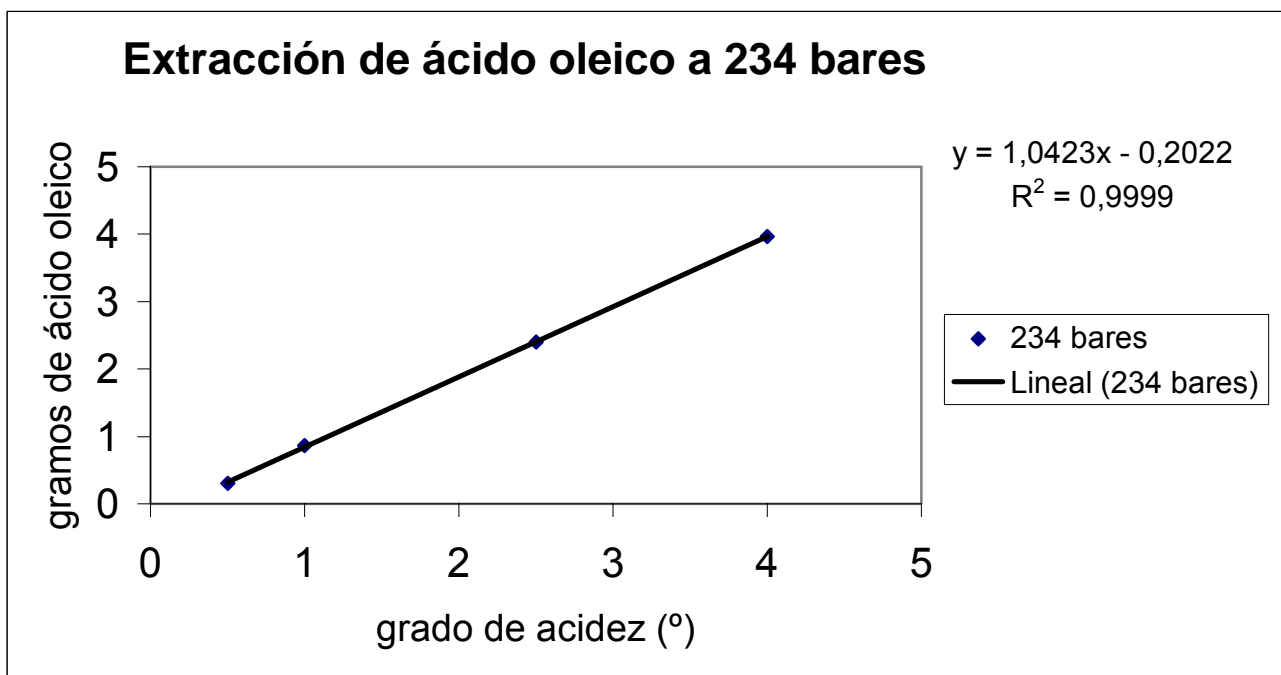
Por esta razón, se optó por la representación de los aceites agrupados para ver el efecto de la presión en el factor de reducción de la acidez.

Se pueden calcular los gramos de ácido graso libre que fueron introducidos la columna de extracción en cada experimento, teniendo en cuenta la cantidad de aceite sometida a extracción (150 mL) y el grado de acidez del aceite de partida. En este sentido, se estudió, en términos absolutos, la cantidad en gramos de ácido oleico extraída en función de la presión y de la acidez de aceite de partida.

De este modo, se pudieron representar las siguientes gráficas:



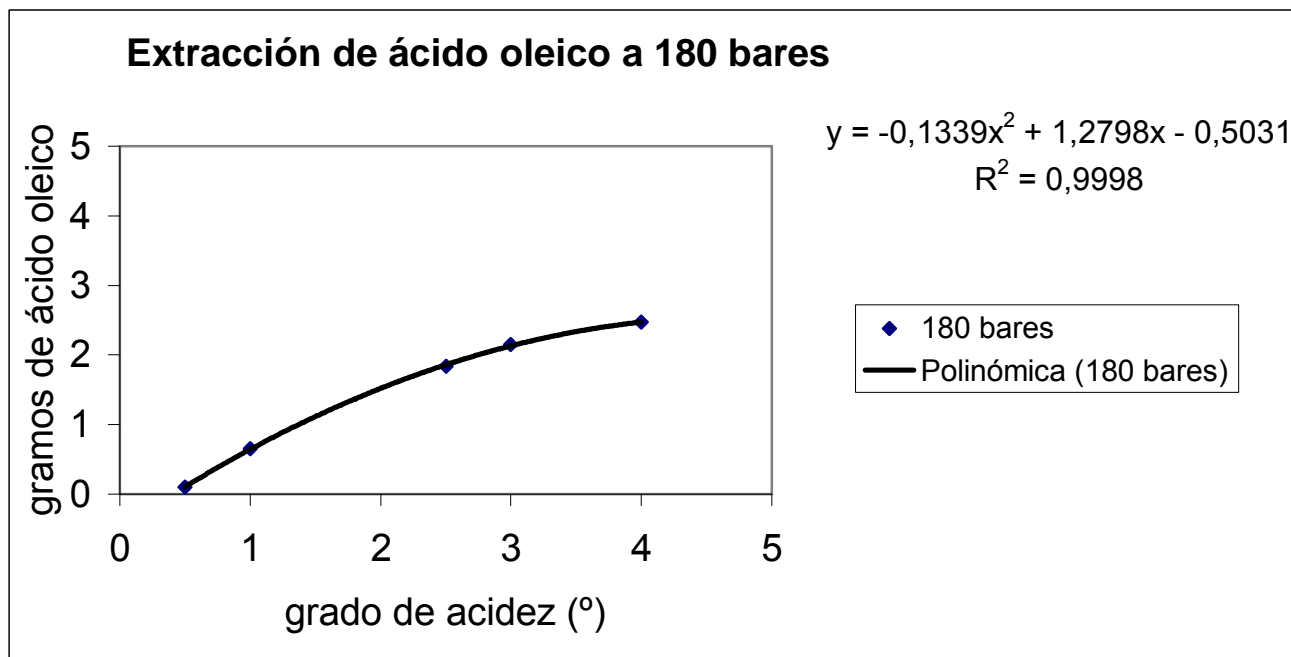
**Figura 51.** Diagrama que representa los gramos de ácido extraídos en función de la acidez del aceite de partida a 250 bares.



**Figura 52.** Diagrama que representa los gramos de ácido extraídos en función de la acidez del aceite de partida a 234 bares.



En las extracciones a 234 bares se excluyó el punto del aceite de 3° de acidez debido a que tuvo mucha desviación, que se supone que es debida a un error experimental.



**Figura 53.** Diagrama que representa los gramos de ácido extraídos en función de la acidez del aceite de partida a 180 bares.

En estas gráficas, se puede apreciar el hecho descrito anteriormente. En todos los casos, cuanto más ácido graso libre hay disponible en el aceite de partida, mayor cantidad total de ácido graso es extraído.

En la presión de extracción más baja, 180 bares, se observó una curvatura que no se observa a 234 ni a 250 bares. Este hecho puede indicar que a 180 bares una acidez superior a 3° puede provocar una saturación del CO<sub>2</sub>. Es decir, 180 bares sería una presión que proporciona una densidad de CO<sub>2</sub> demasiado baja o insuficiente para eliminar de forma eficaz el ácido graso, cuando partimos de un aceite de oliva de elevada acidez (lampante) y con la relación S/F empleada.

A presiones más altas no se observa esta curvatura y podemos extraer ácidos con la misma eficacia. Se puede observar que a 234 y 250 bares la gráfica es lineal en su totalidad, lo que supone que el CO<sub>2</sub> no está saturado de ácido y puede seguir extrayéndolo con la misma eficacia. También se puede apreciar que 234 bares es una presión suficiente para desacidificar los aceites estudiados, no siendo necesario el trabajo a presiones mayores.

Si se pretende trabajar a 180 bares y con aceites de elevada acidez la estrategia para conseguir extraer más cantidad de ácido podría ser aumentar la relación S/F. Se podría disminuir el flujo de

aceite o aumentar el flujo de CO<sub>2</sub>, para tener una mayor cantidad de CO<sub>2</sub> limpio que no se sature de ácido graso. En este sentido, se debe señalar que Bondioli y col. estudiaron procesos de refinado de aceite de oliva lampante con CO<sub>2</sub> supercrítico y establecieron unas condiciones óptimas en las que se emplean presiones más bajas (en torno a 150 bares), pero con un considerable aumento de la relación S/F (en torno a 100) y un gradiente de temperatura en la columna (50/40/30 °C) [374].

Un aumento de la temperatura puede también favorecer la separación entre los ácidos grasos libres y los triacilgliceroles en el interior de la columna de extracción, debido a la diferente volatilidad de estos compuestos. Este incremento en la temperatura puede requerir un aumento en la presión de extracción para mantener la misma densidad de CO<sub>2</sub> utilizada en el proceso de desacidificación.

Como resultados más significativos de desacidificación de aceite de oliva lampante se puede concluir que:

- El factor de reducción de acidez es superior a 234 y 250 bares que a 180 bares.
- Se extrae más cantidad de ácido graso cuanto mayor es la acidez del aceite de partida.
- A 180 bares el CO<sub>2</sub> pierde capacidad para extraer ácido graso en aceites de 3º de acidez o superiores.
- A 234 y 250 bares el CO<sub>2</sub> puede extraer de forma eficaz el ácido graso de aceites de acidez elevada, consiguiéndose valores de desacidificación en torno al 70%.
- La presión de 234 bares es óptima para la desacidificación de aceite, ya que se consiguen buenos factores de reducción de acidez y no se pierde capacidad de extracción de ácido graso en aceites de acidez superior a 4º.

## **8.2.2 Recuperación de escualeno.**

Para el estudio y discusión de las condiciones óptimas para la recuperación de escualeno, se consideraron dos respuestas:

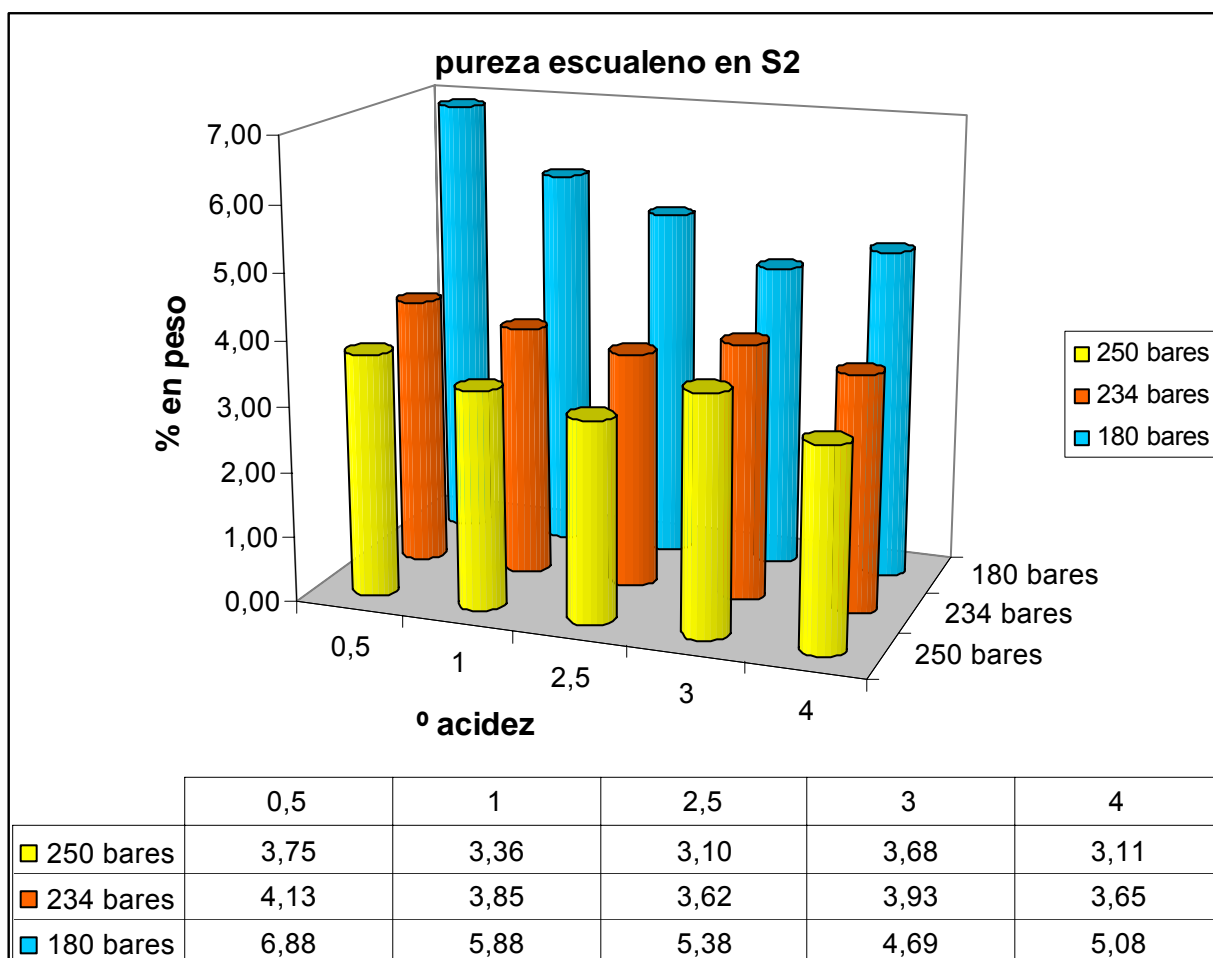
- Pureza de escualeno. Se expresa como la composición en % en peso de escualeno de los extractos de los separadores 1 y 2 (S1 y S2).
- Rendimiento de escualeno. Se expresa como el % de escualeno que se extrae en cada separador respecto de la masa total de escualeno introducido en la planta.

A partir de los resultados obtenidos en los dos experimentos replicados realizados en las mismas condiciones, se calculó una desviación estándar reflejada en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Desviación estándar calculada entre dos experimentos replicados llevados a cabo en las mismas condiciones de presión y con aceite del mismo grado de acidez.

Presión (bar)	° acidez del aceite	Desviación estándar % escualeno S1	Desviación estándar % escualeno S1	Desviación estándar rendimiento escualeno S1 + S2
250	0,5	0,01	0,10	9,61
	1	0,06	0,08	3,95
	2,5	0,13	0,50	8,18
	3	0,11	0,25	4,63
	4	0,14	0,35	6,11
234	0,5	0,25	0,65	16,10
	1	0,02	0,19	26,91
	2,5	0,13	0,19	0,26
	3	0,01	0,04	0,04
	4	0,04	0,02	10,03
180	0,5	0,08	0,75	2,83
	1	0,04	0,23	7,51
	2,5	0,02	0,18	18,36
	3	0,00	0,05	1,95
	4	0,04	0,08	7,14

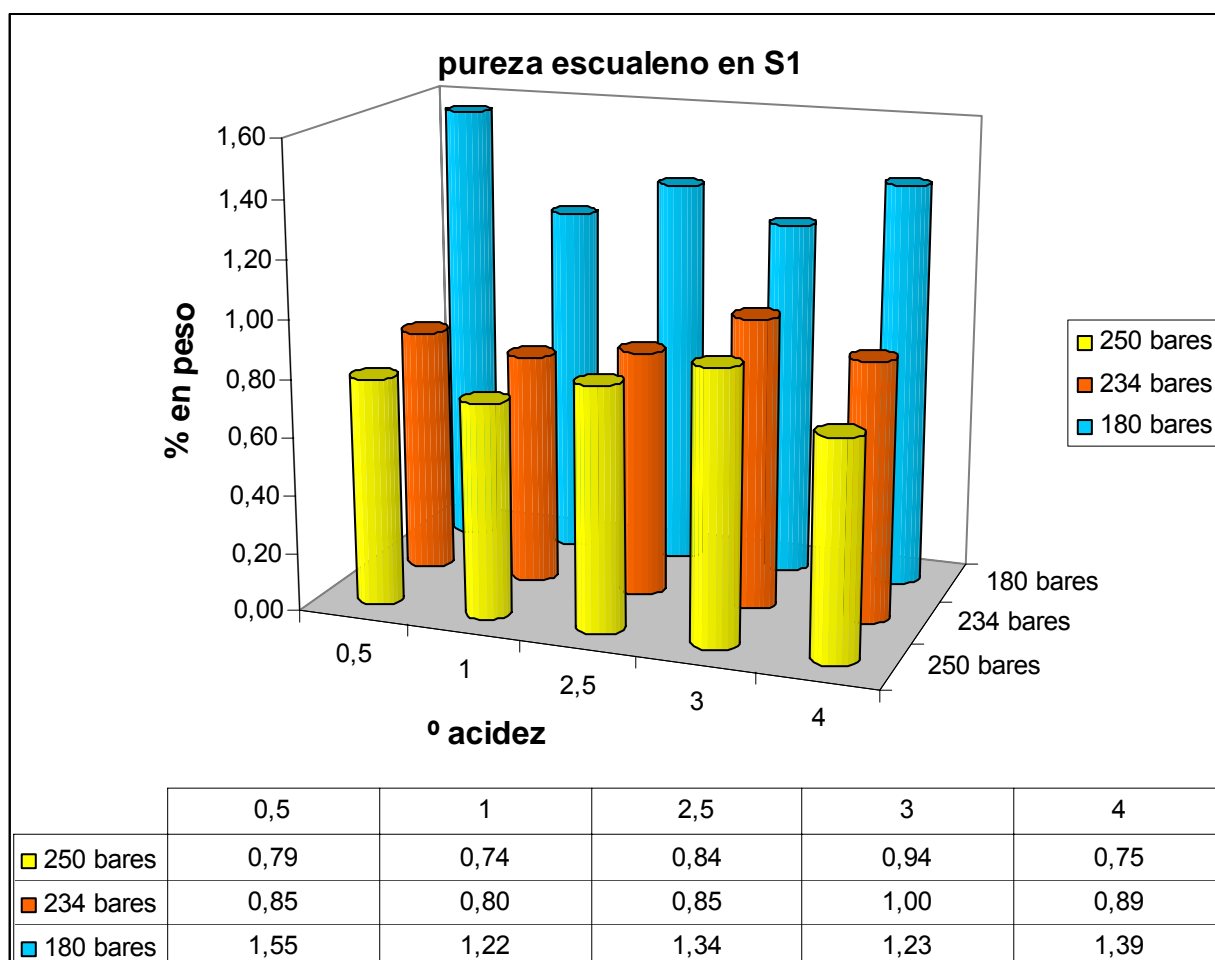
8.2.2.1 Pureza de escualeno en función de la presión de extracción utilizada y de la acidez del aceite de partida.



**Figura 54.** Resultados de pureza de escualeno obtenida en el separador S1.

En el separador S1 se pudo apreciar en todos los casos una diferencia significativa entre la pureza de escualeno obtenida a 180 bares y la obtenida a 234 y 250 bares. La pureza de escualeno a 180 bares fue mayor en todos los aceites.

Entre las presiones de 234 y 250 bares no se apreciaron diferencias significativas, ya que la desviación entre las replicas fue mayor que la diferencia que se pudo observar entre experimentos realizados a distintas condiciones. Por otro lado, se pudo apreciar en todos los casos que la media de la pureza de escualeno fue mayor a 234 bares que a 250 bares.



**Figura 55.** Resultados de pureza de escualeno obtenida en el separador S2.

Si se analizan individualmente los resultados para cada presión seleccionada, se obtienen valores de pureza y rendimiento de escualeno similares en todos los tipos de aceites, tanto en el separador S1 como en el separador S2.

Se puede comprobar de forma comparativa que la pureza de escualeno en el separador S2 fue superior a la del separador S1. Como era previsible teniendo en cuenta la elevada solubilidad en CO<sub>2</sub> de este compuesto, el escualeno precipitó mayoritariamente en el separador S2.

También se pudo observar que partiendo de aceites con un 0,35 – 0,4% en peso de escualeno, se obtuvieron extractos en el separador S2 con purezas del 4% en peso de escualeno en casi todos los casos. En algunos casos se consiguieron extractos con más de un 6% en peso de escualeno. De este modo, se consiguieron factores de enriquecimiento de 10 a 17.

En el separador S2, a las presiones de 234 y 250 bares no se observa ninguna tendencia en función de la acidez de aceite. Sin embargo, a 180 bares se pudo observar, salvo en una inversión en los aceites de 3 y 4° de acidez, un aumento de la pureza en escualeno del separador S2

cuanto menor era la acidez del aceite de partida. Esto podría deberse a la posible extracción conjunta del escualeno y los ácidos grasos libres, precipitando ambos en el separador S2. Por ello, al aumentar la acidez del aceite de partida, se tiene mayor cantidad de ácidos grasos en el separador S2 que hacen que disminuya la pureza de escualeno en la composición del extracto. Entre los aceites de mayor grado de acidez (3 y 4°) los datos los resultados fueron similares.

En el separador S2 se pudo observar que la pureza de escualeno fue mayor en todos los aceites cuando se trabaja a 180 bares de presión en columna respecto a las otras dos presiones estudiadas. Las mayores purezas fueron obtenidas a 180 bares para todos los aceites estudiados.

Además, en los aceites de 1 y 4° de acidez se pudo apreciar que la pureza de escualeno fue mayor a 234 bares respecto a 250 bares, es decir, en estos aceites se pudo observar la siguiente tendencia:

Pureza escualeno en el separador S2: 180 bares > 234 bares > 250 bares.

En los aceites de 0,5; 2,5 y 3° de acidez se comprobó que la media de pureza de escualeno fue mayor a 234 que a 250 bares, pero se tuvo una desviación entre réplicas mayor que la diferencia observada.

Este fenómeno se puede deber a que 180 bares establece unas condiciones bastante suaves de extracción. Esta presión proporciona una densidad del CO<sub>2</sub> relativamente baja, que hace que se extraigan preferentemente los compuestos más solubles en CO<sub>2</sub>, como es el caso del escualeno. De este modo, la composición del extracto tiene una mayor proporción de escualeno, debido a la dificultad que ha tenido que el CO<sub>2</sub> para disolver otros compuestos menos solubles, como los triacilglicerol.

Si se obtuviesen rendimientos de escualeno aceptables a 180 bares, esta presión sería adecuada para procesos de recuperación escualeno a partir de aceites, ya que proporciona una mayor pureza de este compuesto.

Se pudo comprobar que al emplear una mayor presión en la columna de extracción, se obtuvo una menor pureza en composición de escualeno, especialmente en el separador S2. Como se ha explicado anteriormente, la razón que explica este fenómeno se basa en que presiones mayores dan lugar a una densidad de CO<sub>2</sub> mayor, que permite que haya una mayor capacidad para disolver o extraer otros compuestos menos solubles que el escualeno, como los triacilglicerol. Por otro lado, se comprobó que las diferencias en pureza de escualeno entre 234 y 250 bares fueron mínimas.

Por otro lado también se debe estudiar el efecto que pueda tener la variación de otras variables como es la relación S/F. Por ejemplo, sería interesante el estudio de presiones que permitan alcanzar buenas purezas de escualeno, por ejemplo 180 bares, junto con una relación S/F más alta. De este modo, puede que sea posible el mantenimiento de los valores de pureza de escualeno, ya que el CO<sub>2</sub> tiene la misma densidad, y además puede aumentar el rendimiento de escualeno en los separadores, ya que habría una mayor cantidad de CO<sub>2</sub> limpio con capacidad para extraer más cantidad de escualeno.

El punto de introducción de muestra también puede tener un efecto relevante, ya que la introducción de la muestra por el punto superior puede que proporcione una transferencia de materia más eficaz entre el CO<sub>2</sub> y el aceite, dando lugar a un aumento del rendimiento de escualeno en los separadores. Del mismo modo se debería estudiar si este cambio puede producir una mayor extracción de triglicérido, originando un decrecimiento en la pureza de escualeno en los separadores.

Además, la introducción del aceite por el punto superior puede también aumentar el número de etapas de equilibrio, que podría dar lugar a una mejor separación entre el escualeno y el triacilglicerol.

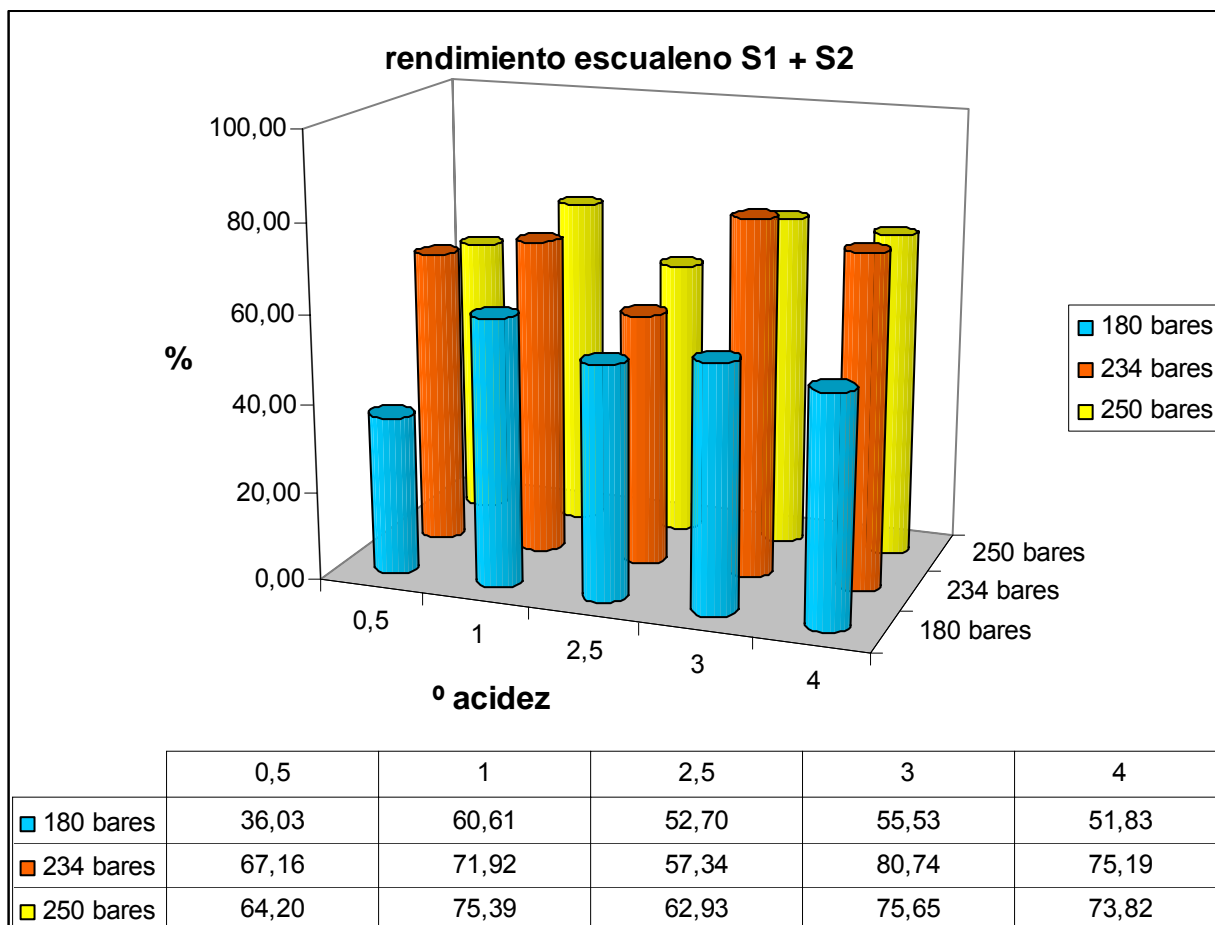
El empleo de un gradiente de temperaturas en la columna de extracción es una herramienta que también puede mejorar la pureza de escualeno. Un aumento de la temperatura en la parte superior de la columna provoca una ligera disminución en la densidad del CO<sub>2</sub>, que hace que precipite una parte de los componentes más pesados y se concentre el escualeno en la salida de la columna, favoreciendo así la separación.

Para conseguir unas buenas condiciones de extracción es fundamental encontrar una buena solución de compromiso entre pureza y rendimiento.

#### 8.2.2.2 Rendimiento de escualeno en función de la presión de extracción utilizada y de la acidez del aceite de partida.

Se observaron diferencias apreciables entre los resultados de rendimiento entre ambos separadores, ya que la mayor parte de escualeno precipitó en el separador S2.

Con objeto de simplificar la interpretación de los resultados y evitar que el fraccionamiento realizado entre los separadores afecte en el estudio, se ha analizado el rendimiento total de escualeno teniendo en cuenta la suma de escualeno en el separador S1 más el escualeno en el separador S2.



**Figura 56.** Resultados de rendimiento de escualeno obtenido en el separador S1 + separador S2.

Se pudo comprobar una gran eficacia en el proceso de extracción, ya que aunque a 180 bares el rendimiento fue más bajo, a 234 y 250 bares los rendimientos fueron elevados y casi siempre superiores al 70%.

El rendimiento de escualeno a 180 bares fue siempre menor que el obtenido a 234 y 250 bares de presión en columna. Entre 234 y 250 bares no se apreciaron diferencias significativas, siendo el rendimiento de escualeno similar para ambas presiones.

La extracción de escualeno en la columna es más elevada a altas presiones, ya que la densidad del CO<sub>2</sub> es mayor y tiene más capacidad para extraer prácticamente la totalidad del escualeno presente. Por esta razón, parece claro que 180 bares es una presión bastante limitada para tener buenos rendimientos de escualeno en los separadores.

Con 234 se obtuvieron buenos rendimientos de escualeno. Además, al aumentar la presión en columna a 250 bares, no se consiguió un aumento significativo en el rendimiento de escualeno respecto al obtenido a 234 bares.



El fraccionamiento llevado a cabo entre los separadores no fue muy eficaz, obteniéndose una precipitación parcial de escualeno en el separador S1. La optimización del fraccionamiento de forma independiente puede dar lugar a una mejora en el rendimiento de escualeno.

La recuperación del escualeno junto con los ácidos grasos libres en el separador S2 permite estudiar otro tipo de estrategias para la posterior purificación del escualeno. Un ejemplo puede ser la neutralización y decantación o lavado de los ácidos grasos libres.

Como resultados más significativos de recuperación de escualeno a partir de aceite de oliva se puede concluir que:

- El escualeno se obtiene mayoritariamente en el separador S2, con unos factores de enriquecimiento de 10 a 17.
- Se obtienen mayores purezas a 180 bares que a 234 y 250 bares, consiguiéndose valores en torno al 6% a 180 bares y en torno al 4% a 234 y 250 bares.
- En los aceites de 1 y 4º la pureza de escualeno es mayor a 234 bares que a 250 bares.
- Se obtiene mejor rendimiento a 234 y 250 bares que a 180 bares.
- Entre 234 y 250 bares no hay diferencias significativas en cuanto a rendimiento, consiguiéndose valores en torno al 75%.

Una buena solución de compromiso entre pureza y rendimiento de escualeno se alcanza empleando una presión de 234 bares. Hurtado Benavides encontró un óptimo de presión a 234 bares para la extracción de compuestos minoritarios a partir de aceite de oliva (escualeno, esteroides y tocoferoles), en el límite de la región experimental explorada, es decir, no exploró regiones de presión superiores [553].

En este estudio se consiguieron resultados similares de recuperación de escualeno a 250 y a 234 bares, introduciendo además algunos cambios en el proceso como son los flujos de muestra y de CO<sub>2</sub> empleados y la temperatura de extracción, con vistas a una mejor productividad en una posible implantación industrial del proceso.

Un aumento de la relación S/F permitió una mejora en el rendimiento de escualeno en el extracto, aunque también dio lugar a una ligera disminución en la pureza, debido al aumento de CO<sub>2</sub> limpio con capacidad para extraer otros compuestos.

**Según los resultados obtenidos, se puede concluir que a 40 °C y con una relación disolvente/alimentación (S/F) de 20, 234 bares es la presión óptima para el proceso de desacidificación y recuperación de escualeno a partir de aceite de oliva.**

### 8.3 Recuperación de escualeno a partir de subproductos de aceite de oliva empleando extracción supercrítica con CO<sub>2</sub>.

Con el fin de obtener productos de origen vegetal enriquecidos en escualeno, se pretendió llevar a cabo procesos de aislamiento y purificación de escualeno a partir de fuentes vegetales que tuvieran en su composición inicial una mayor proporción de este compuesto. Como se ha mencionado anteriormente, los residuos de procesos de desodorización de aceite de oliva (DOD), son materiales de partida interesantes para la producción de escualeno de origen vegetal. Por ello, en este estudio se empleó la extracción supercrítica en contracorriente (CC-SFE) para la recuperación y enriquecimiento de escualeno a partir de un desodorizado de aceite de oliva. Conviene destacar que la purificación de escualeno ha sido abordada previamente mediante varias metodologías, como la destilación molecular, la cromatografía en contracorriente de alta velocidad [554], y extracción supercrítica en contracorriente (CC-SFE) [96, 335, 380, 393, 555-558].

La composición en lípidos neutros del desodorizado de aceite de oliva expresada como porcentaje en peso se muestra en la Tabla 10. Conviene destacar el elevado porcentaje de escualeno, cercano al 20%, y el bajo porcentaje de esteroides tanto libres como esterificados (< 1%). También resulta significativa la ausencia de tocoferoles en el desodorizado.

**Tabla 10.** Principales lípidos neutros presentes en el destilado desodorizado de los aceite de oliva.

	Destilado de aceite de oliva (%)
Escualeno	19,2
Ésteres de esteroles	0,6
Ésteres de ácidos grasos	0,0
Alfa-tocoferol	< 0,5
Triacilgliceroles	0,6
Beta-tocoferol	< 0,5
Gamma-tocoferol	< 0,5
Ácido graso libre	78,1
Delta-tocoferol	< 0,5
Esteroides	0,2
1,3-Diacilgliceroles	1,3

El destilado desodorizado de aceite de oliva fue sometido a una serie de procesos de CC-SFE, cuyas condiciones fueron:

- ⇒ Presión de columna: 170-190 bares.
- ⇒ Temperatura de columna: 60 °C.
- ⇒ Relación S/F: 25-50.
- ⇒ Punto de introducción: superior.
- ⇒ Tiempo de extracción: 1 hora + 30 min de CO<sub>2</sub> puro.

Además, se pretendió realizar un fraccionamiento del extracto manteniendo el separador S1 a una temperatura de 50 °C y una presión de 100-115 bares, con el objetivo de favorecer la precipitación selectiva del compuesto menos soluble (en este caso el ácido graso).

El separador S2 se mantuvo a 30 °C y 20 bares, para recoger la fracción enriquecida de escualeno.

Se pretendió explorar unas condiciones de extracción suaves con el fin de optimizar la selectividad del proceso hacia la extracción de escualeno y reducir en lo posible la extracción de otros compuestos presentes en el desodorizado, fundamentalmente ácidos grasos.

En estos procesos fue posible obtener purezas de escualeno superiores al 40% (factor de enriquecimiento de 2,1). Se obtuvieron rendimientos en escualeno superiores al 50%, lo que indica una elevada tasa de recuperación de este compuesto.

Para una ulterior optimización de este proceso se pueden tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La presión de la columna debería estudiarse entre 150 a 170 bares.
- Se deberían explorar temperaturas superiores a las estudiadas, que favorezcan la solubilidad del escualeno en el CO<sub>2</sub> y reduzcan en la medida de lo posible la solubilidad del ácido graso, teniendo en cuenta sus diferentes presiones de vapor.
- Aumentar el caudal de muestra introducido para saturar más rápidamente el CO<sub>2</sub> en ácidos grasos (componente mayoritario en el desodorizado de partida) y así, favorecer la extracción de escualeno que es más soluble en CO<sub>2</sub>.
- Optimizar el fraccionamiento de escualeno y ácidos grasos en los separadores S1 y S2.
- En este caso sería conveniente disminuir la densidad del CO<sub>2</sub> (mediante las variables presión y temperatura) en el separador S1 para favorecer la precipitación selectiva del compuesto menos soluble (en este caso el ácido graso). Por ejemplo disminuir la presión en el separador S1 desde 102 bares hasta 80 bares.

El siguiente estudio llevado a cabo, tuvo como objetivo la purificación de escualeno mediante CC-SFE, usando como material de partida un subproducto obtenido después de la destilación y la etilación de destilados desodorizados de aceite de oliva. Este material es particularmente interesante debido a su alto contenido en escualeno vegetal, siendo su composición semejante a la de los extractos (enriquecidos en escualeno) obtenidos mediante extracción supercrítica de desodorizados de aceite de oliva. De este modo, mediante un proceso de CC-SFE a partir de un desodorizado de aceite de oliva, se puede conseguir un material de partida con una composición similar a la de este producto, que puede también someterse a un nuevo proceso de CC-SFE, para conseguir una mayor purificación de escualeno.

El análisis de este material, llevado a cabo en nuestro laboratorio, reveló la siguiente composición:

- ⇒ 52% en peso de escualeno.
- ⇒ 22,7% en peso de ésteres de ácidos grasos.
- ⇒ 1,9% en peso de esteroides.
- ⇒ 3,1% en peso de TAGs.

Aproximadamente el 20% de material suministrado no pudo ser identificado, pero se demostró que correspondía a compuestos de elevada volatilidad.

Hay diversos estudios que abordan la recuperación de escualeno a partir de aceite de hígado de tiburón [96, 335, 393]. Este material de partida contiene mayoritariamente TAGs, alquilglicerol, escualeno, ésteres de esteroles y pristano. Son significativas las diferencias de volatilidad y solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico entre el escualeno y el resto de compuestos. Las condiciones del proceso de extracción requieren que la solubilidad del escualeno en CO<sub>2</sub> supercrítico sea lo más elevada posible para maximizar la pureza y el rendimiento del extracto. Esto se mantiene cuando se emplean como materiales de partida destilados desodorizados de aceite de oliva en los que previamente se han transformado los FAMES y FAEEs en sus correspondientes TAGs [380]. De este modo, el escualeno también se recupera en el extracto.

El aislamiento de escualeno a partir de esta mezcla se debe llevar a cabo en unas condiciones muy diferentes de las que se emplean cuando se parte de aceite de hígado de tiburón. En este caso se requiere una baja solubilidad de escualeno para asegurar su recuperación como producto en el refinado.

El fraccionamiento de la mezcla binaria escualeno + metil oleato (conteniendo un 40 y un 70% en peso de escualeno) mediante CO<sub>2</sub> supercrítico, fue estudiada en profundidad por Ruivo y col. [555-558]. Estos autores simulaban una mezcla proveniente del proceso de refinado del aceite de oliva, mezclando escualeno y metil oleato puros en una determinada proporción [558]. En nuestro trabajo, el material de partida es un DOD real proveniente de la industria oleícola, que tiene

similitud con la mezcla empleada por Ruivo y col., aunque contiene un 5% en peso de compuestos de baja volatilidad y un 20% en peso de compuestos con volatilidad mayor que la de ésteres de ácido graso.

En este trabajo, las condiciones del proceso de SFE fueron exploradas usando la Ecuación de Estado de Contribución de Grupos (Group Contribution Equation of State) [188] para simular el comportamiento de la fase de equilibrio termodinámico de la mezcla. Siguiendo a los resultados de este estudio o modelado teórico, se realizó una simulación del proceso. De este modo, se diseñaron y llevaron a cabo una serie de extracciones experimentales en una planta a escala piloto en contracorriente con una columna rellena. La composición del material de partida fue crucial para obtener una concordancia satisfactoria entre las extracciones experimentales y las simuladas en el ordenador de forma teórica. Finalmente, la validación del modelo se empleó para mejorar la eficacia del proceso en términos de selectividad, rendimiento y pureza.

