

Facultad de Ciencias (Universidad de Zaragoza)

Proyecto de Fin de Máster para optar al título de

MÁSTER EN QUÍMICA INDUSTRIAL:

DISEÑO DEL PROCESO DE FRACCIONAMIENTO DE OMEGA-3 MEDIANTE SFC PILOTO A PARTIR DEL ACEITE DE PESCADO



Autor: Joseba Alonso Apecechea

Directora del proyecto: Laura Gil

Ponente: Clara Herrerías

Zaragoza

2017

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
SOLUTEX	5
OBJETIVOS	6
MARCO TEÓRICO	7
ÁCIDOS GRASOS	7
OMEGA-3	8
PROCESO DE OBTENCIÓN DE PUFAS	10
SFC	11
METODOLOGÍA	13
BTO	13
MATERIA PRIMA	13
INSTRUMENTACIÓN	14
PROCEDIMIENTO	15
ESTUDIO DEL EFECTO DEL DISEÑO DE LA COLUMNA EN EL PROCESO DE SEPARACIÓN	15
ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FASE ESTACIONARIA EN EL PROCESO DE SEPARACIÓN	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
FRACCIONAMIENTO DE PUFAS OMEGA-3	19
EFECTO DEL DISEÑO DE LA COLUMNA EN EL PROCESO DE SEPARACIÓN	21
EFECTO DE LA FASE ESTACIONARIA EN LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	23
CONCLUSIONES	25
REFERENCIAS	26



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Tabla 1. Significados de las abreviaturas y los acrónimos usados en el presente trabajo.

ABREVIATURA Y ACRÓNIMOS	SIGNIFICADO
ALA	Ácido alfa-linoléico (<i>Alpha-Linoleic Acid</i>)
API	Principios Activos Farmacéuticos (<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>)
BTO	Oficina Técnica (<i>Business Technical Office</i>)
DHA	Ácido docosahexaenoico (<i>Docosahexaenoic Acid</i>)
DPA	Ácido docosapentaenoico (<i>Docosapentaenoic Acid</i>)
EPA	Ácido eicosapentaenoico (<i>Eicosapentaenoic Acid</i>)
ETA	Ácido eicosatetraenoico (<i>Eicosatetraenoic Acid</i>)
FS	Fluido Supercrítico
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LA	Ácido linoleico (<i>Linoleic Acid</i>)
LC	Cromatografía líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
MUFA	Ácido graso monoinsaturado (<i>Monounsaturated Fatty Acid</i>)
PCB	Policlorobifenilo
PUFA	Ácido graso poliinsaturado (<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>)
SDA	Ácido estearidónico (<i>Stearidonic Acid</i>)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
SFA	Ácido graso saturado (<i>Saturated Fatty Acid</i>)
SFE	Extracción de fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SPM	Mediador lipídico de resolución especializado (<i>Specialized Pro-resolving lipid Mediator</i>)
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Se concentró el aceite de pescado en los PUFAs omega-3 EPA y DHA mediante fraccionamiento con la SFC piloto de Solutex para estudiar el efecto que tienen el diseño de la columna, la variación de las condiciones de trabajo y la elección de la fase estacionaria en la separación.

Dos tipos de columnas con el mismo volumen interior pero con una geometría distinta se compararon inyectando 0.12 mL de aceite de pescado (70 % EPA y 13 % DHA) usando la misma fase estacionaria (sílica amino) y las mismas condiciones: $T_{\text{columna}}=44\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P_{\text{trabajo}}=80$ bar y un caudal de CO_2 de 168 g/min. Las concentraciones de las fracciones del EPA recogidas en ambas pruebas fueron bastante similares ($\approx 93\%$). La diferencia la marcó el tiempo de retención de los picos: mientras que el EPA salió a los 12 minutos con la columna A, empleando la columna B salió a los 23 minutos. También se estudió el efecto que tiene un aumento de las condiciones de proceso en la separación.

