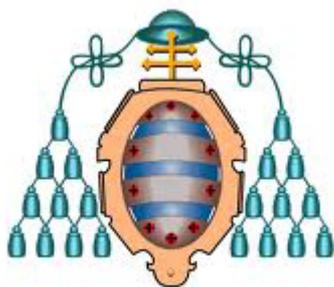


DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS



APLICACIÓN DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS PARA
RECUPERACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA
DESODORIZACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA.
POSIBLE APLICACIÓN A GRASAS LÁCTEAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER - Junio 2012

Jorge Rodríguez Álvarez-Buylla

Tutor IPLA-CSIC: Juan Carlos Bada Gancedo

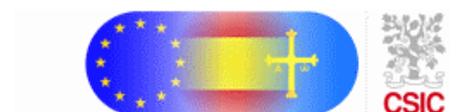
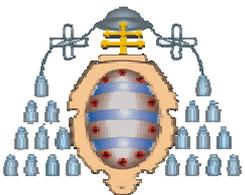
Tutora UNIOVI: Rosana Badía Laiño

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Bada por sus conocimientos, su impulso y su ilusión en este proyecto

A la Dra. Rosana Badía Laiño por su apoyo y asesoramiento

A mis compañeros de trabajo por su ayuda inestimable



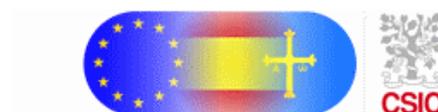
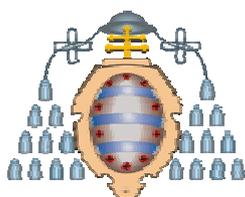
ROSANA BADIA LAIÑO, Profesora Titular de Química Física y Analítica, adscrita al Departamento Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**APLICACIÓN DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS PARA RECUPERACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA DESODORIZACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA. POSIBLE APLICACIÓN A GRASAS LÁCTEAS**” ha sido realizado por el licenciado **JORGE RODRÍGUEZ ÁLVAREZ-BUYLLA** en el **INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS (CSIC)**, bajo su tutoría, constituyendo el Proyecto Fin de Máster del interesado, cuya presentación autoriza.

Oviedo, a 14 de junio de 2012

Fdo: Rosana Badía Laiño



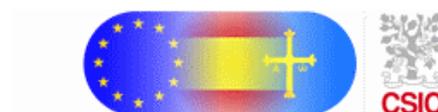
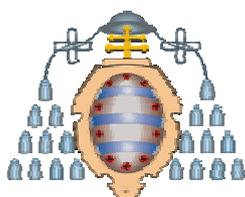
JUAN CARLOS BADA GANCEDO, Científico Titular del Instituto de Productos Lácteos de Asturias, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**APLICACIÓN DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS PARA RECUPERACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA DESODORIZACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA. POSIBLE APLICACIÓN A GRASAS LÁCTEAS**” ha sido realizado por el licenciado **JORGE RODRÍGUEZ ÁLVAREZ-BUYLLA** en el **INSTITUTO DE PRODUCTOS LÁCTEOS DE ASTURIAS (CSIC)**, bajo su tutoría, constituyendo el Proyecto Fin de Máster del interesado, cuya presentación autoriza.

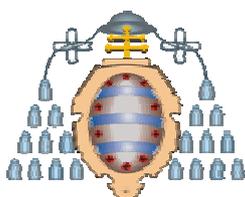
Villaviciosa, a 14 de junio de 2012

Fdo: Juan Carlos Bada Gancedo

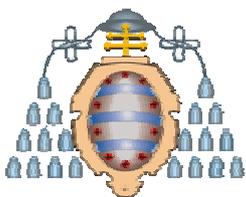


OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo de este trabajo es la separación y/o concentración de compuestos grasos de alto valor añadido, procedentes de destilados de desodorización de aceites de oliva sin tratamiento previo, para conocer su rendimiento de recuperación y su posible utilización industrial. Para ello se partió de destilados de desodorización de aceite de oliva procedentes de la refinería de Koipe (Córdoba, Andalucía); Se realizaron tres grupos de ensayos según tres diseños estadísticos de cuadrado latino de dimensiones tres por tres, con variaciones de presiones, de temperatura de trabajo y de cantidad de modificador, manteniendo constante en todos los ensayos el caudal de destilados; Cada ensayo se realizó por duplicado, efectuando un tercer ensayo en caso necesario; asimismo con los datos obtenidos se aplicó ecuación por mínimos cuadrados para ampliar la interpretación de los resultados. Los ensayos se efectuaron en flujo continuo en una planta de SFC Iberfluid diseñada el año 2004 diseñada al efecto. Las muestras se recogieron en cada uno de los tres separadores cuando la planta estaba en régimen permanente de trabajo y se almacenaron a -20°C en viales con atmósfera de nitrógeno para su correcta conservación; posteriormente se analizaron y se procesaron estadísticamente. Con las conclusiones y experiencias obtenidas, se pretende aplicar la metodología desarrollada a la separación de compuestos grasos presentes en la grasa láctea, con el fin de eliminar los compuestos no deseables de la misma y hacerla más saludable, o con mejores propiedades químicas, físicas y/o organolépticas.



INTRODUCCIÓN.....	3
1.- Clasificación de aceites de oliva.....	3
1.1.- Clasificación de los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva...	3
1.2.- Composición del aceite de oliva virgen.....	5
1.3.- La desodorización.....	6
1.3.2.- Composición del destilado de desodorización y su valor comercial.....	10
1.4.- Grasa láctea.....	11
1.4.1.- Obtención.....	11
1.4.2.- Composición.....	12
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	13
1.- Métodos de recuperación.....	13
1.1.- Extracción líquido-líquido.....	13
1.2.- Destilación molecular.....	14
1.3.- Cristalización.....	14
1.4.- Procesos enzimáticos.....	15
1.5.- Fluidos supercríticos.....	16
1.5.1.- Principios de la extracción supercrítica.....	18
1.5.2.-Ventajas de la extracción con fluidos supercríticos...	20
1.5.3.- Aplicaciones.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1.- Instrumentación.....	23
1.1.- Funcionamiento de la planta.....	24
2.- Cromatógrafo de fases.....	27
3.- Muestras.....	27
4.- Materiales y reactivos.....	28
5.- Métodos.....	28
5.1.-Cuadrados latinos.....	28
5.2.- Análisis FAMES.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43



INTRODUCCIÓN

En España se producen anualmente en torno a 1.200.000 toneladas de aceite de oliva, que representa el 50 % del total mundial y el 70% de la producción de la U.E. Le siguen Italia con 750.000, Grecia con 230.000 y Portugal con 40.000 toneladas. El resto de países mediterráneos producen 515.000 toneladas (1). El 29 de febrero de este año 2012, la Agencia para el Aceite de Oliva (AAO) presentó el informe de situación del mercado de aceite de oliva y de la aceituna de mesa. Del informe se desprende que el aceite producido hasta el momento del corriente año asciende a 1.560.500 toneladas, lo que supone un récord de producción, ya que se trata de una cantidad muy superior a la campaña más alta hasta el momento, que fue la temporada 2003/04, con 1.416.600 toneladas.

El 90 % del consumo del aceite de oliva recae en los países mediterráneos donde se centra el 95 % de la producción mundial. El aceite de oliva pues, se dedica mayoritariamente al consumo doméstico en sus países de origen, siendo poco dependiente del equilibrio entre oferta y demanda a nivel internacional (2).

1.- TIPOS Y CARACTERÍSTICAS DE ACEITES DE OLIVA

1.1.- Clasificación de aceites de oliva y aceites de orujo de oliva

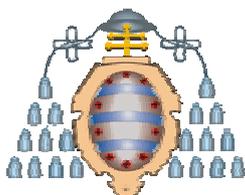
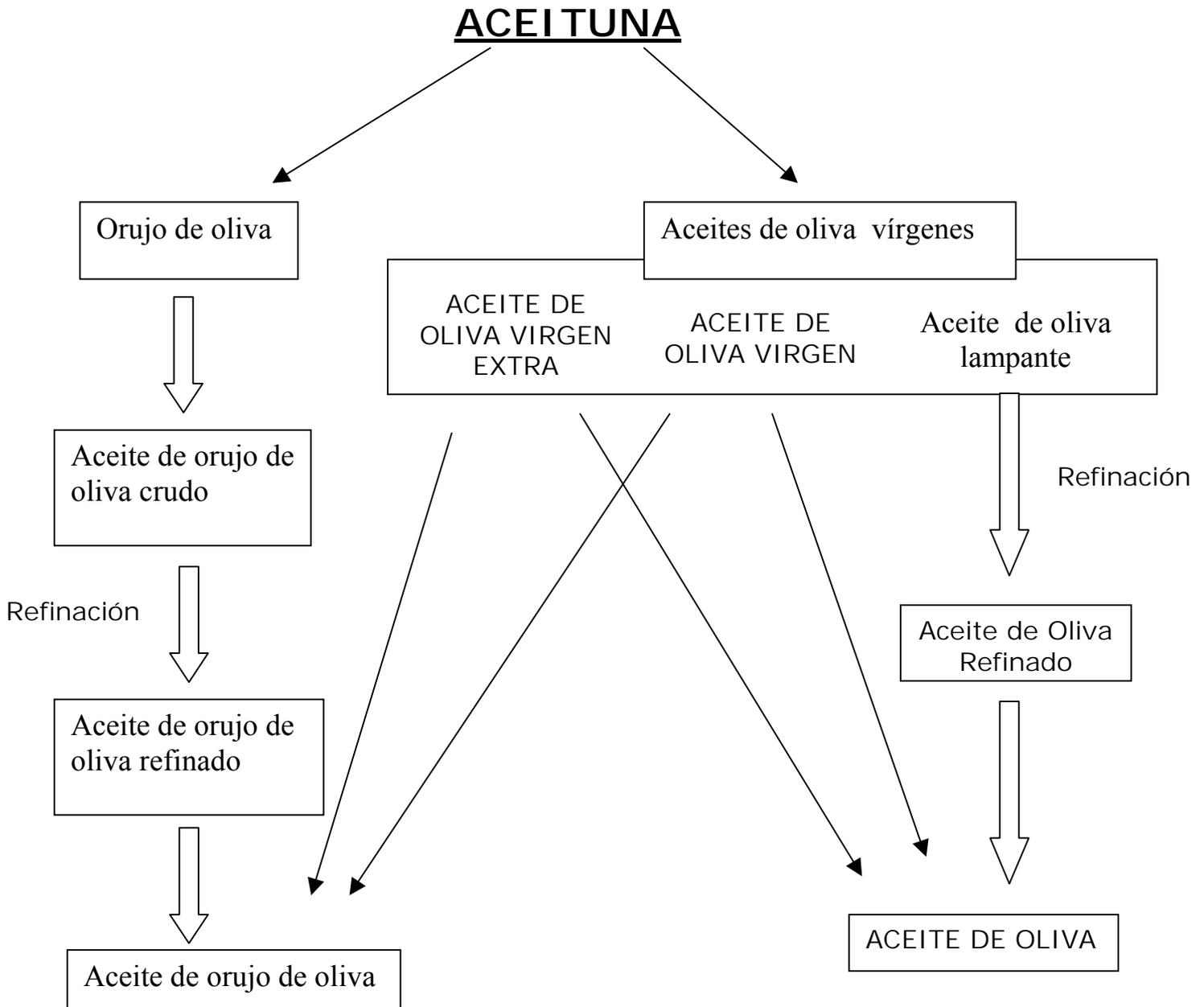


Figura 1. Diagrama de obtención del aceite de oliva y orujo de oliva



Para determinar la categoría de los aceites de oliva y los obtenidos a partir del orujo de oliva, se tienen en cuenta la acidez (expresada como la cantidad de ácido oleico, como ácido predominante) y las características organolépticas (expresadas por la “mediana” de las puntuaciones dadas por los paneles de cata tanto a los defectos del aceite –atrujado, avinado, rancio, etc.) como a su atributo frutado (gusto, olor, etc.).

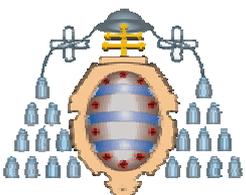


Figura 2: Aceite de oliva virgen

a) Aceites de oliva vírgenes:

Aceite obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos en condiciones, sobre todo térmicas, que no implique la alteración del aceite.

Dentro de los aceites de oliva virgen se encuentran:

- Aceite de Oliva Virgen Extra: aceite de oliva virgen con una acidez libre, expresada en cantidad de ácido oleico, como máximo de 0,8g por 100g, siendo la mediana de sus defectos 0, y la del atributo frutado superior a 0.
- Aceite de Oliva Virgen: aceite de oliva virgen con una acidez libre máxima de 2g por 100g, siendo la mediana de sus defectos inferior o igual a 2,5, y la del atributo frutado superior a 0
- Aceite de oliva Lampante: aceite de oliva virgen con una acidez libre, superior a 2g por 100g siendo la mediana de sus defectos superior a 2,5, y la del atributo frutado superior a 0.



b) Aceite de oliva refinado:

- Aceite de oliva obtenido mediante el refinado de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez no podrá ser superior a 0,3g por 100g, y cuyas otras características son conformes a las establecidas por esta categoría.

c) Aceite de orujo de oliva crudo:

- Aceite obtenido a partir del orujo de oliva mediante tratamiento con disolvente o por medios físicos, o que corresponda, con excepción de algunas características determinadas, a un aceite de oliva lampante.

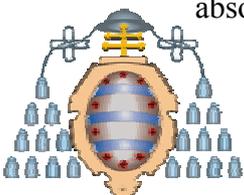
1.2.- Composición del aceite de oliva virgen.

El aceite de oliva, al igual que todos los aceites vegetales, está compuesto de una fracción saponificable triacilglicérols (triglicéridos) y otra insaponificable (componentes menores).

La fracción insaponificable está formada por gran cantidad componentes menores, que son indicadores de la autenticidad fisicoquímica, destacaremos por su interés los siguientes:

Alcoholes terpénicos libres o esterificados con los ácidos grasos. Resulta de gran interés el cicloasterol que favorece la excreción fecal del colesterol.