Las condiciones experimentales de los procesos de CC-SFE para recuperación de escualeno a partir de destilado desodorizado de aceite de oliva fueron las siguientes:

Durante la extracción, se introdujo un flujo continuo 3000 mL/h de CO<sub>2</sub> en el interior de la columna de extracción por la parte inferior. El líquido de muestra fue bombeado con un flujo de 300 mL/h durante el tiempo de extracción de 90 min. La muestra líquida fue introducida por el punto superior de la columna rellena.

Tanto la columna de extracción, como el primer separador se mantuvieron a 343 K en todas las extracciones experimentales. Los ensayos preliminares mostraron que el 20% en peso de material no identificado que contenía la muestra líquida, fue casi completamente concentrado en el extracto. La presencia de estos compuestos sin identificar introduce incertidumbre en el modelado termodinámico. El primer separador no se empleó para recoger compuestos volátiles, sino que se empleó para obtener información experimental sobre el fraccionamiento del extracto y la capacidad del modelo de GC-EoS para simularlo. Por tanto, la presión del primer separador se mantuvo a 20-30 bares por debajo de la presión de operación de la columna de extracción. El segundo separador se empleó para recoger el material que era todavía soluble en el CO<sub>2</sub> a las condiciones de presión y temperatura del primer separador. De este modo, se mantuvo a baja presión (30 bares) y baja temperatura (temperatura ambiente).

La fracción recogida en el primer separador estaba constituida mayoritariamente por escualeno y una parte de los FAAEs, mientras que el segundo separador contenía mayoritariamente FAAEs y compuestos volátiles sin identificar.

Como se ha mencionado previamente, las extracciones experimentales se llevaron a cabo para validar la composición seleccionada para representar el material de partida y para evaluar la capacidad de la GC-EoS para representar el proceso de extracción. De este modo se simuló,

tanto el proceso de extracción supercrítica llevado a cabo en la columna en contracorriente, como el fraccionamiento del extracto llevado a cabo en el primer separador.

En la tabla 3 se muestra la pureza de escualeno (% en peso del producto libre de disolvente) y el rendimiento obtenido en el refinado a las diferentes presiones experimentales.

El rendimiento de escualeno se calculó como la relación entre la cantidad de escualeno presente en el refinado recogido y la cantidad de escualeno alimentado en la columna de extracción. En esta tabla también se muestra la concentración de escualeno en la fase líquida del primer separador, y la concentración y rendimiento global de escualeno obtenidos después de mezclar el refinado con la fase líquida obtenida en el primer separador.

**Tabla 11.** Concentración de escualeno experimental y recuperación obtenida en el refinado, fase líquida del separador y en la mezcla de ambos.

Presión de extracción (bar)	Presión del separador (bar)	Refinado		Extracto		
		Concentración (% p/p)	Rendimiento (% p/p)	Concentración en fase líquida del separador (% p/p)	Rendimiento total	Concentración total (% p/p)
230	190	78,1	30,4	72,1	62,5	74,9
200	170	84,9	49,6	72,1	78,6	79,7
180	150	89,4	64,2	70,3	98,4	81,7
150	120	81,9	75,8	38,5	99,4	64,6

Según los resultados experimentales, se pudo conseguir un refinado con un 89,4% en peso de escualeno y un 64,2% de rendimiento, mediante un proceso de CC-SFE a 343 K, 180 bares y S/F = 13. En cuanto a los TAGs y esteroides, que representan aproximadamente el 5% en peso del material de partida, también se concentraron en el refinado, lo que significa que los FAAEs y los compuestos volátiles sin identificar fueron completamente extraídos.

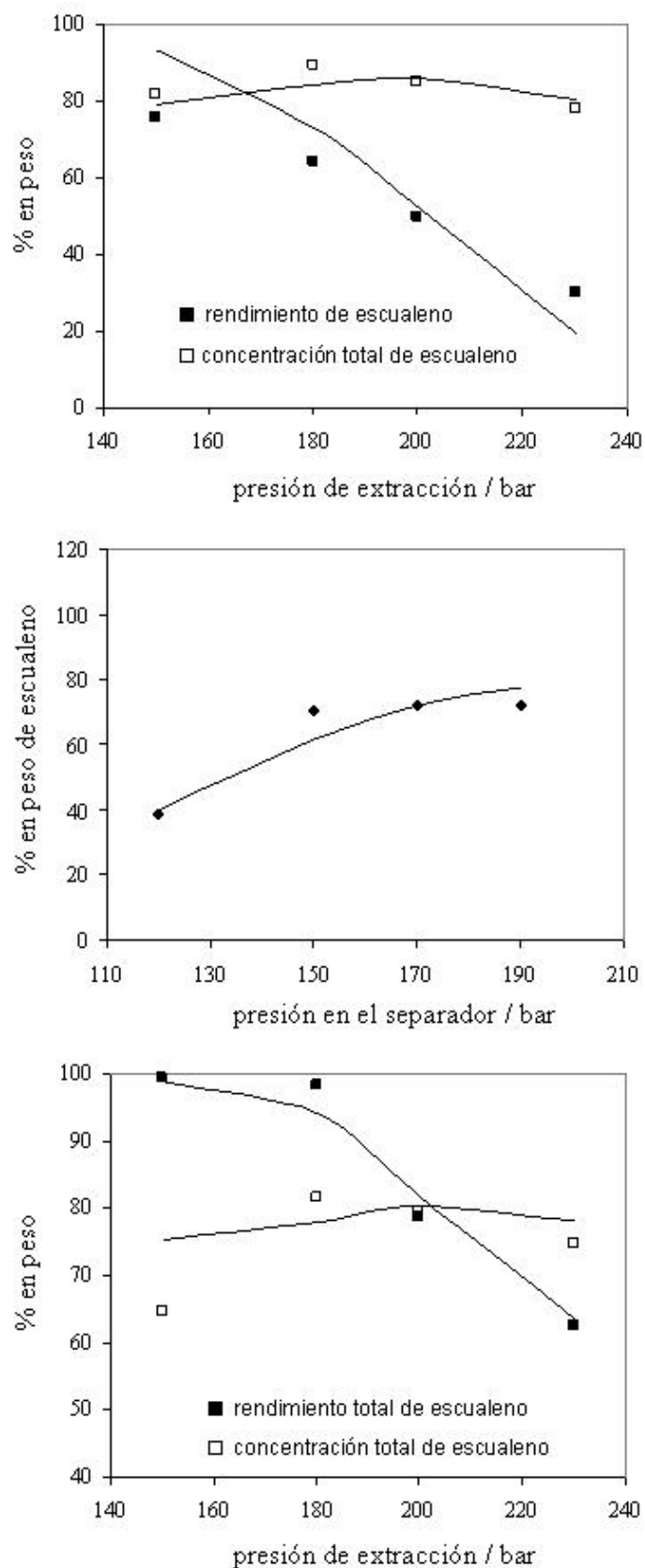
Ruivo y col. [408] realizaron procesos de CC-SFE de mezclas binarias de escualeno y metil oleato, llevados a cabo a 313 K y 115 bares. Con relaciones S/F en torno a 13 se obtuvo mayor recuperación de escualeno (90%) y una pureza de escualeno similar (85% en peso). Las presiones de extracción más elevadas y las temperaturas empleadas en nuestro trabajo

consiguieron la completa eliminación de los FAEEs del escualeno, dando lugar a una pureza algo mejor y un rendimiento algo más bajo.

Los resultados obtenidos para la presión de extracción de 180 bares están bastante cerca de los calculados usando el modelo de simulación termodinámico (84% en peso de escualeno y 70% de rendimiento a 187 bares), para una corriente de alimentación de 60% en peso de escualeno, 35% en peso de etil oleato y 5% en peso de trioleína.

Con el objetivo de mejorar la capacidad del modelo de simulación, se modificó la composición de alimentación que representaba el material de partida, siendo la nueva composición: 52% en peso de escualeno, 10% en peso de etil oleato, 34% en peso de metil miristato y 4% en peso de trioleína. Puesto que el material de partida que no pudo ser identificado (aproximadamente un 20% en peso) fue completamente recuperado en el segundo separador, es razonable la introducción de un compuesto más volátil, como el metilmiristato, para caracterizar la composición del material de alimentación.

Esta composición permite una representación bastante satisfactoria de la concentración y recuperación de escualeno, tanto en la columna de extracción, como en el primer separador, como se puede observar en la Figura 57.



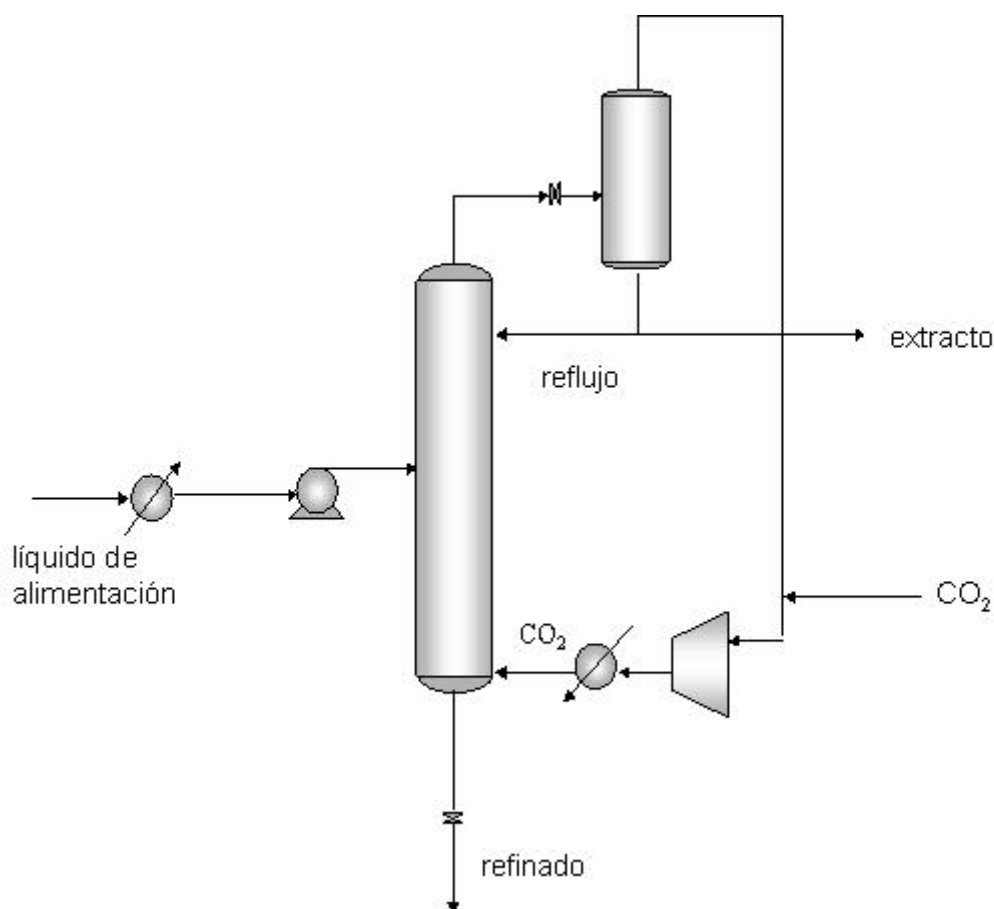
**Figura 57.** Comparación entre el rendimiento experimental de escualeno (■) y composición experimental de escualeno (□) a 343 K, con la simulación del proceso de GC-EoS en el refinado (a), fase líquida del separador (b) y mezcla de estos productos (c).



### 8.3.1 Optimización del proceso.

En este trabajo, las predicciones del modelo GC-EoS y las simulaciones llevadas a cabo en la columna de extracción con varias etapas de equilibrio termodinámico, han proporcionado unos resultados satisfactorios acorde con las extracciones experimentales efectuadas. Por ello, el modelo de simulación desarrollado se usó para optimizar las condiciones del proceso, teniendo como objetivo mejorar el rendimiento y/o pureza de escualeno.

En este caso, se consideró el esquema convencional de extracción supercrítica (Figura 58).



**Figura 58.** Optimización del proceso CC-SFE ayudado por el diagrama de flujo del proceso considerado por el ordenador.

La fase líquida del separador es parcialmente reintroducida en la columna de extracción como refujo, y parcialmente recuperada como producto. La fase de vapor es el CO<sub>2</sub> recuperado, que se puede recircular hacia la columna de extracción.

Las simulaciones se llevaron a cabo para explorar la variación de la pureza y el rendimiento de escualeno, con el número de etapas teóricas y la etapa de alimentación (punto de introducción) en el proceso. Por tanto, estas variables fueron fijadas y solo las variables continuas fueron

consideradas en el proceso de optimización del modelo. Esto reduce considerablemente el problema de la complejidad, sin una pérdida considerable de precisión.

La función objetivo fue maximizar el rendimiento de escualeno en el refinado. Las variables continuas que se optimizaron fueron: presión y temperatura de extracción, presión del tanque de despresurización y recuperación del CO<sub>2</sub>, relación de flujo de CO<sub>2</sub> y relación de reflujo. En el proceso de optimización se llevaron a cabo unas restricciones o acotaciones de los valores máximos y mínimos que podrían tener las variables implicadas. Estas restricciones incluyen especificaciones de pureza de escualeno (>92% en peso), pureza de CO<sub>2</sub> (>99,9% en peso) y límites de operación (Tabla 12).

Los límites de la presión y temperatura de extracción fueron elegidos en el intervalo donde se probó el equilibrio de fases de mezclas binarias y ternarias, siendo satisfactoria la correlación con el modelo de GC-EoS.

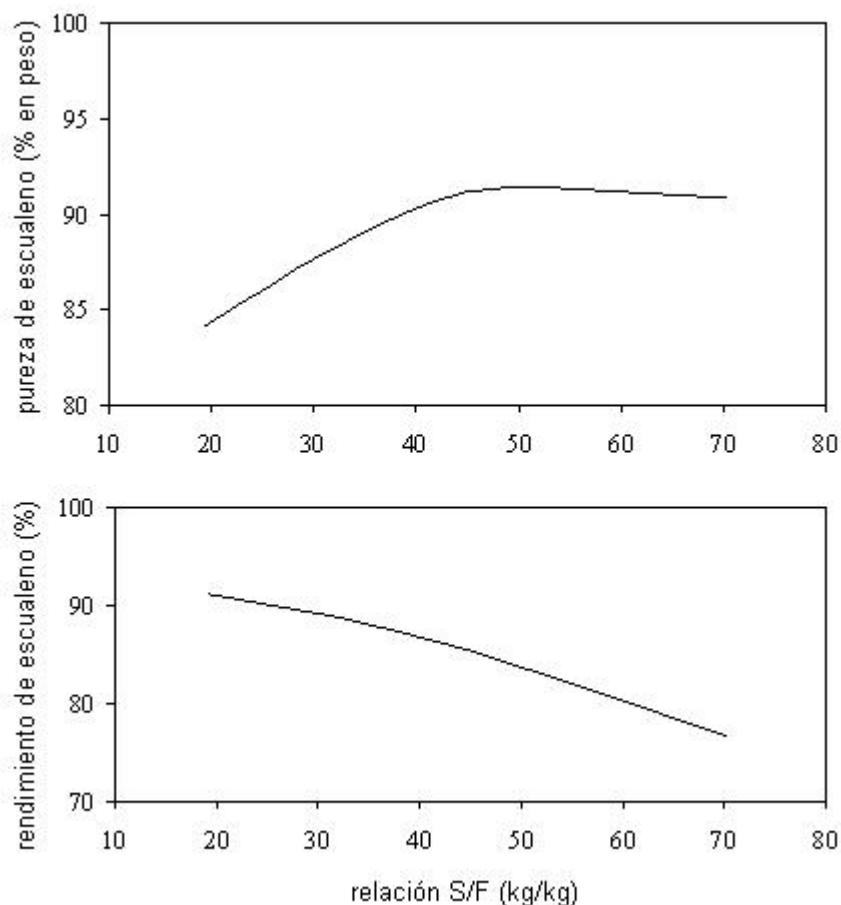
Fueron necesarios altos valores de la relación de reflujo para obtener una alta recuperación de escualeno en el refinado.

**Tabla 12.** Restricciones de desigualdad, límite inferior y superior empleados y valores óptimos obtenidos en la optimización del proceso de CC-SFE.

Variable	Límite inferior	Límite superior	Valor óptimo
Presión de extracción (bar)	150	230	176,8
Temperatura de extracción (K)	313	353	351,1
Presión del separador (bar)	40	70	67,9
Relación S/F (kg/kg)	13	60	51,0
Relación de reflujo (reflujo/extracto)	1	4	3,6
% en peso de escualeno en el refinado	>92		92
Rendimiento de escualeno (función objetivo)			93

La Figura 59 muestra la variación en el rendimiento y la pureza de escualeno, con la relación S/F, para una extracción en columna con 15 etapas teóricas, operando a 180 bares, 343 K y una relación de reflujo de 1,5.

Como era esperado, el rendimiento de escualeno decrece y la pureza de escualeno crece cuando se aumenta la relación S/F, pero con valores por encima de 60-70 no se pudo producir un incremento significativo de la concentración de escualeno en el refinado. Por esta razón, en la optimización del proceso, el límite superior para la relación S/F se fijó en 60.



**Figura 59.** Variación del rendimiento y pureza de escualeno a 343 K y 180 bares con la relación S/F, según la predijo el modelo de GC-EoS.

Las variables óptimas del proceso obtenidas para una pureza del 92% en peso de escualeno en el refinado se muestran en la tabla 4. Este resultado corresponde a 15 etapas teóricas, con un 93% de rendimiento de escualeno y un extracto que contiene en torno al 90% en peso de FAAEs.

Considerando que la simulación de nuestro proceso tiene en cuenta 3 etapas teóricas en 2,4 m, es decir, desde el punto de introducción del CO<sub>2</sub> hasta el punto superior de introducción de muestra, 15 etapas teóricas de equilibrio termodinámico a priori corresponderían a una columna de extracción de 12 m de largo.

En este trabajo se ha estudiado la recuperación de escualeno a partir de residuos de procesos de desodorización del aceite de oliva usando CO<sub>2</sub> supercrítico. La composición del material de partida propone la separación del escualeno y los FAAEs. La integración del modelado termodinámico y las técnicas de optimización no lineales con el trabajo experimental, ofrece una eficiente herramienta que en poco tiempo puede analizar la viabilidad de procesos de extracción supercrítica. La GC-EoS proporcionó la capacidad de representar con precisión el comportamiento del equilibrio de fases de la compleja mezcla de partida. La comparación con las extracciones experimentales, llevadas a cabo a escala piloto en una columna de extracción en contracorriente,

confirmó el potencial del modelo de simulación. El ordenador ayudó en la optimización del proceso de extracción, incluyendo el parcial reflujo del extracto, resultando un refinado con una pureza de escualeno del 91% en peso y una alta recuperación de escualeno (93%).

## 8.4 Extracción supercrítica de lípidos minoritarios a partir de destilados desodorizados de aceite de girasol pretratado.

Los destilados desodorizados de aceites vegetales constituyen una fuente natural de componentes lipídicos minoritarios, como fitoesteroles y tocoferoles, que en los últimos años han atraído cada vez más atención debido a sus beneficios en la salud humana.

En este trabajo, la composición del destilado desodorizado de aceite de girasol (SODD) original fue transformado con el objetivo de convertir los TAGS y FFAs en FAEEs. De este pretratamiento se obtuvo una mezcla (SODD etilado) constituida mayoritariamente por tocoferoles, fitoesteroles y FAEEs. Se estudió la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente (CC-SCCO<sub>2</sub>) del SODD original y del SODD etilado, para obtener un producto concentrado en tocoferoles y fitoesteroles. Las extracciones de los dos materiales de partida se llevaron a cabo en una columna de extracción en contracorriente, se compararon los resultados obtenidos a partir del SODD original y el SODD etilado y se establecieron diferencias.

La transformación química de DOD combinada con procesos de cristalización o destilación molecular a vacío, para recuperar compuestos lipídicos minoritarios, ha sido descrita por varios autores en la literatura. Recientemente, Güclü-Ustündag y Temelli revisaron algunas patentes y contribuciones importantes sobre este tema [184].

En los procesos de CC-SFE se emplearon como materiales de partida SODD original y el producto de la reacción de transesterificación por etanolisis y esterificación en medio ácido llevada a cabo con el SODD original.

La Tabla 13 muestra la composición (en % en peso) del SODD antes y después de la reacción química.

**Tabla 13.** Composición del destilado desodorizado de aceite de girasol (SODD) antes y después de la formación de ácidos grasos etil ésteres.

	SODD original [% en peso]	SODD etilado [% en peso]
Ácidos grasos metil y etil ésteres	10-15	60-70
Ácidos grasos libres	~25	~1

Tocoferoles	1-3	1-3
Esteroles libres	4-6	2-4
Ésteres de esterol	2-3	~ 2
Triacilgliceroles	30-40	< 1
Material no identificado	~20	20-30

La comparación entre la composición del SODD antes y después del proceso de pretratamiento (ver Tabla 13) muestra que todos los TAGs y FFAs presentes en el SODD original son casi completamente convertidos a FAEEs. También se puede observar que la cantidad de material sin identificar después de la formación de FAEEs es similar a la contenida en el SODD. La reducción del contenido en esteroles se debe a la parcial cristalización de esteroles libres después de la formación de FAEEs.

Teniendo en cuenta que el SODD original contiene en torno a un 25% en peso de FFAs y un 30-40% en peso de TAGs, puede obtenerse aproximadamente un 60% en peso de FAEEs a partir de este material. Estos FAEEs pueden separarse más fácilmente de tocoferoles y esteroles que los ácidos grasos y los TAGs, debido a su elevada volatilidad y solubilidad en SCCO<sub>2</sub>. Por tanto, se esperan factores de enriquecimiento más altos cuando se procesa SODD etilado.

La principal desventaja del proceso de CC-SFE descrito en el presente estudio, es relativa a la gran cantidad de compuestos sin identificar presentes en el SODD original (aproximadamente el 20% en peso). En torno al 50% de este material no identificado corresponde a compuestos no volátiles, que se acumulan preferiblemente en el refinado (aproximadamente el 40% en peso). Entre estos compuestos es posible encontrar esteradienos, hidrocarburos pesados, productos de la oxidación de ácidos grasos, etc. No obstante, la caracterización química completa de estos compuestos sin identificar es una difícil tarea. De este modo, en este punto debería investigarse la aplicabilidad de técnicas de purificación para eliminar estos compuestos no volátiles después de la formación de FAEEs, con el objetivo de incrementar los factores de enriquecimiento tanto de fitoesteroles como de tocoferoles.

En este punto, el objetivo fue analizar la influencia de la transformación del material de alimentación en los procesos de extracción CC-SCCO<sub>2</sub>. En este sentido, se llevaron a cabo varios experimentos con el SODD original y con SODD etilado, bajo las mismas condiciones de extracción, por ejemplo: presiones de 10, 15,5 y 210 MPa y relaciones S/F de 15 a 30. La temperatura elegida para los experimentos fue 65 °C. Aunque es posible que otros intervalos de temperaturas pudieran mejorar la separación y con temperaturas más altas se pudiera prevenir la

parcial solidificación de esteroides en el interior de la columna de extracción, en el presente estudio no se exploraron temperaturas superiores a 65 °C, ya que temperaturas más altas podrían provocar la parcial degradación de tocoferoles y esteroides.

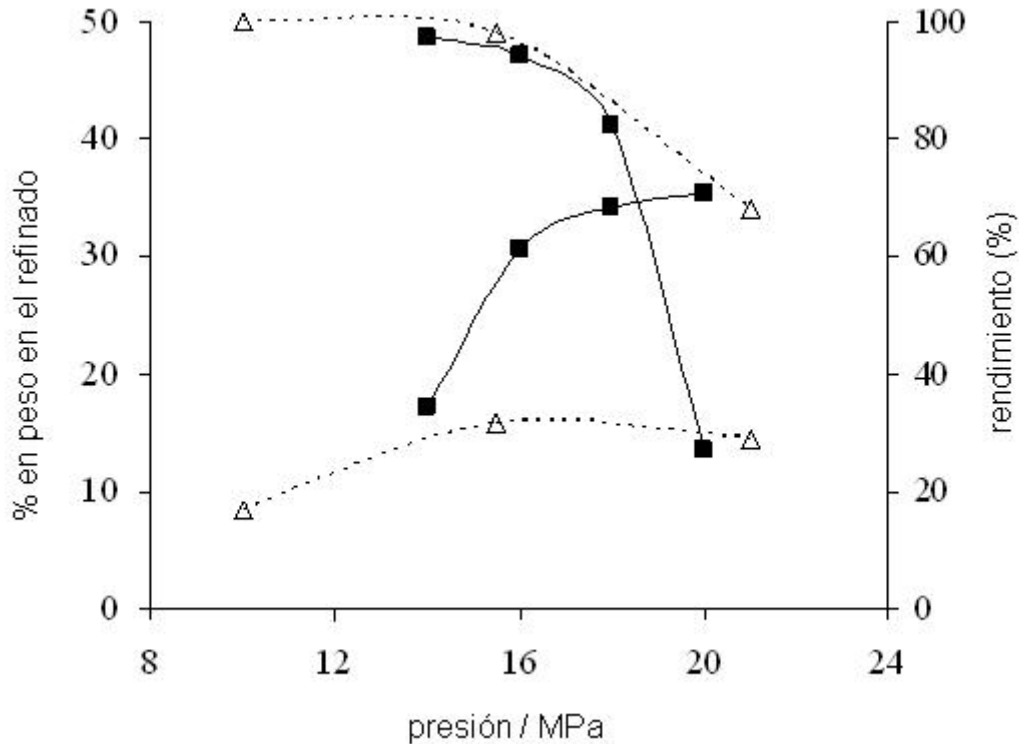
Las condiciones experimentales de los procesos de CC-SFE de lípidos minoritarios a partir de SODD fueron las siguientes:

Durante la extracción, se introdujo un flujo continuo 3000 mL/h de CO<sub>2</sub> en el interior de la columna de extracción por la parte inferior. El líquido de muestra fue bombeado con un flujo de 200 mL/h (a condiciones ambientales) durante un tiempo de extracción de 60 min. La muestra líquida fue introducida por el punto medio de la columna rellena. La altura total de la columna es 300 cm, mientras que la altura efectiva de la columna rellena, es decir, la altura que hay desde el punto de introducción de muestra hasta el punto de introducción de CO<sub>2</sub>, es 180 cm.

El segundo separador se utilizó para recoger el material que todavía era soluble en CO<sub>2</sub> en las condiciones de presión y temperatura del primer separador, y de este modo, se mantuvo a una baja presión (20 bares) y temperatura ambiente. Cuando finalizó la extracción, se bombeó de CO<sub>2</sub> puro durante otros 30 min.

Los análisis de las extracciones CC-SCCO<sub>2</sub> preliminares indican que los mayores factores de enriquecimiento (% en peso en el refinado / % en peso en el material alimentado) para tocoferol + esteroles fue de 1,3 para el SODD original a 15,5 MPa y S/F = 30, y de 3,8 para el SODD etilado a 210 MPa y S/F = 15. Estos resultados confirman que la composición del material de partida juega un importante papel en las condiciones de extracción que deben emplearse en el proceso.

Entre las diferentes especies químicas presentes en la mezcla de SODD original, los TAGs son los compuestos que tienen una menor volatilidad y solubilidad en SCCO<sub>2</sub>. El elevado contenido de estos compuestos en el material de partida reduce la presión de extracción máxima que se puede emplear para concentrar tocoferoles, esteroides libres y ésteres de esteroles en el refinado, junto con, evidentemente, los TAGs. La Figura 60 muestra la concentración (% en peso) de tocoferol + fitoesteroles y el porcentaje de recuperación (refinado/material alimentado) obtenidos en las extracciones CC-SCCO<sub>2</sub> del SODD original. Como se esperaba, a 15,5 MPa las concentraciones son inferiores al 15% en peso en el refinado (el factor de enriquecimiento es 1,3), con una recuperación en torno al 100% de tocoferol + fitoesteroles.



**Figura 60.** Comparación entre concentraciones de tocoferol + fitoesterol (% en peso en el refinado) y recuperaciones obtenidas en las extracciones CC-SCCO<sub>2</sub> experimentales llevadas a cabo con los materiales de alimentación SODD original (-△-) y SODD etilado (—■—).

Considerando las extracciones experimentales llevadas a cabo con el SODD, la eliminación de TAGs y FFAs en el material de partida hace que, empleando SCCO<sub>2</sub>, la separación FAEE/tocoferol sea más fácil que la separación TAG/tocoferol [559], teniendo como resultado factores de enriquecimiento superiores en condiciones de presión más altas. De este modo, a 210 MPa se alcanzaron factores de enriquecimiento de tocoferol + fitoesterol de 3,8 aunque con una recuperación inferior al 30%. Con objeto de mejorar el rendimiento cuando se procesa el material de partida etilado, se llevó a cabo un estudio más detallado de la influencia de la presión de extracción en el proceso de separación. Las condiciones exploradas se muestran en la Tabla 14, y las concentraciones y recuperaciones de tocoferol + esterol obtenidas se muestran en la Figura 60. Como puede deducirse a partir de la figura, se puede obtener un 83% de recuperación de tocoferol + esterol a 180 MPa, manteniendo un factor de enriquecimiento similar ( $\approx 3,7$ ). Presiones superiores a 18 MPa producen un ligero incremento en el factor de enriquecimiento junto a una significativa reducción en los rendimientos de esterol, éster de esterol y tocoferol. La Tabla 15 muestra respectivamente la recuperación y factor de enriquecimiento de éster de esterol, esterol libre y tocoferol obtenidos.

**Tabla 14.** Condiciones experimentales de CC-SCCO<sub>2</sub> llevadas a cabo con el SODD etilado como material de partida. S1: Primer separador, p: presión, T: temperatura. S/F = 15, temperatura de extracción = 65°C, presión del segundo separador = 20 bares. Flujo de CO<sub>2</sub> líquido = 3000 mL/h y flujo de material de alimentación = 200 mL/h.

Experimento	Presión en la columna de extracción [MPa]	$p_{S1}$ [MPa]	$T_{S1}$ [°C]
1	14	15	35
2	16	15	35
3	18	15	35
4	18	14	55
5	18	13	45
6	18	13	40
7	18	13	38
8	18	12	42
9	20	15	35

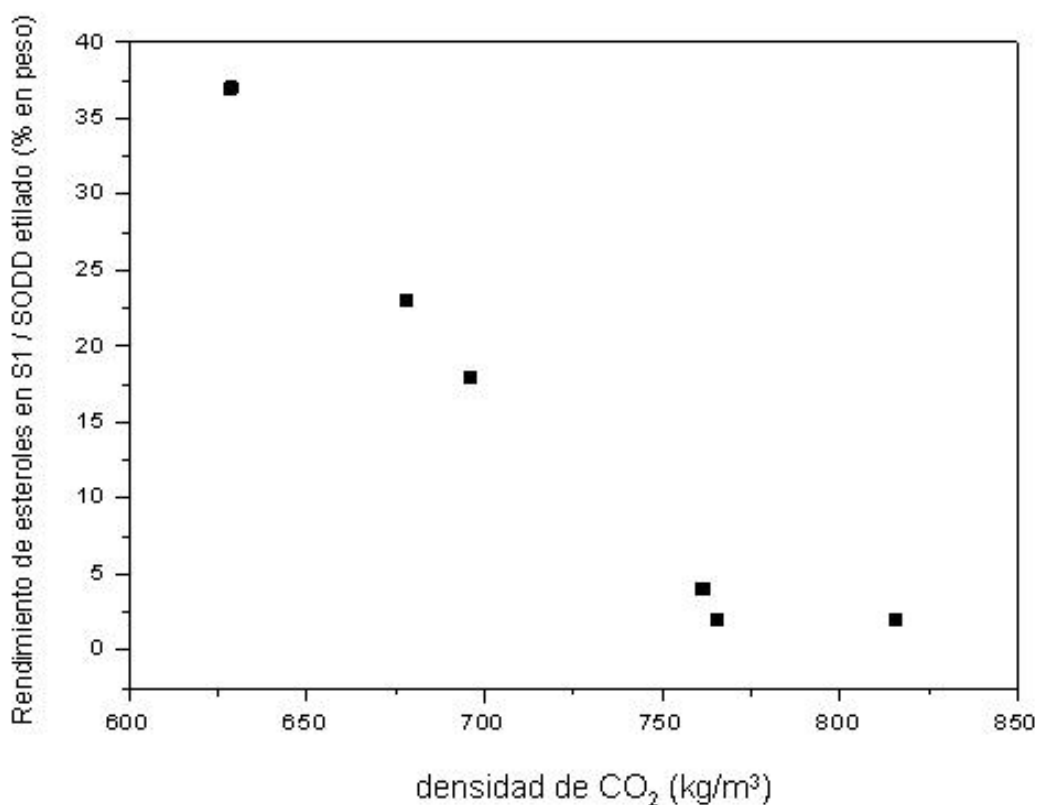
**Tabla 15.** Factores de enriquecimiento y recuperaciones de ésteres de esteroles, esteroides libres y tocoferoles, obtenidos en el refinado de las extracciones CC-SCCO<sub>2</sub> realizadas con SODD etilado como material de partida.

Presión de extracción [MPa]	Factor de enriquecimiento total	Recuperación total [%]	Tocoferoles		Esteroides		Ésteres de esteroles	
			Factor de enriquecimiento	Recuperación [%]	Factor de enriquecimiento	Recuperación [%]	Factor de enriquecimiento	Recuperación [%]
14	1.9	98.0	1.5	98.0	2.1	97.0	2.1	97.0
16	3.3	94.3	2.5	96.4	3.5	86.5	4.7	99.9
18	3.7	82.5	2.2	85.2	4.2	72.8	5.4	89.8
20	3.8	27.1	2.3	15.8	4.1	20.8	6.8	44.3

Con el objetivo de recuperar los fitoesteroides y tocoferoles disueltos en SCCO<sub>2</sub>, el extracto proveniente de la columna de extracción fue fraccionado mediante una descompresión en cascada en dos separadores distintos: S1 y S2.



El objetivo de la despresurización en cascada se puede llevar a cabo una precipitación selectiva en los separadores S1 y S2 de los compuestos extraídos en la columna. De este modo, disminuyendo la presión (y por tanto la densidad) del CO<sub>2</sub> de una manera controlada, se pueden recuperar los fitoesteroles y tocoferoles extraídos en el separador S1. La Figura 61 muestra la recuperación de esterol obtenida a diferentes condiciones de presión y temperatura en S1 (experimentos 3-8 de la Tabla 14). Los resultados mostrados en la Figura 61 indican que es posible la recuperar completamente los esteroles extraídos, manteniendo una densidad del CO<sub>2</sub> en el S1 inferior a 650 kg/m<sup>3</sup>. No obstante, bajo estas condiciones, también precipitan FAEEs cuantitativamente en el S1. A densidades de CO<sub>2</sub> en torno a 700 kg/m<sup>3</sup>, más del 60% de los esteroles extraídos (aproximadamente el 20% del total de los esteroles) fueron recuperados en el S1, con un contenido total de FAEEs inferior al 50%. Cabe destacar que a densidades de CO<sub>2</sub> superiores a 750 kg/m<sup>3</sup>, los esteroles extraídos en la columna no pudieron recuperarse en el S1. En la Figura 61 se pueden observar resultados similares para ésteres de esterol y tocoferoles.



**Figura 61.** Variación de los rendimientos de esteroles obtenidos en el separador S1 con la densidad de CO<sub>2</sub>.

#### 8.4.1 Cristalización de esteroles durante la formación de FAEEs.

La baja solubilidad de los fitoesteroles en determinadas matrices, hace posible el uso de procesos de cristalización para el aislamiento y purificación de estos compuestos. Hay varias publicaciones y patentes que desarrollan procesos de cristalización de fitoesteroles a partir de fuentes de diversa

naturaleza [560-564]. En estos procesos generalmente se emplean disolventes como metanol y acetona.

En el presente estudio, al finalizar la reacción de transesterificación y esterificación del SODD original tuvo lugar una cristalización espontánea de una fracción de los fitoesteres contenidos en el SODD. De este modo, durante el segundo proceso de lavado del SODD transformado, tuvo lugar la aparición de una fase sólida. La fase sólida obtenida después de la formación de FAEEs fue purificada mediante varias extracciones con hexano. Los resultados de este proceso se muestran en la Tabla 16. En torno al 20% de los 247 g de esteroides, contenidos en 4.64 kg del SODD original, fueron recuperados mediante la precipitación durante la formación de FAEEs. No obstante, la pureza de esteroides en esta fase sólida inicial fue aproximadamente del 60% en peso. Después de dos lavados consecutivos con hexano, la pureza de esteroides en la nueva fase sólida aumentó hasta aproximadamente un 88% en peso, que corresponde al 18% de la recuperación total de los esteroides presentes en el SODD original. De este modo, la pureza de esteroides en la fase sólida puede mejorarse de forma significativa mediante lavados con hexano, aunque se debe tener en cuenta el número de lavados si se quiere maximizar la recuperación de esteroides.

**Tabla 16.** Pureza y recuperación de esteroides obtenidos en la fase sólida producida después de la formación de ácidos grasos etil ésteres a partir de SODD.

	Peso recuperado [g]	Pureza [% en peso]	Recuperación [%]
Esteroides libres totales en SODD	247	6	
Fase sólida	84	60	20
Fase sólida purificada (hexano)	63	87	18

También se llevó a cabo un procedimiento de lavado utilizando etanol en vez de hexano. En este caso, se obtuvo una pureza de esteroides similar, pero la recuperación se redujo a aproximadamente un 10%. Este valor bajo de recuperación indica que la fase sólida rica en esteroides tiene una mayor solubilidad en etanol, comparada con su solubilidad en hexano.

La fase sólida también fue analizada mediante HPLC en fase reversa, para revelar la composición en esteroides. La composición en esteroides se muestra en la Tabla 17. El esteroide mayoritario identificado fue el sitosterol (43,7% en peso), seguido de estigmasterol y campesterol (28,9% en peso). El resto de material (11,6% en peso) fue mayoritariamente FAEEs y diacilglicéridos.

**Tabla 17.** Composición en esteroides de la fase sólida obtenida después de la formación de ácidos grasos etil ésteres a partir de SODD y de la extracción con hexano.

	Fase sólida [% en peso]
Sitosterol	43,7
Estigmasterol + Campesterol	28,9
Otros esteroides	15,8
Esteroides totales	88,4

En resumen, se debe destacar que la recuperación de compuestos minoritarios, como tocoferoles y fitoesteroides, a partir de destilados desodorizados mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente, puede mejorarse mediante la formación de FAEEs a partir del material de partida. Este proceso transforma TAGs y FFAs en sus correspondientes FAEEs, facilitando la concentración de los compuestos lipídicos minoritarios en el refinado. En este trabajo se ha llevado a cabo la formación de FAEEs a partir del SODD original, que contiene una cantidad elevada de TAGs + FFAs (aproximadamente el 60% en peso) y cantidades bajas de tocoferoles + fitoesteroides (<10% en peso). Extracciones con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente del SODD original y el SODD etilado, dieron como resultado un incremento de 3,7 veces la concentración de tocoferol + fitoesterol (con aproximadamente un 80% de recuperación) con el material etilado, mientras que solo un incremento de 1,3 veces se obtuvo con el SODD original.

Además, durante la formación de FAEEs, tiene lugar la parcial cristalización de los esteroides libres. En torno a un 20% de los esteroides presente en el SODD original pueden ser recuperados con una elevada pureza (88% en peso) en forma de fase sólida.