La fase estacionaria sílica amino se comparó con la fase estacionaria sílica funcionalizada con plata (Si-Ag). Las temperaturas de columna y caudales de CO_2 fueron de $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 168 g/min y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 200 g/min respectivamente. La presión de trabajo y el volumen de inyección de ambas pruebas fueron 80 bares y 0.12 mL. La fase Si-Ag requirió un 5 % de etanol como co-solvente para evitar la retención total del aceite. Con la fase Si-Ag se consiguió la mejor purificación en EPA (99,2 %) y solo tardó 6 minutos en salir de la columna. Sin embargo, el uso del etanol conlleva ciertas dificultades: eliminación del disolvente, recuperación, coste, etc.

1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3 son esenciales en la dieta humana para tener una buena salud y un adecuado crecimiento y desarrollo, siendo el EPA (ácido eicosapentanoico) y DHA (ácido docosahexanoico) los ejemplos más importantes. El cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos, por lo que se introducen mediante la ingesta de alimentos ricos en omega-3 como el aceite de los pescados o algas [Montañes et al.].

Las autoridades sanitarias recomiendan el consumo de 1.1-1.6 g/día de EPA y DHA en adultos y 0.5 g/día en niños (varía según la edad). Según expertos nutricionistas, el ratio ideal de ω -6: ω -3 es de 5:1, sin embargo, hoy en día los hábitos alimenticios occidentales (basados en grandes consumos de alimentos bajos en omega-3: carne, aceite de semillas, comida rápida, aperitivos, etc.) están caracterizados por tener un ratio de 25:1 llegando, en algunos casos, hasta un 100:1 [Montañes et al.]. Las dietas japonesas o mediterráneas, por otro lado, mantienen el ratio adecuado por basar su dieta en el pescado, la principal fuente de omega-3. Sea por la dificultad de seguir estas dietas por tener que cambiar los hábitos alimenticios, por imposibilidad de seguirlas en los casos alérgicos o por la preocupación de la posible presencia de metales pesados u otros contaminantes en el consumo de los peces, la toma de suplementos de omega-3 es una buena solución. Ante la necesidad del aporte de los PUFAs omega-3, se abre un mercado potencialmente interesante de los concentrados de estos ácidos grasos.

Desde el punto de vista económico, es inviable sintetizarlos por vía química y es necesario transformarlos desde fuentes naturales para concentrarlos para su uso como complementos alimenticios. Solutex dispone de la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), un método de fraccionamiento y concentración muy ventajoso para estos ácidos grasos, ya que se evita usar altas temperaturas que oxidan los PUFAs omega-3 y minimizan el uso de disolventes orgánicos. El dióxido de carbono en estado supercrítico ($scCO_2$) es el disolvente más popular en esta técnica, debido a que es barato, no-tóxico, se elimina fácilmente sin dejar trazas, tiene unas condiciones críticas moderadas y es un subproducto en muchas industrias.

1.1. SOLUTEX

Este trabajo se ha desarrollado en la empresa Solutex GC, S.L., situada en Mallén (Aragón). Es una compañía de base tecnológica experta en la obtención de aceites e ingredientes de valor añadido desde matrices naturales para las industrias de nutrición, farmacia y cosmética. Para ello, dispone de las tecnologías más avanzadas, entre las que destacan las tecnologías de fluidos supercríticos. Solutex busca la rentabilidad junto con la sostenibilidad y la "química verde" en sus prácticas.

Aunque Solutex es una empresa joven (fundada en el año 2004), actualmente es líder en los mercados de estos productos y en los servicios tecnológicos en Europa y Estados Unidos. Gracias a su plataforma científica y tecnológica, Solutex ha ido creciendo a un ritmo regular y cuenta con numerosos acuerdos con diferentes empresas, universidades y centros tecnológicos que le permite seguir desarrollándose a nivel internacional.