Esteroles. Entre los que el mayoritario es el β -Sitosterol, sustancia que se opone a la absorción de colesterol.



Carotenos. Con acción vitamínica A y antioxidantes.

Tocoferoles. El 90% se encuentran en forma α -tocoferol que es la más activa y sus funciones principales son: Vitamina E y alto poder antioxidante.

Clorofilas. Ejercen una acción biológica muy interesante como cicatrizante.

Compuestos fenolicos. Responsables en gran parte de las características organolépticas y de la estabilidad frente a la oxidación.

Hidrocarburos: escualenos, pristanos, farnesanos etc.

La fracción insaponificable disminuye cuando al aceite se somete al proceso de refinación.

La fracción saponificable constituye en torno a el 99% del aceite. Los ácidos grasos que constituyen los triglicéridos presenta gran variabilidad dependiendo, de la variedad, del suelo clima etc...

En la tabla 1 se muestran los límites de la composición ácida fijados por el C.O.I. (Consejo Oleico Internacional):

Tabla 1: Límites de la composición ácida (C.O.I.)

ÁCIDO PALMÍTICO	7,5-20 %
Ácido Palmitoleico	0,3-3,5 %
Ácido Estearico	0,5-5,0 %
Ácido Oleico	55-83 %
Ácido Linoleico	3,5-21 %
Ácido Linolénico	0,0-1,5 %

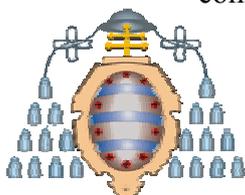
De aquí se deduce que la proporción mayoritaria de ácidos grasos la constituyen el ácido oleico (monoinsaturado), siguiendo los ácidos grasos saturados y los poliinsaturados (linoleico y linolénico) en menor porcentaje (3).

1.3.- La desodorización

El aceite virgen extra y algunas variedades del virgen son aptos para consumo de boca sin tratamientos adicionales. Para el resto es necesaria una refinación para adaptar sus características y propiedades organolépticas a la calidad demandada por el consumidor final y ajustada a lo regulado por la normativa legal.

La refinación comprende los siguientes tratamientos: la neutralización o desacidificación, blanqueo o decoloración (eliminación de impurezas solubles), la filtración y la desodorización. (4, 5)

Para eliminar la acidez libre del aceite virgen (crudo), se somete a una neutralización con una dilución de sosa cáustica con un 15-25 % de más de lo estrictamente



necesario. Tras la neutralización se eliminan jabones formados por medio de lavados con agua caliente, secado de humedad residual y blanqueo y/o decoloración con tierra decolorante y posterior filtración.

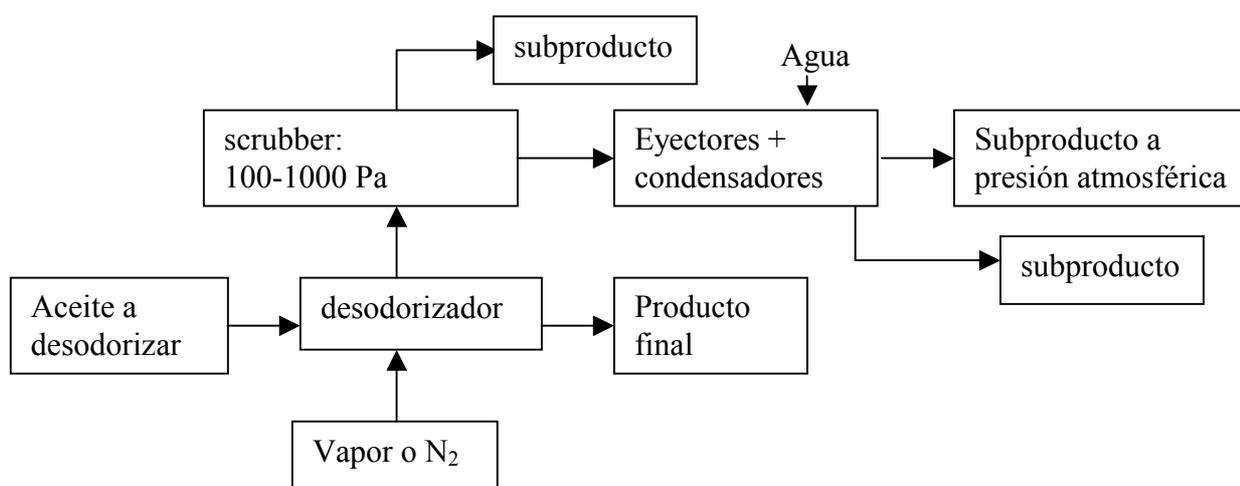
Desodorización es el proceso de destilación a contracorriente que tiene por objeto eliminar las sustancias que comunican a la grasa sabores y olores desagradables (6).

La desodorización se ha descrito como un proceso de destilación con vapor de agua saturado y seco o nitrógeno a alto vacío, y a alta temperatura (7).

Este tratamiento consiste en un calentamiento del aceite por encima de los 200°C, a presión absoluta de 530-800 Pa. En esas condiciones, se inyecta al aceite a contracorriente vapor de agua saturado y seco o nitrógeno en cantidades controladas. Este vapor o nitrógeno (8) arrastra fuera del equipo de desodorización, una considerable cantidad de subproductos tales como ácidos grasos, clorofilas, esteroides, tocoferoles, escualenos, y en muy pequeñas cantidades puede arrastrar mono, di o triacilglicerol. Todos ellos son recuperados en un equipo de condensación. El aceite queda apto para su consumo y los subproductos obtenidos contienen compuestos de alto valor y serán la materia prima del presente estudio.

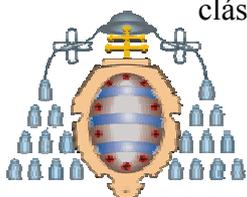
La figura 3 representa una planta de desodorización clásica con eyectores y condensadores:

Figura 3. Planta de desodorización clásica



Los vapores provenientes del vaso del desodorizador contienen aire, vapor de agua, ácidos grasos y otros volátiles. Estos se van condensando haciéndolos pasar por un scrubber. Como este está al mismo vacío que el desodorizador el vapor de agua no condensa, consiguiendo una primera recuperación.

Los vapores restantes se hacen pasar a través de un eyector. Esto es un termo compresor que incrementa la presión de vapor hasta 3000-5000 Pa. En un diseño clásico de sistemas de vacío los vapores son condensados en 2-3 condensadores



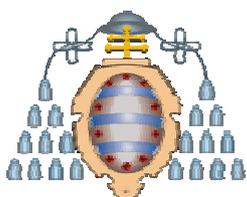
barométricos. Los componentes no condensables son eliminados mediante un eyector a la atmósfera. La función de uno o dos eyectores y los condensadores barométricos pueden ser reemplazados por sistemas de generación de vacío por bombeo mecánico y equipos de condensación-congelación de contacto indirecto. (9)

El presente trabajo se desarrolla directamente sobre este subproducto obtenido en la desodorización. Se calcula la obtención entre 0,5-1 % de este subproducto respecto al aceite bruto inicial, lo que representa una muy considerable cantidad de subproducto que puede ser aprovechado

Figura 4. Subproductos de la desodorización

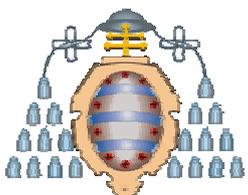


Los compuestos obtenidos en este subproducto tienen un importante valor económico porque sus características nutricionales son beneficiosas para la salud humana (10). Además algunos de sus componentes son utilizados en farmacia y cosmética.



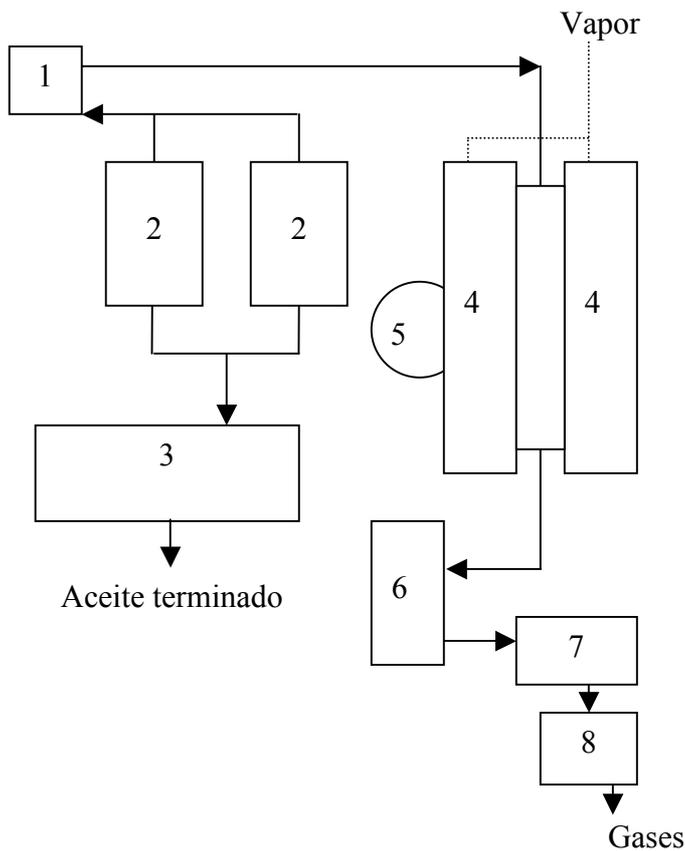
En la figura 5 se muestra la planta de desodorización instalada en ETSII de Gijón de la Universidad de Oviedo.

Figura 5: Planta de desodorización de la ETSII. Gijon. Universidad de Oviedo



En la figura 6 (B) se muestra una planta de desodorización instalada en el Instituto de la Grasa de Sevilla. En primer término pueden verse las dos columnas del sistema de frío, sustitutivo de los eyectores y los condensadores barométricos. En la figura 6 (A) se muestra el diagrama de bloques de la planta.

Figura 6. Planta de desodorización instalada en el Instituto de la Grasa de Sevilla



(A)



(B)

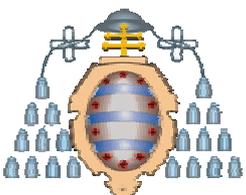
- 1: Condensador ác. Grasos
- 2: Desodorizadores continuos
- 3: Enfriador de aceite
- 4: Condensadores de hielo

- 5: Grupo frigorífico
- 6: Separador de gotas
- 7: Bomba de paletas
- 8: Bomba lobular

(11)

1.3.2.- Composición del destilado de desodorización y su valor comercial

El destilado de desodorización (FAD) tienen un alto nivel de materia insaponificable (32.45 %).



En la tabla 2, se presenta la composición de un destilado de desodorización de aceite de oliva.

Tabla 2. Parámetros de un destilado de aceite de oliva (9)

COMPONENTE (% W/W)	FAD
FFA	34,1
C16:0	16,8
C16:1	0,7
C18:0	2,7
C18:1	58,5
C18:2	20,5
C18:3	0,8
Escualeno	20,4
Monoglicéridos	4,4
Tocoferoles	
Alfa-tocoferol	1,0
Beta-tocoferol	0,3
Gamma-tocoferol	0,4
Total	1,7
Esteroles	
Campesterol	0,2
Sitosterol	2,3
Delta-5 avenasterol	0,2
Delta – 7 estigmasterol	0,2
Delta – 7 avenasterol	0,4
Total	3,3
Diglicéridos	2,8
Triglicéridos	7,6

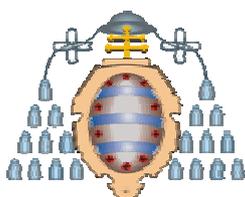
Si se concentra o aísla el escualeno, los esteroides, o incluso un ácido graso con alto valor añadido como puede ser el omega 3 (ácido linolénico), se logrará un producto revalorizado, a partir de un desecho con escaso valor en la industria. (12)

1.4.- Grasa láctea

Dado que en el presente trabajo se propone como aplicación futura del proceso descrito para la separación-concentración por fluidos supercríticos de la grasa láctea, en este apartado se especifica de forma sucinta su modo de obtención así como se describe someramente su composición.

1.4.1.- Obtención: desnatado de la leche

La separación de la nata es posible gracias a la diferencia de densidad entre los glóbulos grasos ($0,93 \text{ g/cm}^3$) y la fase acuosa que constituye la leche desnatada ($1,036 \text{ g/cm}^3$).



El calentamiento acentúa la eficacia de la desnatadora al fluidificar la leche, facilitando así la separación de los glóbulos grasos. La separación se realizaría mediante centrifugación aprovechando la diferencia de densidades. Se obtendría la denominada doble nata por el Código Alimentario, con más del 50 % de grasa láctea.

1.4.2.- Composición

La grasa láctea en razón de su comportamiento se suele dividir en dos grandes grupos:

- lípidos
- fracción insaponificable

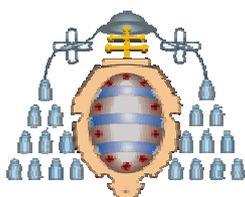
Dentro de los lípidos podemos distinguir los lípidos simples (99 %), ésteres de ácidos grasos y de un alcohol. El alcohol puede ser glicerina o un estero. También están compuestos por lípidos complejos (1 %), los cuales pueden tener además de carbono, hidrógeno y oxígeno, fósforo (fosfátidos) y nitrógeno (fosfoaminolípidos). Comprenden fundamentalmente las lecitinas (35 %), las cefalinas (40 %) y los fosfoesfingolípidos (25 %).