## **8.5 Procesos de purificación, enriquecimiento y síntesis de lípidos funcionales a partir de aceite de hígado de tiburón.**

Como se mencionó anteriormente el aceite de hígado de tiburón es la fuente natural mayoritaria de escualeno. Si embargo otros lípidos como los alquilgliceroides di-esterificados (DEAG) también están presentes en estos aceites en cantidades significativas (REFERENCIA). Estos compuestos han sido objeto de atención debido a sus especiales funciones fisiológicas en humanos [67, 69, 74, 565]. Los 1-O-alkil-*sn*-gliceroides son compuestos de elevado valor y se pueden obtener a partir de la fracción insaponificable del aceite de hígado de tiburón.

En este trabajo, un aceite de hígado de tiburón (libre de escualeno) fue transesterificado con etanol, para producir una mezcla que contenía mayoritariamente FAEE, NEAG y MEAG. Se empleó extracción con fluidos supercríticos en contracorriente (CC-SFE) para eliminar los FAEEs de la mezcla y, de este modo, concentrar NEAG y MEAG en el refinado. Además, se estudió el fraccionamiento del extracto con objeto de enriquecer uno de los extractos en ácidos grasos  $\omega$ -3.

No obstante, para obtener un producto rico en alquilglicerol, previamente también se debe eliminar el escualeno del aceite de hígado de tiburón original. En este sentido la tecnología de fluidos supercríticos ha demostrado tener capacidad y propiedades muy interesantes [174].

Durante la presente tesis también se han llevado a cabo procesos de aislamiento de NEAG mediante la saponificación de aceite de hígado de tiburón. Las reacciones de saponificación o etanolisis son necesarias debido a la presencia de triacilglicerol en el aceite de hígado de tiburón, los cuales pueden experimentar similares reacciones de esterificación y transesterificación en presencia de lipasas. Este proceso será descrito posteriormente.

### 8.5.1 Fraccionamiento con CO<sub>2</sub> supercrítico de alquilglicerol no esterificados obtenidos a partir de aceite de hígado de tiburón.

En los procesos de CC-SFE para la recuperación de alquilglicerol se partió de un producto obtenido mediante una reacción de transesterificación por etanolisis en medio básico de un aceite de hígado de tiburón, libre de escualeno, suministrado por Lysi (Reykjavik, Islandia).

La composición del aceite de hígado de tiburón original y transesterificado se muestra en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Composición del aceite de hígado de tiburón antes y después de la reacción de etanolisis. **FAEE:** ácidos grasos etil ésteres; **DEAG:** alquilglicerol di-esterificados; **TAG:** triacilglicerol; **MEAG:** alquilglicerol mono-esterificados; **NEAG:** alquilglicerol no esterificados.

Porcentaje (peso/peso)	Antes de Etanolisis	Después de Etanolisis
Escualeno	0,5	0,3
Ésteres de colesterol	1,5	0,4
FFA (ácido graso libre)	0,0	< 1,0

FAEE	0,0	71,8
DEAG	44,6	0,0
TAG	53,4	< 1,0
Colesterol	0,0	0,3
MEAG	0,0	4,3
NEAG	0,0	20,9

Como se puede observar en la tabla, el aceite de hígado de tiburón adquirido a la compañía Lysi contenía una cantidad muy baja de escualeno (en torno a un 0,5% en peso) y, por lo tanto, no fue necesario llevar a cabo la eliminación de escualeno del material de partida. De este modo, el material insaponificable de este aceite de tiburón estaba constituido mayoritariamente por alquilglicerol no esterificados (NEAG). También se detectó en este material un pequeño porcentaje de alquilglicerol mono-esterificados (MEAG).

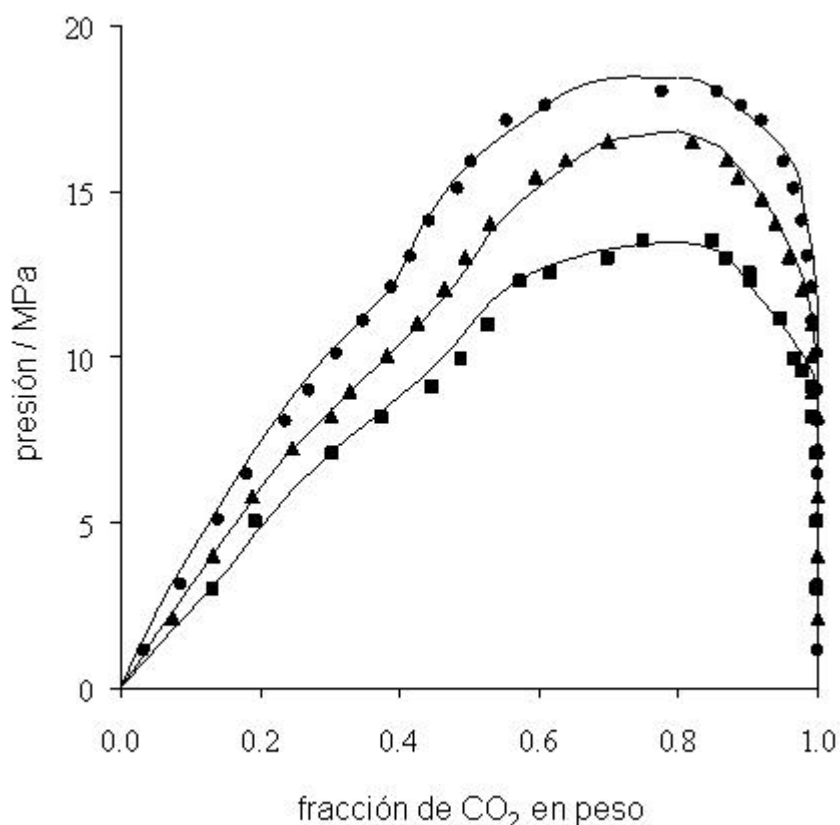
No obstante, para poder utilizar este aceite como sustrato en la producción de alquilglicerol esterificados con PUFAs específicos mediante reacciones enzimáticas, fue necesaria la eliminación de los triacilglicerol.

Por esta razón, fue necesario realizar una reacción de etanolisis para transformar de forma eficaz todos los triacilglicerol y los alquilglicerol di-esterificados (DEAG) en FAEEs y NEAG. El residuo obtenido después de la reacción de transesterificación (ver Tabla 18) contiene un 72% en peso de FAEE y aproximadamente un 25% en peso de NEAG + MEAG. La eliminación de FAEE a partir de esta mezcla pudo originar productos con una elevada concentración en NEAG y MEAG. Los datos de solubilidad de alquilglicerol esterificados o no esterificados en CO<sub>2</sub> supercrítico no están disponibles en la literatura. Sin embargo, la estructura química de NEAG y MEAG son, respectivamente, muy similares a las moléculas de monoacilglicerol y diacilglicerol (ver Figura 6).

De este modo, los datos de solubilidad de la monoleína y dioleína [566] y del etiloleato (que representa la fracción de FAEE), en CO<sub>2</sub> supercrítico [567] fueron analizados para estimar las condiciones más adecuadas de extracción. En general, a temperaturas de 40 a 60 °C y presiones en torno a 140 bares, la solubilidad del etiloleato es 10 veces mayor que la solubilidad de monoleína y dioleína. De esta manera, la eliminación de FAEE parece conseguirse sin mucha dificultad.

Además, la mínima presión requerida a diferentes temperaturas de extracción puede ser estimada a partir del diagrama entre fases que representa presión frente a composición para la mezcla binaria etiloleato + CO<sub>2</sub>. La Figura 62 muestra los datos de equilibrio entre fases reportados por Bharath y col. [567]. El punto crítico para la isoterma de 40 °C está en torno a 140

bares. Además, al ser la fracción de FAEE una mezcla compleja de ésteres, es decir, no es etiloleato puro, se espera que a la temperatura de trabajo de 40 °C, presiones superiores a 140 bares favorezcan la completa eliminación de FAEE del material de partida. De forma similar, presiones superiores a 160 y 180 bares serían requeridas cuando la temperatura de extracción fuese 50 y 60 °C, respectivamente (ver Figura 64).



**Figura 62.** Equilibrio entre fases vapor-líquido para la mezcla binaria etiloleato + CO<sub>2</sub> [567]: (■) 40 °C; (▲) 50 °C; (●) 60 °C.

En este trabajo se utilizó la Ecuación de Estado de Contribución de Grupos (GC-EoS) desarrollada por Skjold-Jørgensen [188] para simular el comportamiento del equilibrio entre fases en los ensayos de extracción. El modelo GS-EoS se basa en una aproximación de la contribución de grupos (cada componente se representa por los grupos químicos presentes en la molécula) y, de este modo, se tiene una capacidad predictiva. Como se ha descrito con anterioridad, los parámetros requeridos para llevar cabo los cálculos de equilibrio entre fases son unos parámetros de grupos (de grupos puros y de interacción binaria de grupos), junto con unos parámetros de componente puro (temperatura crítica, presión crítica y diámetro crítico de esfera dura). Recientemente, Fornari presentó una revisión y un resumen de los parámetros del modelo GC-EoS [194]. Además, el modelo GC-EoS se aplicó y optimizó para representar los datos de

equilibrio vapor-líquido y los datos de solubilidad de mezclas binarias que contienen CO<sub>2</sub> supercrítico y diferentes sustancias lipídicas, incluyendo etil oleato, monoleína, dioleína, trioleína y ácido oleico entre otras.

En este trabajo, se emplearon las sustancias lipídicas con parámetros críticos según Fornari [194] para representar el material líquido de partida empleado en los ensayos experimentales (ver Tabla 18). Las fracciones de FAEE, TAG y FFA fueron representadas, respectivamente, por etil oleato, trioleína y ácido oleico. Las fracciones de NEAG y MEAG fueron representadas, respectivamente, por monoleína y dioleína, debido a sus similitudes en la estructura química (ver Figura 6) y, de este modo, tener un comportamiento de solubilidad similar, ya que no hay datos de equilibrio entre fases de CO<sub>2</sub> supercrítico+ NEAG o MEAG en la literatura. Considerando esta última suposición, los grupos químicos que constituyen la mezcla de muestra líquida + CO<sub>2</sub> son: parafina (CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>), alqueno (CH=CH), éster (CH<sub>2</sub>COO), alcohol (CH<sub>2</sub>OH, CHOH), ácido carboxílico (COOH), triacilglicerol ((CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub>CHCOO) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Todos los parámetros de grupos puros y los parámetros de interacción binaria entre estos grupos fueron obtenidos del trabajo de Fornari [194], con la excepción de los correspondientes a las interacciones del grupo COOH con los grupos éster, triacilglicerol y alcohol, los cuales no estaban disponibles en la literatura y, por lo tanto, fueron elegidos como ideales.

La falta de estos parámetros de interacción no afectó significativamente a los cálculos, ya que la cantidad de FFA en la mezcla era de aproximadamente el 1% en peso.

La representación del material líquido de partida descrita anteriormente, permite una rápida y primera aproximación para simular los procesos experimentales de SFE estudiados en este trabajo, empleando la aplicación del modelo GC-EoS de una manera predictiva. Los cálculos de equilibrio entre fases fueron llevados a cabo considerando una columna de extracción en contracorriente con dos etapas teóricas y una relación S/F de 15.

Las condiciones experimentales de los procesos de CC-SFE empleados para la recuperación de alquilglicerol a partir del producto de etanolisis de aceite de hígado de tiburón fueron las siguientes:

Las extracciones supercríticas se llevaron a cabo en una columna en contracorriente isoterma de 3 metros, sin reflujo y mediante un proceso semi-continuo.

El tiempo de extracción fue de 60 min bombeando un flujo continuo de CO<sub>2</sub> y líquido de muestra en el interior de la columna. Cuando se paró el bombeo de muestra líquida, se bombeó CO<sub>2</sub> puro durante otros 30 min. Se empleó una relación S/F de 15 en todos los experimentos. La muestra líquida fue introducida por el punto medio de la columna rellena.

Se exploraron temperaturas de extracción de 45, 50 y 65 °C y presiones de extracción de 140, 160 y 180 bares. Finalmente, se llevaron a cabo dos experimentos en los que se intentó establecer un reflujo interno en el interior de la columna de extracción, para incrementar la recuperación de

NEAG y MEAG en el refinado. Para conseguir este reflujo, se indujo un gradiente de temperaturas en la columna de extracción, manteniendo los dos tramos superiores a 65 °C, y los dos tramos inferiores a 50 °C en un experimento, y a 45 °C en el otro.

El primer separador (S1) se mantuvo a presiones de 100 a 120 bares y temperaturas de 40, 45 y 55 °C, mientras que el segundo separador (S2) se mantuvo a baja presión (inferior a 20 bares), con objeto de recuperar todo el material que permanecía disuelto en el CO<sub>2</sub> en este separador. El balance de material de cerró en todos los experimentos con una imprecisión inferior al 5%.

Las diferentes condiciones de extracción, es decir, temperatura y presión, empleadas en los ensayos experimentales se muestran en la Tabla 19. También se muestra en la tabla la composición experimental (libre de CO<sub>2</sub>) y los rendimientos obtenidos en el refinado.

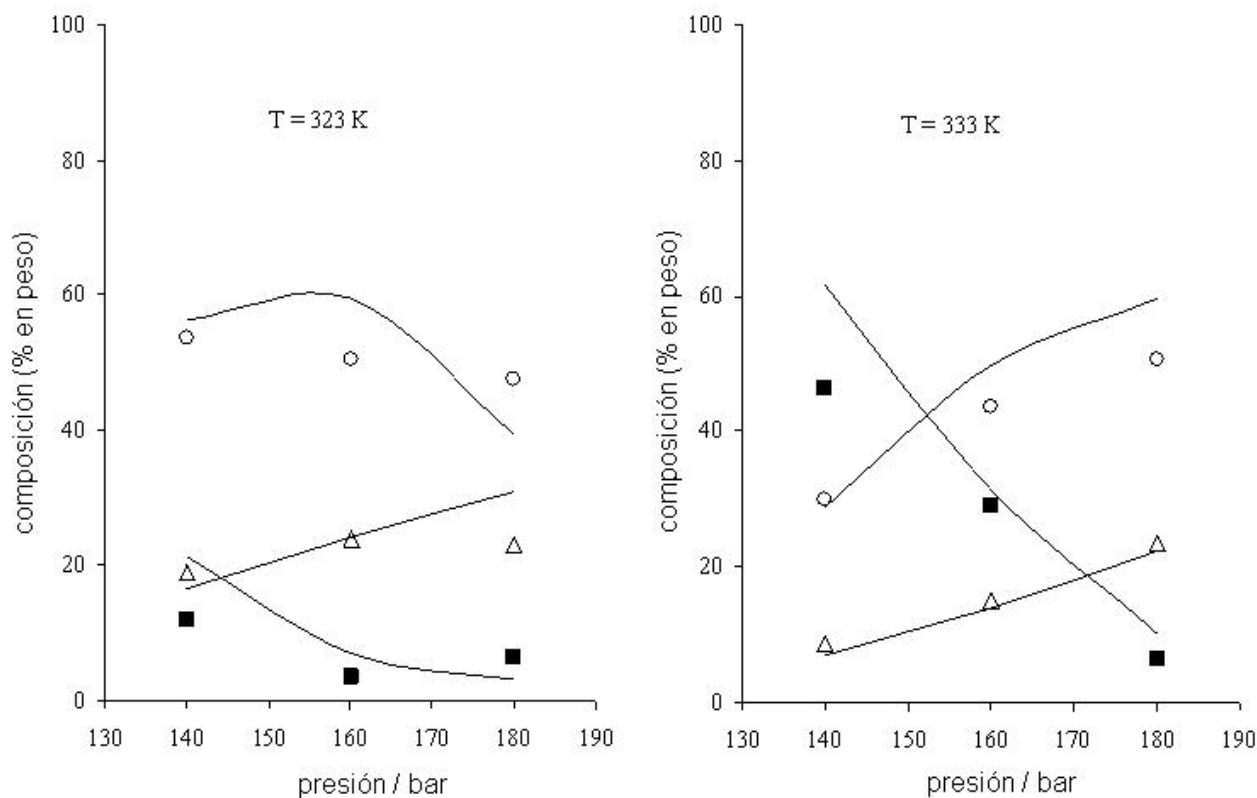
**Tabla 19.** Condiciones de los procesos de SFE llevados a cabo en la columna rellena en contracorriente: Composición (en peso) y rendimiento (masa en el refinado / masa en el material alimentado) obtenido en el refinado.

Ext.	T / °C	P / bar	% en peso (libre de CO <sub>2</sub> ) en el refinado					Rendimiento (%)	
			FAEE	NEAG	MEAG	TAG	FFA	NEAG	MEAG
1	65	140	46,4	30,1	8,8	11,7	3,0	88,4	100,0
2	65	160	29,1	43,7	15,1	5,2	6,9	75,0	92,6
3	65	180	6,3	50,5	23,5	8,8	11,0	39,6	74,9
4	50	140	11,9	53,6	18,8	6,7	9,0	71,5	89,4
5	50	160	3,5	50,5	23,9	11,1	10,9	43,6	72,5
6	50	180	6,4	47,7	22,9	10,5	12,5	34,7	60,5
7	40	140	2,0	56,7	21,8	8,4	11,1	56,0	80,2
8 <sup>a</sup>	40	140	33,9	37,8	12,1	4,0	12,2	82,9	100,0
9 <sup>a</sup>	50	140	27,3	46,1	14,7	4,9	7,0	85,2	100,0

<sup>a</sup> Extracción llevada a cabo empleando un gradiente de temperatura en la columna de extracción.

La Figura 63 muestra una comparación entre las composiciones experimentales obtenidas en el refinado para las fracciones de FAEE, NEAG y MEAG y las que predijo el modelo GC-EoS. A pesar de las simplificaciones consideradas para representar el complejo material de partida, se observó una concordancia satisfactoria entre los valores calculados y los experimentales, que proporciona un fundamento termodinámico a las composiciones descritas en la Tabla 18 y la Tabla 19.





**Figura 63.** Comparación entre la composición obtenida en el refinado de FAEE (■), NEAG (O) y MEAG (△) y la calculada por el modelo GC-EoS (líneas continuas).

El extracto se constituye de dos fracciones líquidas recuperadas en los separadores S1 y S2 que, junto con la recuperación de NEAG, se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Composición (en peso) de las fracciones recogidas en los separadores S1 y S2 (extractos).

Ext.	% en peso (libre de CO <sub>2</sub> ) en S1			Rendimiento de NEAG en S1 (%)	% en peso (libre de CO <sub>2</sub> ) en S2			Rendimiento de NEAG en S2 (%)
	FAEE	NEAG	MEAG		FAEE	NEAG	MEAG	
1	92,1	7,9	0,0	8,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2	91,1	8,2	0,7	24,8	99,6	0,4	0,0	0,1
3	87,0	11,6	1,4	59,3	96,3	3,7	0,0	1,1
4	88,3	10,5	1,2	26,1	94,6	5,4	0,0	2,3
5	84,5	13,3	2,1	53,9	95,3	4,6	0,1	0,9
6	80,2	17,0	2,8	64,7	97,0	3,0	0,0	0,6

7	85,8	12,8	1,4	42,2	95,5	3,8	0,7	1,8
8 <sup>a</sup>	92,0	8,0	0,0	17,1	93,5	6,5	0,0	0,0
9 <sup>a</sup>	100,0	0,0	0,0	14,6	97,8	2,2	0,0	0,2

<sup>a</sup> Extracción llevada a cabo empleando un gradiente de temperatura en la columna de extracción.

Como se ha mencionado anteriormente, casi la total eliminación de FAEE se consiguió a 40 °C y 140 bares (experimento 7 de la Tabla 19). Además con un incremento de la temperatura de extracción a 50 °C ó 65 °C, fue requerida una presión de extracción de, respectivamente, 160 o 180 bares, para conseguir un refinado con una concentración de FAEE inferior a aproximadamente el 6% en peso.

Un incremento de la presión a temperatura constante (y con relación S/F constante), dio lugar a una mejora en la concentración de NEAG y MEAG en el refinado y, como era esperado, también produjo una disminución en la cantidad de NEAG y MEAG recuperados.

Particularmente, los rendimientos de MEAG fueron siempre bastante aceptables (>60%) en todos los experimentos, debido a su alto peso molecular y baja volatilidad.

Se pudieron obtener rendimientos satisfactorios de NEAG con la presión de extracción más baja explorada (140 bares), pero en torno al 65% de los NEAG alimentados fueron extraídos a 180 bares y 50 °C. En general, una temperatura baja de extracción mejora notablemente la concentración de NEAG y MEAG en el refinado, como se puede deducir observando los resultados obtenidos los experimentos 1, 4 y 7 en la Tabla 19, los cuales se llevaron a cabo a una presión de extracción de 140 bares. Sin embargo, temperaturas inferiores a 40 °C no son recomendables, ya que se observó un incremento en la viscosidad del material de partida, que provoca problemas de fluidez en el interior de la columna rellena.

Algunas limitaciones en el equipo disponible de SFE no permiten el uso de un reflujo externo para incrementar los rendimientos de NEAG y MEAG. En su lugar, se generó un gradiente de temperaturas en la columna de extracción para inducir un reflujo interno. En este caso (experimentos 8 y 9 de la Tabla 19), los 120 cm por encima del punto de introducción de muestra líquida se mantuvieron a alta temperatura (65 °C), con objeto de disminuir la densidad de CO<sub>2</sub> y por tanto su solubilidad. De este modo, se generó un reflujo interno en el interior de la columna. El efecto de este reflujo interno fue notable, teniendo en cuenta el incremento obtenido en los rendimientos de NEAG y MEAG, pero se obtuvo también contenido más alto en FAEE en el refinado.

La composición de los extractos obtenidos en los separadores S1 y S2, junto con el rendimiento de NEAG (cantidad de NEAG en el extracto / cantidad de NEAG en el material de partida), se muestran en la Tabla 20. S1 se mantuvo a 100 bares y 45 °C, que dio lugar a una densidad de CO<sub>2</sub> de 446 kg/cm<sup>3</sup>, en todos los experimentos (ver Tabla 20).

Se detectaron cantidades muy pequeñas de ácidos grasos libres y triacilgliceroles en estas fracciones, y casi no se recuperaron MEAG en los extractos del S2. Como se puede observar en la Tabla 20, la concentración de NEAG y MEAG en los extractos del S1 aumenta cuando se incrementa la presión de extracción. Este fenómeno lleva asociado una disminución en el rendimiento (especialmente para NEAG) observado en los refinados. Sin embargo, el fraccionamiento en cascada del extracto permite la recuperación en el S1 de casi el total de NEAG extraído (ver Tabla 20).

Además, se pretendió realizar un fraccionamiento selectivo de los ácidos grasos etil ésteres durante la descompresión en cascada del CO<sub>2</sub>. Tanto los extractos del S1 como los del S2 contienen una gran cantidad de FAEEs, pero las condiciones de fraccionamiento (presión y temperatura) elegidas en el S1 pueden producir, en este separador, una fracción enriquecida en ácidos grasos etil ésteres de cadena larga ω-3, mayoritariamente DHA, DPA y EPA. La Tabla 21 muestra la variación de este enriquecimiento (FAEEs ω-3 en S1 / FAEEs ω-3 en S2) como una función de la densidad del CO<sub>2</sub>, obtenida en unas condiciones de extracción de 140 bares y 50 °C (experimento 4 de la Tabla 19) y diferentes condiciones de fraccionamiento.

**Tabla 21.** Enriquecimiento de ω-3 (ω-3 FAEE en S1 / ω-3 FAEE en S2) obtenido mediante el sistema de fraccionamiento en cascada.

Extracción	Presión del S1 (bar)	Temperatura del S1 (°C)	Densidad de CO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )	Enriquecimiento de ω-3
4	100	40	630	8,20
4	120	55	506	4,63
4	100	45	500	4,51

Un incremento en la densidad de CO<sub>2</sub> produce un alto enriquecimiento de FAEEs ω-3 en el S1, y de este modo esta fracción puede ser utilizada como material de partida para llevar a cabo reacciones de transesterificación de NEAG, con objeto de producir DEAG de alto valor añadido mediante procesos enzimáticos.

En resumen se puede concluir que un aceite de hígado de tiburón fue transesterificado con etanol para producir alquilgliceroles no esterificados (NEAG). El producto de reacción fue fraccionado usando CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente para eliminar los ácidos grasos etil ésteres producidos

en la reacción química. A 40 °C y 140 bares los alquilglicerol no esterificados y los alquilglicerol mono-esterificados se concentraron en el refinado en concentraciones del 25 al 78% en peso, pero aproximadamente el 50% de los NEAG alimentados se perdieron en el extracto. Se indujo un reflujo interno en la columna de extracción, empleando un gradiente de temperaturas y, de este modo, la recuperación de NEAG se mejoró notablemente.

La pureza de NEAG + MEAG obtenida en el refinado en las condiciones óptimas de extracción fue en torno al 78% en peso, obteniéndose además un rendimiento satisfactorio (>60%).

También se exploró la posibilidad de recuperar los NEAG extraídos empleando un fraccionamiento en cascada del extracto. Casi todos los NEAG extraídos fueron recuperados en el primer separador del sistema de descompresión en cascada, manteniendo unas condiciones en S1 de 100 bares y 40 °C.

Además, la fracción de FAEEs recuperada en este separador, estuvo considerablemente enriquecida en FAEEs  $\omega$ -3 y, de este modo, pueden ser utilizados en una posterior esterificación para producir éteres lipídicos estructurados.

### **8.5.2 Preparación de alquilglicerol ricos en ácido linoleico conjugado y ácido eicosapentaenoico.**

El mayor conocimiento del valor nutricional de los lípidos, y en particular, de los efectos metabólicos asociados al consumo de lípidos que contienen niveles significativos de ácidos grasos específicos, ha llevado al desarrollo de nuevas metodologías en la modificación de grasas y aceites para aumentar los beneficios en la salud que origina la ingesta de estas sustancias [568].

En este sentido la tecnología enzimática presenta un enorme potencial.

Una estrategia lógica para asegurar la ingestión de niveles apropiados de PUFAs y CLA, es la producción de aceites y grasas enriquecidos en estas sustancias mediante procesos enzimáticos. Se han empleado reacciones de esterificación [493], hidrólisis [569], transesterificación [570] y acidólisis [571], para conseguir un enriquecimiento selectivo natural de TAGs con PUFAs y CLA.

Por ello, el siguiente objetivo de la presente tesis fue la producción de alquilglicerol con niveles altos de ácidos grasos  $\omega$ -3 ó CLA a partir de otro aceite de hígado de tiburón comercial. Con esta finalidad, se empleó el siguiente procedimiento:

- ⇒ Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente del escualeno de un aceite de hígado de tiburón.
- ⇒ Saponificación del refinado obtenido.
- ⇒ Reacción del residuo insaponificable con CLAEE, CLA, o EPAEE en presencia de lipasas.

Las condiciones experimentales de los procesos de CC-SFE de escualeno a partir de aceite de hígado de tiburón fueron las siguientes:

Se utilizó extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente para extraer el escualeno contenido en el aceite de hígado de tiburón original. Se exploraron diferentes condiciones de extracción para producir refinados con cantidades insignificantes de escualeno (3% en peso aproximadamente). Los mejores resultados se consiguieron con las siguientes condiciones: temperatura de la columna de extracción 65 °C, una presión de la columna entre 170 y 210 bares, con relaciones S/F entre 20 y 25. La muestra líquida se introdujo en la columna por el punto superior. En estas condiciones de extracción se consiguieron rendimientos de escualeno superiores al 85% y una pureza en torno al 95% en peso. Utilizando valores de presión más bajos (150 bares) y relaciones S/F ligeramente superiores (en torno a 30), se alcanzó una pureza de escualeno similar a la del patrón de escualeno empleado en los análisis por HPLC (98% mínimo), aunque el rendimiento del proceso fue significativamente inferior (20% aproximadamente).

En la Tabla 22 se muestra la composición del aceite de hígado de tiburón original, del refinado y del residuo insaponificable.

**Tabla 22.** Composición del aceite de hígado de tiburón original, refinado mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, y residuo insaponificable.

% en peso	Aceite de hígado de tiburón	Refinado	Insaponificable
SQ	60	3	8
CHE	ND	< 1	ND
DEAG	26	63	ND
TAG	13	33	ND
CH	ND	ND	6
NEAG	ND	ND	86

ND no detectado, CHE éster de colesterol, CH colesterol

Los resultados de la Tabla 22 muestran que el contenido de escualeno del aceite de hígado de tiburón es muy alto (aproximadamente un 60%). Esta elevada concentración de escualeno en el hígado indica que estos tiburones pertenecen a especies de mares profundos [97].

Por este motivo, para obtener un residuo insaponificable rico en alquilglicerol, el escualeno tuvo que ser eliminado del aceite de hígado de tiburón original mediante procesos de CC-SFE. La Tabla 22 también indica que la extracción supercrítica elimina más del 95% del contenido inicial de

escualeno en el aceite de hígado de tiburón, para producir un refinado con un muy bajo contenido en escualeno (3% en peso aproximadamente).

No obstante, este refinado no es apto para la producción de alquilglicerol, debido a la presencia de TAGs, que pueden sufrir similares reacciones de transesterificación en presencia de lipasas.

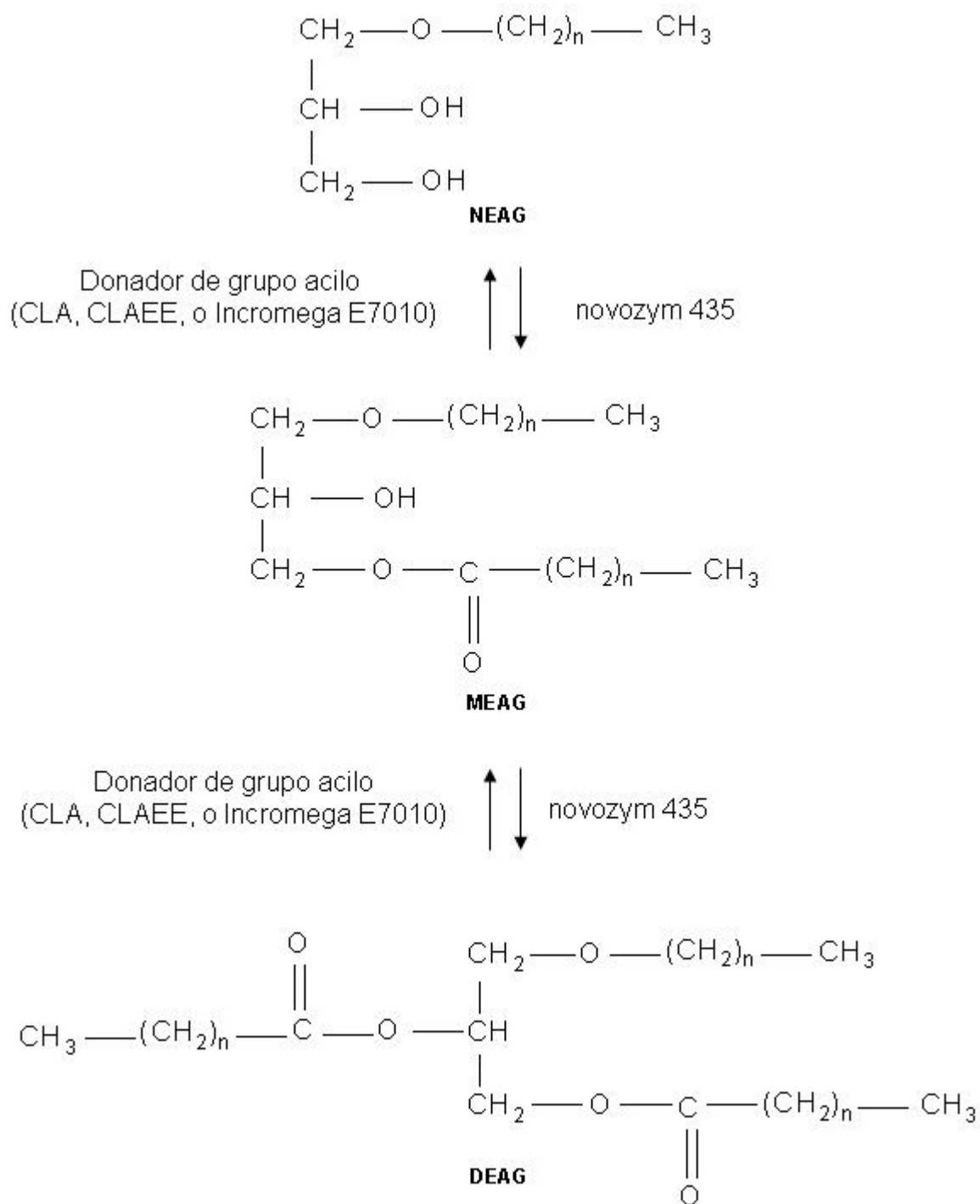
En este caso, con objeto de explorar otras posibles vías para la eliminación de los TAGs, en vez de emplear una reacción de transesterificación junto con un nuevo proceso de CC-SFE para eliminar los FAEEs (proceso descrito anteriormente), se efectuó una saponificación que permitiera transformar todos los triacilglicerol en sus correspondientes jabones y obtener un residuo insaponificable altamente enriquecido en alquilglicerol no esterificados.

Por lo tanto, el presente estudio se centra en la síntesis catalizada por lipasas de alquilglicerol ricos en CLA o EPA. Se ha utilizado una metodología basada en dos etapas.

- ⇒ Primero, la saponificación de un refinado obtenido por extracción supercrítica de aceite de hígado de tiburón, para obtener alquilglicerol no esterificados, que pueden posteriormente reaccionar con un nuevo donador de grupos acilo.
- ⇒ La segunda etapa consiste en la producción de alquilglicerol que contienen nuevos ácidos grasos, mediante reacciones de esterificación o transesterificación.

La producción de alquilglicerol enriquecidos con EPA y DHA mediante transesterificación bajo vacío, ha sido descrita previamente [542]. El estudio realizado por Haraldsson y col. muestra una metodología alternativa a la descrita en el presente trabajo, para el aislamiento de alquilglicerol y para la reacción de transesterificación. Además, nuestro trabajo también incluye la esterificación y transesterificación de alquilglicerol con CLA y CLA etil éster (CLAEE), respectivamente. En el presente estudio también se ha investigado el efecto de una purga de nitrógeno y el tipo de donador de grupos acilo en la cinética de la reacción.

Con el fin de reconstituir de nuevo el DEAG se llevaron a cabo una serie de reacciones enzimáticas en presencia de una lipasa de *Candida antarctica* (NOVOZYM 435). En la Figura 64 se muestra una representación esquemática de la esterificación de alquilglicerol catalizada por lipasas. Estas reacciones tienen lugar en dos etapas consecutivas. Durante la primera acilación se forma el alquilglicerol mono-esterificado (MEAG). A esta etapa le sigue una segunda acilación para obtener el alquilglicerol diesterificado (DEAG). Hay una diferencia en las cinéticas de reacción de estas dos etapas, que podría explicarse teniendo en cuenta la mayor reactividad del hidroxilo primario presente en el NEAG, que conduce a la producción de MEAG, comparada con la reactividad del hidroxilo secundario, responsable de la formación de DEAG.

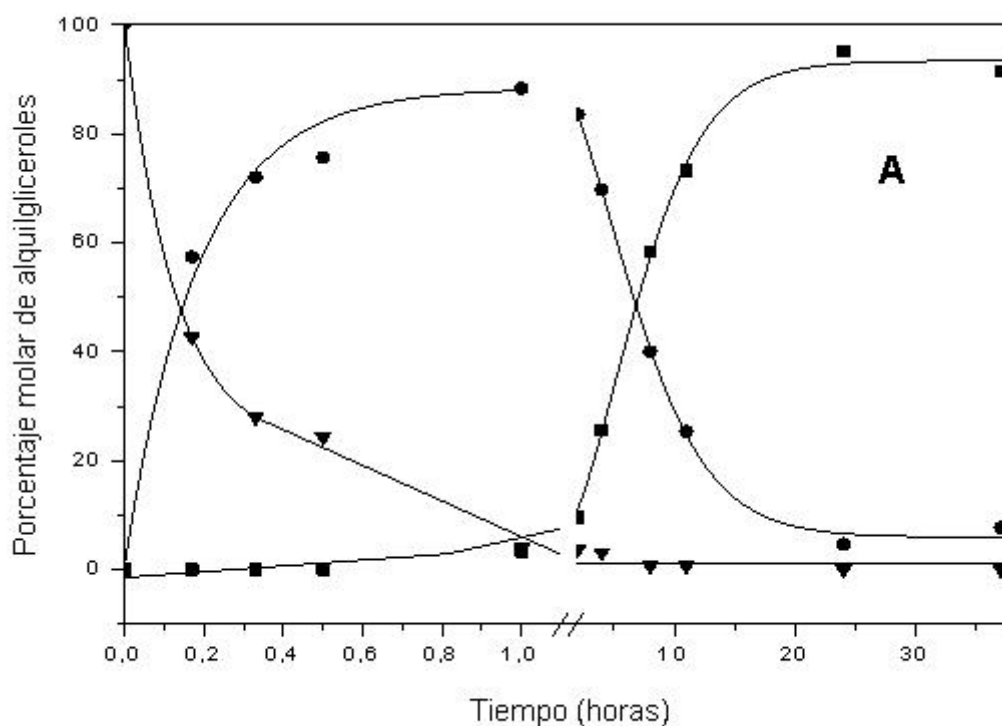


**Figura 64.** Representación esquemática de la reacción enzimática. NEAG: alquilglicerol no esterificado, MEAG: alquilglicerol mono-esterificado, DEAG: alquilglicerol di-esterificado.