La tecnología y el conocimiento científico de Solutex permiten el desarrollo de distintas fórmulas ofreciendo varias líneas de productos: AROMAX es una línea de trabajo en el que se desarrollan diferentes extractos desde frutas, frutos secos, té, café, cítricos, aromáticos, hierbas o especias mediante soluciones customizadas que consisten en la extracción de aromas, descafeinización, desgrasamiento, eliminación de pesticidas, fitoextracción o esterilización; los biolípidos son otra línea de productos, comercializando altas concentraciones de diversos ácidos grasos esenciales omega-3 en las industrias de nutrición y cosmética, APIs a base de omega-3 en la industria farmacéutica y mediadores lipídicos especializados (SPMs) procedente de ácidos grasos omega-3 en la prevención y resolución de los procesos inflamatorios. Solutex ofrece, además, servicios adaptados a cada cliente gracias a la versatilidad de sus instalaciones, consiguiendo una gran matriz de posibilidades y productos únicos.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es llevar a cabo el fraccionamiento de EPA y DHA a partir de aceites concentrados de pescado utilizando para ello la técnica de cromatografía supercrítica.

Como objetivo secundario está el estudio de cómo afectan las variables de presión, temperatura y el caudal, así como el propio diseño de la columna como la elección de la fase estacionaria en el propio proceso de separación. Para ello, se van a llevar a cabo las siguientes tareas:

- Diseño de SFC para el fraccionamiento y concentración de PUFAs omega-3 EPA y DHA a partir del aceite de pescado.
- Estudio del efecto del diseño de la columna cromatográfica en el proceso de separación. Se van a realizar varios experimentos con la misma carga y mismas condiciones que permitan ver el efecto de la geometría de la columna en la retención de la materia prima.
- Estudio del efecto de la fase estacionaria en el proceso de separación cromatográfica. Se van a realizar varios experimentos con 3 fases estacionarias diferentes para ver cuál ofrece los resultados más interesantes para su aplicación en la industria.
- Estudio del efecto de escalado en la separación cromatográfica. Se va a reproducir, a escala laboratorio, un proceso cromatográfico implantado con anterioridad a nivel industrial, con el que se comparará.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos formados por una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxílico. Usualmente, se forman acilglicéridos al estar unidos a un glicerol, y según cuantos ácidos grasos estén en esta estructura, serán mono-, di- o triglicéridos. La *Tabla 2* muestra los ácidos grasos comunes que suelen formar parte de la dieta humana. Un ácido graso se pueden clasificar según el número de insaturaciones (número de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonatada): saturado (SFA), monoinsaturado (MUFA) o poliinsaturado (PUFA). Además, según la posición del primer carbono insaturado partiendo desde el grupo carboxilo, se puede clasificar como omega-3, omega-6, omega-9, omega-11 u omega-13 [Rubio-Rguez, N.].

Tabla 2. Ácidos grasos comunes en la dieta humana.

Tipo	Nombre común	Número de carbonos	Dobles enlaces C=C	Fórmula	
SFA	Ác. Butírico	4	0	C4:0	
	Ác. Caprónico	6	0	C6:0	
	Ác. Caprílico	8	0	C8:0	
	Ác. Cáprico	10	0	C10:0	
	Ác. Láurico	12	0	C12:0	
	Ác. Mirístico	14	0	C14:0	
	Ác. Palmítico	16	0	C16:0	
	Ác. Esteárico	18	0	C18:0	
	Ác. Araquídico	20	0	C20:0	
	Ác. Behénico	22	0	C22:0	
MUFA	ω-9	Ác. Palmitoléico	16	1	C16:1 n-9
		Ác. Oléico	18	1	C18:1 n-9
		Ác. Gadoléico	20	1	C20:1 n-9
	ω-11	Ác. Gondóico	20	1	C20:1 n-11
		Ác. Erúcico	22	1	C22:1 n-13
PUFA	ω-6	Ác. Linoléico	18	2	C18:2 n-6
		Ác. γ-Linoléico	18	3	C18:3 n-6
		Ác. Dihomo γ-Linoléico	20	3	C20:3 n-6
		Ác. Araquinódico	20	4	C20:4 n-6
	ω-3	Ác. α-Linoléico	18	3	C18:3 n-3
		Ác. Estearidónico	18	4	C18:4 n-3
		EPA	20	5	C20:5 n-3
		DPA	22	5	C22:5 n-3
		DHA	22	6	C22:6 n-3