Dentro de la fracción insaponificable sus componenetes son numerosos y variados. Los principales son los caratenoides, tocoferoles, esterole, escualeno y vitaminas liposolubles. (13)

En la tabla 3 muestra una composición típica en ácidos grasos de la grasas lácteas más representativas:

Tabla 3: Composición típica en ácidos grasos de grasas lácteas

ÁCIDOS GRASOS	LECHE DE VACA % (14)	LECHE DE CABRA % (15)	LECHE DE OVEJA % (16)
C4	8,1	2,09	1,98
C6	2,8	2,47	1,48
C8	2,5	2,84	1,49
C10	3,7	10,61	4,50
C10:1	0,4	0,22	0,10
C12	4,4	5,49	2,81
C12:1	0,9	0,18	0,11
C14	12,5	10,01	7,74
C14:1	1,7	0,18	0,36
C16	23,2	27,42	22,37
C16:1	3,7	1,63	0,34
C18	7,6	8,65	14,64
C18:1	24,8	18,68	28,59
C18:2	2,9	3,49	2,3
C20	1,0	0,43	



FUNDAMENTO TEÓRICO

1.- MÉTODOS DE RECUPERACIÓN

En este trabajo se utilizará el CO₂ en estado supercrítico como disolvente para extraer diferentes compuestos a fin de su recuperación.

Anteriores trabajos se han llevado a cabo con CO₂ supercríticos para recuperación de algunos de estos componentes de los destilados de oliva en otros aceites de semillas (17 y 18).

Además se han usado distintos procedimientos, como puede ser la extracción convencional, la destilación, la cristalización, procesos enzimáticos, etc. A continuación se describe cada una de ellas, explicando las ventajas y desventajas que la extracción de fluidos supercríticos (SFE) presenta frente a los mismos.

1.1.- Extracción líquido/líquido

La extracción líquido-líquido envuelve la transferencia de un soluto desde una fase líquida a otra.

Se define el coeficiente de partición K_x como la concentración de una determinada sustancia en un “solvente no polar” (C_x^{NP}) respecto a la concentración de la misma sustancia en el “solvente polar” (C_x^P). Luego:

$$K_x = C_x^{NP} / C_x^P$$

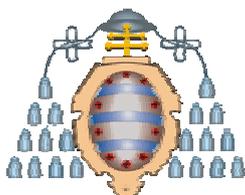
Como propiedad primaria, que sustancias con características polares se disuelven preferentemente en solventes polares, con lo que los ácidos grasos tendrán mayor solubilidad que los tocoferoles-esteroles, y estos a su vez, más que los triglicéridos en el solvente más polar.

La segunda propiedad clave para entender la extracción líquido-líquido es la relación de masas de ambas fases (W^{NP}/W^P) pues la cantidad de una sustancia en una de las fases es el producto de la concentración en ella por el volumen de dicha fase. Si la relación de masas de ambas fases fuese igual a la inversa del coeficiente de partición, la cantidad de la sustancia en cuestión presente en cada fase sería igual.

Entre los aspectos atractivos del proceso de extracción líquido-líquido cabe incluir:

- Se puede aplicar a los destilados de desodorización sin tratamiento previo, pero a costa de perder los ésteres de esteroides.
- Su aplicación industrial por medio de columnas de extracción es simple desde el punto de vista mecánico, demandando un mantenimiento mínimo. (19)

Desafortunadamente como desventaja de las extracciones con líquidos podemos citar las siguientes: necesitan, normalmente, varias horas o más para obtener recuperaciones del analito satisfactorias y aún así algunas veces no se consiguen. Los costes de los disolventes son, con frecuencia elevados. Las disoluciones de los



analitos recuperados son, a menudo, tan diluidas que tras la extracción debe llevarse a cabo un proceso de concentración que puede ir acompañado de la degradación y de la pérdida de analito, así como de la contaminación del mismo. (20)

1.2.- Destilación molecular

Una de las formas más simples propuestas para obtener una fracción rica en tocoferoles y esteroides es la destilación molecular, basada en las diferencias de los puntos de ebullición

A título de ejemplo, en la tabla 4 se mencionan los puntos de ebullición aproximados a la presión de 13 Pa (0,1 mm Hg):

Tabla 4. Puntos de ebullición de ácidos grasos a 13 Pa

ÁCIDOS GRASOS	140 °C
Tocoferoles	220 °C
Esteroides	230 °C
Ésteres de esteroides	260 °C
Triglicéridos	320 °C

El procedimiento es directo, no recurriendo a reacciones químicas para lograr el objetivo, pero presenta algunas desventajas:

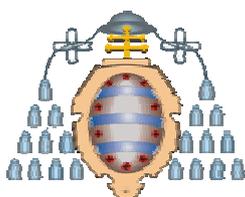
- Una pérdida considerable de tocoferoles y esteroides en el primer destilado.
- La necesidad de tratar el residuo final, mediante hidrólisis o transesterificación, para transformar los ésteres de los esteroides en esteroides libres, más una etapa posterior de recuperación de los esteroides liberados.
- La máxima concentración de tocoferoles y esteroides es altamente dependiente de la actuación del desodorizador. Si éste permite el arrastre de mucho aceite junto con el destilado no podrá obtenerse, por vía física, un concentrado de alto porcentaje de producto deseado.

La destilación puede mejorarse si los ácidos grasos y eventualmente parte o todos los triglicéridos son transformados en sustancias más volátiles, como por ejemplo ésteres de alcoholes inferiores (metílico, etílico, i-propílico). Los puntos de ebullición de estos son unos 30 °C menores que los correspondientes a los ácidos grasos, lo cual favorece la evaporación. (19)

También puede llevarse a cabo el aumentar la concentración de tocoferoles y esteroides a partir de una doble destilación molecular. (21)

1.3.- Cristalización

Se considera generalmente que la cristalización ocurre en dos etapas: la nucleación y el crecimiento de partículas. La nucleación es el proceso por el cual las moléculas en solución se reúnen de manera aleatoria y forman pequeños agregados. El crecimiento de partículas implica la adición de más moléculas al núcleo para formar un cristal.



Cuando una solución contiene más soluto del que debería estar presente en el equilibrio, se dice que la solución está sobresaturada. Se ha encontrado que la velocidad de nucleación depende más de la sobresaturación relativa que de la misma rapidez de crecimiento de partículas. Esto significa que en una solución altamente sobresaturada la nucleación ocurre con mayor velocidad que el crecimiento de partículas. El resultado es una suspensión de partículas sumamente pequeñas o, peor aún, un coloide. En una solución menos sobresaturada, la nucleación no ocurre tan rápidamente y los núcleos tienen la posibilidad de crecer para formar partículas más grandes y manejables. (22)

Se ha llevado a cabo esta aplicación en destilados de soja para eliminar la mezcla de esteroides del residuo de desodorización de soja por recristalización en n-hexano y 50 % (v/v) de metanol a baja temperatura, 4 °C. Con esto se consigue una concentración de los tocoferoles. (23)

La cristalización puede realizarse en dos etapas, de 24 horas cada una, cuyo punto de partida es un destilado de desodorización de aceite de soja, disuelto primero en hexano y luego en acetona (relación óptima de solvente a destilado de desodorización: 6:1). Operando a temperatura de -20°C , se consigue cristalizar el 97 % de los esteroides y reducir el contenido de triglicéridos y ácidos grasos en 64 %. Los tocoferoles permanecen en el licor madre, del cual se recuperan por evaporación del solvente (26).

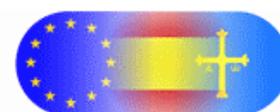
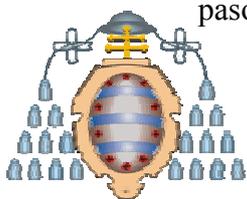
1.4.- Procesos enzimáticos

Otro método utilizado para separar los ácidos grasos de los triglicéridos, tocoferoles, esteroides, ceras, hidrocarburos y otros compuestos presentes en el destilado de desodorización se basa en la esterificación de los ácidos grasos libres con un alcohol inferior (metanol, etanol, etc) usando lipasas inmovilizadas como catalizador, eliminando posteriormente los ésteres por evaporación.

El procedimiento no elimina los triglicéridos, ni libera los esteroides que están esterificados con ácidos grasos. Como ventaja se desarrolla a presión atmosférica y temperatura ambiente o levemente superior. Alcanza elevados grados de conversión (70 % o más) en el término de 3 horas y llega al equilibrio (90 % de conversión) en 24 horas.

También se ha propuesto el uso de enzimas para separar los tocoferoles de los esteroides, haciendo uso de la selectividad de determinadas lipasas, que pueden esterificar los esteroides libres, pero no los tocoferoles, con ácidos grasos, formando compuestos de mayor punto de ebullición fácilmente separables entre sí por evaporación.(19)

Se ha aplicado este método en destilados de aceite de soja (SODD) modificados enzimáticamente para obtener una mezcla compuesta principalmente por ésteres de esteroides, tocoferoles y etilésteres de ácidos grasos. Se usaron dos pasos enzimáticos para separar la esterificación de esteroides y la esterificación de ácidos grasos en tiempo y espacio. El primer paso enzimático permite transformar eficientemente más del 90 % de los esteroides originales en un período corto de tiempo (5h). El segundo paso enzimático convierte más del 95 % de los ácidos grasos libres en menos de 3 h.



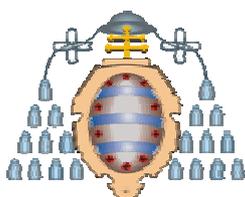
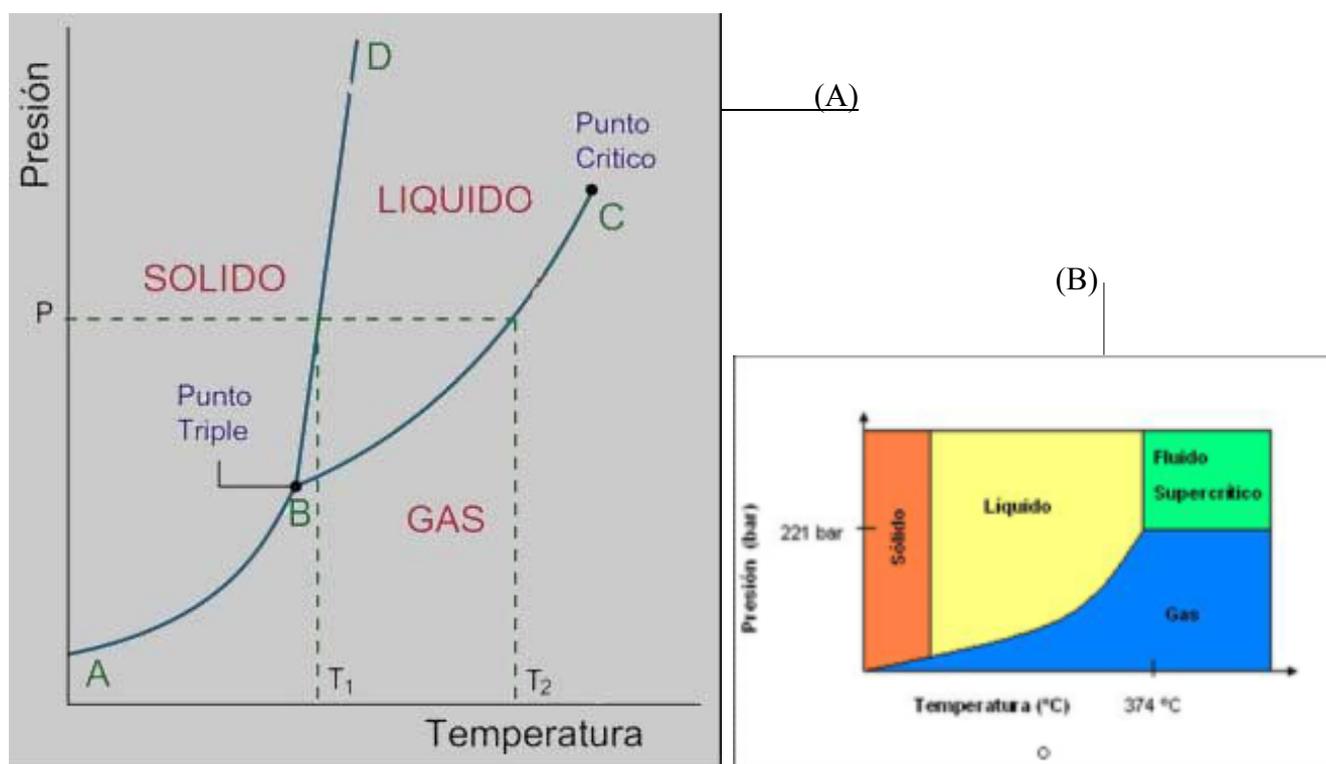
El producto final obtenido es usado como material de partida para la purificación de los ésteres de esteroides, tocoferoles y etilésteres de ácidos grasos mediante una SFE. (24)

1.5.- Fluidos supercríticos

La temperatura crítica de una sustancia es la temperatura por encima de la cual no puede existir en fase líquida independientemente de la presión. La presión de vapor de una sustancia a su temperatura crítica es su presión crítica. Una sustancia a temperaturas y presiones por encima de su temperatura y presión crítica (punto crítico) se denomina fluido supercrítico. Los fluidos supercríticos tienen densidades, viscosidades y otras propiedades que son intermedias entre las características de esa sustancia en estado gaseoso y en estado líquido. (20)

En la figura 7 (A) se puede observar un diagrama de fases típico en donde se identifica el punto crítico. En la figura 7 (B), el diagrama de fases del agua, se delimita con claridad la zona a partir de la cual una sustancia se puede convertir en fluido supercrítico.

Figura 7. Diagrama de fases típico



En la tabla 4, se muestran las propiedades de algunos compuestos, usados comúnmente como fluidos supercríticos.