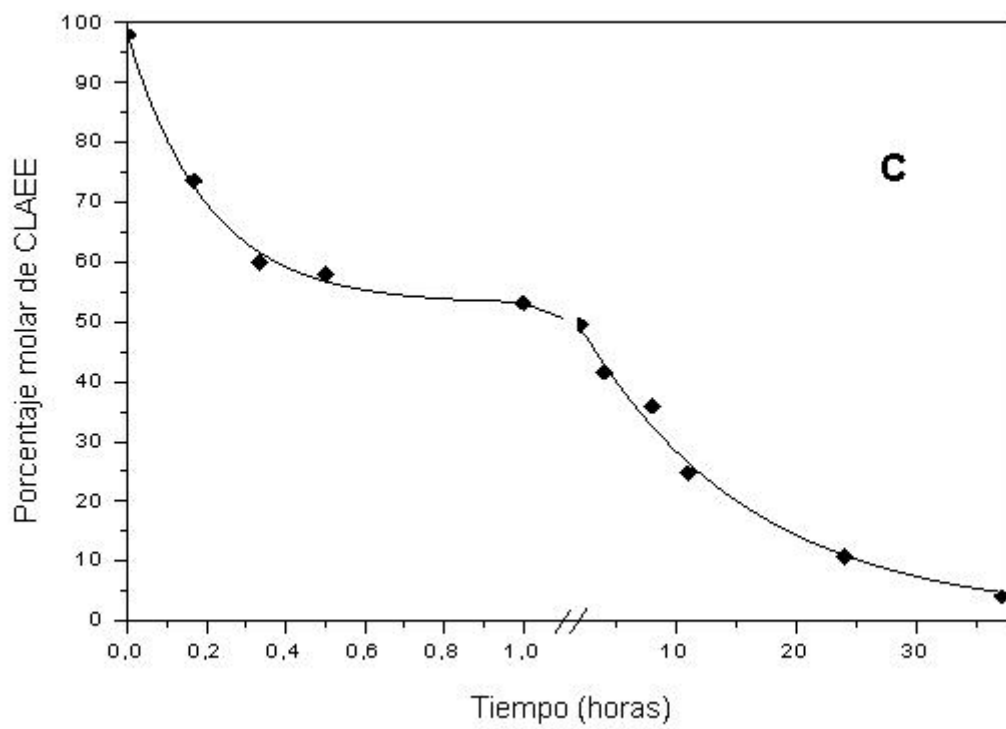
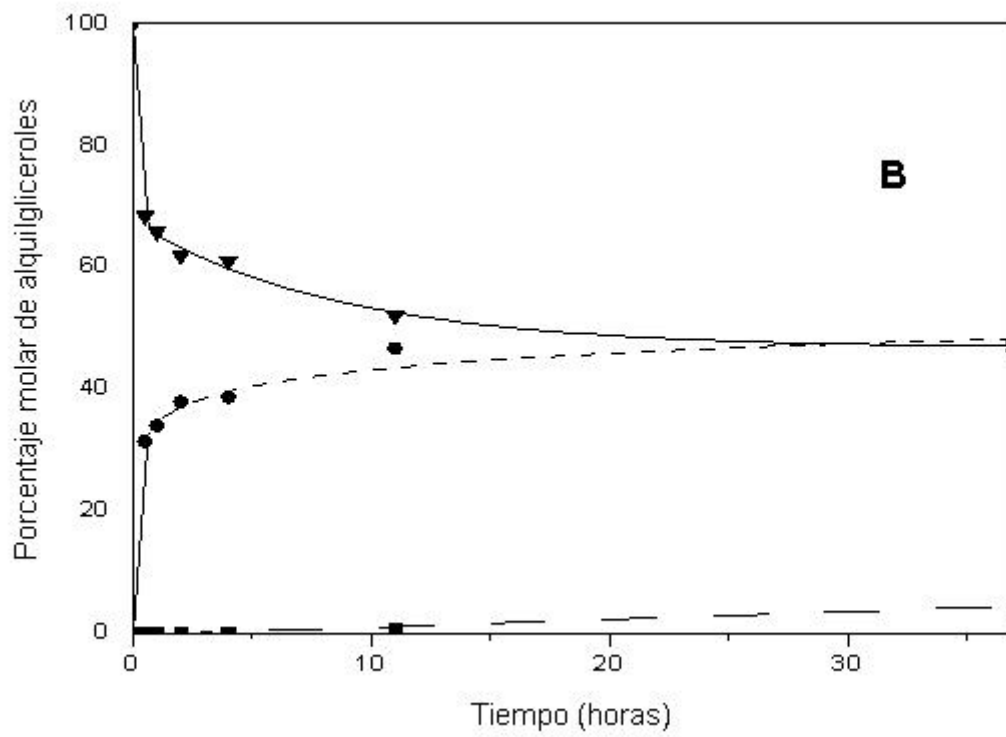
Dado que diversos estudios nutricionales han demostrado que la ingesta en la dieta ácido linoleico conjugado (CLA) tiene una gran variedad de efectos beneficiosos en la salud, incluyendo efectos anticarcinogénicos, antiaterogénicos, antiobesidad, antidiabetes, así como potenciación del sistema inmune [44, 45], se pensó en incorporar este ácido graso sobre alquilgliceroles no esterificados.

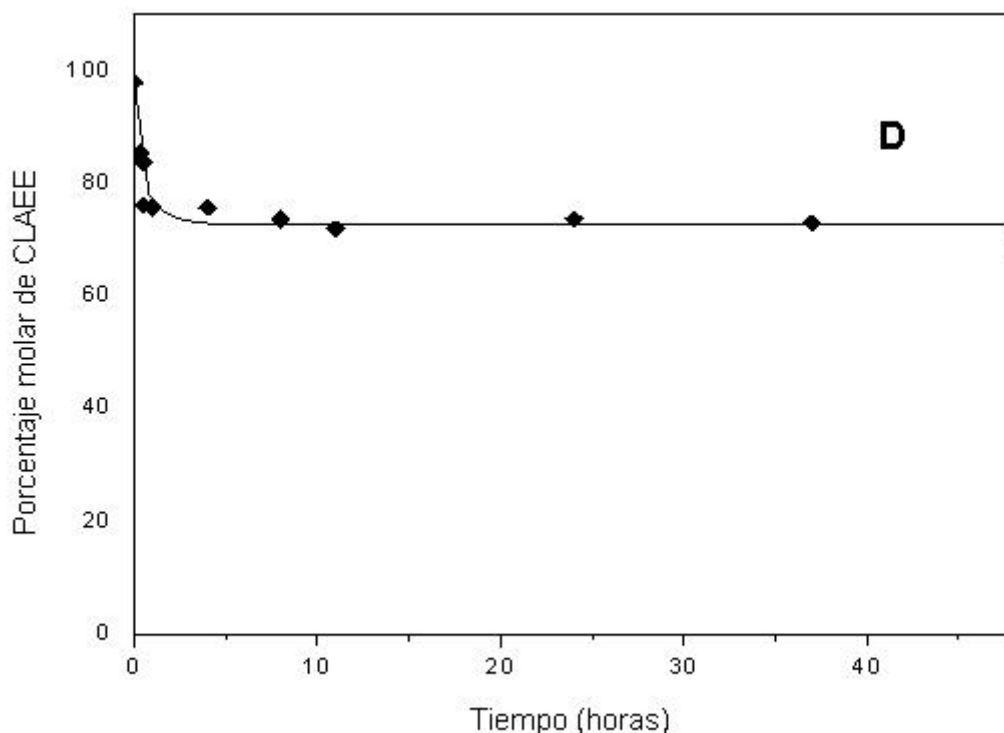
### 8.5.2.1 Reacción de transesterificación.

Se estudió la reacción de transesterificación entre CLAE y el alquilglicerol no esterificado (NEAG) a partir del residuo insaponificable obtenido según se ha descrito anteriormente. También se evaluó el efecto de una corriente que burbujeara de forma continua nitrógeno sobre la mezcla de reacción, comparándolo con un caso en el que no se burbujeara nitrógeno. El objetivo de este burbujeo de nitrógeno sobre la mezcla fue volatilizar el etanol producido durante la reacción. La eliminación de etanol de la mezcla de reacción desplaza el equilibrio hacia la producción de DEAG.









**Figura 65.** Transcurso en el tiempo de la reacción mediada por lipasa de transesterificación de CLAEE con el NEAG a partir del residuo insaponificable. Condiciones: 500 mg de residuo insaponificable, 818 mg de CLAEE, 10% en peso de Novozym 435, 55 °C, 300 rpm. **Figuras A y C:** con purga de nitrógeno; **Figuras B y D:** sin purga de nitrógeno **Figuras A y B:**  $\square$  DEAG;  $\bullet$  MEAG;  $\blacktriangledown$  NEAG. **Figuras C y D:**  $\blacklozenge$  CLAEE.

Los resultados de la Figura 65 B, muestran que, con ausencia de purga de nitrógeno, el consumo de NEAG es aproximadamente el 30% (Figura 65 B), mientras que, en presencia de purga de nitrógeno, la desaparición de NEAG es de aproximadamente el 75%, durante los primeros 30 min de reacción (Figura 65 A).

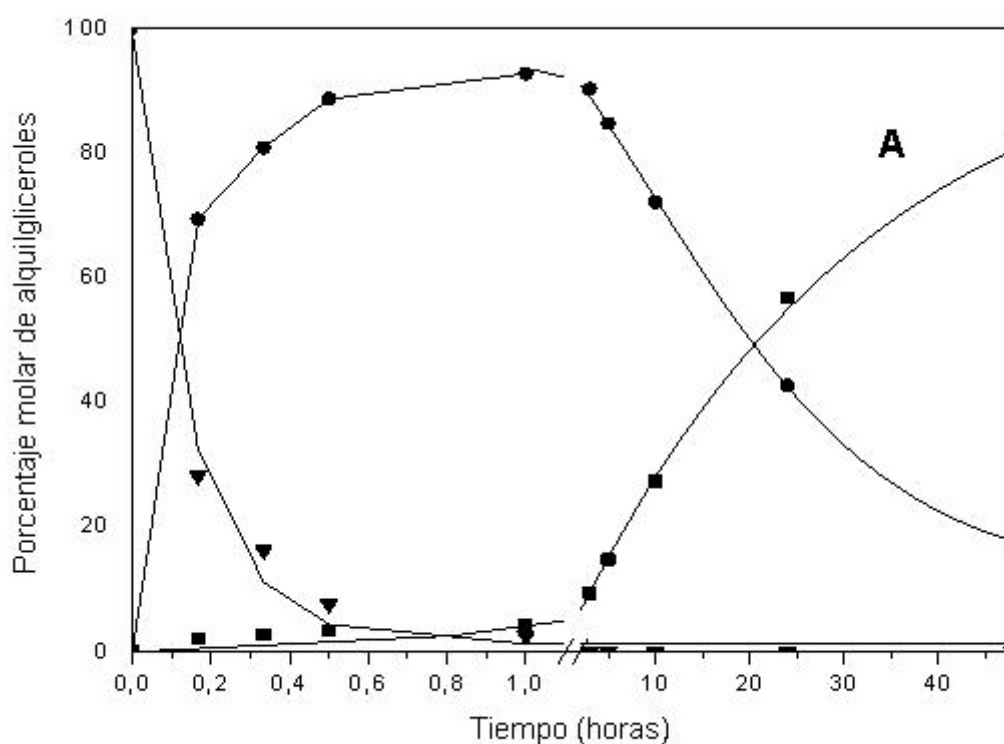
A tiempos de reacción más largos, la conversión de NEAG nunca supera el 50% sin purga de nitrógeno en la mezcla de reacción. Por el contrario, se obtuvo aproximadamente un 95% de DEAG cuando se burbujeó nitrógeno de forma continua a través de la mezcla de reacción.

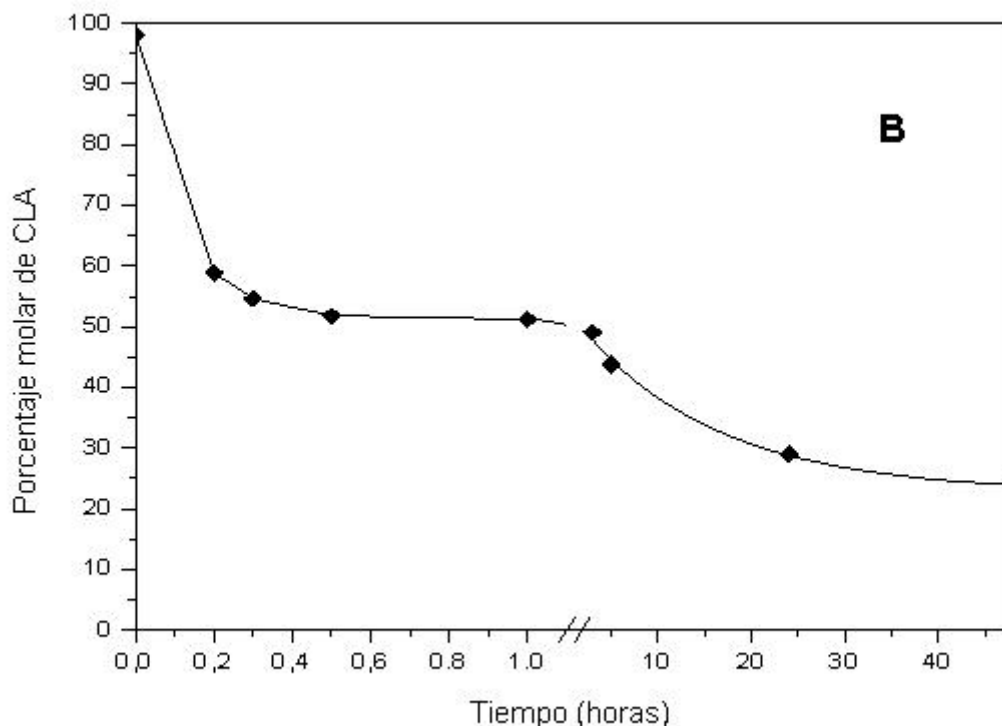
Con la reacción de transesterificación entre CLAEE y alquilglicerol no esterificado (NEAG) a partir del residuo insaponificable se realizó un escalado a 12 g de mezcla de reacción. De este modo, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos a escala analítica (Figura 65 A y Figura 65 C, símbolos vacíos). Las diferencias observadas entre los experimentos realizados a escala analítica y a una escala mayor, podrían deberse a ligeras variaciones en la composición del residuo insaponificable obtenido para ambos experimentos. A partir de estos resultados se puede argumentar que parece factible realizar un escalado superior para este proceso, sin que se vea afectada significativamente la cinética de la reacción ni los rendimientos finales.

La Figura 65 C indica que más del 95% del CLAEE original fue consumido, lo que indica la alta eficacia de la reacción.

### 8.5.2.2 Esterificación de NEAG con CLA.

Con el objetivo de comparar la reacción de transesterificación con la esterificación directa de NEAG, también se llevó a cabo la síntesis de DEAG con CLA. Esta reacción se efectuó también con una purga continua de nitrógeno. En el caso de la reacción de transesterificación de NEAG con CLAE, el nitrógeno elimina el etanol que se forma en el transcurso de la reacción. En cambio, en la reacción de esterificación de NEAG con CLA, el nitrógeno elimina el agua formada. De este modo, se consiguieron resultados similares a los obtenidos en la reacción de transesterificación. En la reacción de esterificación también se distinguen dos etapas consecutivas en el transcurso de la reacción (Figura 66).



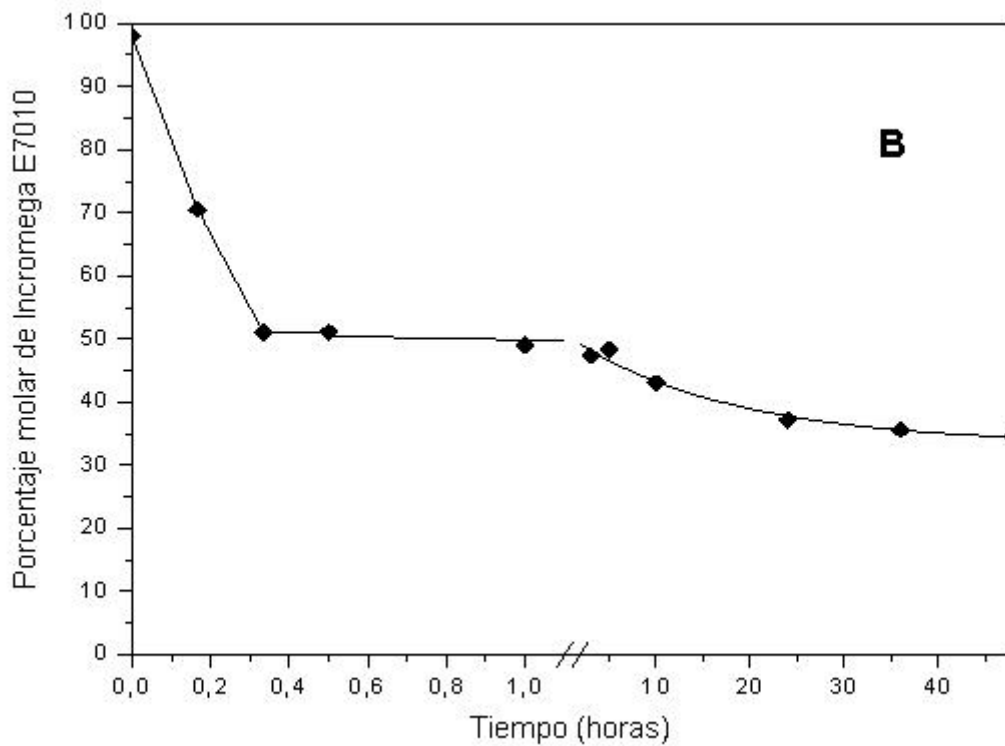
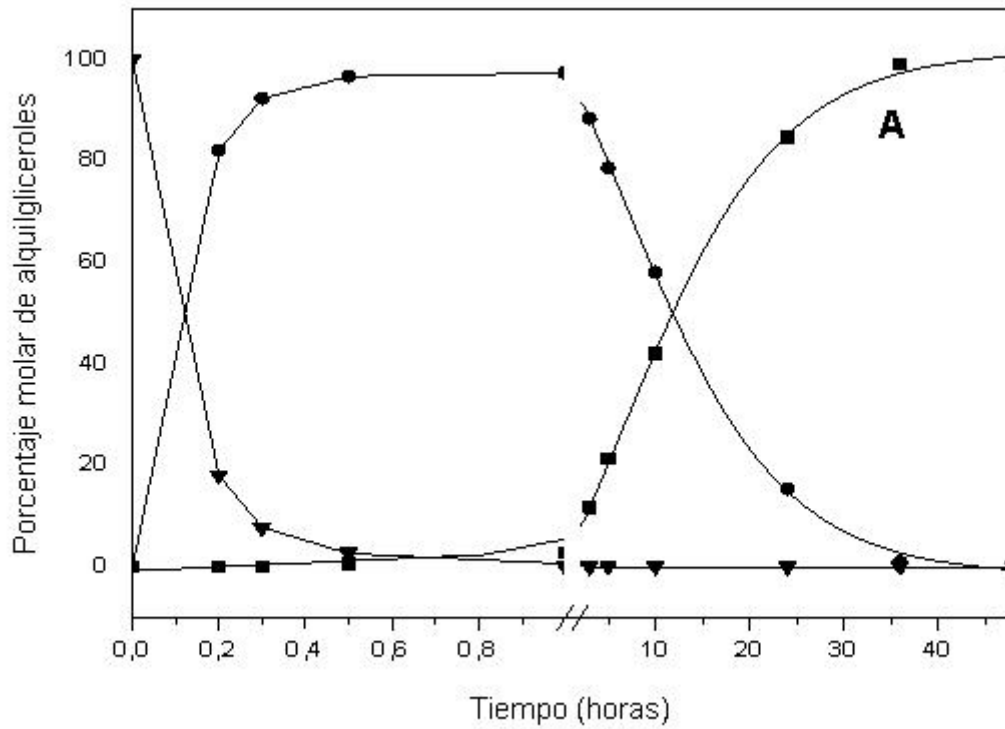


**Figura 66.** Transcurso en el tiempo de la reacción mediada por lipasa de esterificación de CLA con el NEAG a partir del residuo insaponificable. Condiciones: 500 mg de residuo insaponificable, 818 mg de CLA, 10% en peso de Novozym 435, 55 °C, 300 rpm. **Figura A:** ■ DEAG; ● MEAG; ▼ NEAG. **Figura B:** ◆ CLA.

La primera etapa, durante los primeros 30 min, consistió en la conversión de más del 90% de NEAG, y en la segunda etapa, se alcanzó un rendimiento de DEAG de aproximadamente el 80%. Si se comparan la transesterificación (Figura 65 A) y la esterificación directa (Figura 66), se puede observar que el consumo de NEAG es mayor con CLA (durante la primera hora de reacción), aunque se consiguieron niveles inferiores de DEAG después de 48 h de reacción. Estos resultados indican que la eliminación de etanol (en el caso de transesterificación con CLAE) o agua (en el caso de esterificación con CLA) juega un papel crucial en la segunda etapa de la reacción. En consecuencia, se puede suponer que esta cinética de reacción más lenta, se puede deber a una eliminación menos eficiente de agua, comparada con la eliminación de etanol.

### 8.5.2.3 Transesterificación de NEAG con EPAEE.

Finalmente, la reacción de transesterificación de NEAG también se llevó a cabo con una mezcla comercial de EPA etil éster (EPAEE). Como muestran los resultados se de la Figura 67, se observó una tendencia similar a la obtenida con CLAE.



**Figura 67.** Transcurso en el tiempo de la reacción mediada por lipasa de transesterificación de EPAEE con el NEAG a partir del residuo insaponificable. Condiciones: 500 mg de residuo insaponificable, 1000 mg de Incromega E7010, 10% en peso de Novozym 435, 55 °C, 300 rpm. **Figura A:** ■ DEAG; ● MEAG; ▼ NEAG. **Figura B:** ◆ Incromega E7010.

Estos resultados indican que la lipasa B *Candida antarctica* inmovilizada no discrimina entre CLA o EPA etil ésteres para la acilación de alquilglicerol. Se pudieron obtener rendimientos superiores al 90% para ambos compuestos.

La presente metodología describe un proceso muy eficaz y con excelentes rendimientos para la obtención de DEAG con CLA y EPA. Aunque se necesita la realización de estudios que consideren sus actividades biológicas, estos compuestos podrían tener un enorme potencial, ya que combinan las propiedades beneficiosas de alquilglicerol y CLA o EPA. Además, la presencia de estos dos compuestos en la misma molécula podría presentar efectos sinérgicos y potenciar la actividad funcional de cada una de las sustancias por separado.

# CONCLUSIONES

## 9 Conclusiones.

1. La metodología de análisis por HPLC-ELSD desarrollada permite analizar hasta 18 clases de lípidos neutros distintos sin ningún tratamiento previo, con una excelente reproducibilidad considerando los tiempos de retención y en un amplio intervalo de concentraciones. Además, esta metodología analítica, permite también llevar a cabo un seguimiento de cinéticas de reacciones catalizadas por lipasas en las que intervienen compuestos como esteroides, alquilgliceroides y acilgliceroides.
2. En la recuperación de escualeno a partir de aceite de oliva lampante mediante extracción supercrítica en contracorriente, se obtuvo una mayor selectividad hacia la extracción de este compuesto a las presiones más bajas estudiadas, aunque con bajos rendimientos en el proceso. Por el contrario a 234 bares se alcanzó una buena situación de compromiso entre pureza y rendimiento.
3. La extracción supercrítica de ácidos grasos libres de aceite de oliva lampante fue directamente proporcional a la presión de extracción y a la acidez inicial del aceite. A 40 °C y con una relación disolvente/alimentación (S/F) de 20, la presión de 234 bares es óptima para la desacidificación de aceite, ya que se consiguen buenos factores de reducción de acidez y no se pierde capacidad de extracción de ácido graso en aceites de acidez superior a 4°.
4. A partir de subproductos de procesos de desodorización del aceite de oliva se ha recuperado eficazmente escualeno con una elevada pureza y rendimiento empleando una columna de fraccionamiento supercrítico. La recuperación de escualeno fue posible debido a la diferente solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico entre el escualeno y los ácidos grasos ésteres en las condiciones de extracción de 343 K, 180 bares y relación disolvente/alimentación (S/F) de 13. La optimización del proceso se realizó con el apoyo de un modelado termodinámico que supone una eficiente herramienta para analizar la viabilidad, llevar a cabo simulaciones y optimizar los procesos de extracción supercrítica. En el caso de la recuperación de escualeno, la optimización del proceso de extracción dio como resultado un refinado con una pureza de escualeno del 91% en peso y un alto rendimiento (93%).



5. La recuperación de compuestos minoritarios, como tocoferoles y fitoesteroles, a partir de destilados desodorizados por CC-SCCO<sub>2</sub>, puede mejorarse si se transforman triacilgliceroles y ácidos grasos libres del material de partida en sus correspondientes ésteres etílicos de ácidos grasos, en lugar de extraer estos compuestos a partir de destilados desodorizados sin pre-tratar.

Además, durante este proceso, en torno a un 20% de los esteroides presentes en el SODD original pueden ser directamente recuperados con una elevada pureza (88% en peso) debido a la parcial cristalización de los esteroides libres.

6. El empleo de procesos de CC-SFE a partir de un aceite de hígado de tiburón permitió la recuperación y purificación del escualeno presente en estos aceites, obteniendo purezas en torno al 95% en peso y rendimientos superiores al 85%. Mediante reacciones de saponificación de los refinados obtenidos se obtuvo una fracción insaponificable rica en alquilgliceroles no esterificados. Esta fracción pudo ser posteriormente utilizada en procesos de síntesis enzimática en presencia de lipasas con ácidos grasos de interés para obtener alquilgliceroles diesterificados.

7. De forma análoga, la combinación de reacciones de transesterificación con etanol de un aceite de hígado de tiburón con procesos de CC-SFE, permitió obtener un refinado rico en alquilgliceroles no esterificados sin empleo de disolventes orgánicos.

El empleo de un reflujo interno en la columna de extracción mediante un gradiente de temperaturas mejoró notablemente la recuperación de estos alquilgliceroles. Simultáneamente, en este proceso se llevó a cabo un fraccionamiento supercrítico de los FAEEs extraídos que permite obtener productos enriquecidos en FAEEs  $\omega$ -3, los cuales pueden ser utilizados en una posterior transesterificación con alquilgliceroles para producir éteres lipídicos estructurados.

8. El empleo de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada para la acilación de alquilgliceroles utilizando una purga de nitrógeno, permitió obtener alquilgliceroles diesterificados con rendimientos del 95% tanto con CLA como con EPA, ya que la lipasa no discrimina entre ambos compuestos.

Aunque se necesita la realización de estudios que consideren sus actividades biológicas, estos nuevos compuestos presentan un enorme potencial, ya que combinan las propiedades beneficiosas de alquilgliceroles y CLA o EPA en la misma molécula.

9. La realización de procesos de CC-SFE en equipos a escala de planta piloto y de reacciones de síntesis enzimática a escala semi-preparativa con buenos rendimientos, permite estudiar la viabilidad de estos procesos con el fin de evaluar su rentabilidad económica para llevar a cabo un escalado industrial.
  
10. El empleo de tecnologías de extracción y fraccionamiento con fluidos supercríticos permite obtener extractos con componentes lipídicos de interés y alto valor añadido, a partir de distintas materias primas de naturaleza lipídica o subproductos de bajo o nulo valor comercial. La combinación de esta tecnología con reacciones de síntesis enzimática, permite el diseño y obtención de nuevos lípidos funcionales de alta pureza, que pueden ser utilizados en la elaboración de nutracéuticos e ingredientes alimentarios funcionales, mediante procesos limpios, seguros, selectivos y respetuosos con el medio ambiente.

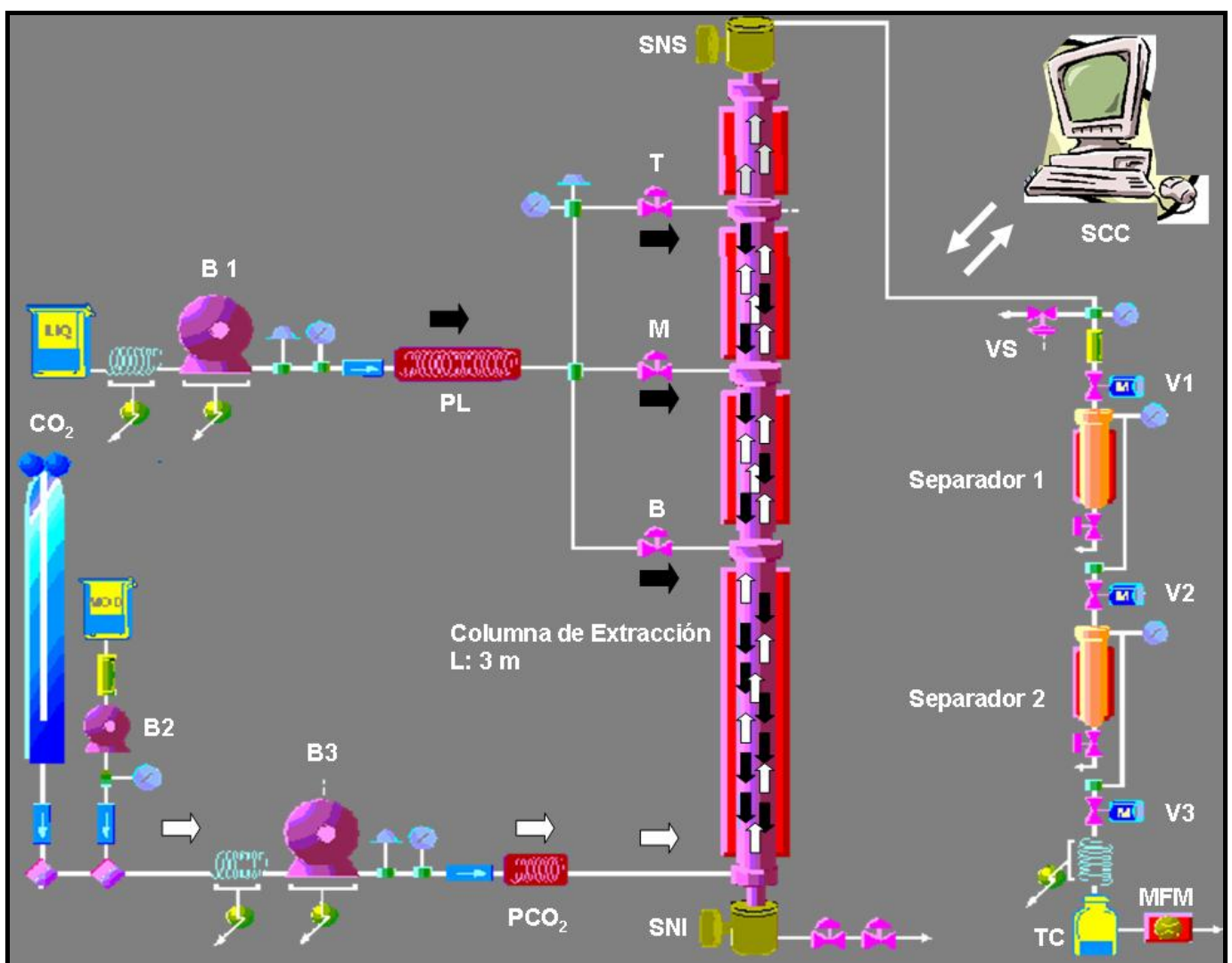
# ANEXOS

## 10 Anexos.

### 10.1 ANEXO 1. Equipo de CC-SFE.

#### 10.1.1 Descripción del equipo.

En la Figura 68 se muestra un esquema detallado de la planta piloto de extracción en contracorriente para el procesamiento de muestras líquidas, utilizada en las investigaciones. El esquema describe, por partes, la influencia de las distintas variables en un proceso de extracción supercrítica.



**Figura 68.** Esquema de la planta piloto de extracción con fluidos supercríticos para muestras líquidas en columna en contracorriente. SCC, sistema de control computerizado; RL, recipiente de muestra líquida; B1, bomba impulsora de muestra líquida; B2, bomba impulsora de modificador; B3, bomba impulsora de CO<sub>2</sub> líquida; PL, precalentador de la muestra líquida previo a su introducción en la columna; PCO<sub>2</sub>, precalentador de CO<sub>2</sub>; CEC, columna de extracción en contracorriente dividida en cuatro tramos; VS, válvula de seguridad; S1, separador 1; S2, separador 2; SNI, sensor del nivel de refinado en la base de la

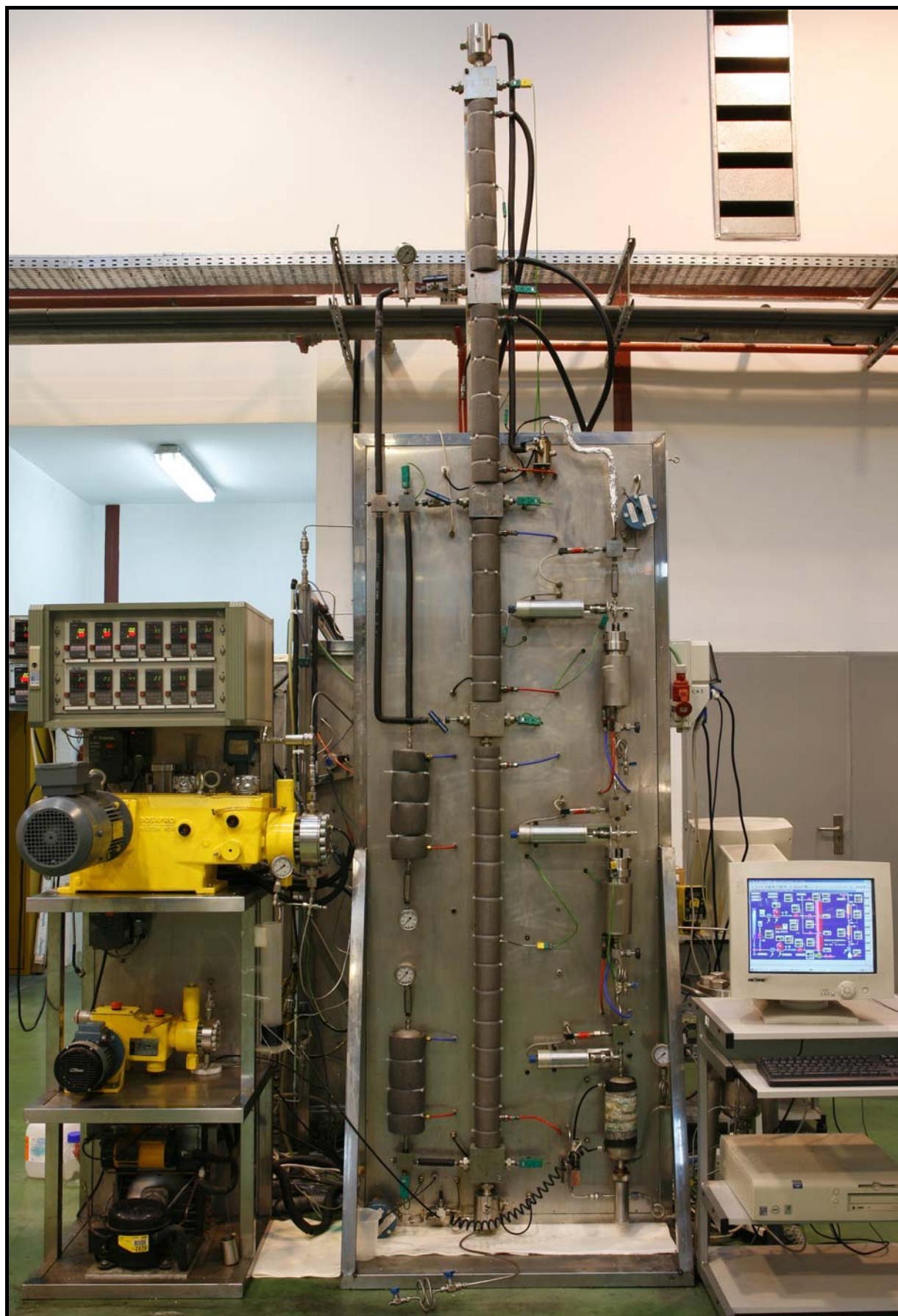
columna; **SNS**, sensor de nivel superior que evita el arrastre; **MFM**, medidor de flujo másico; **TC**, trampa criogénica; **V1, V2, V3**, válvulas micrométricas de regulación; **T**, nivel superior de introducción de muestra; **M**, nivel medio de introducción de muestra; **B**, nivel inferior de introducción de muestra. Las flechas de color negro representan el flujo de CO<sub>2</sub>, mientras que las flechas de color amarillo representan el flujo de muestra líquida, en el interior de la columna.

La planta piloto en contracorriente tiene las siguientes características:

- Una columna de extracción en contracorriente con tres niveles de introducción de muestra (inferior, medio y superior).
- Dos separadores con 270 mL de capacidad cada uno, con control independiente de presión y temperatura, donde tiene lugar una descompresión en cascada.
- Una trampa criogénica a presión atmosférica.

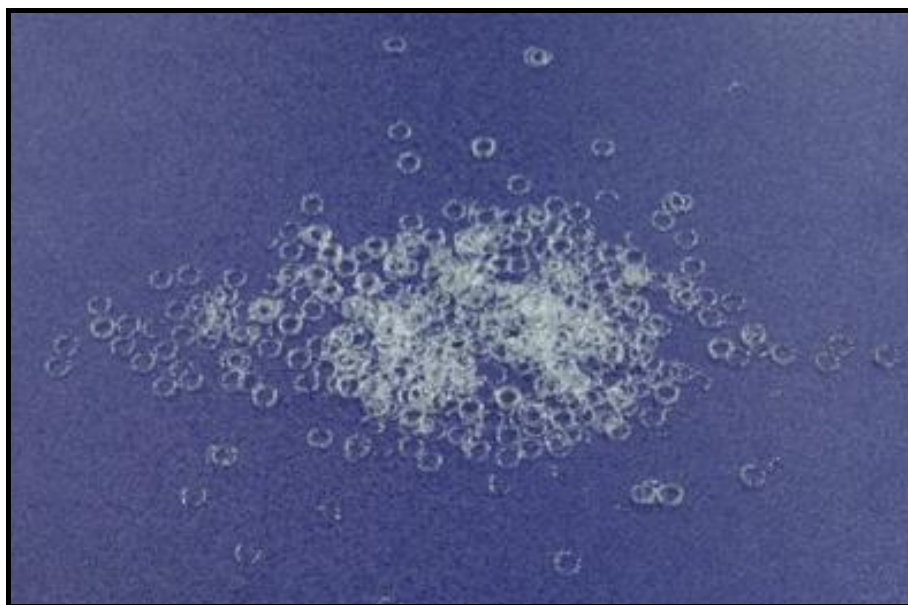
La planta está computerizada mediante unos sistemas de control y un software en un ordenador, manteniéndose una comunicación bi-direccional entre ambos. La planta además está dotada de sistemas de seguridad como son válvulas de seguridad, discos de ruptura y alarmas.

En la Figura 69 se muestra una imagen de la planta piloto empleada en estas investigaciones para la SFE en contracorriente de muestras líquidas (Iberfluid Instruments / ICP CSIC, España).



**Figura 69.** Planta piloto de extracción supercrítica en contracorriente para muestras líquidas.

La columna de extracción (de acero inoxidable 316 SS) en contracorriente está dividida en cuatro tramos, con sistema de calefacción independiente para cada tramo, con una longitud total de 300 cm de altura: 120 cm de altura en el tramo inferior y 60 cm de altura en los cada uno de de los otros tramos, y un diámetro interno de 17,6 mm. Las extracciones se hicieron con la columna rellena con anillos Fenske en todos los experimentos.



**Figura 70.** Anillos Fenske utilizados como relleno en la columna de extracción.

Las diferentes secciones de la columna se encuentran separadas por “Tes” de alta presión (Autoclave Engineers, PA, EEUU). La planta tiene tres puntos o niveles para la introducción de muestra líquida: inferior, medio y superior.

El sistema de calefacción de las diferentes partes del sistema se basa en un circuito de un fluido térmico (aceite de silicona). Este fluido térmico se calienta en un depósito calefactado mediante resistencias, donde el fluido se encuentra a 100-120 °C. Desde este depósito, la silicona se bombea y se distribuye, mediante electroválvulas (Asco Joucomatic, Rueil Malmaison, Francia) hacia las partes del sistema que necesiten alcanzar una determinada temperatura: los cuatro tramos de la columna de extracción, precalentadores de CO<sub>2</sub>, muestra líquida, y separadores. El fluido térmico que se ha enfriado retorna al baño para volver a ser calentado, a través de un circuito cerrado.

La temperatura en el interior de la columna y los separadores sufre oscilaciones menores a  $\pm 1$  °C. Tanto el fluido supercrítico (el CO<sub>2</sub> en nuestro caso) como la muestra líquida son precalentados a la salida de sus respectivas bombas, antes de su introducción en la columna de extracción. Además, la planta tiene un depósito y una bomba para el empleo de un co-disolvente o



modificador, cuando se requiera su uso. Las bombas, tanto de CO<sub>2</sub>, modificador y muestra líquida fueron fabricadas por Dosapro Milton Roy (Pont Saint Pierre, Francia). La planta posee dos separadores de 270 mL de capacidad cada uno (ver Figura 71), con control independiente de temperatura y presión, donde tiene lugar la descompresión en cascada del CO<sub>2</sub>, y una trampa criogénica a presión atmosférica.



**Figura 71.** Detalle de un separador donde tiene lugar la descompresión del CO<sub>2</sub>.



El sistema tiene mecanismos de acción y control manuales ubicados en un panel donde se encuentran los controladores TOHO (ver Figura 72), así como un sistema de control computerizado a través de un sistema informático de control de procesos y adquisición de datos en tiempo real, que recoge información de las diversas variables del proceso como temperaturas, presiones, flujos y niveles, y de diferentes dispositivos de seguridad, como alarmas y válvulas de seguridad.



**Figura 72.** Panel de controladores TOHO para controlar las variables temperatura y presión de las diferentes partes del sistema.



**Figura 73.** Sistema informático de control de procesos y adquisición de datos en tiempo real.

### 10.1.2 Modo de operación.

El CO<sub>2</sub> proviene de un cilindro a una presión de 55 bares y 20 °C, y después se enfría a una temperatura por debajo de 0 °C, para mantenerlo en estado líquido. Posteriormente es bombeado al flujo requerido mediante una bomba de membrana de desplazamiento positivo (ver Figura 74) (Dosapro Milton Roy, Francia). En los procesos de extracción supercrítica llevados a cabo se emplearon dos bombas diferentes para el bombeo de CO<sub>2</sub>:

- Bomba 1: Modelo: MD 99 S (G) 6M 390/. Condiciones máximas de operación: 390 bares y 3,11 L/h, 60 Hz.
- Bomba 2: Modelo: MB 90 H8 M400/J VV1Z. Condiciones máximas de operación: 400 bares y 7,28 l/h, 60 Hz.



**Figura 74.** Bomba 1 utilizada para la introducción de CO<sub>2</sub> líquido (Dosapro Milton Roy, Francia). En primer plano se aprecia también la bomba para la introducción de modificador para los casos en los que se requiera su uso.



**Figura 75.** Bomba 2 utilizada para la introducción de CO<sub>2</sub> líquido (Dosapro Milton Roy, Francia).



Antes de introducir el CO<sub>2</sub> por la parte inferior de la columna, se precalienta a una temperatura próxima a la temperatura de extracción.

La muestra líquida es precalentada en un baño con agua y en un precalentador antes de su introducción en la columna de extracción. De este modo, se asegura la homogeneidad de las muestras lipídicas, ya que se impide la formación de fases sólidas en lípidos que tienen puntos de fusión más altos (más ricas en grasas saturadas).

Cuando se alcanzan las condiciones de presión y de temperatura en la columna y en los separadores, se comienza a bombear la muestra líquida mediante la bomba de alimentación de muestra líquida, modelo: MD 140 S(F) 4M 460 (Dosapro Milton Roy, Francia). Condiciones máximas de operación de la bomba: 460 bar, 1,87 L/h, 60 Hz.



**Figura 76.** Bomba de alimentación de muestra líquida (Dosapro Milton Roy, Francia).

La muestra se introduce por el punto bajo, medio o alto en el interior de la columna (situados por encima del punto de introducción de CO<sub>2</sub>). De este modo se crea un flujo en contracorriente entre la muestra líquida que desciende y el de CO<sub>2</sub> supercrítico que asciende en el interior de la columna de extracción. Para que se genere este flujo en contracorriente, es necesario que la muestra líquida tenga una densidad mayor que el CO<sub>2</sub> supercrítico. La diferencia de densidad entre ambas fases debe ser al menos de 100 kg/m<sup>3</sup> [572].

Posteriormente, el CO<sub>2</sub> junto con los compuestos extraídos sale por la parte superior de la columna (fase extracto). En los dos separadores, se va disminuyendo secuencialmente la densidad del CO<sub>2</sub>, mediante la variación de las variables presión y temperatura. De este modo, se realiza una descompresión por etapas o despresurización en cascada a través de los separadores, obteniéndose un fraccionamiento del extracto. La regulación de la presión en la columna y los separadores se controla mediante unas válvulas de microrregulación (servocontroladas y calefactadas). Las condiciones máximas de trabajo especificadas en las celdas de separación son 200 bares y 100 °C.

En el último separador, se reduce la presión del fluido para que pase de condiciones supercríticas a estado gaseoso, para su eliminación espontánea. A la salida de los 2 separadores se encuentra la trampa criogénica para recoger compuestos volátiles y en el tramo final hay instalado un medidor másico de flujo de CO<sub>2</sub> gas (Bronkhorst High-Tech, Holanda). Los compuestos menos solubles de la muestra que permanecen en la columna de extracción descienden por ella y se recogen en el fondo como refinado.

A la salida del tramo superior existe un recipiente con un mecanismo que impide que, en el caso de existir arrastre de muestra, ésta pase al primer separador. Este mecanismo consiste en un sensor que mide la conductividad eléctrica en el interior de un recipiente situado en la salida superior de la columna. Cuando hay un arrastre de la muestra líquida en la columna, el recipiente se va llenando de este líquido. El sensor detecta la diferencia de conductividad eléctrica en el interior del recipiente provocada por la entrada de líquido. Cuando esta diferencia alcanza un determinado valor, el mecanismo considera que el recipiente está lleno de líquido y detiene de forma automática la bomba de CO<sub>2</sub> para evitar la contaminación del primer separador. De manera similar, en la base de la columna de extracción existe un recipiente con un mecanismo que evita que la muestra o refinado que no ha sido extraído se acumule y vuelva a ascender por la columna.

Antes de finalizar la extracción, se detiene la bomba de muestra líquida, y a partir de ese momento se bombea CO<sub>2</sub> puro durante aproximadamente 30 minutos. De este modo se asegura que toda la muestra líquida introducida en la columna sea sometida a extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. No obstante distintos factores como el volumen de muestra introducido, relación S/F, punto de introducción, viscosidad de la muestra y retención en el relleno, deben ser tenidos en cuenta para minimizar su posible efecto en la composición y rendimientos de los extractos y refinados obtenidos al final de la extracción. Una vez terminada la extracción, tiene lugar la despresurización.

### **10.1.3 Protocolo de limpieza de la columna de extracción.**

Cada vez que se realiza un cambio de material de partida, se llevó a cabo un protocolo de limpieza de la columna de extracción. Según este protocolo, se intercalan extracciones con CO<sub>2</sub> supercrítico a altas (250-300 bares) y bajas presiones (80-120 bares), en las que se bombea a través de la bomba de alimentación de muestra una mezcla de hexano/etanol (96%) (1:1) (vol:vol), que actúa como líquido de lavado. En este protocolo, también se intercalan procesos de limpieza en los que se bombea el líquido de lavado hacia el interior de la columna por el punto de introducción superior, sin bombeo de CO<sub>2</sub>, es decir, sin presión en el interior de la columna. En cada etapa del protocolo de limpieza se utilizan en torno a 500 mL de líquido de lavado. El producto que sale de la columna en forma de refinado es el líquido de lavado junto con el material disuelto o "desecho". Este refinado es evaporado en un rotavapor. Cuando el residuo sólido obtenido es inferior al 0.1% (peso/vol) del volumen recogido de refinado, se considera que la columna de extracción está limpia. Para concluir el protocolo de limpieza se llevan a cabo dos extracciones con CO<sub>2</sub> a alta presión (250-300 bares) y alta temperatura (60-65 °C), para eliminar los restos de disolvente de lavado que pueden permanecer en el interior de la columna.

Posteriormente, se realizan una serie de extracciones para la impregnación del relleno de la columna, con el nuevo material de partida. Estas extracciones tienen lugar todas en las mismas condiciones hasta que se consigue completar el balance de materia del proceso. En este momento se considera que la planta de extracción de CC-SFE está preparada para explorar diferentes condiciones experimentales y para la obtención de resultados reproducibles.

El balance de materia se cerró en todos los experimentos con una imprecisión inferior al 10%.

El refinado y los extractos de cada separador fueron recogidos en viales de vidrio y pesados en una balanza con precisión de  $\pm 0,01$  g, posteriormente fueron purgados con atmósfera de nitrógeno y almacenados en frigorífico a 4 °C hasta el momento de su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y/o cromatografía de gases.

## 10.2 ANEXO 2. Modelado de las fases en equilibrio y predicciones de solubilidad.

Los cálculos de equilibrio entre fases de las mezclas entre los distintos compuestos objeto de estudio y el CO<sub>2</sub> se llevaron a cabo usando la Ecuación de Estado de Contribución de Grupos (Group Contribution Equation of State) (GC-EoS), desarrollada por Skjold-Jørgensen [188] y adaptada a compuestos lipídicos por Epinosa y col. [190] y Fornari [194].

La ecuación GC-EoS se basa en la función de partición de van der Waals y combina el principio de contribución de grupos con las reglas de mezclado de composición local. El modelo tiene dos contribuciones a la energía residual de Helmholtz del sistema:

- Un término repulsivo tipo Carnahan-Starling.
- Un término atractivo que contempla las interacciones energéticas entre las moléculas a través de una versión grupal de la expresión NRTL (Non Random Two Liquids).

Las ecuaciones que describen el modelo GC-EoS se detallan a continuación, aclarando cuáles son los parámetros requeridos para realizar los cálculos. Para una descripción más detallada del modelo se debe referir a Skjold-Jørgensen [188].

La energía residual de Helmholtz ( $A^r$ ) en el modelo GC-EoS depende de dos términos: uno repulsivo o de volumen libre ( $A_{fv}^r$ ) y una contribución energética que contempla las fuerzas intermoleculares atractivas ( $A_{att}^r$ ).

$$A^r = A_{fv}^r + A_{att}^r$$

La contribución de volumen libre se modela asumiendo un comportamiento de esferas duras para las moléculas, caracterizando cada sustancia  $i$  por una esfera dura de diámetro  $d_i$ . La expresión utilizada corresponde al modelo de esfera dura tipo Carnahan-Starling:

$$A_{fv}^r / RT = 3(\lambda_1 \lambda_2 / \lambda_3)(Y - 1) + (\lambda_2^3 / \lambda_3^2)(-Y + Y^2 - \ln Y) + n \ln Y$$

donde:

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

$NC$  es el número de componentes,  $n_i$  es el número de moles del componente  $i$ ,  $V$  es el volumen total,  $R$  es la constante universal de los gases:  $83.14 \text{ cm}^3 \text{ bar} / \text{mol K}$ ,  $T$  es la temperatura,  $d_i$  es el diámetro de esfera dura, y  $N$  es el número de moles.

La siguiente expresión es adoptada para la dependencia de  $d_i$  con la temperatura:

$$d_i = 1.065655 d_{ci} \{1 - 0.12 \exp[-2T_{ci} / (3T)]\}$$

donde  $d_{ci}$  es el diámetro crítico de la esfera dura del componente  $i$ , dado por:

$$d_{ci} = (0.08943RT_{ci} / P_{ci})^{1/3} \quad (T_{ci} \text{ es la temperatura crítica y } P_{ci} \text{ es la presión crítica})$$

cuando el componente coincide con un grupo (por ejemplo:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , etc.). En el caso contrario  $d_{ci}$  se ajusta a la presión de vapor del compuesto puro, normalmente la presión de vapor correspondiente al punto normal de ebullición. Cabe mencionar que este procedimiento no es válido para sustancias termolábiles o muy poco volátiles, puesto que información sobre sus presiones de vapor es escasa, poco confiable o no existe en la literatura. Espinosa y col. demostraron que es posible utilizar información experimental de coeficientes de actividad a dilución infinita para ajustar el parámetro  $d_{ci}$  de alcanos de alto peso molecular y de triglicéridos, obteniendo excelentes resultados al aplicar los valores obtenidos a la predicción de equilibrio vapor-líquido en mezclas alcano +  $\text{CO}_2$  y triglicérido +  $\text{CO}_2$  [573].

Para la evaluación de la contribución atractiva a la energía residual de Helmholtz, se utiliza una versión grupal de la expresión NRTL:

$$\frac{A_{att}^r}{RT} = - \frac{z}{2} \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^i q_j \sum_k^{NG} \frac{\theta_k g_{kj} \tilde{q} \tau_{kj} / RTV}{\sum_l^{NG} \theta_l \tau_{lj}}$$

donde:

$$\theta_j = (q_j / \tilde{q}) \sum_i^{NC} n_i v_j^i \quad q = \sum_i^{NC} n_i \sum_j^{NG} v_j^i q_j$$

$$\tau_{ij} = \exp[\alpha_{ij} \Delta g_{ij} \tilde{q} / (RTV)]$$

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



$NG$  es el número de grupos,  $V$  es el volumen molar,  $z$  es el número de los vecinos más cercanos para cualquier segmento (fijado en 10),  $v_j^i$  es el número de grupos de tipo  $j$  en la molécula  $i$ ,  $q_j$  es el número de segmentos de superficie asignados al grupo  $j$ ,  $\theta_k$  es la fracción de superficie del grupo  $k$ ,  $\tilde{q}$  es el número total de segmentos de superficie,  $g_{ij}$  es el parámetro de energía de atracción para interacciones entre los grupos  $i$  y  $j$ , y  $\alpha_{ij}$  es el parámetro no-aleatorio ( $\alpha_{ij} \neq \alpha_{ji}$ ). Las interacciones entre grupos distintos se calculan de este modo:

$$g_{ij} = k_{ij} (g_{ii} g_{jj})^{1/2} \quad (k_{ij} = k_{ji})$$

$k_{ij}$  es un parámetro (simétrico) de interacción que tiene en cuenta la desviación de las interacciones energéticas entre las moléculas  $i$  y  $j$  respecto de la media cuadrática. La dependencia de los parámetros de interacción con la temperatura viene dada por:

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

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

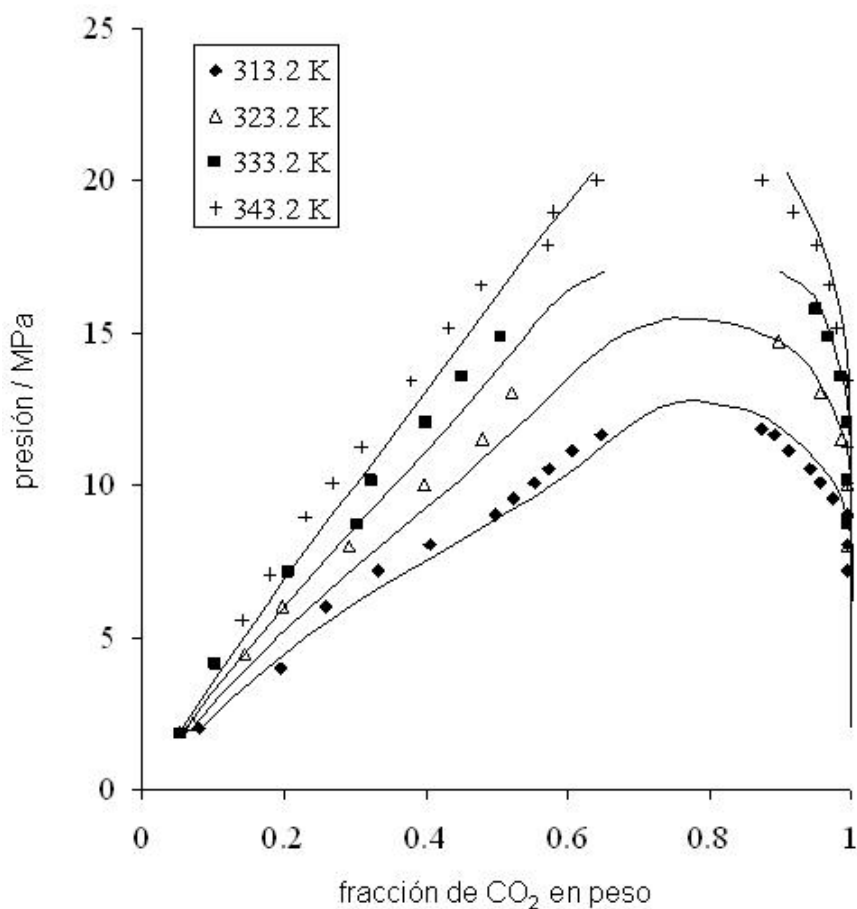
donde  $g_{jj}^*$  y  $k_{ij}^*$  son los valores correspondientes a la temperatura de referencia  $T_i^*$  y  $g'_{jj}$ ,  $g''_{jj}$ ,  $k'_{ij}$  son los valores que definen la dependencia con la temperatura.

En resumen, la contribución atractiva tiene 5 parámetros de grupo puro:  $T^*$ ,  $q$ ,  $g^*$ ,  $g'$  y  $g''$ , y 4 parámetros de interacción binaria:  $k_{ij}^*$ ,  $k'_{ij}$ ,  $\alpha_{ij}$  y  $\alpha_{ji}$ . Con respecto a los parámetros de grupo puro,  $g^*$ ,  $g'$  y  $g''$  (parámetros que definen la energía de interacción entre grupos del mismo tipo) son ajustables, mientras que  $T^*$  (temperatura de referencia) y  $q$  (parámetro de área) no lo son.  $T^*$  se fija en 600 K para grupos funcionales, mientras que para grupos que coinciden con un compuesto ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $H_2$ , etc.) se fija igual a la temperatura crítica de dicho compuesto.

La capacidad del modelo GC-EoS para representar el equilibrio entre fases de las mezclas binarias FFAE +  $CO_2$  y TAG +  $CO_2$  ha sido ampliamente detallada en diferentes trabajos [573-575].

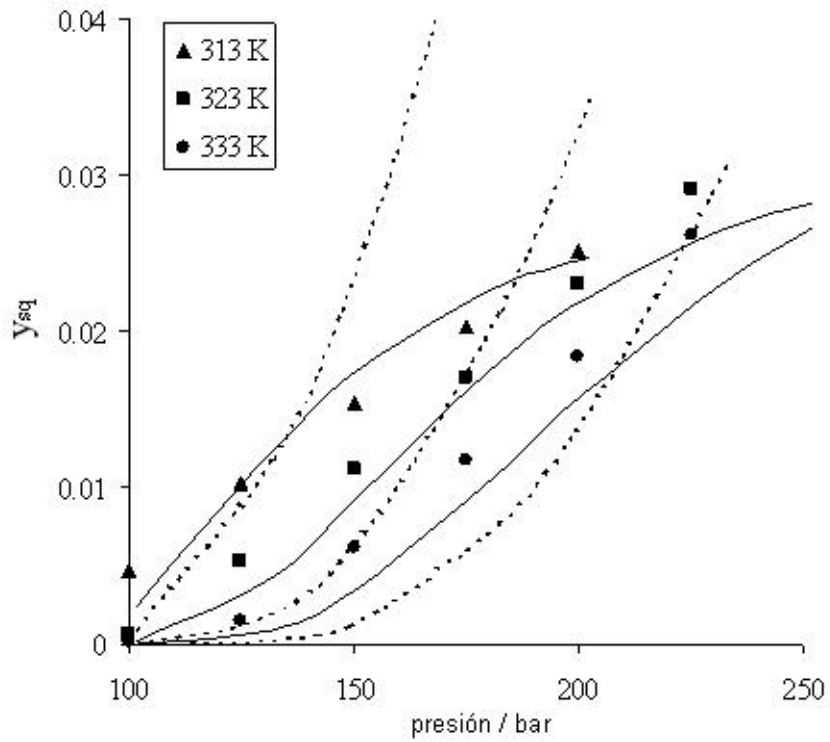
Así, por ejemplo, la Figura 77 compara datos experimentales de equilibrio vapor-líquido del sistema metil oleato +  $CO_2$  con las predicciones del modelo GC-EoS. Como puede observarse en la figura, la predicción de la composición de las fases en equilibrio es muy satisfactoria en el rango de temperaturas y presiones propias de los procesos supercríticos. Resultados similares han sido

publicados para gran número de FAMES y FAEEs saturados e insaturados [574], y TAGs [573, 575].

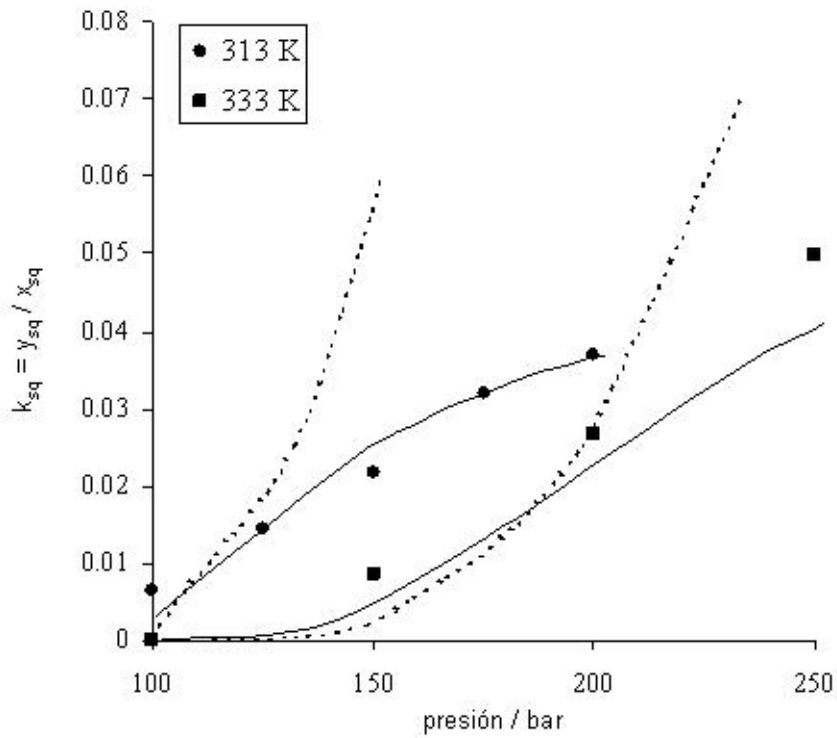


**Figura 77.** Equilibrio vapor-líquido para el sistema metil oleato + CO<sub>2</sub>. Datos experimentales [576]: (◆) 313 K, (△) 323 K, (■) 333 K y (+) 343 K. Las líneas continuas representan las predicciones de GC-EoS.

Para estudiar el comportamiento de la mezcla binaria escualeno + CO<sub>2</sub> y con el objetivo de mejorar la representación cuantitativa de la solubilidad de escualeno en CO<sub>2</sub> supercrítico, en este trabajo han sido revisados los parámetros para el grupo CH=C y su interacción con CO<sub>2</sub> (parámetros originalmente reportados por Pusch y Schmelzer [192]). Los parámetros originales fueron obtenidos usando datos experimentales de equilibrio vapor-líquido correspondientes a mezclas binarias de alquenos de bajo peso molecular con CO<sub>2</sub>. De este modo, es razonable que estos parámetros proporcionen sólo una predicción aproximada del comportamiento de fases para mezclas que contienen alquenos de elevado peso molecular. Los nuevos parámetros se han estimado utilizando datos experimentales vapor-líquido de la mezcla binaria escualeno + CO<sub>2</sub> [577, 578]. De este modo, se ha obtenido una considerable mejora en la representación de la solubilidad del escualeno (Figura 78) y de sus constantes de equilibrio (Figura 79) calculadas con los nuevos parámetros, en comparación con los resultados proporcionados usando los parámetros originales.



**Figura 78.** Solubilidad de escualeno (fracción molar,  $y_{sq}$ ) en SC-CO<sub>2</sub>. Comparación entre los datos experimentales [574] a 313 K (●), 323 K (■) y 343 K (▲), con los cálculos de GC-EoS usando parámetros originales (.....) y parámetros ajustados (—) en este trabajo.



**Figura 79.** Coeficiente de equilibrio de escualeno ( $k_{sq}$ ) en la mezcla con SC-CO<sub>2</sub>. Comparación entre los datos experimentales [574] a 313 K (●) y 333 K (■), con los cálculos del modelo GC-EoS, usando parámetros originales (.....) y parámetros ajustados (—) en este trabajo.

Todos los parámetros de grupos puros e interacciones binarias empleados en este trabajo para representar el equilibrio vapor-líquido de los sistemas binarios FAAE + CO<sub>2</sub>, TAG + CO<sub>2</sub> y escualeno + CO<sub>2</sub> se resumen en la Tabla 23.

**Tabla 23.** Parámetros GC-EoS de grupos puros y de interacción binaria usados en este trabajo.

*Parámetros de grupos puros*

	Temperatura de referencia	Área de superficie de grupos $q$	Parámetros de energía de grupos puros		
	$T^*$		$g$	$g'$	$g''$
CH <sub>3</sub>	600	0,848	316910.	-0,9274	0,0
CH <sub>2</sub>	600	0,540	356080.	-0,8755	0,0
CH=CH	600	0,867	403590.	-0,7631	0,0
CH=C	600	0,676	546780.	-1,0966	0,0
CH=C (*)	600	0,676	421650.	-1,3756	0,0
CH <sub>2</sub> COO	600	1,420	831400.	-1,0930	0,0
(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO grupo triacilglicerol (TAG)	600	3,948	346350.	-1,3460	0,0
CO <sub>2</sub>	304,2	1,261	531890.	-0,5780	0,0

*Parámetros de interacción de grupos binarios*

$i$	$j$	Parámetros de energía de atracción		Parámetros no aleatorios	
		$k_{ij}$	$k'_{ij}$	$\alpha_{ij}$	$\alpha_{ji}$
CO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	0,898	0,0	4,683	4,683
	CH <sub>2</sub>	0,874	0,0	4,683	4,683
	CH=CH	0,948	0,0	0,0	0,0
	CH=C	1,057	0,0	0,0	0,0
	CH=C (*)	0,882	0,022	-14,247	-14,247
	CH <sub>2</sub> COO	1,115	0,094	-1,615	-1,615
	TG	1,094	0,112	-1,651	-1,651

TG	CH <sub>3</sub> /CH <sub>2</sub>	0,860	0,0	0,0	0,0
	CH=CH/CH=C	0,883	0,0	0,0	0,0
	CH <sub>2</sub> COO	1,237	0,0	-8,700	-3,656
CH <sub>2</sub> COO	CH <sub>3</sub> /CH <sub>2</sub>	0,869	0,0	0,0	0,0
	CH=CH/CH=C	1,006	0,0	-0,876	-0,876

(\*) Parámetros ajustados y usados en este trabajo. El resto de parámetros mostrados en la tabla se obtuvieron de la bibliografía [189, 190, 192].

Los parámetros críticos (temperatura y presión crítica) y el diámetro crítico de esfera dura, utilizados en este trabajo para cada uno de los compuestos puros estudiados, se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Parámetros de componentes puros.

	Temperatura crítica, $T_{ci}$ (K)	Presión crítica, $P_{ci}$ (bar)	Diámetro molecular crítico de esfera dura (cm/mol)
metilmiristato	707,9 <sup>a</sup>	14,2 <sup>a</sup>	7,710 <sup>b</sup>
metiloleato	767,0 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	7,982 <sup>b</sup>
etiloleato	784,2 <sup>a</sup>	10,5 <sup>a</sup>	8,078 <sup>b</sup>
escualeno	838,1 <sup>c</sup>	6,5 <sup>c</sup>	9,336 <sup>b</sup>
trioleína	1020,0 <sup>d</sup>	4,5 <sup>d</sup>	12,181 <sup>d</sup>

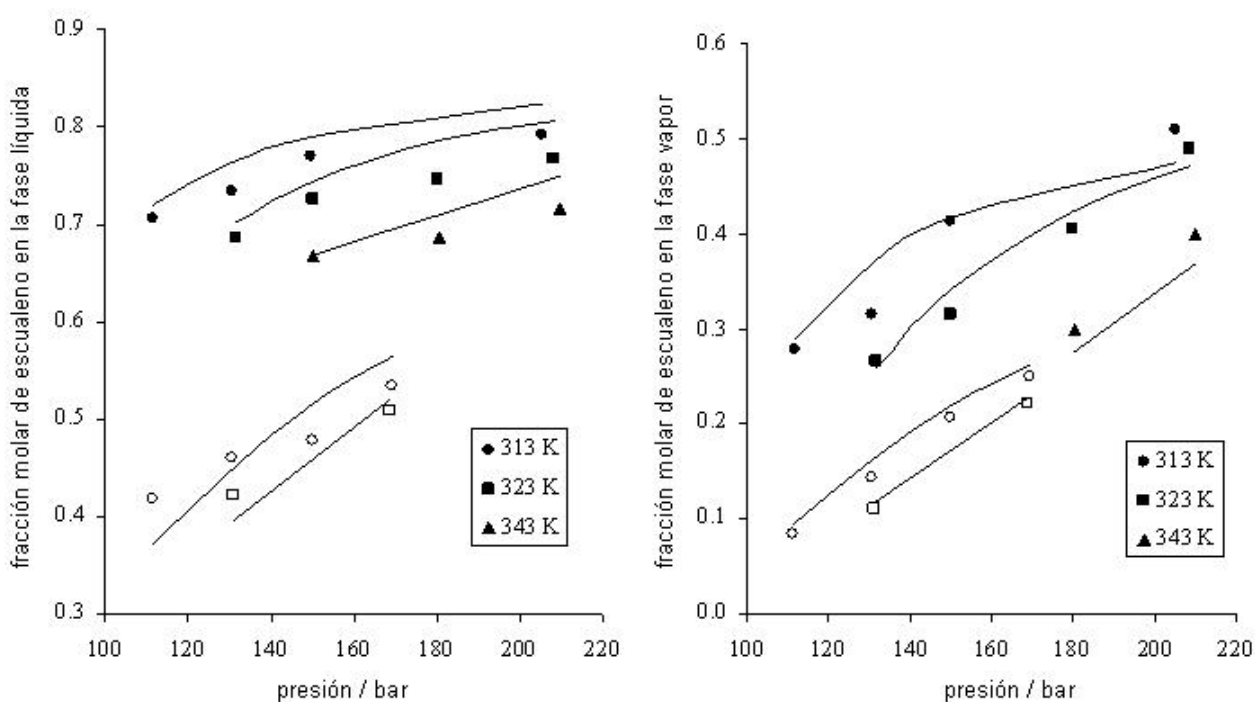
<sup>a</sup> Joback y Reid [579].

<sup>b</sup> Espinosa y col. [574].

<sup>c</sup> Constantinou y Gani [580].

<sup>d</sup> Espinosa y col. [573].

Se exploró la capacidad del modelo GC-EoS para predecir el equilibrio vapor-líquido de la mezcla ternaria metiloleato + escualeno + CO<sub>2</sub>, tomando como base los datos experimentales aportados por Ruivo y col. [558]. Se obtuvieron resultados satisfactorios, representados en la Figura 80, a través de la variación de las fracciones molares líquido/vapor de escualeno en función de la presión, temperatura y composición del material de alimentación.



**Figura 80.** Fracciones molares experimentales [575] de escualeno en las fases de líquido (a) y vapor (b) (libres de CO<sub>2</sub>) del sistema ternario CO<sub>2</sub> + escualeno + metiloleato, a diferentes temperaturas. Mezcla de alimentación (libre de CO<sub>2</sub>): 64,5% moles de escualeno (símbolos rellenos) y 33,5% moles de escualeno (símbolos vacíos). Las líneas continuas representan las predicciones de GC-EoS.

Según los datos experimentales de Ruivo y col. [558], los mayores valores del factor de separación entre metil oleato y escualeno se obtuvieron en la temperatura más alta investigada (343 K) y presiones en torno a 150 bar.

En distintos artículos ha sido ampliamente demostrado que el modelo GC-EoS proporciona una representación satisfactoria del equilibrio entre fases de mezclas binarias y ternarias que contienen CO<sub>2</sub> y las sustancias que componen el material de partida disponible. No obstante, en la simulación y optimización de procesos de CC-SFE es importante considerar algunos factores como el número de etapas de equilibrio, si existe relación de reflujo y si existe recirculación de CO<sub>2</sub>.

En una etapa simple de equilibrio termodinámico, entran en contacto íntimo una fase líquida con una fase supercrítica, de modo que las composiciones de fase líquida y fase supercrítica que

abandonan la etapa, siguiendo su curso en la columna, se encuentran en equilibrio termodinámico.

El reflujo consiste en la introducción en el interior de la columna de una parte de la fase líquida obtenida en el extracto. De este modo, se consigue aumentar la recuperación en el refinado de los componentes menos solubles en el fluido supercrítico.

En un proceso de CC-SFE el número de etapas y la relación de reflujo deben ser adecuados, para que tenga lugar la separación y distribución de componentes deseada.

La recirculación del fluido supercrítico consiste la reutilización del fluido de forma continua durante el proceso de extracción. De este modo, después de la precipitación de los compuestos en los separadores, se recupera el fluido en estado gaseoso, se limpia mediante filtros de diferente naturaleza (por ejemplo: carbón activo), se condensa y se vuelve a bombear al interior de la columna de extracción. La recirculación del fluido supercrítico es necesaria en procesos de CC-SFE a escala industrial, por razones económicas.

En el presente estudio el modelo desarrollado se utilizó para representar el proceso de CC-SFE, utilizando un programa de cálculo que contiene la simulación por ordenador de una columna de múltiples etapas de equilibrio, con posibilidad de considerar una corriente de reflujo y diferentes puntos de alimentación de la muestra líquida y del reflujo.

El primer objetivo de la simulación fue diseñar las extracciones experimentales determinando las condiciones más apropiadas que permitan concentrar escualeno a partir del destilado desodorizado de aceite de oliva. Inicialmente se consideró que la composición del material de partida fue de 60% en peso de escualeno, 35% en peso de etil oleato y 5% en peso de trioleína. Estas estimaciones proporcionan suficiente información para validar por un lado, la composición seleccionada para representar el material de partida, y por otro lado, la capacidad de la GC-EoS para representar el proceso de extracción en contracorriente.

De este modo se simuló un proceso de CC-SFE con tres etapas teóricas sin reflujo y sin recirculación de CO<sub>2</sub>. Las condiciones del proceso obtenidas para maximizar la concentración de escualeno como producto en el refinado, manteniendo una recuperación de escualeno superior al 70%, fueron de 343 K, 187 bar y una relación S/F en torno a 13. En estas condiciones de extracción, se predijo una concentración de escualeno como producto de refinado del 84% en peso. De este modo, se decidió llevar a cabo extracciones experimentales a 343 K, S/F = 13 y presiones de 150 a 230 bar.

# LISTA DE TABLAS



## II Lista de tablas.

Tabla 1. Condiciones críticas de distintos fluidos. ....	32
Tabla 2. Orden de magnitud de las propiedades físicas de los fluidos supercríticos, gases y líquidos.....	33
Tabla 3. Resumen de aplicaciones destacables de la extracción con fluidos supercríticos con columna rellena en contracorriente [215].....	42
Tabla 4. Etapas del proceso de refinado alcalino de aceite. ....	52
Tabla 5. Composición del gradiente de la fase móvil (%). ....	102
Tabla 6. Tiempos de retención y resolución de los diferentes compuestos estudiados. ....	117
Tabla 7. Desviación estándar relativa (RSD) de la respuesta de distintos días de las diferentes clases de lípidos analizadas. ....	119
Tabla 8. Coeficientes de regresión cuadrática para escualeno, FFA, MEAG, esteroides, TAG, ésteres de esteroles, 1,3-DAG, $\alpha$ -tocoferol, FAEE, NEAG, y MAG.....	123
Tabla 9. Desviación estándar calculada entre dos experimentos replicados llevados a cabo en las mismas condiciones de presión y con aceite del mismo grado de acidez.....	137
Tabla 10. Principales lípidos neutros presentes en el destilado desodorizado de los aceite de oliva. ....	144
Tabla 11. Concentración de escualeno experimental y recuperación obtenida en el refinado, fase líquida del separador y en la mezcla de ambos.....	148
Tabla 12. Restricciones de desigualdad, límite inferior y superior empleados y valores óptimos obtenidos en la optimización del proceso de CC-SFE.....	152
Tabla 13. Composición del destilado desodorizado de aceite de girasol (SODD) antes y después de la formación de ácidos grasos etil ésteres.....	154
Tabla 14. Condiciones experimentales de CC-SCCO <sub>2</sub> llevadas a cabo con el SODD etilado como material de partida. ....	158
Tabla 15. Factores de enriquecimiento y recuperaciones de ésteres de esteroles, esteroides libres y tocoferoles, obtenidos en el refinado de las extracciones CC-SCCO <sub>2</sub> realizadas con SODD etilado como material de partida. ....	158
Tabla 16. Pureza y recuperación de esteroides obtenidos en la fase sólida producida después de la formación de ácidos grasos etil ésteres a partir de SODD. ....	160
Tabla 17. Composición en esteroides de la fase sólida obtenida después de la formación de ácidos grasos etil esteroides a partir de SODD y de la extracción con hexano.....	161
Tabla 18. Composición del aceite de hígado de tiburón antes y después de la reacción de etanolisis.....	162

Tabla 19. Condiciones de los procesos de SFE llevados a cabo en la columna rellena en contracorriente: Composición (en peso) y rendimiento (masa en el refinado / masa en el material alimentado) obtenido en el refinado.....	166
Tabla 20. Composición (en peso) de las fracciones recogidas en los separadores S1 y S2 (extractos).....	167
Tabla 21. Enriquecimiento de $\omega$ -3 ( $\omega$ -3 FAEE en S1 / $\omega$ -3 FAEE en S2) obtenido mediante el sistema de fraccionamiento en cascada.....	169
Tabla 22. Composición del aceite de hígado de tiburón original, refinado mediante extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico, y residuo insaponificable. ....	171
Tabla 23. Parámetros GC-EoS de grupos puros y de interacción binaria usados en este trabajo. ....	202
Tabla 24. Parámetros de componentes puros.....	203

# LISTA DE FIGURAS

## 12 Lista de figuras.

Figura 1. Digestión y absorción de TAG (arriba) y 1,3-DAG (abajo) en el intestino animal.....	14
Figura 2. Estructura molecular de los fitoesteroles y fitoestanoles más comunes [8, 9].....	15
Figura 3. Mecanismo propuesto de solubilización competitiva de colesterol y fitoesterol. ....	16
Figura 4. Distintos eicosanoides sintetizados a partir de ácidos grasos $\omega$ -3 y $\omega$ -6.....	17
Figura 5. Diferencias estructurales entre TAG y alquilglicerol (ambos tienen en su estructura una molécula de glicerol). ....	20
Figura 6. Estructura química de alquilgliceroles no esterificados, monesterificados y diesterificados. ....	21
Figura 7. Principales tipos de alquilgliceroles. ....	21
Figura 8. Estructura de un alquilglicerol sustituido con un grupo metoxilo. ....	23
Figura 9. Estructura molecular del escualeno.....	24
Figura 10. Estructura molecular del $\alpha$ -tocoferol.....	26
Figura 11. Diagrama del detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD). ....	30
Figura 12. Diagrama de fases sólido/líquido/gas.....	31
Figura 13. Proceso de separación típico al usar un fluido supercrítico como agente extractante..	37
Figura 14. Procesos de extracción con CO <sub>2</sub> supercrítico de muestras sólidas y líquidas. ....	38
Figura 15. Hidrólisis alcalina (saponificación) de aceite para formar jabones. ....	63
Figura 16. Hidrogenación.....	63
Figura 17. Distintos tipos de transesterificación. ....	64
Figura 18. Transesterificación de TAGs con alcohol. ....	65
Figura 19. Salatrim.....	68
Figura 20. Caprenin. ....	68
Figura 21. TAG estructurado tipo MLM.....	69
Figura 22. Betapol <sup>TM</sup> . ....	69
Figura 23. Equivalente de grasa de cacao (CBE, "Cocoa Butter Equivalents").....	70
Figura 24. La biocatálisis y la biotecnología como herramientas interdisciplinarias de diferentes ciencias y sus múltiples usos industriales.....	76
Figura 25. Especificidad posicional de las lipasas en triacilgliceroles. ....	79