Tabla 4a. Propiedades de algunos compuestos usados como fluidos supercríticos

SOLVENTE	PESO MOLECULAR	T ^a CRÍTICA	PRESIÓN CRÍTICA	DENSIDAD CRÍTICA
	g/mol	K	MPa(atm)	g/cm ³
Dióxido de carbono (CO ₂)	44,01	304,1	7,38 (72,8)	0,469
Agua (H ₂ O)	18,02	647,3	22,12 (218,3)	0,348
Metano (CH ₄)	16,04	190,4	4,60 (45,4)	0,162
Etano (C ₂ H ₆)	30,07	305,3	4,87 (48,1)	0,203
Propano(C ₃ H ₈)	44,09	369,8	4,25 (41,9)	0,217
Etileno (C ₂ H ₄)	28,05	282,4	5,04 (49,7)	0,215
Propileno (C ₃ H ₆)	42,08	364,9	4,60 (45,4)	0,232
Metanol (CH ₃ OH)	32,04	512,6	8,09 (79,8)	0,272
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	46,07	513,9	6,14 (60,6)	0,276
Acetona (C ₃ H ₆ O)	58,08	508,1	7,40 (46,4)	0,278

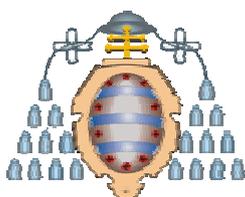
Tabla 4b. Comparación de algunas propiedades según el estado del compuesto

	DENSIDAD (Kg/m ³)	VISCOSIDAD (uPa.s)	DIFUSIVIDAD (mm ² /s)
Gases	1	10	1-10
Fluidos Supercríticos	100-1000	50-100	0,01-0,1
Líquidos	1000	500-1000	0,001

Una propiedad importante de los fluidos supercríticos, relacionada con sus densidades elevadas (de 0,2 a 0,5 g/cm³), es su notable capacidad para disolver moléculas grandes no volátiles. Por ejemplo, el dióxido de carbono supercrítico disuelve fácilmente n-alcanos que poseen entre 5 y 30 átomos de carbono, ftalatos de di-n-alkilo en los cuales los grupos alkilo contienen entre 4 y 16 átomos de carbono y diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos que presentan varios anillos.

Una segunda propiedad es que los analitos disueltos en ellos pueden ser fácilmente recuperados por el procedimiento simple de permitir que las disoluciones se equilibren con la atmósfera a temperaturas relativamente bajas. Esta propiedad es particularmente importante en el caso de los analitos termolábiles. Muchos fluidos supercríticos tienen la ventaja sobre otros en que son baratos y no son sustancias tóxicas.

La difusividad de los solutos en ellos son un orden de magnitud más altas que en los líquidos y las viscosidades son un orden de magnitud más bajas que las de los disolventes líquidos.



1.5.1.- Principios de la extracción supercrítica

La SFE es una técnica que estudia las propiedades solvatantes de un fluido por encima de su punto crítico.

La habilidad de un fluido supercrítico para la solubilización de sólidos fue ya señalada en el siglo XIV al solubilizar sales metálicas en etanol en condiciones supercríticas. Sin embargo, hasta los años cincuenta no aparecen estudios sobre aplicaciones industriales, concretamente para eliminar las fracciones ligeras del residuo de la destilación del crudo.

A partir de los 70, la aplicación de los fluidos supercríticos a la industria agroalimentaria es uno de los más importantes centros de atención por parte de las investigaciones. En comparación con otros tipos de extracción, las principales ventajas de la que utiliza fluidos supercríticos son:

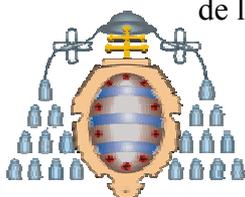
- menores tiempos de extracción,
- uso, generalmente, de un fluido no tóxico, no inflamable o no corrosivo,
- extracción a temperaturas sin afectación de compuestos termolábiles,
- fácil separación de los solutos del fluido supercrítico. Esto no es posible en las extracciones convencionales en muchos casos, produciendo contaminaciones indeseables del producto,
- alta pureza del solvente,
- posibilidad de realizar fraccionamientos,
- posibilidad de seleccionar el tipo de extracción eligiendo la polaridad del fluido, su densidad y la utilización o no de modificadores,
- bajo coste del solvente.

Las ventajas de la SFE provienen de las propiedades antes comentadas y de la compresibilidad. Los grandes cambios de densidad del fluido y, en consecuencia, el poder de solvatación, pueden ser realizados mediante pequeños cambios en la presión a temperatura constante al haber una gran compresibilidad si se trabaja a temperaturas próximas a la crítica. Al depender la fuerza solvatante de un fluido supercrítico de su densidad, la posibilidad de solvatación de un fluido supercrítico hacia una sustancia en particular puede ser modificada fácilmente cambiando la presión de extracción y, en menor medida, la temperatura. Esto hace que la SFE sea selectiva. (25)

Además, si la transferencia de masa está mejorada, el uso de la SFE proporciona tiempos de extracción más breves y una eficiencia de extracción mejorada por una mejor penetración en la matriz (26).

Por otra parte el poder solvente de un fluido supercrítico no podía ser explicado exclusivamente desde el aumento de densidad. El poder solvente de estos fluidos depende de dos efectos: (27)

- efecto de estado, que depende el estado físico del fluido supercrítico y su principal variable es la densidad,
- efecto químico, que define la interrelación entre el fluido supercrítico y el soluto que es diferente para cada soluto y depende de su polaridad, propiedades ácido-básicas y de la formación de puentes de hidrógeno.



En general, un incremento de la presión a temperatura constante produce un incremento en la solubilidad del compuesto pero disminuye la selectividad (28). El efecto de la temperatura sobre la solubilidad es más complejo, ya que ésta puede aumentar, disminuir o permanecer invariable con el aumento de temperatura a presión constante.

Este comportamiento viene dado por un factor predominante, que puede ser la presión de vapor del soluto o la densidad del solvente. A bajas presiones, la solubilidad disminuye levemente con el aumento de temperatura; a altas presiones, aumenta marcadamente.

El primer efecto se debe a la disminución de la densidad, el segundo se debe a que hay un importante aumento de la presión de vapor del soluto frente a la pequeña variación de la densidad del solvente en esta zona de altas presiones. Con una densidad determinada, la solubilidad aumenta con la temperatura (29).

La estructura química del soluto también es un factor a tener en cuenta a la hora de mejorar su selectividad, De modo esquemático se pueden citar los siguientes grupos funcionales de los solutos y su efecto beneficioso o adverso sobre su solubilidad en CO₂ supercrítico:

aumentan la solubilidad:

- insaturaciones.
- ramificaciones.
- esterificaciones.
- eterificaciones.

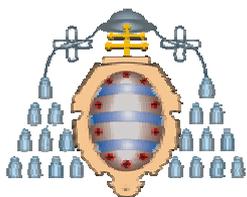
disminuyen la solubilidad:

- el aumento del peso molecular.
- aromaticidad.
- hidroxilos.
- carboxilos.
- halógenos.
- aminas.
- nitroderivados.

Se puede concluir que la elección de un fluido supercrítico depende de:

- a) la polaridad del soluto,
- b) poder solvente y selectividad requeridos,
- c) estabilidad térmica del compuesto a extraer a la temperatura de operación,
- d) limitaciones instrumentales, que se asocian a la presión crítica de algunos
- e) fluidos,
- f) toxicidad del fluido supercrítico.

Normalmente, el fluido supercrítico es utilizado a una temperatura ligeramente mayor a su temperatura crítica y a una presión significativamente mayor a su presión crítica (30).



Se ha estudiado una gran variedad de fluidos supercríticos para la extracción que cubre un amplio rango de temperatura y presión críticas, pesos moleculares y polaridad (31).

El dióxido de carbono es el más usado por tener una presión crítica moderada ($7,2 \times 10^6$ Pa) y baja temperatura crítica ($31\text{ }^\circ\text{C}$), siendo de elección para la extracción de compuestos termolábiles. Sin embargo, el CO_2 también tiene sus limitaciones, sobre todo para la extracción de compuestos polares. La tabla 5 muestra una serie de fluidos supercríticos usuales con sus ventajas e inconvenientes, El agua no es usada por las dificultades técnicas que supone trabajar a presiones por encima de su punto crítico.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de fluidos supercríticos (32)

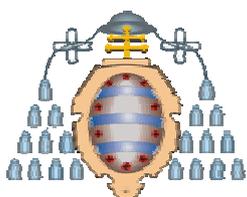
PROPIEDADES	INORGÁNICOS				ORGÁNICOS		
	CO_2	NH_3	H_2O	N_2O	CFCs	HC	Alcoholes
Toxicidad	V	D	V		V	V	D
Inflamabilidad	V	D	V		V	D	D
Coste	V	D	V		V	V	D
Reactividad	V	D	D	D	V	V	D
Facilidad de alcanzar condiciones supercríticas	V	D	D	V	V	V	D
Agresividad medioambiental	V		V		D		
Gas en condiciones ambientales	V		D	V	V	V	D
Compatibilidad con detectores	V					D	
Polaridad	D	V		V	V	D	V

Actualmente, un tema de gran interés es la correlación y predicción de equilibrios de fases a alta presión. Ya se han descrito un gran número de diagramas de fases para mezclas binarias (fluido supercrítico y compuesto sólido o líquido) (28), aunque la predicción de los equilibrios no está todavía satisfactoriamente resuelta. Y mucho más complejos aún son los sistemas para mezclas ternarias. Aunque se comprueba que los fluidos supercríticos son disolventes específicos que permiten realizar una extracción selectiva o un fraccionamiento.

1.5.2.- Ventajas de la extracción con fluidos supercríticos (SFE)

1.- La SFE, en general, es rápida. A mayor velocidad de difusión y más reducida viscosidad, la velocidad de transferencia de masa será mayor. Como ya se ha señalado anteriormente, ambas variables son más favorables para los fluidos supercríticos que para un disolvente líquido típico. En consecuencia, la SFE se completa, generalmente, entre 10 y 60 minutos, mientras que las extracciones con líquidos orgánicos pueden necesitar varias horas e incluso días.

2.- El poder disolvente de un fluido supercrítico puede modificarse por los cambios en la presión y, con menor alcance, en la temperatura. Por el contrario el poder



disolvente para un líquido orgánico es esencialmente constante e independiente de las condiciones. Esta propiedad permite que las condiciones para la SFE puedan ser optimizadas para una clase de analitos dada.

3.- Muchos de los fluidos supercríticos son gases a temperatura ambiente. Así, las recuperaciones de los analitos son sencillas comparadas con las de los líquidos orgánicos que deben vaporizarse por calentamiento, lo que lleva a una posible descomposición en el caso de los analitos térmicamente inestables o bien a pérdidas en el caso de los analitos volátiles. En contraposición, un fluido supercrítico puede ser separado simplemente por descenso de la presión. Además, la corriente del analito puede hacerse borbotear a través de un pequeño vial que contenga un buen disolvente para el analito, el cual se disolverá en un pequeño volumen de disolvente.

4.- Algunos fluidos supercríticos son baratos, inertes y no tóxicos. Por tanto, se les puede eliminar fácilmente una vez finalizada la extracción dejando que se evaporen a la presión atmosférica. (20)

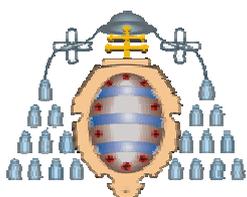
5.- Utiliza bajas temperaturas, al contrario que la destilación, pudiendo seleccionar su capacidad de extracción con la presión, cosa imposible en esta última.

1.5.3.- Aplicaciones

Se han desarrollado multitud de aplicaciones para la extracción mediante fluidos supercríticos en las últimas décadas. No sólo en el sector de la agroalimentación, sino también en otras industrias como pueden ser los polímeros, suelos, residuos, etc.

Como ejemplo se pueden nombrar los siguientes:

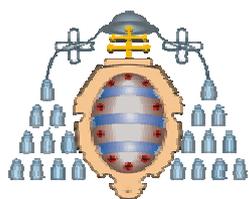
- Recuperación de escualeno en aceites vegetales. Se obtienen refinados de hasta un 90 % de concentración. (33)
- Limpieza de metales, plásticos, cerámicas, componentes electrónicos, materiales ópticos y una gran variedad de otras matrices de sus contaminantes orgánicos. (34)
- Sustituto de solventes para aplicaciones en pintura. (34).
- Eliminación de contaminantes de suelos. Eliminar el hexaclorociclohexano y otros disolventes organoclorados como pueden ser los PCBs. (34)
- Decafeinización del te y el café. Fue el primer proceso desarrollado en la industria alimentaria. (35).
- Denicotinación del tabaco. Obtenemos dos productos tabaco sin nicotina y un extracto aromático. (35)
- Extracción del aroma y sabor del lúpulo.(35).



- Otras aplicaciones industriales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Aplicaciones industriales de los fluidos supercríticos (35)

APLICACIONES	DISOLVENTE
Espicias	CO ₂
Aromas	CO ₂
Aceites esenciales	CO ₂
Aceites vegetales	CO ₂
Extracción de colesterol	CO ₂
Eliminación de grasa alimentaria	CO ₂
Piretrinas	CO ₂
Plantas medicinales	CO ₂
Descontaminación de suelos	CO ₂
Tratamiento de fango	Propano



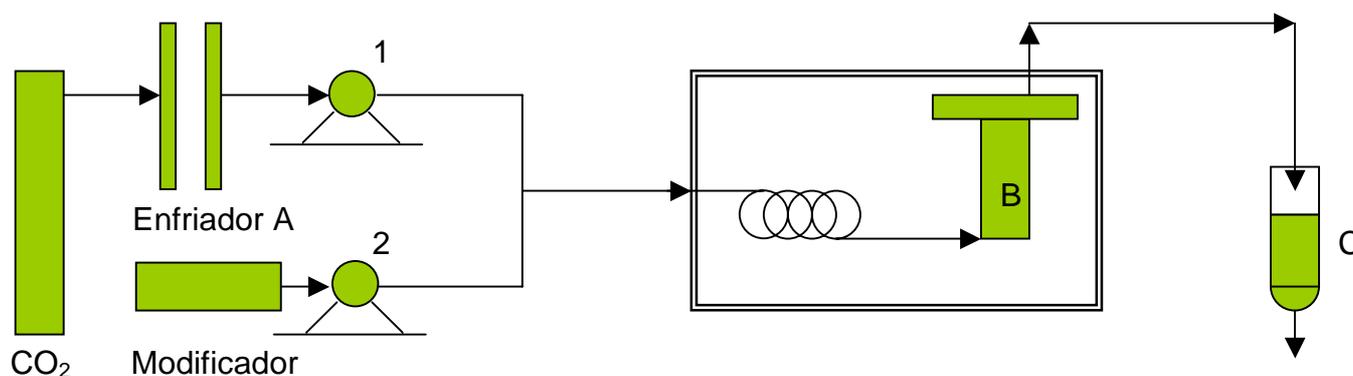
MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Instrumentación

La planta piloto de extracción por dióxido de carbono supercrítico en régimen continuo fue adquirida a Process Integral Development. Canto Blanco, Madrid, bajo diseño compartido (37), ya que en el mercado la inmensa mayoría de las existentes son plantas de fluidos supercríticos sólido-líquido.