Figura 26. Especificidad por diferentes ácidos grasos de las lipasas.....	80
Figura 27. Clasificación de los diferentes tipos de TAGs dependiendo de su estructura.....	81
Figura 28. Síntesis enzimática de TAGs estructurados del tipo EEE. ....	81
Figura 29. Síntesis de TAGs estructurados simétricos por interesterificación enzimática de dos TAGs mono-ácidos, RRR y R'R'R'. ....	82
Figura 30. Estrategias para sintetizar por vía enzimática TAGs estructurados del tipo MLM.....	83
Figura 31. Dos rutas diferentes para sintetizar TAGs del tipo CEC.....	84
Figura 32. Ruta enzimática para sintetizar TAGs estructurados del tipo COC.....	85
Figura 33. Estrategia para sintetizar TAGs estructurados del tipo CCE.....	86
Figura 34. Equipo de HPLC empleado para el análisis de lípidos neutros.....	100
Figura 35. Detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD).....	101
Figura 36. Detalle de la cámara de nebulización del ELSD.....	101
Figura 37. Cromatógrafo de gases de la marca Perkin-Elmer (Norwalk, CT, EEUU).....	103
Figura 38. Cromatógrafo de gases de la marca Agilent (Avondale, PA, EEUU). ....	104
Figura 39. Equipo de HPLC isocrático con detector UV/Vis.....	105
Figura 40. Reactor con tapa de 5 vías y manta térmica (Afora, España), agitador mecánico (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania), controlador para la temperatura (Selecta, Abrera, España) y criostato (Huber, Offenburg, Alemania) que condensa los vapores generados durante la reacción. ....	109
Figura 41. Detalle del reactor y la tapa de 5 vías (Afora, España). ....	110
Figura 42. Separación de las diferentes clases de lípidos neutros.....	116
Figura 43. Curvas de calibrado de las siguientes clases de lípidos: Escualeno; FFA; MEAG; Esteroles.....	121
Figura 44. Curvas de calibrado de las siguientes clases de lípidos: TAG; Éster de esterol; 1,3-DAG. ....	121
Figura 45. Curvas de calibrado de las siguientes clases de lípidos: $\alpha$ -tocoferol; MAG; NEAG; FAEE.....	122
Figura 46. Análisis por HPLC de un destilado de aceite de girasol.....	124
Figura 47. Análisis por HPLC de un aceite de hígado de tiburón.....	125
Figura 48. Diagrama de puntos que representa el factor de reducción de acidez en función de la presión y de la acidez del aceite de partida.....	130
Figura 49. Diagrama de puntos que representa el factor de reducción de acidez en función de la presión. ....	131

Figura 50. Rendimiento obtenido de aceite refinado mediante CC-SFE. ....	132
Figura 51. Diagrama que representa los gramos de ácido extraídos en función de la acidez del aceite de partida a 250 bares. ....	134
Figura 52. Diagrama que representa los gramos de ácido extraídos en función de la acidez del aceite de partida a 234 bares. ....	134
Figura 53. Diagrama que representa los gramos de ácido extraídos en función de la acidez del aceite de partida a 180 bares. ....	135
Figura 54. Resultados de pureza de escualeno obtenida en el separador S1. ....	138
Figura 55. Resultados de pureza de escualeno obtenida en el separador S2. ....	139
Figura 56. Resultados de rendimiento de escualeno obtenido en el separador S1 + separador S2. ....	142
Figura 57. Comparación entre el rendimiento experimental de escualeno (■) y composición experimental de escualeno (□) a 343 K, con la simulación del proceso de GC-EoS en el refinado (a), fase líquida del separador (b) y mezcla de estos productos (c). ....	150
Figura 58. Optimización del proceso CC-SFE ayudado por el diagrama de flujo del proceso considerado por el ordenador. ....	151
Figura 59. Variación del rendimiento y pureza de escualeno a 343 K y 180 bares con la relación S/F, según la predijo el modelo de GC-EoS. ....	153
Figura 60. Comparación entre concentraciones de tocoferol + fitoesterol (% en peso en el refinado) y recuperaciones obtenidas en las extracciones CC-SCCO <sub>2</sub> experimentales llevadas a cabo con los materiales de alimentación SODD original (- -Δ- -) y SODD etilado (—■—). ....	157
Figura 61. Variación de los rendimientos de esteroides obtenidos en el separador S1 con la densidad de CO <sub>2</sub> . ....	159
Figura 62. Equilibrio entre fases vapor-líquido para la mezcla binaria etiloleato + CO <sub>2</sub> [567]: (■) 40 °C; (▲) 50 °C; (●) 60 °C. ....	164
Figura 63. Comparación entre la composición obtenida en el refinado de FAEE (■), NEAG (O) y MEAG (Δ) y la calculada por el modelo GC-EoS (líneas continuas). ....	167
Figura 64. Representación esquemática de la reacción enzimática. ....	173
Figura 65. Transcurso en el tiempo de la reacción mediada por lipasa de transesterificación de CLAEE con el NEAG a partir del residuo insaponificable. Condiciones: 500 mg de residuo insaponificable, 818 mg de CLAEE, 10% en peso de Novozym 435, 55 °C, 300 rpm. Figuras A y C: con purga de nitrógeno; Figuras B y D: sin purga de nitrógeno Figuras A y B: —■— DEAG; —●— MEAG; ▼ NEAG. Figuras C y D: —◆— CLAEE. ....	176
Figura 66. Transcurso en el tiempo de la reacción mediada por lipasa de esterificación de CLA con el NEAG a partir del residuo insaponificable. Condiciones: 500 mg de residuo insaponificable, 818 mg de CLA, 10% en peso de Novozym 435, 55 °C, 300 rpm. Figura A: —■— DEAG; —●— MEAG; ▼ NEAG. Figura B: —◆— CLA. ....	178
Figura 67. Transcurso en el tiempo de la reacción mediada por lipasa de transesterificación de EPAEE con el NEAG a partir del residuo insaponificable. Condiciones: 500 mg de residuo insaponificable, 1000 mg de Incromega E7010, 10% en peso de Novozym 435, 55 °C, 300 rpm. Figura A: —■— DEAG; —●— MEAG; ▼ NEAG. Figura B: —◆— Incromega E7010. ....	179

Figura 68. Esquema de la planta piloto de extracción con fluidos supercríticos para muestras líquidas en columna en contracorriente.....	186
Figura 69. Planta piloto de extracción supercrítica en contracorriente para muestras líquidas....	188
Figura 70. Anillos Fenske utilizados como relleno en la columna de extracción.....	189
Figura 71. Detalle de un separador donde tiene lugar la descompresión del CO <sub>2</sub> .....	190
Figura 72. Panel de controladores TOHO para controlar las variables temperatura y presión de las diferentes partes del sistema.....	191
Figura 73. Sistema informático de control de procesos y adquisición de datos en tiempo real....	192
Figura 74. Bomba 1 utilizada para la introducción de CO <sub>2</sub> líquido (Dosapro Milton Roy, Francia). En primer plano se aprecia también la bomba para la introducción de modificador para los casos en los que se requiera su uso.....	193
Figura 75. Bomba 2 utilizada para la introducción de CO <sub>2</sub> líquido (Dosapro Milton Roy, Francia). .....	193
Figura 76. Bomba de alimentación de muestra líquida (Dosapro Milton Roy, Francia).....	194
Figura 77. Equilibrio vapor-líquido para el sistema metil oleato + CO <sub>2</sub> . Datos experimentales [575]: (◆) 313 K, (Δ) 323 K, (■) 333 K y (+) 343 K. Las líneas continuas representan las predicciones de GC-EoS.....	200
Figura 78. Solubilidad de escualeno (fracción molar, y <sub>sq</sub> ) en SC-CO <sub>2</sub> . Comparación entre los datos experimentales [573] a 313 K (●), 323 K (■) y 343 K (▲), con los cálculos de GC-EoS usando parámetros originales (••••••) y parámetros ajustados (—) en este trabajo.....	201
Figura 79. Coeficiente de equilibrio de escualeno (k <sub>sq</sub> ) en la mezcla con SC-CO <sub>2</sub> . Comparación entre las datos experimentales [573] a 313 K (●) y 333 K (■), con los cálculos del modelo GC-EoS, usando parámetros originales (••••••) y parámetros ajustados (—) en este trabajo.....	201
Figura 80. Fracciones molares experimentales [574] de escualeno en las fases de líquido (a) y vapor (b) (libres de CO <sub>2</sub> ) del sistema ternario CO <sub>2</sub> + escualeno + metiloleato, a diferentes temperaturas. Mezcla de alimentación (libre de CO <sub>2</sub> ): 64,5% moles de escualeno (símbolos rellenos) y 33,5% moles de escualeno (símbolos vacíos). Las líneas continuas representan las predicciones de GC-EoS.....	204

# BIBLIOGRAFÍA



## 13 Bibliografía.

1. **Mesa, M.D., y col.** *Lípidos como alimentos funcionales*, en Libro: *Lípidos como alimentos funcionales*, M. Juárez, y col., Editores. **2005**, FECYT. Madrid.
2. **Hasler, C.M.** *Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion*. Food Technology, **1998**. 52(11): p. 63-70.
3. **Huang, Y.-S.** *Lipids as Functional Foods*, en Libro: *Lipids as Functional Foods*, C.T. Hou y J.-F. Shaw, Editores. **2007**, CRC Press: Boca Raton, FL.
4. **Hara, K., y col.** *Dietary diacylglycerol-dependent reduction in serum triacylglycerol concentration in rats*. Ann Nutr Metab, **1993**. 37(4): p. 185-91.
5. **Murata, M., T. Ide, y K. Hara.** *Reciprocal responses to dietary diacylglycerol of hepatic enzymes of fatty acid synthesis and oxidation in the rat*. Br J Nutr, **1997**. 77(1): p. 107-121.
6. **Maki, K.C., y col.** *Consumption of diacylglycerol oil as part of a reduced-energy diet enhances loss of body weight and fat in comparison with consumption of a triacylglycerol control oil*. The American Journal of Clinical Nutrition, **2002**. 76(6): p. 1230-1236.
7. **Nagao, T., y col.** *Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial*. J Nutr, **2000**. 130(4): p. 792-7.
8. **Ostlund, R.E., Jr.** *Phytosterols in human nutrition*. Annu Rev Nutr, **2002**. 22: p. 533-49.
9. **Rozner, S. y N. Garti.** *The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols*. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, **2006**. 282-283: p. 435-456.
10. **Bosner, M.S., L.G. Lange, W.F. Stenson, y R.E. Ostlund, Jr.** *Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry*. J Lipid Res, **1999**. 40(2): p. 302-8.
11. **Kris-Etherton, P.M., y col.** *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. Am. J. Med., **2002**. 113: p. 71S-88S.
12. **Leveille, G., Sr. Consultant, Scientific and Regulatory Affairs CargillTM.** *Linking Biological Science with Food Technology*. **2002**.
13. **Ostlund, R.E., Jr.** *Phytosterols and cholesterol metabolism*. Curr Opin Lipidol, **2004**. 15(1): p. 37-41.
14. **Katan, M.B., y col.** *Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels*. Mayo Clin. Proc., **2003**. 78: p. 965-978.
15. **Nestel, P., y col.** *Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods*. Eur J Clin Nutr, **2001**. 55(12): p. 1084-90.
16. **Rukmini, C. y T.C. Raghuram.** *Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review*. J Am Coll Nutr, **1991**. 10(6): p. 593-601.
17. **Sugano, M. y E. Tsuji.** *Rice bran oil and cholesterol metabolism*. J Nutr, **1997**. 127(3): p. 521S-524S.
18. **Ntanios, F.Y. y G.S. Duchateau.** *A healthy diet rich in carotenoids is effective in maintaining normal blood carotenoid levels during the daily use of plant sterol-enriched spreads*. Int J Vitam Nutr Res, **2002**. 72(1): p. 32-9.
19. **Kinsella, J.E.** *Food components with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils*. Food-Technology, **1986**. 40(2) p. 89-97.
20. **Simopoulos, A.P.** *Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development*. **1991**. p. 438-463.
21. **Sardesai, V.M.** *Nutritional role of polyunsaturated fatty acids*. J Nutr Biochem, **1992**. 3: p. 154-166.
22. **Harris, W.S.** *Fish Oils Supplementation: Evidence for Health Benefits*. Cleveland Clinic Journal of Medicine, **2004**. 71(208-221).
23. **Fischer, S.** *Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans*. Adv Lipid Res, **1989**. 23: p. 169-98.

24. **Kremer, J.M., y col.** *Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects.* *Arthritis Rheum*, **1990**. 33(6): p. 810-20.
25. **Cleland, L.G., M.J. James, y S.M. Proudman.** *The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis.* *Drugs*, **2003**. 63(9): p. 845-53.
26. **De Caterina, R., y col.** *The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells.* *Arterioscler Thromb*, **1994**. 14(11): p. 1829-36.
27. **Almallah, Y.Z., y col.** *Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ.* *J Clin Immunol*, **2000**. 20(1): p. 68-76.
28. **Ehringer, W., D. Belcher, S.R. Wassall, y W. Stillwell.** *A comparison of the effects of linolenic (18:3 omega 3) and docosahexaenoic (22:6 omega 3) acids on phospholipid bilayers.* *Chem Phys Lipids*, **1990**. 54(2): p. 79-88.
29. **Hoffman, D.R., y col.** *Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long-chain polyunsaturated fatty acids on later visual development.* *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **2000**. 31(5): p. 540-53.
30. **Neuringer, M., G.J. Anderson, y W.E. Connor.** *The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain.* *Annu Rev Nutr*, **1988**. 8: p. 517-41.
31. **Morris, M.C., y col.** *Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease.* *Arch Neurol*, **2003**. 60(7): p. 940-6.
32. **Hardy, J.A.** *Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved?* *Curr Alzheimer Res*, **2006**. 3(1): p. 71-73.
33. **Hardy, J.A. y G.A. Higgins.** *Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade hypothesis.* *Science*, **1992**. 256(5054): p. 184-185.
34. **Lim, G.P., y col.** *A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model.* *J Neurosci*, **2005**. 25(12): p. 3032-40.
35. **Puskas, L.G., y col.** *Short-term administration of omega 3 fatty acids from fish oil results in increased transthyretin transcription in old rat hippocampus.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**. 100(4): p. 1580-5.
36. **Hibbelin, J.** *Fish consumption and major depression.* *Lancet*, **1998**. 351: p. 1213.
37. **Hibbelin, J.R. y N.J. Salem.** *Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy.* *Am J Clin Nutr*, **1995**. 62(1): p. 1-9.
38. **Chin, S., y col.** *Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens.* *Journal of food composition and analysis (J. food compos. anal.)*, **1992**. 5: p. 185-197.
39. **Parodi, P.W.** *Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents.* *J Nutr*, **1997**. 127(6): p. 1055-60.
40. **Griinari, J.M. y D. Bauman.** *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, ed. A. Press. Vol. vol 1. **1999**, Champaign.
41. **Kelly, M.L., y col.** *Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows.* *J Nutr*, **1998**. 128(5): p. 881-5.
42. **Kelly, M.L., y col.** *Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows.* *J Dairy Sci*, **1998**. 81(6): p. 1630-6.
43. **Rainer, L. y C.J. Heiss.** *Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition.* *J Am Diet Assoc*, **2004**. 104(6): p. 963-8, 1032.
44. **Pariza, M.W., Y. Park, y M.E. Cook.** *The biologically active isomers of conjugated linoleic acid.* *Prog Lipid Res*, **2001**. 40(4): p. 283-98.
45. **Whigham, L.D., M.E. Cook, y R.L. Atkinson.** *Conjugated linoleic acid: implications for human health.* *Pharmacol Res*, **2000**. 42: p. 503-510.
46. **Chujo, H., y col.** *Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells.* *Cancer Lett*, **2003**. 202(1): p. 81-7.

47. **Riserus, U., P. Arner, K. Brismar, y B. Vessby.** *Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome.* Diabetes Care, **2002**. 25(9): p. 1516-21.
48. **Ip, C., y col.** *Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats.* J Nutr, **1999**. 129(12): p. 2135-42.
49. **Liu, K.L. y M.A. Belury.** *Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE2 synthesis in murine keratinocytes.* Cancer Lett, **1998**. 127(1-2): p. 15-22.
50. **Sugano, M., I. Ikeda, K. Wakamatsu, y T. Oka.** *Influence of Korean pine (Pinus koraiensis)-seed oil containing cis-5,cis-9,cis-12-octadecatrienoic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism, eicosanoid production and blood pressure of rats.* Br J Nutr, **1994**. 72(5): p. 775-83.
51. **Chuang, L.T., y col.** *Inhibitory effect of conjugated linoleic acid on linoleic acid elongation in transformed yeast with human elongase.* Lipids, **2001**. 36(10): p. 1099-103.
52. **Chuang, L.T., y col.** *Effect of conjugated linoleic acid on fungal delta6-desaturase activity in a transformed yeast system.* Lipids, **2001**. 36(2): p. 139-43.
53. **Chuang, L.T., y col.** *Effect of conjugated linoleic acid on Delta-5 desaturase activity in yeast transformed with fungal Delta-5 desaturase gene.* Mol Cell Biochem, **2004**. 265(1-2): p. 11-8.
54. **Azain, M.J., y col.** *Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number.* J Nutr, **2000**. 130(6): p. 1548-54.
55. **DeLany, J.P. y D.B. West.** *Changes in body composition with conjugated linoleic acid.* J Am Coll Nutr, **2000**. 19(4): p. 487S-493S.
56. **Nagao, K., y col.** *The 10trans,12cis isomer of conjugated linoleic acid suppresses the development of hypertension in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats.* Biochem Biophys Res Commun, **2003**. 306(1): p. 134-8.
57. **Blankson, H., y col.** *Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans.* J Nutr, **2000**. 130(12): p. 2943-8.
58. **Mougios, V., y col.** *Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat.* J Nutr Biochem, **2001**. 12(10): p. 585-594.
59. **Riserus, U., L. Berglund, y B. Vessby.** *Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial.* Int J Obes Relat Metab Disord, **2001**. 25(8): p. 1129-35.
60. **Thom, E., J. Wadstein, y O. Gudmundsen.** *Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans.* J Int Med Res, **2001**. 29(5): p. 392-6.
61. **Mangold, H. y F. Paltauf.** *Ether Lipids.* Biochemical and Biomedical Aspects, **1983**.
62. **Kayama, M. y M. Mankura.** *Natural oleochemicals in marine fishes* International news on fats, oils and related materials **1998**. 9(8): p. 794-799.
63. **Pugliese, P.T., K. Jordan, H. Cederberg, y J. Brohult.** *Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil.* J Altern Complement Med, **1998**. 4(1): p. 87-99.
64. **Mangold, H. y N. Weber.** *Biosynthesis and biotransformation of ether lipids.* Lipids, **1987**. 22(11): p. 789-799.
65. **Benveniste, J. y B. Vargaftig.** *Platelet-activating factor: an ether lipid with biological activity.* Ether Lipids: Biochemical and Biomedical Aspects, **1983**: p. 356-373.
66. **Brohult, A., J. Brohult, y S. Brohult.** *Biochemical effects of alkoxyglycerols and their use in cancer therapy.* Acta Chem Scand, **1970**. 24(2): p. 730.
67. **Brohult, A., J. Brohult, S. Brohult, y I. Joelsson.** *Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix.* Acta Obstet Gynecol Scand, **1977**. 56(4): p. 441-8.
68. **Firshein, R.N.** *Method of treating cancer using alkylglycerols in conjunction with chemotherapy,* **1997**, United States Patent 6121245.
69. **Andreesen, R.** *Ether lipids in the therapy of cancer.* Prog Biochem Pharmacol, **1988**. 22: p. 118-31.

70. **Brohult, A., J. Brohult, y S. Brohult.** *Regression of tumour growth after administration of alkoxyglycerols.* Acta Obstet Gynecol Scand, **1978.** 57(1): p. 79-83.
71. **Brohult, A., J. Brohult, S. Brohult, y I. Joelsson.** *Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols.* Acta Obstet Gynecol Scand, **1986.** 65(7): p. 779-85.
72. **Heymans, F., y col.** *Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C.* FEBS Lett, **1987.** 218(1): p. 35-40.
73. **Daniel, L.W., G.W. Small, y J.D. Schmitt.** *Alkyl-linked diglycerides inhibit protein kinase C activation by diacylglycerols.* Biochem Biophys Res Commun, **1988.** 151: p. 291-297.
74. **Palmlblad, J., J. Samuelsson, y J. Brohult.** *Interactions between alkylglycerols and human neutrophil granulocytes.* Scand J Clin Lab Invest, **1990.** 50(4): p. 363-70.
75. **Yamamoto, N.** Macrophage activating factor from vitamin D binding protein, **1993,** United States Patent 5326749.
76. **Yamamoto, N., S. Homma, J.G. Haddad, y 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. 420-4.
77. **Yamamoto, N. y B.Z. Ngwenya.** *Activation of mouse peritoneal macrophages by lysophospholipids and ether derivatives of neutral lipids and phospholipids.* Cancer Res, **1987.** 47(8): p. 2008-13.
78. **Yamamoto, N., B.Z. Ngwenya, T.W. Sery, y R.A. Pieringer.** *Activation of macrophages by ether analogues of lysophospholipids.* Cancer Immunol Immunother, **1987.** 25(3): p. 185-92.
79. **Yamamoto, N., D.A. St Claire, Jr., S. Homma, y B.Z. Ngwenya.** *Activation of mouse macrophages by alkylglycerols, inflammation products of cancerous tissues.* Cancer Res, **1988.** 48(21): p. 6044-9.
80. **Homma, S., I. Millman, y N. Yamamoto.** *A serum factor for macrophage activation after in vitro dodecylglycerol treatment of mouse lymphocytes.* Immunol Cell Biol, **1990.** 68 ( Pt 2): p. 137-42.
81. **Homma, S. y N. Yamamoto.** *Activation process of macrophages after in vitro treatment of mouse lymphocytes with dodecylglycerol.* Clin Exp Immunol, **1990.** 79(2): p. 307-13.
82. **Berdel, W.E., y col.** *The influence of alkyllysophospholipids and lysophospholipids activated macrophages of tritiated thymidine uptake in cells of human urologic tumors.* J Natl Cancer Inst, **1982.** 66: p. 813.
83. **Berdel, W.E., y col.** *The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid-activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma.* Eur J Cancer, **1980.** 16(9): p. 1199-204.
84. **Modelell, M.L., y col.** *Disturbance of phospholipid metabolism during selective destruction of tumor cells induced by alkylphospholipids.* Cancer Res, **1979.** 38: p. 4681.
85. **Hallgren, B. y S. Larsson.** *The glyceryl ethers in man and cow.* Journal of Lipid Research, **1962.** 3: p. 39-43.
86. **Ngwenya, B.Z. y D.M. Foster.** *Enhancement of antibody production by lysophosphatidylcholine and alkylglycerol.* Proc Soc Exp Biol Med, **1991.** 196(1): p. 69-75.
87. **Yu, B.** Baby food with high immune reaction - comprises alkoxyglycerol in modified milk powder or weaning food, **1991,** KR9308102-B1.
88. **Hammond, J.L., y col.** *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.
89. **Hostetler, K.Y., y col.** *Alkylglycerol foscarnet analogs are active in vitro at submicromolar concentrations against a panel of drug-resistant strains of HIV-1.* in *7th Conference Retrovir Opportunistic Infect.* **2000.** San Francisco (California, USA).
90. **Hostetler, K.Y. y J.W. Mellors.** Treatment of drug-resistant human immunodeficiency virus infection, **2002,** United States Patent 20030207843.

91. **Hallgren, B., A. Niklasson, G. Stallberg, y H. Thorin.** *On the occurrence of 1-O-alkylglycerols and 1-O-(2-methoxyalkyl)glycerols in human colostrum, human milk, cow's milk, sheep's milk, human red bone marrow, red cells, blood plasma and a uterine carcinoma.* Acta Chem Scand B, **1974**. 28(9): p. 1029-34.
92. **Gopinath, D., y col.** *1-O-Alkylglycerol vesicles (Algosomes): their formation and characterization.* Int J Pharm, **2002**. 246(1-2): p. 187-97.
93. **Legrand, A.** *1-O-alkylglycerols for pharmaceutical or veterinary use for preserving and/or improving sperm,* **1999**, United States Patent 6624191.
94. **Mitre, R., y col.** *Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm.* Theriogenology, **2004**. 62(8): p. 1557-66.
95. **Linman, J.W.** *Hemopoietic effects of glyceryl ethers. III. Inactivity of selachyl alcohol.* Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine, **1960**. 104: p. 703-706.
96. **Catchpole, O.J., J.C. Von Kamp, y J.B. Grey.** *Extraction of squalene from shark liver oil in a packed column using supercritical carbon dioxide.* Ind. Eng. Chem. Res., **1997**. 36: p. 4318.
97. **Hernández-Pérez, M., R.M. Rabanal, P.J. Pascual, y A. Brito.** *Squalene content in livers from deep-sea sharks caught in Canary Island waters.* Marine and Freshwater Research, **1998**. 48(7): p. 573-576.
98. **He, H.-P., Y. Cai, S. Mei, y H. Corke.** *Extraction and Purification of Squalene from Amaranthus Grain* J. Agric. Food Chem., **2002**. 50 (2): p. 368-372.
99. **He, H.-P., H. Corke, y J.-G. Cai.** *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oil and Squalene from Amaranthus Grain.* J. Agric. Food Chem., **2003**. 51(27): p. 7921-7925.
100. **Taylor, J.P.** *Selective extraction of squalene from the other components of dee-sea shark liver oils using: (A) crystallisation of urea complexes; (B) Liquid-liquid solvent extraction.,* in Tesis Doctoral. **1998**.
101. **Laden, B.P. y T.D. Porter.** *Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls.* Journal Lipid Research, **2001**. 42: p. 235-240.
102. **Nagumo, A., T. Kamei, J. Sakakibara, y T. Ono.** *Purification and characterization of recombinant squalene epoxidase.* Journal of Lipid Research, **1995**. 36: p. 1489-1497.
103. **Nakamura, Y., y col.** *Transcriptional regulation of squalene epoxidase by sterols and inhibitors in HeLa cells.* Journal of Biological Chemistry, **1996**. 271: p. 8053 - 8056.
104. **Saudek, C.D., B.M. Frier, y G.C.K. Liu.** *Plasma squalene: lipoprotein distribution and kinetic analysis.* Journal of Lipid Research, **1978**. 19: p. 827-835.
105. **Singh, D.K., V. Mokashi, C.L. Elmore, y T.D. Porter.** *Phosphorylation of supernatant protein factor enhances its ability to stimulate microsomal squalene monooxygenase.* Journal of Biological Chemistry, **2003**. 278: p. 5646-5651.
106. **Smith, T.J., y col.** *Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NKK)-induced lung tumorigenesis and DNA oxidation by dietary squalene.* Proceedings of the American Association for Cancer Research, **1999**. 40: p. 262.
107. **Smith, T.J., y col.** *Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene.* Carcinogenesis, **1998**. 19: p. 703-706.
108. **Kelly, G.S.** *Squalene and its potential clinical uses.* Alternative Med. Rev., **1999**. 4: p. 29-36.
109. **Newmark, H.L.** *Squalene, olive oil, and cancer risk: review.* Annals of the New York Academy of Sciences, **1999**. 889: p. 193-203.
110. **Rao, C.V., H.L. Newmark, y B.S. Reddy.** *Chemopreventive effect of squalene on colon cancer.* Carcinogenesis, **1998**. 19: p. 287-290.
111. **Smith, T.J.** *Squalene: potential chemopreventive agent.* Expert Opin Investig Drugs, **2000**. 9: p. 1841 - 8.
112. **Van Duuren, B.L. y B.M. Goldsmith.** *Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis.* J. Natl. Cancer Inst., **1976**. 56: p. 1237-1242.

113. **Yamaguchi, T., M. Nakagawa, y K. Hidaka.** *Potential by squalene of antitumor effect of 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidiny)methyl]-1-(2-chloroethyl)-nitrosourea in a murine tumor system.* Japanese Journal Cancer Research, **1985**. 76: p. 1021-1026.
114. **Budiyanto, A., y col.** *Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice.* Carcinogenesis, **2000**. 21: p. 2085-2090.
115. **Kohno, Y., y col.** *Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol.* Biochemical & Biophysical Research Coimmunications **1995**. 1256: p. 52-56.
116. **Evans, H.M. y K.S. Bishop.** *On the Existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction.* Science, **1922**. 56: p. 650-651.
117. **Dunford, N.T.** *Health benefits and processing of lipid-based nutritional.* Food-technology, **2001**. 55(11): p. 38-44.
118. **Azzi, A. y A. Stocker.** *Vitamin E: Non-antioxidant roles.* Progress Lipid Res., **2000**. 39: p. 231-255.
119. **Kamal-Eldin, A. y L.-Å. Appelqvist.** *The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols.* Lipids, **1996**. 31(7): p. 671-701.
120. **Jensen, L.B., I.M. Skovgaard, y L.H. Skibsted.** *The antioxidative activity of RRR- $\alpha$ -tocopherol versus RRR- $\delta$ -tocopherol in combination with ascorbyl palmitate in cooked, minced turkey.* Food Chemistry, **1996**. 4(56): p. 347.
121. **Carpenter, A.P.** *Determination of Tocopherols in Vegetable Oils.* JAOCS, **1979**. 9: p. 668.
122. **Eitenmille, R.R.** *Vitamin E content of fats and oils-nutritional implications.* Food Technology, **1997**. 5(51): p. 78.
123. **Speek, A.J., J. Schrijver, y W.H.P. Schreurs.** *Vitamin E composition of some seeds oils as determined by HPLC with fluorometric detection.* Journal of Food Science, **1985**. 50: p. 121.
124. **Alessi, P., A. Cortesi, y I. Kikic.** *Characterization of tocopherols using inverse chromatographic data.* in *Fifth Conference on Supercritical Fluids and their Applications.* **1999**.
125. **Woerfel, J.B.** *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization.* **1995**, IL, USA: AOCS Press.
126. **Fryer, M.J.** *The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (alpha-tocopherol).* Plant-Cell-Environ, **1992**. 15(4): p. 381-392.
127. **Tani, Y. y T. Haruhiko.** *Screening for tocopherol-producing microorganisms and  $\alpha$ -tocopherol production by Euglena gracilis Z* Agricultural and Biological Chemistry **1989**. 53 (2): p. 305-12.
128. **Podhaisky, H.P. y W. Wohlrab.** *Is the photoprotective effect of vitamin E based on its antioxidative capacity?* J Dermatol Sci, **2002**. 28(1): p. 84-6.
129. **Seth, R.K. y S. Kharb.** *Protective function of alpha-tocopherol against the process of cataractogenesis in humans.* Ann Nutr Metab, **1999**. 43(5): p. 286-9.
130. **Brigelius-Flohe, R. y M.G. Traber.** *Vitamin E: function and metabolism.* Faseb J, **1999**. 13(10): p. 1145-55.
131. **Chow, C.K.** *Handbook of vitamins*, ed. S.U. Rucker RB, McCormick DB, Machlin y e. LJ. **2001**, New York and Basel: Marcel Dekker.
132. **Traber, M.G. y L. Packer.** *Vitamin E: Beyond antioxidant function.* Am. J. Clin. Nutr., **1995**. 62: p. 1501S-9S.
133. **Giese, J.** *Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation.* Food Technology, **1996**. 50(11): p. 73-81.
134. **Alberts, D.S., y col.** *Disposition and metabolism of topically administered alpha-tocopherol acetate: a common ingredient of commercially available sunscreens and cosmetics.* Nutr Cancer, **1996**. 26(2): p. 193-201.

135. **Scalia, S., y col.** *Assay of vitamin A palmitate and vitamin E acetate in cosmetic creams and lotions by supercritical fluid extraction and HPLC.* J Pharm Biomed Anal, **1995**. 13(3): p. 273-7.
136. **Faustman, C., W.K. Chan, D.M. Schaefer, y A. Havens.** *Beef color update: the role for vitamin E.* Journal of Animal Science **1998**. 76(4): p. 1019-1026.
137. **Kennedy, O.B., B.J. Stewart-Knox, P.C. Mitchell, y D.I. Thurnham.** *Vitamin E supplementation, cereal feed type and consumer sensory perceptions of poultry meat quality.* British Journal of Nutrition, **2007**. 93: p. 333-338.
138. **Institute of Medicine Food and Nutrition Board.** *Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.* National Academy Press. **2000**, Washington, DC.
139. **Theriault, A., y col.** *Tocotrienol: A review of its therapeutic potential.* Clin. Biochem., **1999**. 32(5): p. 309-319.
140. **Leigh, S. y M.L.S. Leigh.** *Pharmaceutical compositions and their uses,* **1999**, PCT Appl. WO, 99/44642.
141. **Hanin, I.** *Commercially available "Lecithin". Proposed guidelines for nomenclature and methodology.,* en Libro: *Commercially available "Lecithin". Proposed guidelines for nomenclature and methodology.,* A. Barbeau, y col., Editores. **1979**, Raven Press: New York. p. 443-445.
142. **Jorissen, B.L., y col.** *The influence of soy-derived phosphatidylserine on cognition in age-associated memory impairment.* Nutr Neuroscience, **2001**. 4(2): p. 121-34.
143. **Ngwenya, B.Z. y N. Yamamoto.** *Effects of inflammation products on immune systems. Lysophosphatidylcholine stimulates macrophages.* Cancer Immunol Immunother, **1986**. 21(3): p. 174-82.
144. **Li, T.S.C.** *Sea buckthorn: New crop opportunity,* en Libro: *Sea buckthorn: New crop opportunity,* Janeck, Editor. **1999**.
145. **Keys, A., A. Menotti, y M.J. Karvonen.** *The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study.* Am J Epidemiol, **1986**. 124: p. 903-915.
146. **Dietschy, J.M.** *Dietary Fatty Acids and the Regulation of Plasma Low Density Lipoprotein Cholesterol Concentrations* The Journal of Nutrition, **1998**. 128(2): p. 444S-448S.
147. **Kris-Etherton, P.M., y col.** *High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations.* Am J Clin Nutr **1999**. 70: p. 1009-15.
148. **Parthasarathy, S., y col.** *Low Density Lipoprotein Rich in Oleic Acid is Protected Against Oxidative Modification: Implications for Dietary Prevention of Atherosclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1990**. 87(10): p. 3894-3898.
149. **Oomah, B.D. y G. Mazza.** *Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops.* Trends Food Sci. Technol., **1999**. 10: p. 193-198.
150. **Johnston, P.V.** *Flaxseed oil and cancer:  $\alpha$ -Linolenic acid and carcinogenesis,* en Libro: *Flaxseed oil and cancer:  $\alpha$ -Linolenic acid and carcinogenesis,* S.C. Cunnane y L.U. Thompson, Editores. **1995**, AOCS Press, Champaign, Ill. p. 207-218.
151. **Cunnane, S.C.** *Metabolism and function of:  $\alpha$ -Linolenic acid in humans,* en Libro: *Metabolism and function of:  $\alpha$ -Linolenic acid in humans,* S.C. Cunnane y L.U. Thompson, Editores. **1995**, AOCS Press, Champaign, Ill.
152. **Ziboh, V.A., C.C. Miller, y Y. Cho.** *Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites.* Am J Clin Nutr, **2000**. 71(1 Suppl): p. 361S-6S.
153. **DeLuca, P., y col.** *Effects of gammalinolenic acid on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha secretion by stimulated human peripheral blood monocytes: studies in vitro and in vivo.* J Investig Med, **1999**. 47(5): p. 246-50.
154. **Brzeski, M., R. Madhok, y H.A. Capell.** *Evening primrose oil in patients with rheumatoid arthritis and side-effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs.* Br J Rheumatol, **1991**. 30(5): p. 370-2.

155. **Bakshi, A., y col.** *Gamma-linolenic acid therapy of human gliomas.* Nutrition, **2003**. 19(4): p. 305-9.
156. **Gillis, R.C., B.J. Daley, B.L. Enderson, y M.D. Karlstad.** *Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell death in anti-inflammatory fatty acid-treated HL-60 cells.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, **2004**. 28(5): p. 308-14.
157. **Calder, P.C. y R.B. Zurier.** *Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, **2001**. 4(2): p. 115-21.
158. **Ziboh, V.A., y col.** *Suppression of leukotriene B4 generation by ex-vivo neutrophils isolated from asthma patients on dietary supplementation with gammalinolenic acid-containing borage oil: possible implication in asthma.* Clin Dev Immunol, **2004**. 11(1): p. 13-21.
159. **Jamal, G.A. y H. Carmichael.** *The effect of gamma-linolenic acid on human diabetic peripheral neuropathy: a double-blind placebo-controlled trial.* Diabet Med, **1990**. 7(4): p. 319-23.
160. **Keen, H., y col.** *Treatment of diabetic neuropathy with gamma-linolenic acid. The gamma-Linolenic Acid Multicenter Trial Group.* Diabetes Care, **1993**. 16(1): p. 8-15.
161. **Matsuo, N., y col.** *Effects of gamma-linolenic acid and its positional isomer pinolenic acid on immune parameters of brown-Norway rats.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, **1996**. 55(4): p. 223-9.
162. **Cain, F., P. Parmar, J. Powell, y J. Rogers.** Compositions containing pinolenic acid and its use as a health component, **2002**, 6479070, Unilever Patent Holdings.
163. **Charlesworth, J.M.** *Evaporative Analyzer as a Mass Detector for Liquid Chromatography.* Analytical Chemistry, **1978**. 50: p. 1414-1420.
164. **Becart, J., C. Chavalier, y J.P. Viese.** J. High Resol. Chromatogr., **1990**. 13.
165. **Christie, W.E.** *Advances in Lipid Methodology - One*, ed. T.O. Press. **1992**, Ayr, Scotland.
166. **El Handy, A. y W. Christie.** J. High Resol. Chromatogr., **1993**. 16: p. 55.
167. **Elfman-Börjesson, I. y M. Härröd.** *Analysis of non-polar lipids by HPLC on a diol column.* Journal of High Resolution Chromatography, **1997**. 20(9): p. 516 - 518.
168. **Schaefer, A., T. Kuchler, T.J. Simat, y H. Steinhart.** *Migration of lubricants from food packagings: Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection* Journal of Chromatography A **2003**. 1017(1-2): p. 107-116.
169. **Moreau, R., K. Kohout, y V. Singh.** *Temperature-enhanced alumina HPLC method for the analysis of wax esters, sterol esters, and methyl esters.* Lipids, **2002**. 37(12): p. 1201-1204.
170. **Nordbäck, J. y E. Lundberg.** *High resolution separation of non-polar lipid classes by HPLC-ELSD using alumina as stationary phase* Journal of high resolution chromatography, **1999**. 22(9): p. 483-486.
171. **Luque de Castro, M.D., M. Valcárcel, y M.T. Tena.** *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico.* **1993**: Reverté.
172. **Peng, D.Y. y D.B. Robinson.** *A new two-constant equation of state.* Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals, **1976**. 15(1).
173. **De Fillipi, R.P., V.J. Krukons, R.J. Robey, y M. Modell.** *Supercritical fluid regeneration of activated carbon for adsorption of pesticides*, en Libro: *Supercritical fluid regeneration of activated carbon for adsorption of pesticides*, M.A.y.K. Mc Hugh, V.A., Eds., Editor. **1980**, Butterworth-Heinemann: Stoneham, MA.
174. **Mukhopadhyay, M.** *Natural Extracts using Supercritical Carbon Dioxide.* **2000**, Boca Raton, Florida: CRC Press.
175. **Moyler, D.A.** *Extraction of essential oils with carbon dioxide.* Flavour and Fragrance Journal, **1993**. 8(5): p. 235-247.
176. **Moyler, D.A.** *Extraction of flavours and fragrances with compressed CO<sub>2</sub>*, en Libro: *Extraction of flavours and fragrances with compressed CO<sub>2</sub>*, M.B.K.y.T.R.B. (Eds.), Editor. **1993**, Blackie Academic & Professional: Glasgow, UK. p. 155-156.



177. **Rizvi, S.S.H.** *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*. 1<sup>a</sup> Ed. ed. **1994**, London, UK: Blackie Academic & Professional.
178. **Luque de Castro, M.D. y M.M. Jiménez-Carmona.** *Where is supercritical fluid extraction going?* TrAC Trends in Analytical Chemistry, **2000**. 19(4): p. 223-228.
179. **King, M.B., O.J. Catchpole, y B. T.R.** *Estimation of separation cost*, en Libro: *Estimation of separation cost*, M.B.K.y.T.R.B. Eds., Editor. **1993**, Blackie Academic & Professional. p. 299.
180. **King, M.B. y O.J. Catchpole.** *Physico-chemical data required for the dsign of near-critical fluid extraction process*, en Libro: *Physico-chemical data required for the dsign of near-critical fluid extraction process*, M.B. King y T.R. Bott, Editores. **1993**, Blackie Academic Profesional: London, UK.
181. **Reglero, G., F.J. Señoráns, y E. Ibanez.** *Supercritical Fluid Extraction: An Alternative to Isolating Natural Food Preservatives*, en Libro: *Supercritical Fluid Extraction: An Alternative to Isolating Natural Food Preservatives*, G.V. Barbosa-Cánovas, y col., Editores. **2005**, CRC Press: Boca Ratón, FL. p. 539-553.
182. **Christov, M. y R. Dohrn.** *High-pressure fluid phase equilibria - Experimental methods and systems investigated (1994-1999)*. Fluid Phase Equilibria, **2002**. 202: p. 153-218.
183. **Coutsikos, P., K. Magoulas, y G.M. Kontogeorgis.** *Prediction of Solid-Gas Equilibria with the Peng-Robinson Equation of State*. J. of Supercritical Fluids, **2003**. 25: p. 197-212.
184. **Guclu-Ustundag, O. y F. Temelli.** *Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide*. The Journal of Supercritical Fluids, **2004**. 31(3): p. 235-253.
185. **Güçlü-Üstündag, Ö. y F. Temelli.** *Solubility behavior of ternary systems of lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects*. The Journal of supercritical fluids, **2005**. 36(1): p. 1-15.
186. **Li, Q., y col.** *Solubility of solid solutes in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents*. Fluid Phase Equilibria, **2003**. 207: p. 183-192.
187. **Walsh, J.M., G.D. Ikonou, y M.D. Donohue.** *Supercritical phase behavior: the entrainer effect*. Fluid Phase Equilibria, **1987**. 33: p. 295-314.
188. **Skjold-Jørgensen, S.** *Gas solubility calculations. II: Application of a new group — contribution equation of state*. Fluid phase equilibria, **1984**. 16: p. 317-351.
189. **Skjold-Jørgensen, S.** *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*. Ind. Eng. Chem. Res., **1988**. 27: p. 110-118.
190. **Espinosa, S., G.M. Foco, A. Bermúdez, y T. Fornari.** *Revision and extension of the group contribution equation of state to new solvent groups and higher molecular weight alkanes*. Fluid Phase Equilibria, **2000**. 172: p. 129-143.
191. **Pereda, S., S.B. Bottini, y E.A. Brignole.** *Gas-liquid reactions under supercritical conditions - phase equilibria and thermodynamic modeling*. Fluid Phase Equilibria, **2002**. 194-197(493-499).
192. **Pusch, J. y J. Schmelzer.** *Extension of the group-contribution equation of state parameter matrix for the prediction of phase equilibria containing argon, ammonia, propene and other alkenes*. Ber. Bunsenges, Phys Chem., **1993**. 97(4): p. 597-603.
193. **Schmelzer, J., S. O. Obst, K. Sühnel, y K. Quitzsch.** *Phasengleichgewichte in phenolhaltigen Medellsystemen*. Chem. Tech., **1991**. 43: p. 261-265.
194. **Fornari, T.** *Revision and summary of the group contribution equation of state parameter table: application to edible oil constituents*. Fluid Phase Equilibria, **2007**. 262(1-2): p. 187-209.
195. **Brunetti, L., y col.** *Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **1989**. 66(2): p. 209-217.
196. **Ayorinde, F.O. y M. Hassan.** *Deacidification of vegetable oils*, **1995**, United States Patent and Trademark Office Granted Patent, US5414100.

197. **Reverchon, E., M. Poletto, L. Osséo, y M. Somma.** *Hexane elimination from soybean oil by continuous packed tower processing with supercritical CO<sub>2</sub>*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(1): p. 9-14.
198. **Roselius, W., O. Vitzthum, y P. Hubert.** Decaffeinated coffee, **1974**, U.S. Patent, 3843824.
199. **Zosel, K.** Caffeine recovery, **1974**, United-States-Patent USA, 3805619.
200. **Del Valle, J.M. y J.M. Aguilera.** *Review: High pressure CO<sub>2</sub> extraction. Fundamentals and applications in the food industry.* Food Science Technology International, **1999**. 5: p. 1-24.
201. **Hannay, J.B. y H. J.** *On the solubility of solids in gases.* Proceedings of the Royal Society (London), **1879**. 29: p. 324-326.
202. **Gehrig, M. y J. Schulmeyr.** Process for decaffeination of black tea. Verfahren zur Entcaffeinierung von schwarzem Tee, **1997**, R. Hopfenextraktion HVG Barth, 85283 Wolnzach, Germany, German Federal Republic Patent Application, Germany, DE 19524481.
203. **Chang, C.J., K.L. Chiu, Y.L. Chen, y C.Y. Chang.** *Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction - antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins* Food Chemistry, **2000**. 68(1): p. 109-113(5).
204. **Lin, C.M. y Y.H. Chu.** *Effect of supercritical carbon dioxide extraction on caffeine, polyphenol, turbidity and color of jasmine tea infusion.* Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science, **2000**. 38: p. 157-163.
205. **Saldana, M.D., C. Zetzl, R.S. Mohamed, y G. Brunner.** *Extraction of methylxanthines from guarana seeds, mate leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol.* J Agric Food Chem, **2002**. 50(17): p. 4820-6.
206. **Adda, J. y J.L. Lorne.** Process for extraction of volatiles with supercritical CO<sub>2</sub>, and the compounds so obtained, **1989**, French Patent Application, France, FR 2 629 735 A1, FR 88-04765 (19880411).
207. **Williams, L.A.** *Perspectives on flavours.* World of Food Ingredients, **2002**. Oct / Nov: p. 42-44.
208. **Yao, J., N. M.G., y A. Chandra.** *Supercritical carbon dioxide extraction of Scotch Bonnet (Capsicum annuum) and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1994**. 42: p. 1303-1305.
209. **Barth, M.M., C. Zhou, K.M. Kute, y G.A. Rosenthal.** *Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (Daucus carota L.) tissue.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1995**. 43: p. 2876-2878.
210. **Coenen, H. y R. Hagen.** *Natural food colour from paprika by gas extraction.* Natuerlicher Farbstoff aus Paprika durch Gasextraktion, **1983**. 83: p. 164-170.
211. **Rybak, M.E., E.M. Calvey, y J.M. Harnly.** *Quantitative determination of allicin in garlic supercritical fluid extraction and standard addition of alliin.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2004**. 52: p. 682-687.
212. **Cavero, S.** *Obtención de extractos de plantas aromáticas mediante fluidos subcríticos y supercríticos: caracterización química y funcional,* en *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. **2003**, Universidad Autónoma de Madrid: Madrid. p. 254.
213. **Zhang-Rui, Xu-Yaqin, y Shi-Yang.** *The extracting technology of flavonoids compounds.* Food and Machinery, **2003**. 1: p. 21-22.
214. **Gamse, T. y R. Marr.** *SFC extraction in industry.* in *Secon European School on Industrial Applications of Supercritical State Fluids Technologies*. **2001**. Barcelona.
215. **Ruiz, A.** *Diseño de procesos alimentarios basados en la tecnología de fluidos supercríticos: extracción en contracorriente y cromatografía preparativa.* **2004**. Universidad Autónoma de Madrid.
216. **Heinz, V. y D.W. Knorr.** *Inactivation of Bacillus subtilis endospores by ultra-high-pressure in combination with other treatments.* in *IFT Annual Meeting 1995*. **1995**.

217. **Berry, D.** *New food solutions from extrusion*. Prepared Foods, **2000**. 169: p. 67-72.
218. **Coleman, K., R. Boutant, y F. Verillon.** *Practical aspects of preparative supercritical fluid chromatography*. **1999**, UK: Gordon & Breach Science Publishers.
219. **Alkio, M., C. Gonzalez, M. Jäntti, y O. Aaltonen.** *Purification of polyunsaturated fatty acid esters from tuna oil with supercritical fluid chromatography*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(3): p. 315-321.
220. **Choo, Y., y col.** *Separation of crude palm oil components by semipreparative supercritical fluid chromatography*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(4): p. 523-525.
221. **Lee, T.W. y C.I. Hastilow.** *Quantitative determination of triacylglycerol profile of structured lipid by capillary supercritical fluid chromatography and high-temperature gas chromatograph*. Journal of the American Oil Chemists Society, **1999**. 76: p. 1405-1413.
222. **Sandra, P., y col.** *Supercritical Fluid Chromatography*, en Libro: *Supercritical Fluid Chromatography*, R.M. Smith, Editor. **1988**, The Royal Society of Chemistry: London, UK. p. 137.
223. **Staby, A., C. Borch-Jensen, S. Balchen, y J. Mollerup.** *Supercritical fluid chromatographic analysis of fish oils*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **1994**. 71(4): p. 355-359.
224. **Andrikopoulos, N.K.** *Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification*. Food Reviews International, **2002**(18): p. 71-102.
225. **Lesellier, E.** *Analysis of non-saponifiable lipids by super-/subcritical-fluid chromatography*. Journal of Chromatography A, **2001**. 936(1-2): p. 201-214.
226. **Smith, R.M., M. Hyytiäinen, A.V. Felipe, y P.M. Morris.** *High resolution packed column supercritical fluid chromatography of fatty acid methyl esters*. Journal of Separation Science, **2001**. 24: p. 208-212.
227. **Señoráns, F.J. y E. Ibañez.** *Analysis of fatty acids in foods by supercritical fluid chromatography*. Analytica Chimica Acta, **2002**. 465: p. 131-144.
228. **Ibañez, E., J. Palacios, y G. Reglero.** *Analysis of tocopherols by on-line coupling supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography*. Journal Microcolumn Separation, **1999**. 11: p. 605-611.
229. **Moreno-Castilla, C. y F.J. Maldonado-Hodar.** *Carbon aerogels for catalysis applications: An overview*. Carbon, **2005**. 43(3): p. 455-465.
230. **Maury, S., P. Buisson, A. Perrard, y A.C. Pierre.** *Influence of the sol-gel chemistry on the activity of a lipase encapsulated in a silica aerogel*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2004**. 29(1): p. 133-148.
231. **Ranjit, T. y B.G. Ram.** *Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process*. International Journal of Pharmaceutics, **2006**. 308(1): p. 190-199.
232. **Catchpole, O.J., J.B. Grey, K.A. Mitchell, y J.S. Lan.** *Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture*. The Journal of Supercritical Fluids, **2004**. 29(1): p. 97-106.
233. **Ozge Guney, A.A.** *Synthesis of controlled-release products in supercritical medium*. AIChE Journal, **2002**. 48(4): p. 856-866.
234. **Wang, Y., R. Pfeffer, R. Dave, y T. New Jersey Institute Of.** *Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical antisolvent process*, **2004**, EP espacenet, United States, PCTUS04010645 / WO04091571.
235. **Wang, Y., y col.** *The application of a supercritical antisolvent process for sustained drug delivery*. Powder Technology, **2006**. 164(2): p. 94-102.
236. **Subramaniam, B. y M.A. McHugh.** *Reactions in Supercritical Fluids-A Review*. Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. , **1986**. 25: p. 1-12.

237. **King, J., R. Holliday, G. List, y 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.
238. **Kusdiana, D. y S. Saka.** *Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol.* Fuel, **2001**. 80(5): p. 693-698.
239. **He, H., T. Wang, y S. Zhu.** *Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process.* Fuel, **2007**. 86(3): p. 442-447.
240. **Aaltonen, O. y R. Markku.** *Biocatalysis in supercritical carbon dioxide* Chemtechnology, **1991**. 21(4): p. 240-248.
241. **Hammond, D.A., M. Karel, A.M. Klibanov, y V.J. Krukonis.** *Enzymatic reactions in supercritical gases.* Applied biochemistry and biotechnology, **1985**. 11(5): p. 393-400
242. **Nakamura, K.** *Biochemical reactions in supercritical fluids.* Trends Biotechnol, **1990**. 8: p. 288-292.
243. **Nakamura, K., Y.M. Chi, Y. Yamada, y T. Yano.** *Lipase activity and stability in supercritical carbon dioxide.* Chemical Engineering Communications, **1986**. 45(1): p. 207-212.
244. **Randolph, T.W., H.W. Blanch, J.M. Prausnitz, y C.R. Wilke.** *Enzymatic catalysis in a supercritical fluid.* Biotechnology Letters, **1985**. 7(5): p. 325-328.
245. **Chrisochou, A. y K. Schaber.** *Design of a supercritical fluid extraction process for separating mixtures incurred in enzyme-catalyzed reactions.* Chemical Engineering and Processing, **1996**. 35(4): p. 271-282.
246. **Jackson, M. y J. King.** *Methanolysis of seed oils in flowing supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(3): p. 353-356.
247. **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 zelandia. .
248. **Brunner, G.** *Fractionation of fats with supercritical carbon dioxide.* European Journal of Lipid Science and Technology, **2000**. 102: p. 240-245.
249. **Molero Gómez, A. y E. Martínez 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.
250. **Friedrich, J.P. y G.R. List.** *Characterization of soybean oil extracted by supercritical carbon dioxide and hexane.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, **1982**. 30: p. 192-193.
251. **Díaz-Reinoso, B., A. Moure, H. Domínguez, y J.C. Parajó.** *Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity* J. Agric. Food Chem. , **2006**. 54(7): p. 2441 -2469.
252. **Crowe, T., T. Crowe, L. Johnson, y P. White.** *Impact of extraction method on yield of lipid oxidation products from oxidized and unoxidized walnuts.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(5): p. 453-456.
253. **Crowe, T. y P. White.** *Oxidation, flavor, and texture of walnuts reduced in fat content by supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2003**. 80(6): p. 569-574.
254. **Crowe, T. y P. White.** *Oxidative stability of walnut oils extracted with supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2003**. 80(6): p. 575-578.
255. **Calvo, L., M. Cocero, y 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.
256. **Cheung, P.C.K., A.Y.H. Leung, y P.O.J. Ang.** *Comparison of Supercritical Carbon Dioxide and Soxhlet Extraction of Lipids from a Brown Seaweed, Sargassum hemiphyllum (Turn.) C. Ag.* J. Agric. Food Chem., **1998**. 46 (10): p. 4228-4232.

257. **Díaz-Maroto, M.C., I.J. Díaz-Maroto, E. Sánchez-Palomo, y M.S. Pérez-Coello.** *Volatile Components and Key Odorants of Fennel (Foeniculum vulgare Mill.) and Thyme (Thymus vulgaris L.) Oil Extracts Obtained by Simultaneous Distillation-Extraction and Supercritical Fluid Extraction* J. Agric. Food Chem., **2005**. 53(13): p. 5385-5389.
258. **Szulczewska-Remi, A., y col.** *Preparation of tocochromanol concentrate from red plum oil.* **2005**. p. 112-123.
259. **Lau, H.L.N., Y. Choo, A. Ma, y C. Chuah.** *Quality of residual oil from palm-pressed mesocarp fiber (Elaeis guineensis) using supercritical CO<sub>2</sub> with and without ethanol.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2006**. 83(10): p. 893-898.
260. **Lau, H.L.N., Y.M. Choo, A.N. Ma, y C.H. Chuah.** *Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of palm oil (Elaeis Guineensis).* **2006**. p. 210-221.
261. **Lim, C., Z. Manan, y M. Sarmidi.** *Simulation modeling of the phase behavior of palm oil-supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2003**. 80(11): p. 1147-1156.
262. **Ge, Y., y col.** *Extraction of Natural Vitamin E from Wheat Germ by Supercritical Carbon Dioxide.* J. Agric. Food Chem., **2002**. 50 (4): p. 685 -689.
263. **Panfili, G., L. Cinquanta, A. Fratianni, y R. Cubadda.** *Extraction of wheat germ oil by supercritical CO<sub>2</sub>: Oil and defatted cake characterization.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2003**. 80(2): p. 157-161.
264. **Salgin, U., A. Çalimli, y B. Zühtü Uysal.** *Supercritical fluid extraction of jojoba oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2004**. 81(3): p. 293-296.
265. **De Lucas, A., J. Rincón, y I. Gracia.** *Influence of operating variables on yield and quality parameters of olive husk oil extracted with supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(3): p. 237-243.
266. **De Lucas, A., J. Rincón, y I. Gracia.** *Influence of operation variables on quality parameters of olive husk oil extracted with CO<sub>2</sub>: Three-step sequential extraction.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2003**. 80(2): p. 181-188.
267. **Eller, F. y S. Taylor.** *Pressurized Fluids for Extraction of Essential Oils from Juniperus Virginiana.* Journal of Agricultural and Food Chemistry., **2004**. 52(8): p. 2335-2338.
268. **Hansen, S. y W. Artz.** *Supercritical fluid fractionation of thermally oxidized canola oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1994**. 71(6): p. 615-618.
269. **Osséo, L., G. Caputo, I. Gracia, y E. Reverchon.** *Continuous fractionation of used frying oil by supercritical CO<sub>2</sub>.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2004**. 81(9): p. 879-885.
270. **Hurtado-Benavides, A.M., F.J. Senorans, E. Ibanez, y G. Reglero.** *Countercurrent packed column supercritical CO<sub>2</sub> extraction of olive oil. Mass transfer evaluation.* The Journal of Supercritical Fluids, **2004**. 28(1): p. 29-35.
271. **Ibáñez, E., A.M. Hurtado-Benavides, F.J. Señoráns, y G. Reglero.** *Concentration of sterols and tocopherols from olive oil with supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists Society, **2002**. 79: p. 1255-1260.
272. **Dobarganes-Nodar, M., A. Molero-Gomez, y E.M. de la Ossa.** *Characterisation and process development of supercritical fluid extraction of soybean oil.* Food Science and Technology International, **2002**. 8: p. 337-342.
273. **Reverchon, E.** *Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products.* The Journal of Supercritical Fluids, **1997**. 10(1): p. 1-37.
274. **Bulley, N., M. Fattori, A. Meisen, y L. Moyls.** *Supercritical fluid extraction of vegetable oil seeds.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1984**. 61(8): p. 1362-1365.
275. **Eggers, R., U. Sievers, y W. Stein.** *High pressure extraction of oil seed.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1985**. 62(8): p. 1222-1230.
276. **Bozan, B. y F. Temelli.** *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of flaxseed.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(3): p. 231-235.

277. **Odabasi, A.Z. y M.O. Balaban.** *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of sesame oil from raw seeds.* Journal of Food Science and Technology, **2002**. 39: p. 496-501.
278. **Cherry, J.** *Cottonseed oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1983**. 60(2): p. 360-367.
279. **Kuk, M. y R. Hron.** *Supercritical carbon dioxide extraction of cottonseed with co-solvents.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1994**. 71(12): p. 1353-1356.
280. **Oliveira, R., M. Fátima Rodrigues, y M. Gabriela Bernardo-Gil.** *Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(3): p. 225-230.
281. **Reverchon, E. y L. Osséo.** *Comparison of processes for the supercritical carbon dioxide extraction of oil from soybean seeds.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1994**. 71(9): p. 1007-1012.
282. **Del Valle, J. y E. Uquiche.** *Particle size effects on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil-containing seeds.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(12): p. 1261-1266.
283. **Snyder, J., J. Friedrich, y D. Christianson.** *Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO<sub>2</sub>.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1984**. 61(12): p. 1851-1856.
284. **da Cruz Francisco, J., B. Danielsson, A. Kozubek, y E.S. Dey.** *Extraction of rye bran by supercritical carbon dioxide: influence of temperature, CO<sub>2</sub>, and cosolvent flow rates.* J Agric Food Chem, **2005**. 53(19): p. 7432-7.
285. **Shen, Z., M. Palmer, S. Ting, y R. Fairclough.** *Pilot Scale Extraction and Fractionation of Rice Bran Oil Using Supercritical Carbon Dioxide* J. Agric. Food Chem., **1997**. 45(12): p. 4540-4544.
286. **Shen, Z., M. Palmer, S. Ting, y R. Fairclough.** *Pilot Scale Extraction of Rice Bran Oil with Dense Carbon Dioxide* J. Agric. Food Chem., **1996**. 44(10): p. 3033-3039.
287. **García, A., y col.** *Supercritical carbon dioxide extraction of fatty and waxy material from rice bran.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(9): p. 1127-1131.
288. **Sparks, D., y col.** *Extraction of rice brain oil using supercritical carbon dioxide and propane.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2006**. 83(10): p. 885-891.
289. **Xu, Z. y J. Godber.** *Comparison of supercritical fluid and solvent extraction methods in extracting  $\gamma$ -oryzanol from rice bran.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(5): p. 547-551.
290. **Taylor, S. y J. King.** *Preparative-scale supercritical fluid extraction/supercritical fluid chromatography of corn bran.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(11): p. 1133-1136.
291. **Hannigan, K.J.** *Extraction process creates low-fat potato chips.* Food Engineering, **1981**. 53: p. 77.
292. **Neff, W.E., F. Eller, y K. Warner.** *Composition of oils extracted from potato chips by supercritical fluid extraction.* European Journal of Lipid Science and Technology, **2002**. 104: p. 785-791.
293. **Pfeifer, L.** A method for degreasing crushed, starchy, fatty vegetable material, **1975**, British patent, UK, 1398459.
294. **Hampson, J., K. Jones, T. Foglia, y K. Kohout.** *Supercritical fluid extraction of meat lipids: An alternative approach to the identification of irradiated meats.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(6): p. 717-721.
295. **King, J.W., y col.** *Extraction of Fat from Ground Beef for Nutrient Analysis Using Analytical Supercritical Fluid Extraction.* J. Agric. Food Chem., **1996**. 44(9): p. 2700-2704.
296. **Eller, F.J. y J.W. King.** *Supercritical fluid extraction of fat from ground beef: effects of water on gravimetric and GC-FAME fat determinations.* J Agric Food Chem, **2001**. 49(10): p. 4609-14.

297. **Chao, R., S. Mulvaney, y H. Huang.** *Effects of extraction and fractionation pressures on supercritical extraction of cholesterol from beef tallow.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1993**. 70(2): p. 139-143.
298. **Schneider, F. y W. Sirtl.** Method of recovering and/or refining animal fats, **1981**, United-States-Patent, 4280961.
299. **Kaufmann, W., y col.** *Fractionation of butterfat by extraction with supercritical CO<sub>2</sub>.* Milchwissenschaft, **1982**. 37: p. 92-96.
300. **Rizvi, S.S.H. y A.R. Bhaskar.** *Supercritical fluid processing of milk fat: fractionation, scale-up, and economics.* Food Technology, **1995**. 49: p. 90-100.
301. **Arul, J., y col.** *Solubility of milk fat triglycerides in supercritical carbon dioxide.* Food Research International, **1994**. 27: p. 459-467.
302. **Ogasahara, J., H. Hariu, y M. Takahashi.** Process for producing liquid egg having reduced cholesterol content and food containing liquid egg thus produced., **1991**, European-Patent-Application, EP 0 426 425 A1.
303. **Camin, R., y col.** Process for manufacture of cholesterol reduced fats and corresponding sausages made from pork and pork fat, **2000**, German-Federal-Republic-Patent-Application, Germany, DE19917929A1.
304. **Bradley, R.L.** *Cholesterol removal from milkfat.* Indian Dairyman, **1994**. 46: p. 255-257.
305. **Cully, J., H.R. Vollbrecht, y E. Schuetz.** Process for elimination of cholesterol and cholesterol esters from foods, **1991**, German Federal Republic Patent Application, Germany, DE 3929555.
306. **Kang, S.S., B.J. Kim, y B.S. Chun.** *Recovery of high unsaturated fatty acid from squid processing wastes using supercritical carbon dioxide extraction method.* Journal of the Korean Fisheries Society, **1999**. 32: p. 217-222.
307. **Hung, L.B., M.T. Chiang, y Y.W. Pan.** *Supercritical fluid extraction of mackerel visceral oil and the study on its edible safety.* Food Science Taiwan, **1996**. 23: p. 641-649.
308. **Lo, W.S. y Z.R. Yu.** *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids from marine microalga Isochrysis galbana TK2.* Food Science Taiwan, **1999**. 26(651-657).
309. **Nilsson, W., y col.** *Fractionation of menhaden oil ethyl esters using supercritical fluid CO<sub>2</sub>.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1988**. 65(1): p. 109-117.
310. **Perretti, G., y col.** *Supercritical carbon dioxide fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters.* The Journal of Supercritical Fluids, **2007**. 40(3): p. 349-353.
311. **Balaban, V.O., S. O'Keefe, y J.I. Polak.** *Supercritical Fluid Extraction of Algae*, en Libro: *Supercritical Fluid Extraction of Algae*, J.W. King y G.R. List, Editores. **1996**, AOCS Press.
312. **Wisniak, J. y E. Korin.** *Supercritical Fluid Extraction of Lipids and Other Materials from Algae*, en Libro: *Supercritical Fluid Extraction of Lipids and Other Materials from Algae*, C.R. Zvi Cohen, Editor. **2005**, AOCS Press.
313. **Andrich, G., y col.** *Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga Nannochloropsis sp.* Eur. J. Lipid Sci. Technol., **2005**. 107: p. 381-386.
314. **Mendiola, J.A., y col.** *Use of supercritical CO<sub>2</sub> to obtain extracts with antimicrobial activity from Chaetoceros muelleri microalga. A correlation with their lipidic content.* Eur Food Res Technol, **2007**. 224: p. 505-510.
315. **Cheung, P.C.K.** *Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed.* Food Chemistry, **1999**. 65: p. 399-403.
316. **Kiy, T., C. Siffrin, H. Engelhardt, y D. Fabritius.** Method for obtaining fatty acids from biomass by combined in/situ extraction, reaction and chromatography using compressed gases, **2001**, 744142 AXIVA GmbH (Frankfurt am Main, DE)
317. **Higashidate, S., Y. Yamauchi, y M. Saito.** Extraction and separation method and apparatus using supercritical fluid, **1991**, US Patent 5013443.
318. **Kulas, E. y H. Breivik.** Recovery of polyunsaturated fatty acids from urea adducts, **2000**, European Patent EP1202950 US6528669 Norsk Hydro ASA.

319. **Walker, T.H., H.D. Cochran, y G.J. Hulbert.** *Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from *Pythium irregulare**. Journal of the American Oil Chemists' Society, **1999**. 76(5): p. 595-602.
320. **Sakaki, K., T. Yokochi, O. Suzuki, y T. Hakuta.** *Supercritical fluid extraction of fungal oil using CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CHF<sub>3</sub> and SF<sub>6</sub>*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **1990**. 67(9): p. 553-557.
321. **Shih, F. y K. Daigle.** *Supercritical fluid extraction of encapsulated oil products*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **2001**. 78(10): p. 1057-1059.
322. **Li-YQ.** *Study on the SC-CO<sub>2</sub> extraction of yolk lipids*. Science and Technology of Food Industry, **2000**. 21: p. 39-41.
323. **Chen, H., S.J. Schwartz, y G.A. Spanos.** *Fractionation of butter oil by supercritical carbon dioxide*. Journal of Dairy Science, **1992**. 75: p. 2659-2669.
324. **Alessandra, y col.** *Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Characterization of *Laurus nobilis* Essential Oil* J. Agric. Food Chem., **2002**. 50 (6): p. 1492-1496.
325. **Jarén-Galán, M., U. Nienaber, y S.J. Schwartz.** *Paprika (*Capsicum annuum*) Oleoresin Extraction with Supercritical Carbon Dioxide*. J. Agric. Food Chem., **1999**. 47: p. 3558-3564.
326. **Simándi, B., A. Deák, y E. Rónyai.** *Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Fractionation of Fennel Oil* J. Agric. Food Chem., **1999**. 47 (4) p. 1635 -1640.
327. **Rozzi, N.L., R.K. Singh, R.A. Vierling, y B.A. Watkins.** *Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Processing Byproducts* J. Agric. Food Chem., **2002**. 50(9): p. 2638-2643.
328. **Ruiz del Castillo, M., M. Gómez-Prieto, M. Herraiz, y G. Santa-María.** *Lipid composition in tomato skin supercritical fluid extracts with high lycopene content*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **2003**. 80(3): p. 271-274.
329. **Baysal, T., S. Ersus, y D.A.J. Starmans.** *Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of  $\beta$ -Carotene and Lycopene from Tomato Paste Waste* J. Agric. Food Chem., **2000**. 48(11): p. 5507 -5511.
330. **Gómez-Prieto, M., M. Caja, y G. Santa-María.** *Solubility in supercritical carbon dioxide of the predominant carotenes of tomato skin*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(9): p. 897-902.
331. **Bortolomeazzi, R., P. Berno, L. Pizzale, y L.S. Cont.** *Sesquiterpene, Alkene, and Alkane Hydrocarbons in Virgin Olive Oils of Different Varieties and Geographical Origins* J. Agric. Food Chem., **2001**. 49 (7): p. 3278-3283.
332. **Beis, S. y N. Dunford.** *Supercritical fluid extraction of daphne (*Laurus nobilis* L.) seed oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **2006**. 83(11): p. 953-957.
333. **McLean, B. y P. Drake.** *Review of methods for the determination of fat and oil in foodstuffs*. Campden-&-Chorleywood-Food-Research-Association **2002**.
334. **Señoráns, F.J. y K. Markides.** *On-line SFE-SFC for the analysis of fat soluble vitamins and other lipids from water matrices*, en Libro: *On-line SFE-SFC for the analysis of fat soluble vitamins and other lipids from water matrices*, J.W.y.A.C. (Eds.), Editor. **2000**, Humana Press: Totowa, New Jersey. p. 127-133.
335. **Catchpole, O.J., J.B. Grey, y K.A. Noermark.** *Fractionation of fish oils using supercritical CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>+ethanol mixtures*. The Journal of Supercritical Fluids, **2000**. 19(1): p. 25-37.
336. **Montanari, L., J.W. King, G.R. List, y K.A. Rennick.** *Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents*. Journal of Food Science, **1996**. 61: p. 1230-1233, 1253.
337. **Cocero, M. y L. Calvo.** *Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO<sub>2</sub>-ethanol mixtures*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(11): p. 1573-1578.
338. **Nilsson, W. y J. Hudson.** *Solubility of simple and mixed triacylglycerols in supercritical CO<sub>2</sub>*. Journal of the American Oil Chemists' Society, **1993**. 70(8): p. 749-754.



339. **Vasconcellos, V. y F. Cabral.** *A new method for estimating solubility of fatty acids, esters, and triglycerides in supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2001**. 78(8): p. 827-829.
340. **Maheshwari, P., Z. Nikolov, T. White, y R. Hartel.** *Solubility of fatty acids in supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1992**. 69(11): p. 1069-1076.
341. **Staby, A. y J. Mollerup.** *Solubility of fish oil fatty acid ethyl esters in suband supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1993**. 70(6): p. 583-588.
342. **Shimada, Y., y col.** *Facile purification of tocopherols from soybean oil deodorizer distillate in high yield using lipase.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(10): p. 1009-1013.
343. **Batistella, C., E. Moraes, R. Filho, y M. Maciel.** *Molecular distillation.* Applied Biochemistry and Biotechnology, **2002**. 98-100(1): p. 1187-1206.
344. **Nagao, T., y col.** *Purification of Conjugated Linoleic Acid Isomers through a Process Including Lipase-catalyzed Selective Esterification.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **2003**. 67(6): p. 1429-1433.
345. **Cvengros, J.** *Physical refining of edible oils.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1995**. 72(10): p. 1193-1196.
346. **Szelag, H. y W. Zwierzykowski.** *The application of molecular distillation to obtain high concentration of monoglycerides.* Fette, Seifen, Anstrichmittel, **1983**. 85(11): p. 443-446.
347. **Chang, S.S.B., B. Ostric-Matijasevic, O.A.L. Hsieh, y C. Huang.** *Natural antioxidants from rosemary and sage* Journal of Food Science, **1977**. 42(4): p. 1102-1106.
348. **Ooi, C., y col.** *Recovery of carotenoids from palm oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1994**. 71(4): p. 423-426.
349. **Pietsch, A. y P. Jaeger.** *Concentration of squalene from shark liver oil by short-path distillation.* Eur. J. Lipid Sci. Technol. , **2007**. 109: p. 1077-1082.
350. **Hoffmann, G.** *The Chemistry and Technology of Edible Oils and Fats and Their High Fat Products*, en Libro: *The Chemistry and Technology of Edible Oils and Fats and Their High Fat Products*. **1989**, Academic Press: San Diego. p. 139, 140, 162, 185-190.
351. **De Greyt, W. y M. Kellens.** *Refining practice*, en Libro: *Refining practice*, W.H.y.R.J.H. (Ed.), Editor. **2000**, Sheffield Academic Press.: Sheffield, UK. p. 90-105.
352. **Hendrix, B.** *Neutralization*, en Libro: *Neutralization*, D.R.E. (Ed.), Editor. **1990**, AOCS Press.: Champaign, Illinois. p. 94-100.
353. **Lanzón, A., T. Albi, y J. Gracián.** *Alteraciones registradas en los componentes alcohólicos del insaponificable del aceite de oliva en el proceso de refinación. Primeros ensayos.* Grasas y Aceites, **1987**. 38: p. 203-209.
354. **Pasqualone, A. y M. Catalano.** *Free and total sterols in olive oils. Effects of neutralization.* Grasas y Aceites, **2000**. 51: p. 180-182.
355. **Huesa, J. y M.C. Dobarganes.** Patente ES 2.013.206, **1990**, Chem. Abstr. 113, pp. 1.744-1.764,
356. **Amelotti, G.** *Effects of the interesterification for physical refining of some olive oils (I).* Riv Ital. Sostanze Grasse, **1987**. 64: p. 223-26.
357. **Gracián, J. y M. Mancha.** *Fenómenos de transesterificación durante el calentamiento de aceites de oliva y de orujo y su influencia en la alteración de la estructura glicerídica.* Grasas y Aceites, **1971**. 22: p. 30-39.
358. **Verleyen, T., y col.** *Identification of alpha-tocopherol oxidation products in triolein at elevated temperatures.* J. Agric. Food-Chem., **2001**. 49: p. 1.508-1.511.
359. **León-Camacho, M., M.V. Ruiz-Méndez, y E. Graciani Constante.** *Kinetics of the cis-trans isomerisation of linoleic acid in the deodorization and/or physical refining of edible fats.* Eur. J. Lipid Sci. Technol., **2001**. 102: p. 85-92.

360. **Tatum, J. y C.K. Chow.** *Effects of processing and storage on fatty acids in Edible oils.*, en Libro: *Effects of processing and storage on fatty acids in Edible oils.*, C.K.C. (Ed.), Editor. **2000**, Marcel Decker: Nueva York. p. 419-420.
361. **Dunford, N.T. y J.W. King.** *Phytosterol enrichment of rice bran oil by a supercritical carbon dioxide fractionation technique.* J. Food Sci., **2000**. 65: p. 1395-1399.
362. **León-Camacho, M., M.V. Ruiz-Méndez, y E. Graciani Constante.** *Changes in olive oil components during deodorization and/or physical refining at the pilot plant scale using nitrogen as stripping gas.* Fett - Lipid, **1999**. 101: p. 38-42.
363. **Hernández, N. y J. Boatella.** *Variaciones del contenido en tocoferoles y tocotrienoles durante los procesos de obtención, refinación e hidrogenación de aceites comestibles.* Grasas y Aceites, **1987**. 45: p. 413-429.
364. **Ouyan, H., S. Daun, C.S. S., y C.T. Ho.** *Formation of carbonyl compounds from  $\beta$ -carotene during palm oil deodorization.* J. Food Sci., **1980**. 45: p. 1.214-22.
365. **Rivers, J.B.J.** Method for dynamically refining and deodorizing fats and oils by distillation, **1990**, US Patent, USA, 4971660.
366. **Zosel, K.** Process for deodorizing fats and oils, **1979**, U. S. Patent, USA, 4156688.
367. **Nikolov, Z.L., y col.** *Presented at the Conference on Food Engineering (CoFE)*, in *American Institute of Chemical Engineering.* **1991**: Chicago.
368. **Ziegler, G. y Y.-J. Liaw.** *Deodorization and deacidification of edible oils with dense carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1993**. 70(10): p. 947-953.
369. **Ooi, C., y col.** *Continuous supercritical carbon dioxide processing of palm oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(2): p. 233-237.
370. **List, G., y col.** *Supercritical CO<sub>2</sub> degumming and physical refining of soybean oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1993**. 70(5): p. 473-476.
371. **Eisenmenger, M., y col.** *Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of wheat germ oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2006**. 83(10): p. 863-868.
372. **Dunford, N. y J. King.** *Thermal gradient deacidification of crude rice bran oil utilizing supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2001**. 78(2): p. 121-125.
373. **Danielski, L., C. Zetzl, H. Hense, y G. Brunner.** *A process line for the production of raffinated rice oil from rice bran.* Jnl. of Supercritical Fluids, **2005**. 34(2): p. 133-141.
374. **Bondioli, P., y col.** *Lampante olive oil refining with supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1992**. 69(5): p. 477-480.
375. **Briones, J.A., J.C. Mullins, y M.C. Thies.** *Solvent extraction of fatty acids from natural oils with liquid water at elevated temperatures and pressures.* JAOCS, **1990**. 67: p. 852.
376. **REAL DECRETO 308/1983 DE 25 DE ENERO. POR EL QUE SE APRUEBA LA REGLAMENTACION TECNICO-SANITARIA DE ACEITES VEGETALES COMESTIBLES,** BOE n. 44 de 21/2/1983.
377. **Birtigh, A., M. Johannsen, G. Brunner, y N. Nair.** *Supercritical-fluid extraction of oil-palm components.* The Journal of Supercritical Fluids, **1995**. 8(1): p. 46-50.
378. **Chuang, M.-H. y G. Brunner.** *Concentration of minor components in crude palm oil.* Journal of Supercritical Fluids, **2006**. 37: p. 151-156.
379. **Snyder, J., J. King, S. Taylor, y A. Neese.** *Concentration of phytosterols for analysis by supercritical fluid extraction.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1999**. 76(6): p. 717-721.
380. **Bondioli, P., y col.** *Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1993**. 70(8): p. 763-766.
381. **Chang, C.J., y col.** *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of High-Value Substances from Soybean Oil Deodorizer Distillate.* Ind. Eng. Chem. Res., **2000**. 39(12): p. 4521-4525.