En la figura 8 se muestra un diagrama de planta de fluidos supercríticos sólido-líquido. Esta trabaja en discontinuo.

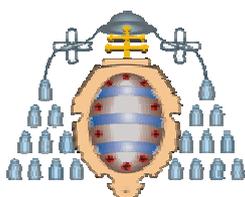
Figura 8. Diagrama de planta de fluidos supercríticos sólido-líquido



Funcionamiento:

El CO₂ se enfría en el enfriador A para poder ser bombeado por 1 hasta alcanzar la presión adecuada. Se mezcla con un modificador, etanol en nuestro caso, y se hace pasar por un reactor B en donde tenemos nuestra muestra en estado sólido. Al pasar a través de ella extraerá el analito, que recogeremos mediante una sonda C al final de la planta.

En esta planta al trabajar en discontinuo, para realizar una nueva extracción, es necesario reemplazar la muestra por una nueva y reiniciar el proceso.



El esquema de la planta se muestra en la figura 9:

Figura 9. Diagrama de la planta piloto de SFC (CO₂)

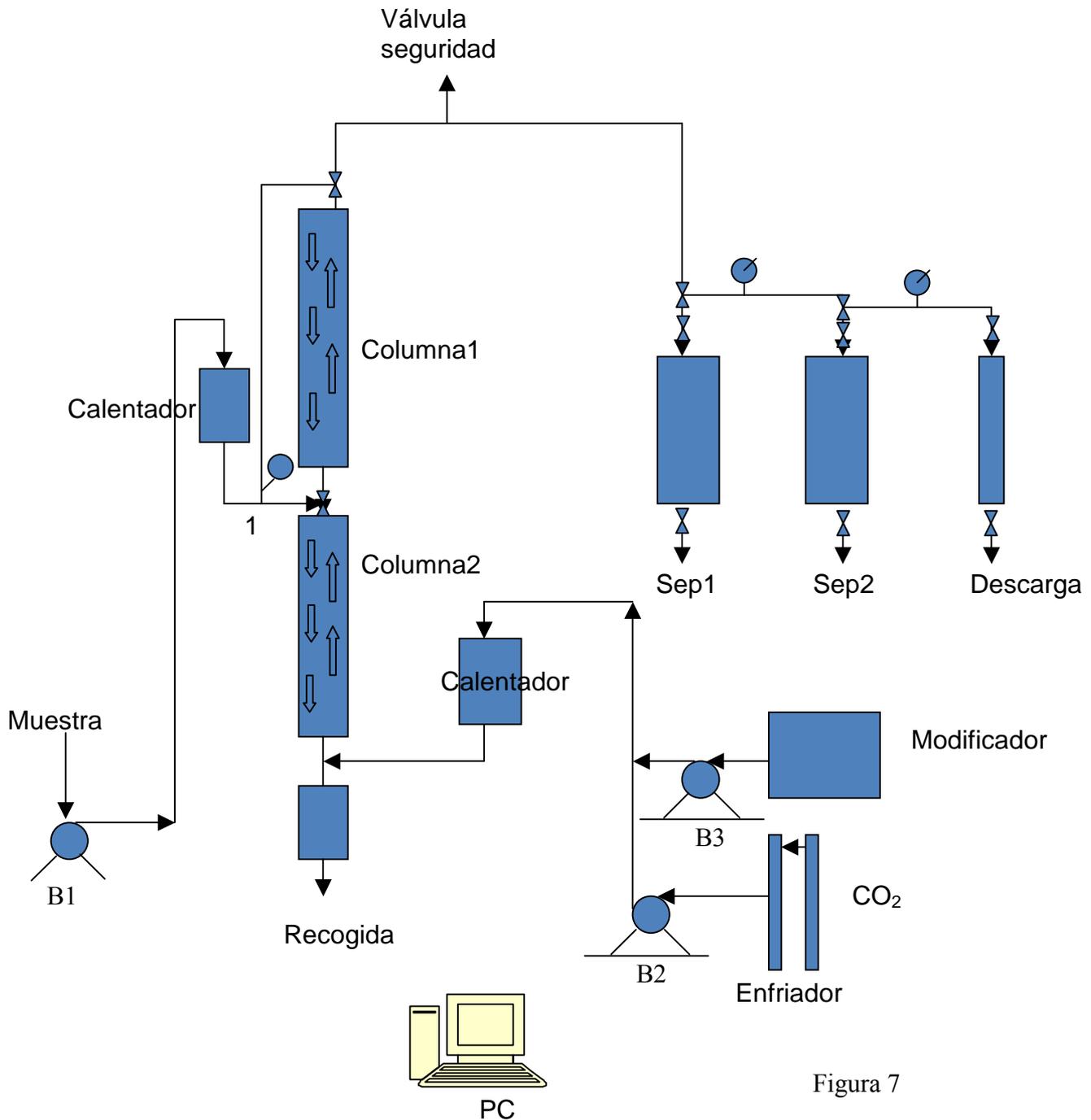
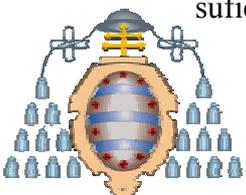


Figura 7

1.1.- Funcionamiento de la planta

El dióxido de carbono está en estado líquido. Previo a la bomba B2 la planta dispone de un sistema de refrigeración (enfriador) para mantener el CO₂ condensado. Es necesario mantenerlo en estado líquido para que la bomba pueda impulsarlo con la suficiente fuerza.



Una vez presurizado se le hace pasar por un calentador para adquirir la temperatura de trabajo. El CO₂ circula por toda la planta pasando por las columnas, saliendo por la parte inferior de los separadores 1, 2 o por la descarga final si estos permanecen cerrados.

Por otro lado, la muestra se calienta hasta la temperatura de trabajo y se la introduce (B1) pudiendo a través de la válvula 1 hacerla pasar por las dos columnas, o tan sólo una, en ambos casos por su parte superior. De este modo podemos modificar la superficie de contacto entre el fluido supercrítico y la muestra. La muestra va cayendo por las columnas mientras el CO₂ circula en contracorriente. Las columnas están llenas de bolas de acero inoxidable AISI 304 de diámetro 3 mm. Con ellas se consigue una mayor superficie de intercambio entre la muestra y el CO₂.

El dióxido de carbono extrae los componentes de la muestra. Tal y como se ha visto anteriormente según su presión puede disolver selectivamente a unos o a otros. Por eso, tanto en el separador 1, como en el separador 2 se pueden seleccionar presiones diferentes a fin de sacar a través de ellos dos fracciones diferentes según la selectividad conseguida en el experimento. Por último el fluido sale a través de la descarga a condiciones ambientales.

La muestra en estudio tras ser extraída se deposita en el recipiente de recogida en donde se puede recuperar.

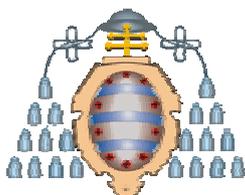
Un software instalado en un ordenador personal controla y comanda el proceso de la planta y puede, establecer diferentes programas de funcionamiento en continuo.

Los niveles de control en la planta son:

NIVELES DE CONTROL

- Temperatura de refrigeración del CO₂
- Calentador del CO₂
- Bomba modificador (B3)
- Bomba CO₂ (B2)
- Bomba muestra (B1)
- Temperatura muestra
- Temperatura columna 1
- Temperatura columna 2
- Presión separador 1
- Temperatura separador 1
- Presión separador 2
- Temperatura separador 2

Antes de cada experimento es necesario fijar cada uno de ellos en el PC, así como determinar cómo irán variando a lo largo del tiempo.



Descripción de los elementos más importantes

- 10 controladores Toho con regulación PID, para la regulación manual o via software. Se encargan de establecer 6 temperaturas (columna 1 y 2, calentamiento CO₂, calentamiento muestra, separador 1 y 2), 3 presiones (salida de la columna, separador 1 y 2), y el nivel de rebose de muestra en el depósito de recogida.
- Válvulas antirretorno. Son cilindros hexagonales que evitan la pérdida de presión.
- Válvula de seguridad. Es una válvula que permanece cerrada hasta una presión de 400 bares. Cuando se supera este límite se abre para proteger la planta. Además el sistema dispone de un sello que se rompe a 410 bares. Es otro nivel de seguridad, pero una vez roto es necesario reponerlo.
- Bomba CO₂: la de mayor tamaño de la planta. Puede alcanzar presiones de hasta 600 bares. Está conectada a un variador de frecuencia para establecer su flujo de trabajo. Un flujo habitual es de 1.500 mL/h. Dispone de un sistema de refrigeración para conseguir tener el dióxido de carbono en estado líquido.
- Bomba para muestra: dispone de un variador de frecuencia para poder variar el caudal del sistema. Está conectada al depósito de alimentación calefactado de la planta.
- Bomba de modificador: llega hasta un máximo de 80 bares. Es una bomba pequeña pues el modificador se introduce previo a la bomba de CO₂, por lo que tan sólo tiene que vencer la presión de la botella, que suele ser de unos 50 bares.

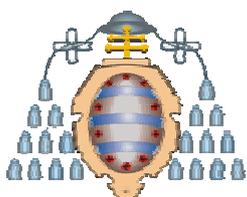


Figura 10. Foto de la planta Piloto de SFC



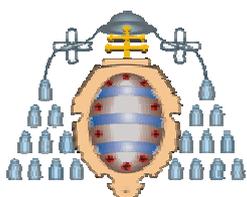
2.- Cromatógrafo de gases

Los análisis se realizaron en un CG Agilent modelo 7890-FID. Las condiciones instrumentales fueron las siguientes:

Cromatógrafo de gases	Modelo 6890 Agilent Technologies, DE, USA
Columna	WCOT FUSED SILICA 100m x 0,25 mm coating HP 88 for FAME DF=0,2 de Varian
Programa de temperaturas	$T_0 = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ $T_f = 240\text{ }^{\circ}\text{C}$

3.- Muestras

La materia prima del presente estudio es el subproducto rico en ácidos grasos, esteroides, escualenos y otros compuestos menores, proveniente de la refinación-desodorización de aceite de oliva. Fue proporcionado por Koipe. Se procesará sin tratamiento previo en la planta piloto en régimen continuo para conseguir la recuperación y/o concentración de algunos de los componentes del subproducto.



La Tabla 7 muestra la composición en ácidos grasos de la muestra inicial.

Tabla 7. Composición en ácidos grasos de la muestra inicial

INICIAL	C16	C16:1 Δ^6	C16:1	C17	C17:1	C18	C18:1T	C18:1C	C18:1W 7	C18:2 T9, T12
Medias	10,97	0,17	0,68	0,23	0,12	3,26	0,7	57,96	1,77	0,14

INICIAL	C18:2 C9, T12	C18:2 T9,C12	C18:2 C9, C12	C20	C18:3 N6	C20:1	C18:3 N3	C20:2	C22	
Medias	0,87	1	16,48	0,44	0	0,23	0,8	0,23	0,26	g/100g

4.- Materiales y reactivos

Utrillaje de laboratorio. Vasos de precipitados, matraces, pipetas, viales de cromatografía, etc.

CO₂ líquido, Helio y Aire comprimido suministrado por Carbuos Metálicos, S.A.

Etanol suministrado por DYNs. Laboratorios Noriega S.L. Llanera-Asturias.

Mezcla de estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos, MERCK

Mezcla de los isómeros del éster metílico del ácido linoleico, SUPELCO.

Metanol, KOH y HCl MERCK

5.- Métodos

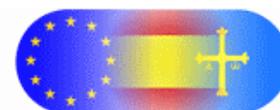
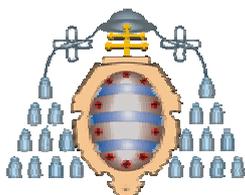
5.1.- Cuadrados latinos

El cuadrado latino se usa para estudiar la variabilidad de los parámetros seleccionados en un experimento. También permite ordenarlos de tal manera que se pueda realizar el estudio sobre todo ellos sin dejar ninguno atrás.

Las siguientes matrices son cuadrados latinos:

$$\begin{bmatrix} 1 & 2 & 3 \\ 2 & 3 & 1 \\ 3 & 1 & 2 \end{bmatrix} \quad \begin{bmatrix} a & b & d & c \\ b & c & a & d \\ c & d & b & a \\ d & a & c & b \end{bmatrix}$$

Un cuadrado latino es una matriz de $n \times n$ elementos, en la que cada casilla está ocupada por uno de los n símbolos de tal modo que cada uno de ellos aparece exactamente una vez en cada columna y en cada fila. (36)



En nuestro caso los parámetros a modificar son la presión de extracción, la temperatura y el % de etanol introducido junto al CO₂. Con estos tres parámetros se diseñan tres cuadrados latinos. Cada uno de ellos de dimensiones 3x3.

Los experimentos se diseñaron estableciendo los siguientes parámetros:

Tabla 8: Parámetros para el cuadrado latino 1

Cuadrado 1	50 °C	55 °C	60 °C
250 bares	20 %	25 %	30 %
230 bares	25 %	30 %	20 %
230 bares	30 %	20 %	25 %

Tabla 9: Parámetros para el cuadrado latino 2

Cuadrado 2	50 °C	55 °C	60 °C
180 bares	20 %	25 %	30 %
150 bares	25 %	30 %	20 %
150 bares	30 %	20 %	25 %

Tabla 10: Parámetros para el cuadrado latino 3

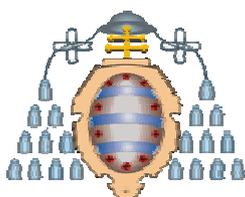
Cuadrado 3	50 °C	55 °C	60 °C
90 bares	20 %	25 %	30 %
90 bares	25 %	30 %	20 %
90 bares	30 %	20 %	25 %

En la primera fila se indican las temperaturas de trabajo en °C. En la primera columna se indican las presiones en bares y el porcentaje de modificador, en este caso etanol, se radica en el cuerpo de la tabla.