382. **Araujo, M.E., N.T. Machado, y M.A.A. Meireles.** *Modeling the Phase Equilibrium of Soybean Oil Deodorizer Distillates + Supercritical Carbon Dioxide Using the Peng-Robinson EOS.* Ind. Eng. Chem. Res., **2001**. 40(4): p. 1239-1243.
383. **Fang, T., y col.** *Phase equilibria for binary systems of methyl oleate–supercritical CO<sub>2</sub> and  $\alpha$ -tocopherol–supercritical CO<sub>2</sub>.* The Journal of Supercritical Fluids, **2004**. 30(1): p. 1-16.
384. **Stoldt, J. y G. Brunner.** *Phase equilibrium measurements in complex systems of fats, fat compounds and supercritical carbon dioxide.* Fluid Phase Equilibria, **1998**. 146(1): p. 269-295(27).
385. **Stoldt, J. y G. Brunner.** *Phase equilibria in complex systems of palm oil deodorizer condensates and supercritical carbon dioxide: experiments and correlation.* The Journal of Supercritical Fluids, **1999**. 14(3): p. 181-195(15).
386. **Stoldt, J., C. Saure, y G. Brunner.** *Phase Equilibria of Fat Compounds with Supercritical Carbon Dioxide.* Fluid Phase Equilibria, **1996**. 116(1): p. 399-406(8).
387. **Ibáñez, E., y col.** *Isolation and separation of tocopherols from olive by-products with supercritical fluids.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(2): p. 187-190.
388. **Mendes, M.F., F.L.P. Pessoa, G.V. Coelho, y A.M.C. Uller.** *Recovery of the high aggregated compounds present in the deodorizer distillate of the vegetable oils using supercritical fluids.* The Journal of Supercritical Fluids, **2005**. 34(2): p. 157-162.
389. **Martins, P.F., V.M. Ito, C.B. Batistella, y M.R.W. Maciel.** *Free fatty acid separation from vegetable oil deodorizer distillate using molecular distillation process.* Separation and Purification Technology, **2006**. 48(1): p. 78-84.
390. **Lee, H., B.H. Chung, y Y. Park.** *Concentration of tocopherols from soybean sludge by supercritical carbon dioxide.* JAOCS, **1991**. 68: p. 571.
391. **Brunner, G.** *Gas Extraction—An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluid and the Application to Separation Processes*, ed. Springer. **1994**, Berlin.
392. **Brunner, G., T. Malchow, K. Stürken, y T. Gottschau.** *Separation of tocopherols from deodorizer condensates by countercurrent extraction with carbon dioxide.* J. Supercrit. Fluids, **1991**. 4: p. 72.
393. **Catchpole, O.J., y col.** *Fractionation of Lipids in a Static Mixer and Packed Column Using Supercritical Carbon Dioxide.* Ind. Eng. Chem. Res. , **2000**. 39(12): p. 4820-4827.
394. **Machado, N.T., M.E. Araújo, y A.A. Meireles.** *Modelling using the Peng-Robinson EOS the fractionation of soybean oil deodorizer distillates with supercritical carbon dioxide.* in *Proceedings of the 5th International Symposium on Supercritical Fluids*. **2000**.
395. **Zhao, Y., G. Sheng, y D. Wang.** *Pilot-scale isolation of tocopherols and phytosterols from soybean sludge in a packed column using supercritical carbon dioxide.* in *Proceedings of the 5th International Symposium on Supercritical Fluids*. **2000**.
396. **Dunford, N.T. y J.W. King.** *Enrichment of phytosterols in vegetable oils utilizing supercritical carbon dioxide and a fractionation tower.* in *Presented at Ann. Mtg. Inst. of Food Technologists*. **2000**. Dallas (Tex, USA)
397. **Fang, T., y col.** *Separation of natural tocopherols from soybean oil byproduct with supercritical carbon dioxide.* The Journal of Supercritical Fluids, **2007**. 40(1): p. 50-58.
398. **Mendes, M.F., A.M.C. Uller, y F.L.P. Pessoa.** *Simulation and thermodynamic modeling of the extraction of tocopherol from a synthetic mixture of tocopherol, squalene y CO<sub>2</sub>.* Brazilian Journal of Chemical Engineering, **2000**. 17: p. 4-7.
399. **Gast, K., M. Jungfer, C. Saure, y G. Brunner.** *Purification of tocopherols from edible oil.* The Journal of Supercritical Fluids, **2005**. 34(1): p. 17-25.
400. **Mendes, M.F., F.L.P. Pessoa, y A.M.C. Uller.** *An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate.* The Journal of Supercritical Fluids, **2002**. 23(3): p. 257-265.
401. **Jiang, S.T., P. Shao, L.J. Pan, y Y.Y. Zhao.** *Molecular Distillation for recovering Tocopherol and Fatty Acid Methyl Esters from Rapeseed Oil Deodoriser Distillate.* Biosystems Engineering, **2006**. 93(4): p. 383-391.

402. **Nagao, T., y col.** *Improvement of a process for purification of tocopherols and sterols from soybean oil deodorizer distillate.* Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, **2005**. 37(1): p. 56-62.
403. **Ko, T.F., Y.M. Weng, y R.Y. Chiou.** *Squalene content and antioxidant activity of Terminalia catappa leaves and seeds.* Journal of Agricultural and Food Chemistry., **2002**. 50: p. 5343-8.
404. **Kim, A.J., S.B. Lee, K.A. Park, y I.K. Hong.** *Characterization of extraction and separation of rice bran oil rich in EFA using SFE process.* Separation and purification technology, **1999**. 15: p. 1-8.
405. **Kiritsakis, A.K.** *El Aceite de Oliva*, ed. M.V. Ediciones. **1992**, Madrid.
406. **Hita, E.** *El grupo SOS se mueve al ritmo del tiburón*, en *El Mundo. Nueva Economía*. 28/04/02. **2002**.
407. **Travería Casanova, T., J.L. Pérez Parras, y J. Serrano Valladares.** Procedimiento para la obtención de escualeno de origen vegetal de alta pureza, **2002**, Patente de invención., ES 2 162 742 B1.
408. **Ruivo, R., M.J. Cebola, P.C. Simoes, y M. Nunes da Ponte.** *Fractionation of edible oil model mixtures by supercritical carbon dioxide in a packed column.* Industrial Engineering Chemistry Research, **2001**. 40: p. 1706-1711.
409. **Ruivo, R., A. Paiva, y P. Simoes.** *Phase equilibria of the ternary system methyl oleate/squalene/carbon dioxide at high pressure conditions.* Journal of Supercritical Fluids, **2003**. 29: p. 77-85.
410. **Bondioli, P., y col.** Process and device for producing squalene from olive oil, **1993**, P 43 16 620.2
411. **Hurtová, S., y col.** *Random interesterification of fat blends with alkali catalysts.* Lipid/Fett, **2006**. 98(2): p. 60 - 65.
412. **Sreenivasan, B.** *Interesterification of fats.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1978**. 55(11): p. 796-805.
413. **Liu, L. y D. Lampert.** Partial interesterification of triacylglycerols, **1997**, US Patent, 932755, Cargill Incorporated
414. **Liu, L. y D. Lampert.** *Monitoring chemical interesterification.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1999**. 76(7): p. 783-787.
415. **Ma, F. y M.A. Hanna.** *Biodiesel production: a review.* Bioresource Technology, **1999**. 70(1): p. 1-15.
416. **Engler, C.R., L.A. Johnson, W.A. Lepori, y C.M. Yarbrough.** *Effects of processing and chemical characteristics of plant oils on performance of an indirect-injection diesel engine.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1983**. 60(8): p. 1592-1596.
417. **Ziejewski, M., H. Goettler, y G.L. Pratt.** Paper No. 860301, in *International Congress and Exposition*. **1986**: Detroit, MI 24-28.
418. **Goering, C.E.** *Final report for project on Effect of nonpetroleum fuels on durability of direct-injection diesel engines under contract.* in 59-2171-1-6-057-0 **1984**. USDA, ARS, Peoria, IL.
419. **Schwab, A.W., M.O. Bagby, y B. Freedman.** *Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils.* Fuel, **1987**. 66: p. 1372-1378.
420. **Ziejewski, M.Z., K.R. Kaufman, y G.L. Pratt.** *Vegetable oil as diesel fuel.* USDA, Agric, Rev. Man., **1983**. ARM-NC-28: p. 106-111.
421. **Schwab, A., y col.** *Diesel fuel from thermal decomposition of soybean oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1988**. 65(11): p. 1781-1786.
422. **Niehaus, R.A., C.E. Goering, L.D.J. Savage, y S.C. Sorenson.** *Cracked soybean oil as a fuel for a diesel engine.* Trans. ASAE, **1986**. 29(683-689).
423. **Pioch, D., y col.** *Biofuels from catalytic cracking of tropical vegetable oils.* Oleagineux, **1993**. 48: p. 289-291.

424. **Allen, H.D., G. Rock, y W.A. Kline.** Process for treating fats and fatty oils, **1945**, U.P. 2, USA, 383-579
425. **Bradshaw, G.B. y W.C. Meuly.** Preparation of detergents, **1944**, US Patent 2, USA, 360-844.
426. **Freedman, B., R.O. Butterfield, y E.H. Pryde.** *Transesterification kinetics of soybean oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1986**. 63: p. 1375-1380.
427. **Freedman, B., E.H. Pryde, y T. Mounts.** *Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1984**. 61(10): p. 1638-1643.
428. **Ma, F., L.D. Clements, y M.A. Hanna.** *Biodiesel fuel form animal fat. Ancillary studies on transesterification of beef tallow.* Ind. Eng. Chem. Res., **1998**. 37: p. 3768-3771.
429. **Ma, F., L.D. Clements, y M.A. Hanna.** *The effect of mixing on transesterification of beef tallow.* Bioresource Technology, **1999**. 69: p. 289-293.
430. **Tanaka, Y., A. Okabe, y S. Ando.** Method for the preparation of a lower alkyl ester of fatty acids, **1981**, US Patent 4, 303-590
431. **Trent, W.R.** Process of treating fatty glycerides, **1945**, U.P. 2, USA, 383-632
432. **Vicente, G., M. Martínez, y J. Aracil.** *Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems.* Bioresource Technology, **2004**. 92: p. 297-305.
433. **Shimada, Y., Y. Watanabe, A. Sugihara, y Y. Tominaga.** *Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2002**. 17(3): p. 133-142.
434. **Watanabe, Y., y col.** *Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized Candida antarctica lipase.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2007**. 44(3-4): p. 99-105.
435. **Watanabe, Y., Y. Shimada, A. Sugihara, y Y. Tominaga.** *Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized Candida antarctica lipase.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2002**. 17(3-5): p. 151-155.
436. **Torres, C.F., y col.** *Ethanolysis of a waste material from olive oil distillation catalyzed by three different commercial lipases: A kinetic.* Biochemical Engineering Journal, **2007**. 34(2): p. 165-171.
437. **Vazquez, L., y col.** *Supercritical fluid extract ion of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates.* European Journal of Lipid Science and Technology, **2006**. 108(8): p. 659-665.
438. **Wright, H.J., y col.** *A report on ester interchange.* Oil and Soap, **1944**. 21: p. 145-148.
439. **Keim, G.I.** Process for treatment of fatty glycerides, **1945**, US Patent 2, USA, 383-601
440. **Bistrrian, B.R.** Method of treating cancer using structured lipids, **1990**, United States Patent 5081105.
441. **Wheeler, E.L., y col.** Reduced calorie triglyceride mixtures, **1991** United States Patent 5258197,
442. **Ehrman, A.M., P. Seiden, R.M. Weitzel, y R.L. White.** Process for tempering flavored confectionery compositions containing reduced calorie fats and resulting tempered products, **1989**, United States Patent 4888196.
443. **Ghosh, S. y D. Bhattacharyya.** *Medium-chain fatty acid-rich glycerides by chemical and lipase-catalyzed polyester-monoester interchange reaction.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1997**. 74(5): p. 593-595.
444. **Kwon, D., H. Song, y S. Yoon.** *Synthesis of medium-chain glycerides by lipase in organic solvent.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(11): p. 1521-1525.
445. **Bommarius, A.S. y B.R. Riebel.** *Biocatalysis: Fundamentals and Applications.* **2004**, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
446. **Bommarius, A.S., M. Schwarm, y K. Drauz.** *Factors for process design towards enantiomerically pure l- and d-amino acids.* Chimia, **2001**. 55: p. 50-59.

447. **Rasor, J.P. y E. Voss.** *Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry.* Appl. Catal. A: General, **2001**. 221: p. 145-158.
448. **Rozzell, J.D.** *Biocatalysis at commercial scale: myths and realities.* Chimica Oggi, **1999**. 6/7: p. 42-47.
449. **Crossley, R.** *Chirality and the Biological Activity of Drugs.* **1995**, Boca Raton: CRC Press.
450. **Liese, A. y M.V. Filho.** *Production of fine chemicals using biocatalysis.* Curr. Opin. Biotechnol., **1999**. 10: p. 595-603.
451. **Liese, A., K. Seelbach, y C. Wandrey.** *Industrial Biotransformations: A Collection of Processes.* **2000**, Weinheim: VCH.
452. **Straathof, A.J.J., S. Panke, y A. Schmid.** *The production of fine chemicals by biotransformations.* Curr. Opin. Biotechnol., **2002**. 13: p. 548-556.
453. **Zaks, A.** *Industrial biocatalysis.* Curr. Opin. Chem. Biol., **2001**. 5: p. 130-136.
454. **Carter, P. y J.A. Wells.** *Dissecting the catalytic triad of a serine protease.* Nature, **1988**. 332: p. 564-568.
455. **Caussette, M., y col.** *Inactivation of enzymes by inert gas bubbling: a kinetic study.* Ann. N.Y. Acad. Sci., **1998**. 864: p. 228-233.
456. **Kelly, S.T. y A.L. Zydney.** *Effects of intermolecular thiol-disulfide interchange reactions on BSA fouling during microfiltration.* Biotech. Bioeng., **1994**. 44(8): p. 972-982.
457. **Quax, W.J., y col.** *Enhancing the thermostability of glucose isomerase by protein engineering.* Bio/Technology, **1991**. 9: p. 738-742.
458. **Slusarczyk, H., S. Felber, M.R. Kula, y M. Pohl.** *Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from Candida boidinii by site-directed mutagenesis of cysteine residues.* Eur. J. Biochem., **2000**. 267: p. 1280-89.
459. **Baneyx, F.** *Recombinant protein expression in Escherichia coli.* Curr. Opin. Biotechnol., **1999**. 10: p. 411-421.
460. **Anastas, P.T. y M.M. Kirchhoff.** *Origins, current status, and future challenges of green chemistry.* Acc. Chem. Res., **2002**. 35: p. 686-694.
461. **Anastas, P.T. y T.C. Williamson.** *Frontiers in green chemistry.* Green Chem., **1998**: p. 1-26.
462. **Cheetham, P.S.J.** *Bioprocesses for the Manufacture of Ingredients for Foods and Cosmetics*, en Libro: *Bioprocesses for the Manufacture of Ingredients for Foods and Cosmetics.* **2004**. p. 83-158.
463. **Klibanov, A.M.** *Improving enzymes by using them in organic solvents.* Nature, **2001**. 409(6817): p. 241-246.
464. **Kim, M.S.M. y J.S. Rhee.** *Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1991** 68(7): p. 499-503.
465. **Klibanov, A.M.** *Enzyme work in organic solvents* Chemtechnology, **1986**. 16: p. 354.
466. **Zaks, A. y A.M. Klibanov.** *Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents.* J. Biol. Chem., **1988**. 263(7): p. 3194-3201.
467. **REAL DECRETO 472/1990 DE 6 DE ABRIL. POR EL QUE SE REGULAN LOS DISOLVENTES DE EXTRACCION UTILIZADOS EN LA ELABORACION DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS Y SUS INGREDIENTES,** BOE n. 88 de 12/4/1990.
468. **Hari Krishna, S.** *Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media.* Biotechnology Advances, **2002**. 20(3-4): p. 239-267.
469. **Primožič, M., M. Habulin, y Ž. Knez.** *Modeling of kinetics for the enzymatic hydrolysis of sunflower oil in a high-pressure reactor.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2005**. 82(8): p. 543-547.
470. **Jackson, M. y J. King.** *Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1997**. 74(2): p. 103-106.

471. **Moquin, P., F. Temelli, J. King, y M. Palcic.** *Kinetic modeling of the glycerolysis reaction for soybean oils in supercritical carbon dioxide media.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2005**. 82(8): p. 613-617.
472. **Turner, C. y T. McKeon.** *The use of immobilized Candida antarctica lipase for simultaneous supercritical fluid extraction and in-situ methanolysis of cis-vaccenic acid in milkweed seeds.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(5): p. 473-478.
473. **Knez, Ž., V. Rižner, M. Habulin, y D. Bauman.** *Enzymatic synthesis of oleyl oleate in dense fluids.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1995**. 72(11): p. 1345-1349.
474. **Nakaya, H., K. Nakamura, y O. Miyawaki.** *Lipase-catalyzed esterification of stearic acid with ethanol, and hydrolysis of ethyl stearate, near the critical point in supercritical carbon dioxide.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(1): p. 23-27.
475. **Frykman, H., J. Snyder, y J. King.** *Screening catalytic lipase activities with an analytical supercritical fluid extractor.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1998**. 75(4): p. 517-520.
476. **Shishikura, A., K. Fujimoto, T. Suzuki, y K. Arai.** *Improved lipase-catalyzed incorporation of long-chain fatty acids into medium-chain triglycerides assisted by supercritical carbon dioxide extraction.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1994**. 71(9): p. 961-967.
477. **Iwasaki, Y. y T. Yamane.** *Enzymatic synthesis of structured lipids.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **2000**. 10(1): p. 129-140.
478. **Irimescu, R., y col.** *Enzymatic synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-eicosapentaenoylglycerol.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(5): p. 501-506.
479. **Fomuso, L. y C. Akoh.** *Structured lipids: Lipase-catalyzed interesterification of tricaproin and trilinolein.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1998**. 75(3): p. 405-410.
480. **Akoh, C.C., K.T. Lee, y L.B. Fomuso.** *Structured Triacylglycerols, in Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, ed. A.M.C. (Ed.). **1998**: 46 AOCS Press, IL.
481. **Torres, C.F., T.J. Nettekoven, y C.G.J. Hill.** *Preparation of highly purified acylglycerols of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their re-esterification with conjugated linoleic acid* Enzyme and Microbial Technology **2003**. 32(1): p. 49-58.
482. **Torres, C.F., y col.** *Purification of phytosterol esters from an enzymatic modified oil deodorizer distillate using supercritical fluid extraction.* Food Engineering Journal, **2007**. (Submitted).
483. **Hita, E., y col.** *Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases.* Process Biochemistry, **2007**. 42(3): p. 415-422.
484. **Fomuso, L.B. y C.C. Akoh.** *Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor.* Food Research International, **2002**. 35(1): p. 15-21.
485. **Jennings, B.H. y C.C. Akoh.** *Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid.* Food Chemistry, **2001**. 72(3): p. 273-278.
486. **Lai, O.M., C.T. Low, y C.C. Akoh.** *Lipase-catalyzed acidolysis of palm olein and caprylic acid in a continuous bench-scale packed bed bioreactor.* Food Chemistry, **2005**. 92(3): p. 527-533.
487. **Jennings, B.H. y C.C. Akoh.** *Lipase-catalyzed modification of rice bran oil to incorporate capric acid.* J Agric Food Chem, **2000**. 48(9): p. 4439-43.
488. **Senanayake, S.P.J.N. y F. Shahidi.** *Acidolysis of seal blubber oil with lauric acid.* Jurnal of Food Lipids, **2007**. 14: p. 78-96.
489. **Senanayake, S.P.J.N. y F. Shahidi.** *Enzyme-catalyze synthesis of structured lipids via acidolysis of seal (Phoca groenlandica) blubber oil with capric acid.* Food Research International, **2002**. 35: p. 745-752.
490. **Shimada, Y., y col.** *Continuous production of structured lipid containing  $\gamma$ -linolenic and caprylic acids by immobilized Rhizopus delemar lipase.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1999**. 76(2): p. 189-193.

491. **Shimada, Y., y col.** *Production of structured lipids containing essential fatty acids by immobilized Rhizopus delemar lipase.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1996**. 73(11): p. 1415-1420.
492. **Shimada, Y., y col.** *Enzymatic synthesis of structured lipid containing arachidonic and palmitic acids.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(1): p. 89-93.
493. **Shimada, Y., y col.** *Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with Rhizopus delemar lipase.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1997**. 74(2): p. 97-101.
494. **Torres, C., H. Garcia, J. Ries, y C. Hill.** *Esterification of glycerol with conjugated linoleic acid and long-chain fatty acids from fish oil.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2001**. 78(11): p. 1093-1098.
495. **Soumanou, M., U. Bornscheuer, y R. Schmid.** *Two-step enzymatic reaction for the synthesis of pure structured triacylglycerides.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1998**. 75(6): p. 703-710.
496. **Soumanou, M.M., U.T. Bornscheuer, U. Schmid, y R.D. Schmid.** *Synthesis of structured triglycerides by lipase catalysis.* Lipid - Fett, **1998**. 100(4-5): p. 156-160.
497. **Schmid, U., y col.** *Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1998**. 75(11): p. 1527-1531.
498. **Irimescu, R., y col.** *Utilization of reaction medium-dependent regiospecificity of Candida antarctica lipase (Novozym 435) for the synthesis of 1,3-dicapryloyl-2-docosahexaenoyl (or eicosapentaenoyl) glycerol.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2001**. 78(3): p. 285-290.
499. **Irimescu, R., Y. Iwasaki, y C. Hou.** *Study of TAG ethanolysis to 2-MAG by immobilized Candida antarctica lipase and synthesis of symmetrically structured TAG.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002**. 79(9): p. 879-883.
500. **Han, J., Y. Iwasaki, y T. Yamane.** *Monitoring of lipase-catalyzed transesterification between eicosapentaenoic acid ethyl ester and tricaprylin by silver ion high-performance liquid chromatography and high-temperature gas chromatography.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1999**. 76(1): p. 31-39.
501. **Han, J. y T. Yamane.** *Enhancement of both reaction yield and rate of synthesis of structured triacylglycerol containing eicosapentaenoic acid under vacuum with water activity control.* Lipids, **1999**. 34(9): p. 989-995.
502. **Chandler, I., P. Quinlan, y G. McNeill.** *Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1998**. 75(11): p. 1513-1518.
503. **Xu, X.** *Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review.* Eur J Lipid Sci Technol., **2000**. 102: p. 287-303.
504. **Xu, X., S. Balchen, C.-E. Hoy, y A. Nissen.** *Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot continuous enzyme bed reactor.* J Am Oil Chem Soc, **1998**. 75: p. 1573-1579.
505. **Xu, X.** *Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration.* Inform, **2000**. 11: p. 1121-1129.
506. **Akoh, C.C.** *Structured lipids*, **1999**, United States Patent 6369252.
507. **Haraldsson, G.** *Enrichment of lipids with EPA and DHA by lipase.* Enzymes in Lipid Modification, **2000**: p. 170-189.
508. **Haraldsson, G. y B. Hjaltason.** *Using biotechnology to modify marine lipids.* INFORM, **1992**.
509. **Gunstone, F.D.** *Structured and Modified Lipids*. **2001**, New York.
510. **Haraldsson, G. y B. Kristinsson.** *Separation of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in fish oil by kinetic resolution using lipase.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1998**. 75(11): p. 1551-1556.



511. **Haraldsson, G., y col.** *The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1997**. 74(11): p. 1419-1424.
512. **Irimescu, R., K. Hata, Y. Iwasaki, y T. Yamane.** *Comparison of acyl donors for lipase-catalyzed production of 1,3-dicapryloyl-2-eicosapentaenoylglycerol.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2001**. 78(1): p. 65-70.
513. **Yamane, T.** *Lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids: monitoring the reaction and increasing the yield,* en Libro: *Lipase-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols containing polyunsaturated fatty acids: monitoring the reaction and increasing the yield*, U.T. Bornscheuer, Editor. **2000**, Wiley-CF: Weinheim. p. 148-169.
514. **Kawashima, A., y col.** *Enzymatic synthesis of high purity structured lipids with caprylic acid at 1,3-positions and polyunsaturated fatty acid at 2-position* J. Am. Oil Chem. Soc., **2001**. 78: p. 611-616.
515. **Christie, W.** *The positional distributions of fatty acids in triglycerides.* Analysis of Oils and Fats **1986**: p. 313-339.
516. **Hölmer, G.** *Triglycerides.* Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils, **1989**. 2: p. 139-173.
517. **Wijesundera, C.** *Synthesis of regioisomerically pure triacylglycerols containing n-3 very long-chain polyunsaturated fatty acids.* Eur. J. Lipid Sci. Technol., **2005**. 107: p. 824-832.
518. **Rosu, R., M. Yasui, Y. Iwasaki, y T. Yamane.** *Enzymatic synthesis of symmetrical 1,3-diacylglycerols by direct esterification of glycerol in solvent-free system.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **1999**. 76(7): p. 839-843.
519. **Rosu, R., y col.** *Enzymatic synthesis of glycerides from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **1998**. 4(4): p. 191-198.
520. **Kawashima, A., y col.** *Preparation of regioisomers of structured TAG consisting of one mole of CLA and two moles of caprylic acid.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2004**. 81(11): p. 1013-1020.
521. **Haraldsson, G.G., B.O. Gudmundsson, y O. Almarsson.** *The Synthesis of Homogeneous Triglycerides of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase.* Tetrahedron, **1995**. 51(3): p. 941-952(12).
522. **Haraldsson, G., A. Halldorsson, y E. Kuls.** *Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2000**. 77(11): p. 1139-1145.
523. **Haraldsson, G.G., H. Svanholm, y B. Hjaltason.** *Process for producing triglycerides from glycerol and long-chain polyunsaturated fatty acids using lipase from candida antarctica,* **1997**, US Patent No. 5604119 Novo Nordisk A/S.
524. **Croft, S.L., K. Seifert, y M. Duchene.** *Antiprotozoal activities of phospholipid analogues.* Mol Biochem Parasitol, **2003**. 126(2): p. 165-72.
525. **Doig, S.D. y R.M.M. Diks.** *Toolbox for exchanging constituent fatty acids in lecithins.* Eur J Lipid Sci Technol., **2003**. 105(359-367).
526. **D'Arrigo, P. y S. Servi.** *Using phospholipases for phospholipid modification.* Tibtech, **1997**. 15(90-96).
527. **Mustranta, A., y col.** *Modification of phospholipids with lipases and phospholipases.* Biocatalysis, **1994**. 9: p. 181-194.
528. **Adlercreutz, D., H. Budde, y E. Wehtje.** *Synthesis of phosphatidylcholine with defined fatty acid in the sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction.* Biotechnol. Bioeng., **2002**. 78: p. 403-411.
529. **Hosokawa, M., K. Takahashi, Y. Kikuchi, y M. Hatano.** *Preparation of therapeutic phospholipids through porcine pancreatic phospholipase A2-mediated esterification and lipozyme-mediated acidolysis.* J Am Oil Chem Soc, **1995**. 72: p. 1287-1291.

530. **Hosokawa, M., M. Ito, y K. Takahashi.** *Preparation of highly unsaturated fatty acidcontaining phosphatidylcholine by transesterification with phospholipase A2.* *Biotechnology Techniques*, **1998**. 12: p. 583-586.
531. **Haraldsson, G.G. y A. Thorarensen.** *Preparation of phospholipids highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids by lipase.* *J Am Oil Chem Soc*, **1999**. 76: p. 1143-1149.
532. **Mutua, L.N. y C.C. Akoh.** *Lipase-catalyzed modification of phospholipids: incorporation of n-3 fatty acids into biosurfactants.* *J Am Oil Chem Soc*, **1993**. 70: p. 125-128.
533. **Na, A., y col.** *Synthesis of phosphatidylcholine with (n-3) fatty acids by phospholipase A2 in microemulsion.* *J Am Oil Chem Soc*, **1990**. 67: p. 766-770.
534. **Totani, Y. y S. Hara.** *Preparation of polyunsaturated phospholipids by lipasecatalyzed transesterification.* *J Am Chem Soc*, **1991**. 68: p. 848-851.
535. **Peng, L., y col.** *Production of structured phospholipids by lipase-catalyzed acidolysis: optimization using response surface methodology.* *Enzyme Microb Tech*, **2002**. 31: p. 523-532.
536. **Hara, S., y col.** *Modification of soybean phospholipids by enzymatic transacylation.* *J Oleo Sci*, **2002**. 51: p. 417-421.
537. **Mustranta, A., T. Suortti, y K. Poutanen.** *Transesterification of phospholipids in different reaction conditions.* *J Am Oil Chem Soc*, **1994**. 71: p. 1415-1419.
538. **Svensson, I., P. Adlercreutz, y B. Mattiasson.** *Interesterification of the phosphatidylcholine with lipases in organic media.* *Appl Microbiol Biotechnol*, **1990**. 33: p. 255-258.
539. **Frohman, M.A. y A.J. Morris.** *Phospholipase D structure and regulation.* *Chem Phys Lipids*, **1999**. 98: p. 127-140.
540. **Ulbrich-Hofmann, R.** *Phospholipases used in lipid transformations*, en Libro: *Phospholipases used in lipid transformations*, U. Bornscheuer y F. Spener, Editores. **2000**, Wiley-VCH: Weinheim, Berlin. p. 219-262.
541. **Acevedo, R., y col.** *The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols.* *Vaccine*, **2006**. 24(Supplement 2): p. S32-S33.
542. **Haraldsson, G.G. y A. Thorarensen.** *The generation of glyceryl ether lipids highly enriched with eicopentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase.* *Tetrahedron*, **1994**. 35: p. 7681-7684.
543. **Houte, H., V. Partali, H.R. Sliwka, y E.G.K. Quartey.** *Synthesis of structured lipids and ether lipids with antioxidants: combination of a seleno fatty acid and a seleno fatty alcohol with a carotenoic acid in glyceride molecules.* *Chem Phys Lipids*, **2000**. 105: p. 105-113.
544. **Bradley, M., P. Wetherbee, y D. Nichols.** *Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the Chatham Rise, New Zealand.* *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **2000**. 125: p. 511-521.
545. **Jayasinghe, C., y col.** *Inter species changes of lipid compositions in liver of shallow-water sharks from the Indian Ocean.* *Fisheries Science*, **2003**. 69: p. 644-653.
546. **Señoráns, F.J., J. Tabera, y M. Herraiz.** *Rapid separation of free sterols in edible oils by on-line coupled Reversed phase Liquid Chromatography-Gas Chromatography.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**. 44: p. 3189-3192.
547. **Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura de España.** *Métodos oficiales de análisis de aceites y grasas.* **1974**.
548. **Gundersen, T.E. y R. Blomhoff.** *Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples* *Journal of Chromatography A* **2001**. 935(1-2): p. 13-43.
549. **Panfili, G., A. Fratianni, y M. Irano.** *Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51: p. 3940.
550. **Schaefer, A., T. Küchler, T.J. Simat, y H. Steinhart.** *Migration of lubricants from food packagings - Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase*

- liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection* Journal of Chromatography A **2003**. 1017(1-2): p. 107-116.
551. **Genge, B.R., L.N. Wu, y R.E. Wuthier.** *Separation and quantification of chicken and bovine growth plate cartilage matrix vesicle lipids by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection.* Anal Biochem, **2003**. 322(1): p. 104-15.
552. **Perona, J.S. y V. Ruiz-Gutierrez.** *Quantification of major lipid classes in human triacylglycerol-rich lipoproteins by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection.* J Sep Sci, **2004**. 27(9): p. 653-9.
553. **Hurtado Benavides, A.M.** *Estudio del proceso de extracción de componentes minoritarios de aceite de oliva con CO2 supercrítico en contracorriente.* **2002**, Universidad Autónoma de Madrid.
554. **Lu, H.-T., Y. Jiang, y F. Chen.** *Preparative separation and purification of squalene from the microalga Thraustochytrium ATCC 26185 by high-speed counter-current chromatography.* Journal of Chromatography A **2003**. 994(1-2): p. 37-43.
555. **Ruivo, R., M.J. Cebola, P. Simoes, y M. Nunes da Ponte.** *Fractionation of Edible Oil Model Mixtures by Supercritical Carbon Dioxide in a Packed Column. Part 2: A Mass-Transfer Study.* Ind. Eng. Chem. Res., **2002**. 41(9): p. 2305 -2315.
556. **Ruivo, R., M.J. Cebola, P.C. Simoes, y M. Nunes da Ponte.** *Fractionation of edible oil model mixtures by supercritical carbon dioxide in a packed column. Part I: experimental results.* Industrial Engineering Chemistry Research, **2001**. 40: p. 1706-1711.
557. **Ruivo, R., y col.** *Dynamic model of a countercurrent packed column operating at high pressure conditions* The Journal of Supercritical Fluids, **2004**. 32(1-3): p. 183-192.
558. **Ruivo, R., A. Paiva, y P. Simoes.** *Phase equilibria of the ternary system methyl oleate/squalene/carbon dioxide at high pressure conditions.* Journal of Supercritical Fluids, **2004**. 29: p. 77-85.
559. **Chang, C.-m.J., M.-s. Lee, B.-c. Li, y P.-y. Chen.** *Vapor-liquid equilibria and densities of CO2 with four unsaturated fatty acid esters at elevated pressures.* Fluid Phase Equilibria, **2005**. 233(1): p. 56-65.
560. **Fernandes, P. y J.M.S. Cabral.** *Phytosterols: Applications and recovery methods.* Bioresource Technology, **2007**. 98(12): p. 2335-2350.
561. **Lin, K.-M. y S.S. Koseoglu.** *Separation of sterols from deodorizer distillate by crystallization.* Journal of Food Lipids, **2003**. 10(2): p. 107-127.
562. **Robinson, P.L., T.J. Cuff, y J.E. Parker.** *Isolation and purification of sterols from neutral fraction of tall oil pitch by single decantation crystallization,* **2000**, WESTVACO CORPORATION. WO/2000/027867. PCT/US1999/014136
563. **Volkmar, J., y col.** *Processes for recovering phytosterols via crystallization,* **2007**, USA 7244856, Cognis Deutschland GmbH & Co. KG. 10896486.
564. **Yan, Z.Q., y col.** *Isolation and purification of sterols from neutrals fraction of tall oil pitch by direct crystallization, dual phase,* **2000**, USA, WESTVACO CORPORATION. WO/2000/012533. PCT/US1999/014135.
565. **Mangold, H.K.** *Ether Lipids*, en Libro: *Ether Lipids*, F.L. Snyder, Editor. **1972**, Academic: New York. p. 157-176.
566. **Nilsson, W.B., E.J. Gauglitz, y J.K. Hudson.** *Solubilities of methyl oleate, oleic acid, oleyl glycerols, and oleyl glycerols mixtures in supercritical carbon dioxide.* JAOCS, **1991**. 68: p. 87-91.
567. **Bharath, R., H. Inomata, y K. Arai.** *Vapor-Liquid Equilibria for Binary Mixtures of Carbon Dioxide and Fatty Acid Ethyl Esters.* Fluid Phase Equilibria, **1989**. 50: p. 315-327.
568. **Willis, W.M., R.W. Lencki, y A.G. Marangoni.** *Lipid Modification Strategies in the Production of Nutritionally Functional Fats and Oils.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **1998**. 38(8): p. 639-674.

569. **McNeil, G.P., R.G. Ackman, y S.R. Moore.** *Lipase-catalyzed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids.* J Am Oil Chem Soc, **1996.** 73: p. 1403-1407.
570. **Breivik, H., G. Haraldsson, y 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.
571. **Torres, C., F. Munir, L. Lessard, y C. Hill.** *Lipase-mediated acidolysis of tristearin with CLA in a packed-bed reactor: A kinetic study.* Journal of the American Oil Chemists' Society, **2002.** 79(7): p. 655-661.
572. **Brunner, G.** *Industrial process development Countercurrent multistage gas extraction (SFE) processes.* The Journal of Supercritical Fluids, **1998.** 13(1): p. 283-301.
573. **Espinosa, S., T. Fornari, S.B. Bottini, y E.A. Brignole.** *Phase equilibria in mixtures of fatty oils and derivatives with near critical fluids using the GC-EOS model.* Journal of Supercritical Fluids, **2002.** 23: p. 91-102.
574. **Espinosa, S., S. Diaz, y E.A. Brignole.** *Thermodynamic Modeling and Process Optimization of Supercritical Fluid Fractionation of Fish Oil Fatty Acid Ethyl Esters.* Ind. Eng. Chem. Res. , **2002.** 41: p. 1516-1527.
575. **Florusse, L.J., T. Fornari, S.B. Bottini, y C.J. Peters.** *Phase behavior of carbon dioxide and certain low-molecular weight triglycerides binary systems: measurements and thermodynamic modeling.* The Journal of Supercritical Fluids, **2004.** 31(2): p. 123-132.
576. **Inomata, H., y col.** *Vapour-liquid equilibria for binary mixtures of carbon dioxide and fatty acid methyl esters.* Fluid phase equilibria, **1989.** 46(1): p. 41-52.
577. **Catchpole, O.J., J.B. Grey, y K.A. Noermark.** *Solubility of Fish Oil Components in Supercritical CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + Ethanol Mixtures.* J. Chem. Eng. Data, **1998.** 43(6): p. 1091-1095.
578. **Catchpole, O.J. y J.C. von Kamp.** *Phase Equilibrium for the Extraction of Squalene from Shark Liver Oil Using Supercritical Carbon Dioxide.* Ind. Eng. Chem. Res. , **1997.** 36(9): p. 3762-3768.
579. **Joback, K.G. y R.C. Reid.** *Estimation of pure-component properties from group-contributions* Chemical Engineering Communications, **1987.** 57(1 - 6): p. 233 - 243.
580. **Constantinou, L. y R. Gani.** *New group contribution method for estimating properties of pure compounds.* AIChE Journal, **1994.** 40(10): p. 1697-1710.

# PUBLICACIONES

## 14 Publicaciones.

1. Autores: Torres, C. F.; Vázquez L.; Señoráns F.J.; Reglero, G.  
Título: **“Study of the analysis of alkoxyglycerols and other non-polar lipids by liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector”**.  
Revista: Journal of Chromatography A.  
Volumen: 1078  
Páginas, inicial: 28 final: 34  
Fecha: 2004
2. Autores: L. Vázquez, C. F. Torres, T. Fornari, N. Grijelmo, F. J. Señoráns; G. Reglero.  
Título: **“Supercritical fluid extraction of minor lipids from preteated sunflower oil deodorized distillates”**.  
Revista: European Journal of Lipid Science and Technology.  
Volumen: 108  
Páginas, inicial: 659 final: 665  
Fecha: 2006
3. Autores: L. Vázquez, C. F. Torres, T. Fornari, F. J. Señoráns, G.Reglero.  
Título: **“Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical carbon dioxide extraction”**.  
Revista: Journal of Supercritical Fluids.  
Volumen: 40  
Páginas, inicial: 59 final: 66  
Fecha: 2007
4. Autores: Carlos F. Torres, Luis Vázquez, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero.  
Título: **“An efficient methodology for the preparation of alkoxyglycerols rich in conjugated linoleic acid and eicosapentaenoic acid”**.  
Revista: JAOCS.  
Volumen: 84(5)  
Páginas, inicial: 443 final: 448  
Fecha: 2007

5. Autores: Luis Vázquez, Ana Toré, Carlos F. Torres, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero.  
Título: **“Detector evaporativo de dispersion de luz. Una herramienta versátil en el análisis de aceites y grasas”**.  
Revista: Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos.  
Volumen: 385  
Páginas, inicial: 62 final: 66  
Fecha: 2007
  
6. Autores: Luis Vázquez, Tiziana Fornari, Francisco J. Señoráns, Guillermo Reglero, Carlos F. Torres.  
Título: **“Supercritical Carbon Dioxide Fractionation of Nonesterified Alkoxyglycerols Obtained from Shark Liver Oil”**.  
Revista: Journal of Agricultural and Food Chemistry.  
En prensa  
Fecha: 2007

## **Patentes:**

1. Inventores: G. Reglero, L. Vázquez, C. Torres, T. Fornari, F. Moreno, F.J. Señoráns.  
Título: **ALCOXIGLICEROLES MODIFICADOS CON ACTIVIDAD BENEFICIOSA PARA LA SALUD.**  
Nº de registro: P200602493  
Año de petición: 2006  
Fecha de prioridad: 29-sep-2006  
Entidad Titular: Universidad Autónoma de Madrid y Solutex S.L.  
Países a los que se ha extendido: ESPAÑA  
Empresa/s que la están explotando: Soluciones Extractivas Alimentarias S.L.