Se procesó la muestra según cada una de las nueve condiciones definidas en cada uno de los cuadrados latinos y con un caudal de muestra constante de 300 mL/h. Un total de 27 condiciones determinadas por tres parámetros, presión, temperatura y porcentaje de modificador, sin que hubiera ninguna coincidencia al mismo tiempo. Las muestras se tomaron estando la planta en régimen de trabajo estable, en dos momentos sucesivos: a los 60 y a los 80 minutos.

Las muestras recogidas se guardaron en viales cerrados bajo atmósfera de nitrógeno y se almacenaron a temperatura de congelación para su posterior análisis.

Finalmente se llevaron a cabo los análisis estadísticos: los distintos ensayos fueron tratados estadísticamente en tres cuadrados latinos de 3x3, tal y como se indicó anteriormente, con dos niveles de significación: F=0,05 y F=0,1. También se aplicó una ecuación de segundo grado por mínimos cuadrados para relacionar el porcentaje de ácido extraído con las variables del proceso.



5.2.- Análisis FAMES

La cromatografía de gases (CG) es la técnica más ampliamente usada en el análisis de ácidos grasos. Estos se analizan habitualmente como ésteres metílicos de ácidos grasos o FAMES por su acrónimo del inglés. La derivatización es necesaria para aumentar la volatilidad de los compuestos y hacer posible su análisis mediante la CG.

5.2.1.- Protocolo de derivatización

El principio utilizado es la neutralización de los ácidos grasos libres y metanólisis alcalina de los glicéridos seguida por una esterificación de los ácidos grasos en medio ácido.

Se pesan 4 g de la muestra a un matraz.

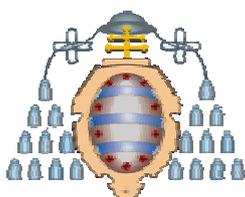
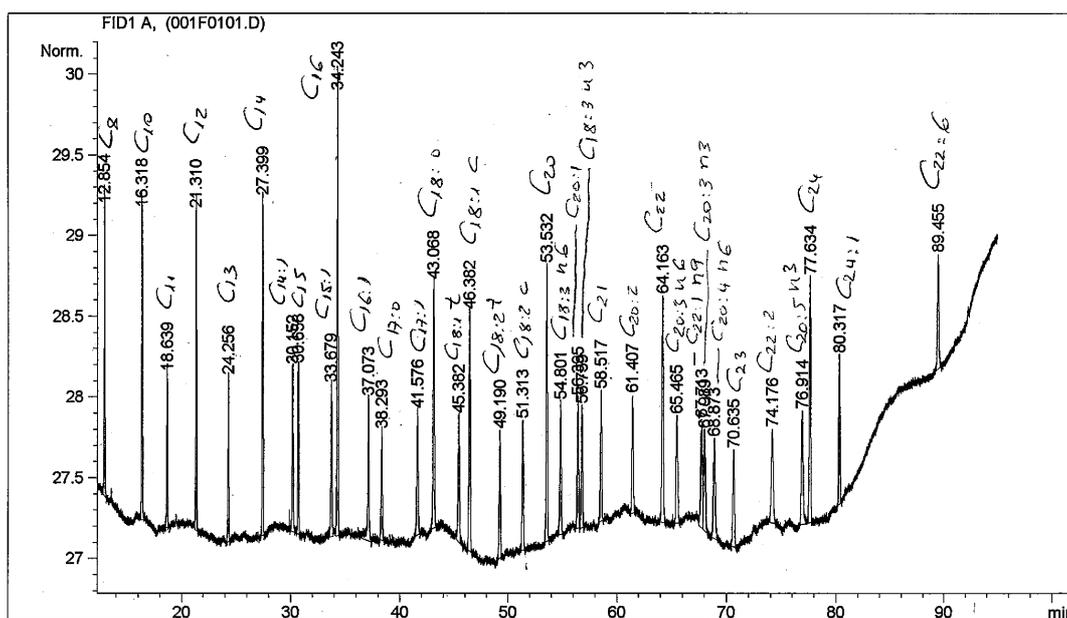
Se aconseja purgar el metanol y el matraz con una corriente de nitrógeno para eliminar el oxígeno y evitar posibles deterioros de la muestra.

Se añade una disolución metanólica de metilato sódico, plato poroso y se calienta a reflujo durante 15 minutos hasta que la disolución se vuelva clara. Se añaden una disolución metanólica de ácido clorhídrico y se hierve otra vez durante 10 minutos.

Se deja enfriar. Se realiza una extracción con heptano, dos veces, lavándolo hasta pH neutro. Se seca con sulfato sódico anhidro. Se filtra y se evapora hasta que queden unos 20 mL.

En la figura 12 se muestra el cromatograma obtenido con la inyección de los patrones.

Figura 12. Cromatograma de los patrone FAME C4-C24 (Sigma-Aldrich)

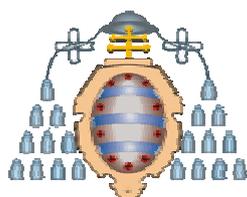


En la tabla 11 se identifican los compuestos presentes.

Tabla 11. Compuestos presentes en el cromatograma de la figura 12

T retención	Compuesto	Fórmula Molecular	Peso
12,854	Éster metílico del ácido caprílico	C ₉ H ₈ O ₂	158
16,318	Éster metílico del ácido cáprico	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186
18,639	Éster metílico del ácido undecanoico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200
21,310	Éster metílico del ácido laúrico	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214
27,399	Éster metílico del ácido mirístico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242
30,152	Metil miristoleato	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	240
30,658	Éster metílico del ácido pentanodioico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
33,679	Éster metílico del ácido cis-10-pentadecanoico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254
34,243	Éster metílico del ácido palmítico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270
37,073	Éster metílico del ácido palmitoleico	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268
38,293	Éster metílico del ácido heptadecanoico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
41,576	Éster metílico del ácido cis-10-heptadecanoico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
43,068	Éster metílico del ácido esteárico	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298
45,382	Éster metílico del ácido trans-9-ocatdecanoico	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296
46,382	Éster metílico del ácido oleico	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296
49,190	Éster metílico del ácido linonelaídico	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294
51,313	Éster metílico del ácido linoleico	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294
53,532	Éster metílico del ácido araquídico	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326
54,801	Éster metílico del ácido gamma-linolénico	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292
56,395	Éster metílico del ácido cis-11-eicosenoico	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324
56,759	Éster metílico del ácido linolénico	C ₁₉ H ₃₉ O ₂	292
58,517	Éster metílico del ácido heneicosanoico	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340
61,407	Éster metílico del ácido cis-11,14-eicosadienoico	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	322
64,163	Éster metílico del ácido behénico	C ₂₃ H ₄₃ O ₂	354
65,465	Éster metílico del ácido cis-8,11,14 eicostrienoico	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	320
67,713	Éster metílico del ácido euríico	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	352
67,989	Éster metílico del ácido cis-11,14,17 eicosatrienoico	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	320
68,873	Éster metílico del ácido araquidónico	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	318
70,635	Éster metílico del ácido tricosanoico	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368
74,176	Éster metílico del ácido cis-13,16 docosadienoico	C ₂₃ H ₄₂ O ₂	350
76,914	Éster metílico del ácido cis-5,8,11,14,17 eicosapentaenoico	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316
77,634	Éster metílico del ácido lignocérico	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	382
80,317	Éster metílico del ácido nervónico	C ₂₅ H ₄₈ O ₂	380
89,455	Éster metílico del ácido cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	342

A partir de estos patrones se pudo identificar los tiempos de retención y compararlos con los de las muestras.



A fin de confirmar el orden de elución se utilizó el mismo sistema, pero acoplándolo a un detector de masas. Esto permitió a diferenciar algunos isómeros, así como a resolver las partes del espectro donde los compuestos aparecían menos resueltos ya que a pesar de disponer de los patrones no siempre queda totalmente claro el orden de elución, debido a las condiciones particulares de cada análisis.

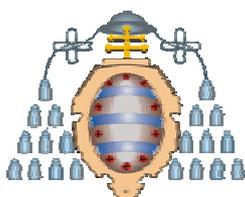
También se utilizaron patrones de la mezcla de isómeros del ácido linoleico, por encontrarse todos ellos muy cercanos en el cromatograma.

De todos los ácidos grasos posibles, se escogieron para realizar el estudio los más interesantes presentes en la muestra. Se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Ácidos grasos estudiados en el presente trabajo

FÓRMULA	ÁCIDO GRASO
C16	Ácido palmítico
C16:1 Δ^6	Ácido sapiénico
C16:1 Δ^9	Ácido palmitoleico
C17	Ácido margárico
C17:1	Ácido heptadecenoico
C18	Ácido esteárico
C18:1t	Ácido elaídico
C18:1c	Ácido oleico
C18:1w7	Ácido vaccénico
C18:2 t9,t12	Ácido linoeláidico
C18:2 c9,c12	Ácido linoleico
C20	Ácido araquídico
C18:3 n6	Ácido gamma-linolénico
C20:1	Ácido gadoleico
C18:3 n3	Ácido alfa-linolénico
C20:2	Ácido eicosadienoico
C22	Ácido behénico

Realizamos el análisis de cada uno de estos ácidos grasos en cada uno de los extractos obtenidos en cada una de las condiciones marcadas en los cuadrados latinos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos se llevaron cabo variando las presiones en cada una de las tomas de muestra y descarga, la temperatura de trabajo y el porcentaje de modificador respecto al caudal de destilados, manteniendo constante este caudal en todos los ensayos.

Las muestras se tomaron estando la planta en régimen de trabajo estable, en dos momentos sucesivos: a los 60 minutos y a los 80 minutos.

Una vez obtenido el extracto se realizó la derivatización y se obtuvieron los resultados que se resumen en las tablas 15, 16 y 17. Se presentan tan sólo los valores medios de las dos muestras recogidas para cada una de las condiciones:

Tabla 13. Cuadrados latinos

Cuadrado 1	50 °C	55 °C	60 °C
250 bares	20 %	25 %	30 %
230 bares	25 %	30 %	20 %
230 bares	30 %	20 %	25 %

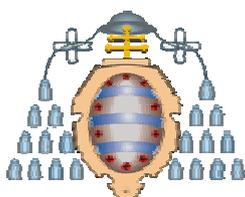
Cuadrado 2	50 °C	55 °C	60 °C
180 bares	20 %	25 %	30 %
150 bares	25 %	30 %	20 %
150 bares	30 %	20 %	25 %

Cuadrado 3	50 °C	55 °C	60 °C
90 bares	20 %	25 %	30 %
90 bares	25 %	30 %	20 %
90 bares	30 %	20 %	25 %

Tabla 14. Composición en ácidos grasos estudiados de la muestra inicial

INICIAL	C16	C16:1 Δ^6	C16:1	C17	C17:1	C18	C18:1T	C18:1C	C18:1W 7	C18:2 T9, T12
Medias	10,97	0,17	0,68	0,23	0,12	3,26	0,7	57,96	1,77	0,14

INICIAL	C18:2 C9, C12	C20	C18:3 N3	C20:1	
Medias	16,48	0,44	0,8	0,23	g/100g



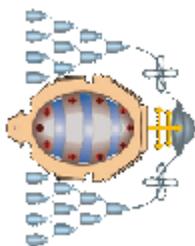


Tabla 15. Concentración en ácidos grasos obtenidos en las pruebas 1-3

PRUEBA	CONDICIONES		C16	C16: 1 Δ ⁶	C16:1	C17	C17:1	C18	C18:1 t	C18:1 c	C18:1 W7	C18:2 t9, t12	C18:2 c9, c12	C20	C18:3 n3	C20:1
1.1	P=250 bar T= 50 °C, %= 20	Media en g/100g	10,03	0,08	0,54	1,15	0,52	3,60	0,4	61,92	3,67	0,94	15,81	0,40	0,72	0,19
1.2	P=180 bar T= 50°C, %=20	Media en g/100g	10,25	0,08	0,56	1,47	0,91	3,53	0,37	60,16	4,07	0,98	16,35	0,32	0,56	0,17
1.3	P=90 bar T= 50°C, %=20	Media en g/100g	11,22	0,10	0,59	0,56	0,56	3,57	0,36	64,08	3,82	0,72	13,06	0,37	0,60	0,20
2.1	P=250 bar T= 55 °C, %= 25	Media en g/100g	10,09	0,14	0,68	0,24	0,13	3,18	0,53	60,76	1,90	0,12	15,82	0,43	0,79	0,23
2.2	P=180 bar T= 55°C, %=25	Media en g/100g	10,86	0,18	0,73	0,22	0,14	3,13	0,49	61,00	1,91	0,12	14,32	0,39	0,83	0,23
2.3	P=90 bar T= 55°C, %=25	Media en g/100g	12,81	0,23	0,79	0,18	0,14	3,50	0,53	62,73	1,89	0,09	11,85	0,42	0,77	0,22
3.1	P=230 bar T= 50 °C, %= 25	Media en g/100g	16,25	0,15	0,76	0,05	0,13	3,93	0,39	64,47	2,02	0,06	8,58	0,41	0,72	0,23
3.2	P=150 bar T= 50°C, %=25	Media en g/100g	16,61	0,15	0,79	0,05	0,13	3,81	0,47	64,35	2,02	0,03	8,39	0,39	0,75	0,21
3.3	P=90 bar T= 50°C, %=25	Media en g/100g	16,82	0,15	0,80	0,06	0,13	3,83	0,46	64,24	1,98	0,03	8,41	0,39	0,75	0,21



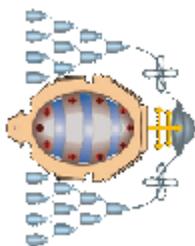


Tabla 16. Concentración en ácidos grasos obtenidos en las pruebas 4-6

PRUEBA	CONDICIONES		C16	C16: 1 Δ ⁶	C16:1	C17	C17:1	C18	C18:1 t	C18:1 c	C18:1 W7	C18:2 t9, t12	C18:2 c9, c12	C20	C18:3 n3	C20:1
4.1	P=230 bar T= 55 °C, %= 30	Media en g/100g	16,49	0,15	0,77	0,08	0,14	3,84	0,50	63,44	2,13	0,05	8,99	0,40	0,72	0,18
4.2	P=150 bar T= 55°C, %=30	Media en g/100g	16,40	0,15	0,78	0,08	0,14	3,66	0,48	63,29	2,11	0,07	9,13	0,39	0,77	0,18
4.3	P=90 bar T= 55°C, %=30	Media en g/100g	15,57	0,14	0,72	0,07	0,14	3,86	0,52	63,85	2,04	0,04	8,64	0,40	0,73	0,20
5.1	P=230 bar T= 60 °C, %= 25	Media en g/100g	17,03	0,16	0,78	0,06	0,14	4,01	0,52	64,85	2,05	0,05	7,52	0,42	0,58	0,22
5.2	P=150 bar T= 60°C, %=25	Media en g/100g	17,12	0,16	0,79	0,06	0,13	3,93	0,49	64,64	2,04	0,05	7,83	0,40	0,64	0,23
5.3	P=90 bar T= 60°C, %=25	Media en g/100g	17,14	0,15	0,81	0,06	0,13	3,90	0,53	64,43	2,00	0,05	7,69	0,41	0,63	0,19
6.1	P=250 bar T= 60 °C, %= 30	Media en g/100g	16,72	0,14	0,73	0,05	0,14	4,01	0,50	64,60	2,03	0,05	8,08	0,42	0,61	0,20
6.2	P=180 bar T= 60°C, %=30	Media en g/100g	17,21	0,14	0,77	0,06	0,63	3,90	0,52	64,41	2,05	0,05	7,79	0,40	0,63	0,21
6.3	P=90 bar T= 60°C, %=30	Media en g/100g	17,41	0,15	0,78	0,06	0,15	3,94	0,49	64,33	2,01	0,05	7,63	0,39	0,63	0,19



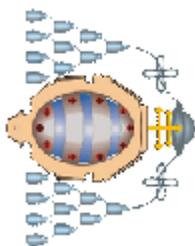


Tabla 17. Concentración en ácidos grasos obtenidos en las pruebas 7-9

PRUEBA	CONDICIONES		C16	C16: 1 Δ ⁶	C16:1	C17	C17:1	C18	C18:1 t	C18:1 c	C18:1 W7	C18:2 t9, t12	C18:2 c9, c12	C20	C18:3 n3	C20:1
7.1	P=230 bar T= 50 °C, %= 30	Media en g/100g	16,82	0,14	0,75	0,05	0,13	3,98	0,49	64,76	2,02	0,06	7,81	0,42	0,58	0,24
7.2	P=150 bar T= 50°C, %=30	Media en g/100g	17,13	0,16	0,77	0,06	0,13	3,94	0,49	64,45	2,03	0,07	7,88	0,41	0,62	0,22
7.3	P=90 bar T= 50°C, %=30	Media en g/100g	17,10	0,15	0,77	0,06	0,13	3,96	0,56	64,53	2,02	0,05	7,81	0,41	0,61	0,20
8.1	P=230 bar T= 55 °C, %= 20	Media en g/100g	17,09	0,15	0,76	0,06	0,13	3,99	0,47	64,55	1,99	0,06	7,88	0,42	0,64	0,21
8.2	P=150 bar T= 55°C, %=20	Media en g/100g	17,31	0,14	0,77	0,06	0,13	3,95	0,53	64,31	2,01	0,06	7,83	0,40	0,65	0,24
8.3	P=90 bar T= 55°C, %=20	Media en g/100g	17,33	0,14	0,78	0,06	0,13	3,98	0,47	64,23	1,96	0,07	7,92	0,42	0,66	0,24
9.1	P=230 bar T= 60 °C, %= 25	Media en g/100g	16,93	0,16	0,75	0,07	0,13	4,05	0,49	64,39	2,00	0,08	7,71	0,43	0,62	0,26
9.2	P=150 bar T= 60°C, %=25	Media en g/100g	17,26	0,15	0,78	0,05	0,13	4,01	0,51	64,44	2,02	0,08	7,72	0,43	0,63	0,26
9.3	P=90 bar T= 60°C, %=25	Media en g/100g	17,22	0,15	0,78	0,06	0,14	4,03	0,50	64,40	1,98	0,09	7,74	0,42	0,64	0,25



A partir de estos datos se realiza un estudio estadístico ANOVA de comparación de varianzas para determinar si la concentración conseguida en el extracto es significativamente distinta del propio error del método de análisis.

Empezamos a estudiar el ácido graso C16:0, con el primer cuadrado latino (ver tabla 15):

Calculamos la varianza respecto de cada una de las variables, la varianza total de todos los datos y la varianza del error se haya por diferencia. Dividiendo la varianza entre los grados de libertad obtenemos el parámetro CM. Y este dividido entre el CM del error resulta en el parámetro F0, el cual comparándolo con el valor tabulado para F nos dice si la variación respecto de la variable estudiada es significativa o no. Será significativa si $F_0 > F$.

Tabla 18. Estudio estadístico ANOVA del cuadrado latino 1 para el ácido graso C16:0

		GL	CM	F0	F (P=0,05)	F (P=0,1)
Var T	11,7542889	2	5,87714444	1,30703577	18,5128205	8,52631579
Var P	40,6281556	2	20,3140778	4,51770866	18,5128205	8,52631579
Var %	9,08962222	2	4,54481111	1,01073417	18,5128205	8,52631579
Var error	8,99308889	2	4,49654444			
Varianza Tot	70,4651556	8			NO SIGNIFICATIVO	

Así pues, los valores obtenidos y resumidos en la tabla 18 con los parámetros del primer cuadrado latino para la concentración del ácido palmítico no son significativas para un nivel de confianza del 95 (F, $p=0,05$), ni incluso del 90 % (F, $p=0,1$).

Se repitió el análisis para el cuadrado latino 2 (ver tabla 19):

Tabla 19. Estudio estadístico ANOVA del cuadrado latino 2 para el ácido graso C16:0

		GL	CM	F0	F (P=0,05)	F (P=0,1)
Var T	11,8908222	2	5,94541111	1,19318412	18,5128205	8,52631579
Var P	35,7400222	2	17,8700111	3,58633123	18,5128205	8,52631579
Var %	8,06722222	2	4,03361111	0,80950512	18,5128205	8,52631579
Var error	9,96562222	2	4,98281111			
Varianza Tot	65,6636889	8			NO SIGNIFICATIVO	

Igual que en el caso anterior las variaciones no son significativas. Por último realizamos el cálculo para el ácido palmítico en las condiciones del cuadrado latino número 3 (ver tabla 20):

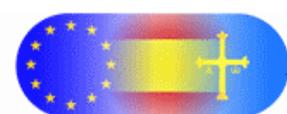
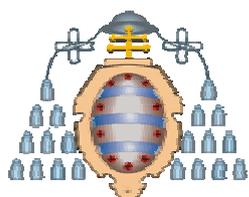


Tabla 20. Estudio estadístico ANOVA del cuadrado latino 3 para el ácido graso C16:0

		GL	CM	F0	F (P=0,05)	F (P=0,1)
Var T	7,89806667	2	3,94903333	1,08073271	18,5128205	8,52631579
Var P	21,1142	2	10,5571	2,88916357	18,5128205	8,52631579
Var %	5,60346667	2	2,80173333	0,7667509	18,5128205	8,52631579
Var error	7,30806667	2	3,65403333			
Varianza Tot	41,9238	8			NO SIGNIFICATIVO	

Tras realizar este análisis estadístico sobre todos los ácidos grasos seleccionados nos encontramos que en el único en el que hay un valor significativo de concentración es para el ácido α -linolénico, C:18 n3 también conocido como omega-3. Los resultados obtenidos se hallan resumidos en las tablas 21, 22 y 23:

Tabla 21. Estudio estadístico ANOVA del cuadrado latino 1 para el ácido α -linolénico

		GL	CM	F0	F (P=0,05)	F (P=0,1)
Var T	0,0225246	2	0,011262	16,0496957	18,5128205	8,52631579
Var P	0,00544376	2	0,00272188	3,87889056	18,5128205	8,52631579
Var %	0,02342349	2	0,01171174	16,6900159	18,5128205	8,52631579
Var error	0,0140344	2	0,00070172			
Varianza Tot	0,0544	8			SIGNIFICATIVO	

Tabla 22. Estudio estadístico ANOVA del cuadrado latino 2 para el ácido α -linolénico

		GL	CM	F0	F (P=0,05)	F (P=0,1)
Var T	0,02320886	2	0,01160443	8,26723544	18,5128205	8,52631579
Var P	0,01036115	2	0,00518057	3,69074707	18,5128205	8,52631579
Var %	0,02141073	2	0,01070537	7,62672206	18,5128205	8,52631579
Var error	0,00280734	2	0,00140367			
Varianza Tot	0,056	8			NO SIGNIFICATIVO	

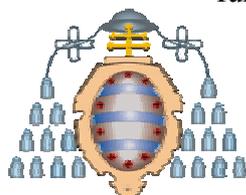
Tabla 23. Estudio estadístico ANOVA del cuadrado latino 3 para el ácido α -linolénico

		GL	CM	F0	F (P=0,05)	F (P=0,1)
Var T	0,01129945	2	0,00564973	12,9000042	18,5128205	8,52631579
Var P	0,00704201	2	0,0035212	8,03949734	18,5128205	8,52631579
Var %	0,01137539	2	0,0056877	12,9867017	18,5128205	8,52631579
Var error	0,00087592	2	0,00043796			
Varianza Tot	0,0288	8			SIGNIFICATIVO	

(38)

Con el fin de buscar los parámetros de trabajo óptimos de la planta SFC, se propone una ecuación de segundo grado, por mínimos cuadrados :

Con todos los datos obtenidos para un mismo cuadrado latino es posible relacionar el porcentaje de ácido extraído con las variables del proceso. La función que las liga y = fun. (temperatura (T), presión (p) y (% de etanol) es desconocida, pero para un



intervalo pequeño de las variables (entre 50 y 60 °C, 20 –30 % de etanol y 250 y 230 bares en el primer cuadrado, 180 y150 bares en el segundo cuadrado ó 90 bares en el tercer cuadrado) la función desconocida se puede suponer que se adapta a una ecuación de 2º grado sin que existan grandes discrepancias de tal forma que se puede decir para cada cuadrado latino que:

$$Y_{\text{separador } n^{\circ}} = a (T_{n^{\circ}}) + b (T_{n^{\circ}})^2 + c (p_{n^{\circ}}) + d (p_{n^{\circ}})^2 + e (\%_{n^{\circ}}) + f (\%_{n^{\circ}})^2 + \text{independiente}$$

Como hay más datos, diez en total, que coeficientes desconocidos, siete, se puede realizar un ajuste por mínimos cuadrados para estimar dichos coeficientes; la Tabla 24 muestra los valores de esos coeficientes. (37)

Tabla 24. Coeficientes resultantes del ajuste por mínimos cuadrados

	A	B	C	D	E	F	INDEPENDIENTE
Separador 1	33,40	-0,31	3,97E-15	0,0011	16,79	-0,34	-1064,83
Separador 2	45,10	-0,42	-0,028	0,00082	12,61	-0,26	-1282,98
Separador 3	12,28	-0,12	-8,25E-16	0,0069	7,89	-0,17	-353,76

Se observa que la influencia de la presión es muy baja en los tres separadores.

Con estas ecuaciones se puede representar la función anterior mediante cortes por planos adecuados que indiquen como influye una de las variables manteniendo constante la otra.

En la figura 11 se muestra la influencia de la temperatura en las mejores condiciones de porcentaje de etanol para cada uno de los tres separadores.

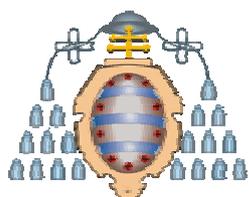
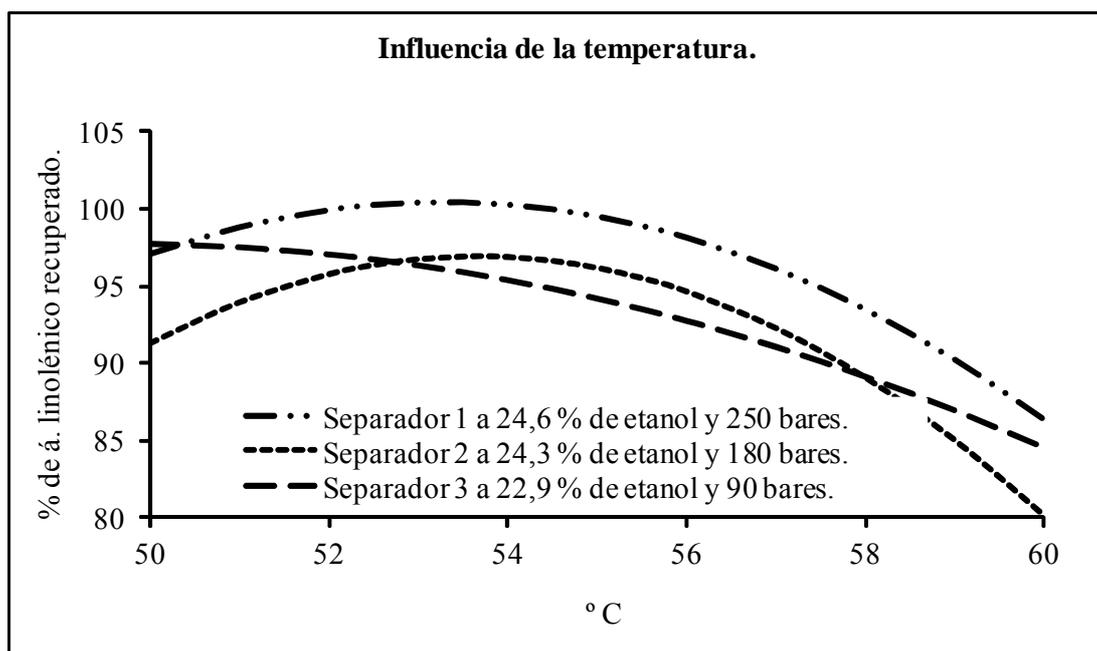


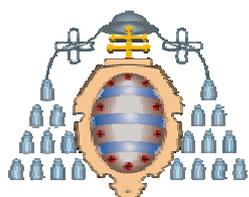
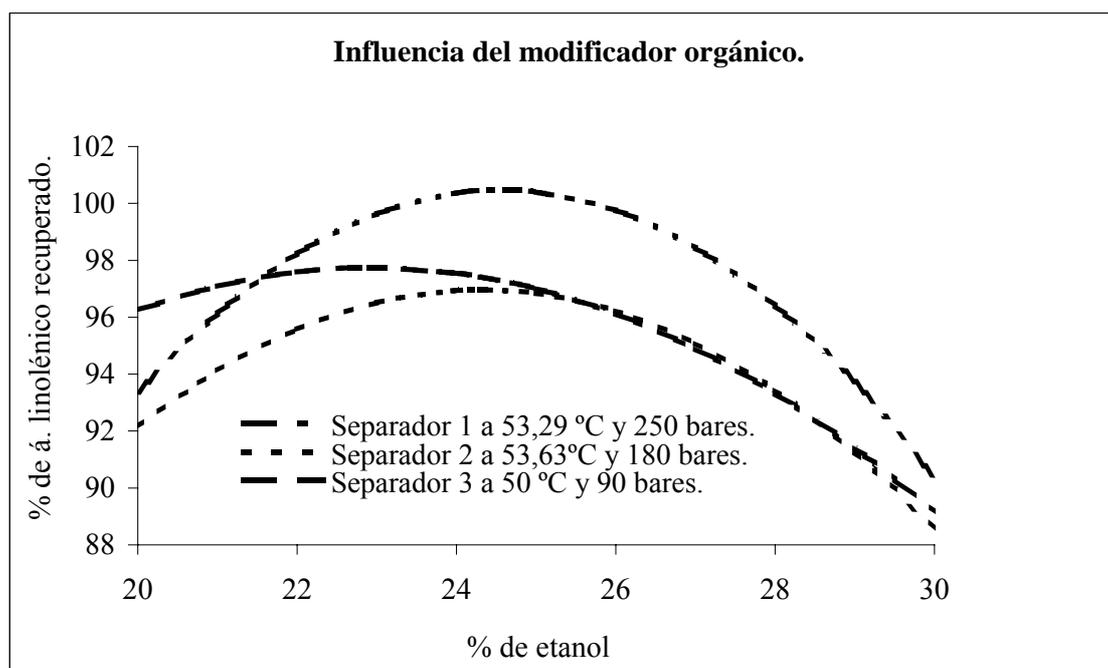
Figura 11. Función de ajuste a presión y porcentaje de etanol constante



Los separadores 1, 2 y 3 son extracciones realizadas dentro de las condiciones de los cuadrados latinos 1, 2 y 3 respectivamente.

En la Figura 12 se muestra el porcentaje de recuperación del ácido linolénico respecto al porcentaje de modificador, para las condiciones de cada uno de los cuadrados latinos.

Figura 12. Función de ajuste a presión y temperatura constante



CONCLUSIONES

Obtenemos una recuperación a niveles significativos estadísticamente para el ácido linolénico. Este compuesto tiene un alto valor añadido en la industria de la alimentación.

Podemos modificar las condiciones de la extracción modificando la presión, temperatura y porcentaje de modificador orgánica. Las condiciones experimentales óptimas para la recuperación del ácido linolénico están en el entorno de los 53,5 °C y con un 24,5 % de etanol para los dos primeros separadores, que trabajan a presiones más altas y algo menos de temperatura y de porcentaje de modificador orgánico para el tercer separador, trabajando a 90 bares.

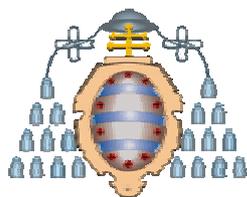
Si estos resultados se interpretan conjuntamente, se podría utilizar más de un extractor en serie. Convenientemente regulada la concentración del modificador orgánico a la entrada de cada extractor sería posible obtener fracciones enriquecidas en cada uno de los componentes de acuerdo con la presión establecida en el separador.

El método de trabajo elegido muestra que procesando el subproducto de desodorización de aceite de oliva como muestra para la separación-concentración de compuestos grasos de alto valor es un método válido para concentrar el ácido linolénico. Este método de trabajo no conlleva ningún tipo de tratamiento previo de la muestra, por lo que es altamente interesante por su escaso costo y buen rendimiento de operación.

Es posible la ampliación del trabajo de investigación llevado a cabo, desde varios puntos de vista: con una optimización para concentrar otros compuestos grasos de la muestra como son los esteroides o el escualeno, que tienen un alto valor comercial por su excelente aplicación en alimentación y cosmética. Otras posibilidades pasan por aplicar al subproducto de desodorización, o a la grasa láctea en su caso, tratamientos previos, para conseguir una eliminación o preconcentración de productos previa a la extracción en la planta. También es posible el estudio de la utilización de otros modificadores o incluso el uso de otros fluidos supercríticos.

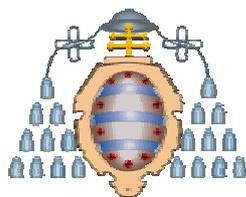
Si el proceso seguido se llega a optimizar, se pretende aplicarlo a la separación-concentración de determinados compuestos de grasa láctea. Para ello se deberá proceder al máximo desnatado de la leche. De las natas, convenientemente fluidificadas, el objetivo sería, a través de la SFE la separación y/ o eliminación de colesterol, de ácidos grasos saturados como el ácido láurico, el ácido mirístico, el ácido palmítico, o la concentración de ácidos grasos como el oleico y/o otros insaturados.

En tal caso, la grasa láctea quedaría exenta o con una menor concentración de compuestos grasos potencialmente perjudiciales para la salud y posteriormente se procederá a la recomposición de la leche, que podrá ser utilizada para cualquier tipo de producto lácteo más saludable.



BIBLIOGRAFÍA

- 1.- *Alimarket o MAPA sobre producciones anuales*. ASAJA Sevilla en Huelva.
- 2.- *Aceite de oliva, un mercado en expansión, demanda y tendencias a futuro*. Pedro Rodríguez. The World Food Science (www.worldfoodscience.org) Consulta 13 de abril de 2012.
- 3.- *El aceite de oliva*: Brígida Jiménez Herrera. Directora del Centro de Investigación y Formación Agraria. Cabra (Córdoba). www.museoaceite.com – Museo del aceite en Baena – consulta 13/04/2012
- 4.- *A comparative study of two procedures in the physical refining of edible Oil*. Prieto González, M^a.M.; Bada Gancedo, J.C. and Lombardía, I. J.Am. Oil Chem. Soc., 76 1471-1476 (1999)
- 5.- *Applications of two methods in physical refining of high fatty acid olive and sunflower Oil*. Bada Gancedo, J.C.; Prieto González, M^a.M.; Xiberta Bernat, J.; Graciani Constante, E. And León Camacho, M. J.Am. Oil Chem. Soc., 79 (2002)
- 6.- *Refinación de Aceites y Grasas para usos alimenticios*. A.J.C. Andersen. Barcelona 1956.
- 7.- *Handbook for Soy Oil Processing and Utilization*. Brekke, O.L. Edited by Brekke, O.L; Erickson, D.R.; Pryde, E.H.; Mounts, T.C.; Falb, R.A.. AOCS, Champaign IL and American Soybean Association, St. Louis, MO, 1980, pp 155-191.
- 8.- *Physical refining of edible Oil using nitrogen as stripping gas. Process optimisation*. Graciani Constante, E; Bada Gancedo J.C; Rodríguez Berbel, F. And Ruiz Méndez M^a.V.. Grasas y Aceites, 45 132-146 (1994)
- 9.- *Olive oil and pomace olive oil processing*. Kostas Antonopoulos, Nick Valet, Dimos Spiratos and George Siragakakis. Grasas y aceites, 57. 2006
- 10.- *Gamma-linolenic acid: recent advances in biotechnology and clinical applications*. Yung-Sheng and Vincent A. Ziboh. Ed. AOCS Press.2001.
- 11.- *Recuperación de subproductos de destilados de la desodorización de aceites vegetales mediante condensación-congelación en cambiadores de superficie*. Juan Carlos Bada Gancedo. Marzo, 2002 Tesis Doctoral
- 12.- *Estudio teórico de algunas propiedades termodinámicas de los ácidos grasos obtenidos como destilados en la desodorización de aceites comestibles*. Prieto González, M^a.M; Bada Gancedo, J.C.; Lombardía Prendes, I. Y Graciani Constante, E. Grasas y Aceites, 49 151-158 (1998)
- 13.- *Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*. Dr. Roger Veisseyre. Editorial Ascribia. 1980
- 14.- *Principles of dairy chemistry*. Robert Jenness, Stuart Patton. John Wiley & Sons. 1959
- 15.- *Fatty Acid Composition of Caprine Milk: Major, Branched-chain, and Trans Fatty Acid*. L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M.J. Fraga and M. Juárez. J Dairy Sci. 82:878-884 (1999)
- 16.- *The chemical composition and fatty acid profile in milk of Polish Mountain Sheep and Polish Merino*. Aurelia Radzik-Rant, Agnieszka Rozbicka-Wieczorek, Marina Czauderna, Witold Rant, Beata Kuczynska. Animal Science No 49, 163-172 (2011)
- 17.- *Supercritical fluid extraction of minor lipids from pretreated sunflower oil deodorizer distillates*. Luis Vázquez, Carlos F. Torres, Tizian Fornari, Nuria Grigelmo, Francisco J. Señorans, Guillermo Reglero... *Eur.J. Lipid Sci. Technol.* 108, 659-665. 2006



- 18.- *Supercritical carbon dioxide extraction of high-value substances from soybean oil deodorizer distillate*. Chiehming J., Chang; Yu-Fang Chang; Hong-zhi Lee; Jia-qun Lin; Po-Wen Yang. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39, 4521-4525 2000
- 19.- *Recuperación de tocoferoles y esteroides desde destilados de desodorización y otras materias primas*. Eduardo A. Moreira, Miguel A. Baltanás. *A&G* 43, Tomo XI, Nº 2, 253-259 (2001)
- 20.- “*Principios de Análisis Instrumental*”, Quinta Edición. Skoog, Holler, Nieman. 2001
- 21.- *Estudio de la purificación de ácidos grasos, tocoferoles y esteroides a partir del destilado de desodorización*. M. Pramparo; S. Prizzon; M.A. Martinello. *Grasas y Aceites* Vol. 56. Fasc. 3, 228-234 2005
- 22.- *Análisis químico cuantitativo*. Daniel C. Harris. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. 1992
- 23.- *Concentration of Tocopherols from Soybean Sludge by Supercritical Carbon Dioxide*. H.Lee; B.H. Chung, Y.H. Park. *JAOCs*, 68 (8) (1991)
- 24.- *A two steps enzymatic procedure to obtain sterol esters, tocopherols and acid ethyl estere from soybean oil deodorizer distillate*. Carlos F. Torres, Guzmán Torrelo, Francisco J. Señorans, Guillermo Reglero.. *Process Biochemistry*. **42**. 1335-1341. 2007
- 25.- *Supercritical fluid extraction: Principles and practice*, Mark A. McHugh and Val J. Krukonis, 1986. Butterworth Publishers, Stoneham, MA, USA
- 26.- *Analytical supercritical fluid extraction of adsorbent materials*. Wright, B.W., Wright, C.W., Gafe, R.W., Smith, R.D. *Anal Chem*. 59, 38. (1987)
- 27.- *Physical-chemical principles of extraction with above-critical gases*. Schneider, G.M. (1978) *Angew. Chem* 90, 762.
- 28.- *Fermentation of whey and permeate*. Zadow, J.G. *Bull Int. Dairy Fed.* 233, 53. (1988)
- 29.- *Analytical supercritical fluid extraction*. Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M., Tena, M.T. Springer Lab Manual, Springer-Verlag, Alemania. 1994.
- 30.- *Supercritical fluid extraction of alcohols from water*. Brignole, E.A., Andersen, P.M., Fredenslund, A. *Ind. Eng. Chem.* 26, 254. (1987)
- 31.- *Extraction with supercritical fluids: why, how and so what*. Hoyer, G.G. *Chem. Tech.* 15, 440. (1985)
- 32.- *Aplicación del dióxido de carbono supercrítico al procesado de alimentos: nata, subproductos del refinado de aceites vegetales y zumo de naranja*. Pedro Ruiz Sala. Madrid, 1996. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 33.- *Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical carbon dioxide extraction*. Luis Vázquez, Carlos F. Torres, Tiziana Fornari, F. Javier Señorans, Guillermo Reglero. *Eur J.Lipid. Sci. Technol.* **40**, 59-66
- 34.- *Soil and waste treatment. Cleaning by SFE*. Garay, I.; Acilu, M; Susaeta, I. State of the art book on supercritical fluids. AINIA. 2004
- 35.- *Revision on supercritical extraction industrial plant trends*. García-Reverter, J; Blasco, M.; Subirats, S; State of the art book on supercritical fluids. AINIA. 2004
- 36.- *Iberfluid. Process Integral Development*. 2004. Canto Blanco. Madrid
- 37.- *Analyse de variance et plans d'expérience*. D. Dugué, M. Girault. 12ª Edición. Dunod. Paris. 1969
- 38.- *Métodos Estadísticos aplicados a la Investigación y a la Producción*. Owen L. Davies. Ed. Aguilar.