El cuerpo humano puede producir SFAs o MUFAs para sí mismo, pero no es capaz de producir ningún PUFA (por eso, estos ácidos grasos se les llama “esenciales”), por eso, la ingesta directa de los PUFAs esenciales es fundamental en la dieta humana. El ser humano también puede obtener estos ácidos grasos desde fuentes indirectas; debido a una serie de reacciones enzimáticas basadas en la desaturación y elongación de la cadena hidrocarbonada, se pueden producir ácidos grasos omega-6 y omega-3 desde el ácido linoleico (LA) y el ácido α -linoléico (ALA) respectivamente, ya que son los precursores de estos ácidos grasos. El ALA, por lo tanto, es un ácido graso esencial importante para el aporte indirecto de PUFAs omega-3 como el EPA. Asimismo, como el LA y el ALA compiten por las mismas enzimas, un nivel alto en LA conlleva una menor conversión del ALA al EPA y viceversa [Rubio-Rguez, N.].

3.1.1. OMEGA-3

Los omega-3 son ácidos grasos poliinsaturados que tienen su primer carbono insaturado en la posición 3 desde el metilo terminal. Los PUFAs omega-3 son ácidos grasos esenciales porque el organismo humano no los puede sintetizar. Mayormente, los omega-3 provienen de los pescados o de sus derivados. Hoy en día, hay suplementos nutricionales y muchos productos alimentarios enriquecidos con omega-3 en el mercado, como la leche y sus derivados, el pan, los huevos, los zumos y refrescos, la carne, etc. para mantener un buen ratio de n-6:n-3 en las dietas con bajo consumo de pescado [Rubio-Rguez, N.].

Algunas fuentes vegetales como semillas de lino, semillas de chía o nueces proporcionan PUFAs omega-3, sin embargo, la fuente principal de los PUFAs omega-3 son las familias de peces oleosos como *Scombridae* (atunes y bonitos), *Clupeidae* (sardinias y arenques) y *Salmonidae* (salmones) [Rubio-Rguez, N.]. Este contenido de omega-3 en los peces se debe a que la nutrición marina se basa en el fitoplancton, el productor primario de estos ácidos grasos.

Hay varios ácidos grasos omega-3, entre otros: ALA (18:3), SDA (18:4), ETA (20:4), EPA (20:5), DPA (22:5) y DHA (22:6), siendo el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) los más importantes en la dieta humana. Aquellos omega-3 que

tengan 18 carbonos o menos en su cadena se denominan «de cadena corta», mientras que aquellos que tengan 20 carbonos o más se denominan «de cadena larga».

El EPA es un PUFA omega-3 de cadena corta que tiene 20 carbonos y 5 insaturaciones, tal y como se muestra en la *Figura 1*. Se puede encontrar en aceite de pescados mencionados anteriormente, en microalgas, en plantas genéticamente modificadas como Camelina y también se puede hallar en la leche materna. El EPA se puede metabolizar desde el ALA y es el precursor de algunos eicosanoides importantes en el cuerpo humano como la prostaglandina-3, el tromboxano-3 o leucotrieno-5 que tienen efectos autocrinos y paracrinos parecidos a los hormonales [Shanmugam, K.].

El DHA es un PUFA omega-3 de cadena larga como se muestra en la *Figura 1*, teniendo 22 carbonos y 6 insaturaciones. Se puede obtener directamente desde aceite de pescado, microalgas o leche materna, y se puede sintetizar desde el ALA como en el caso del EPA, pero con una conversión reducida. Muchos animales lo obtienen desde el ALA presente en las plantas, por eso, los productos animales suelen llevar un cierto nivel de DHA.

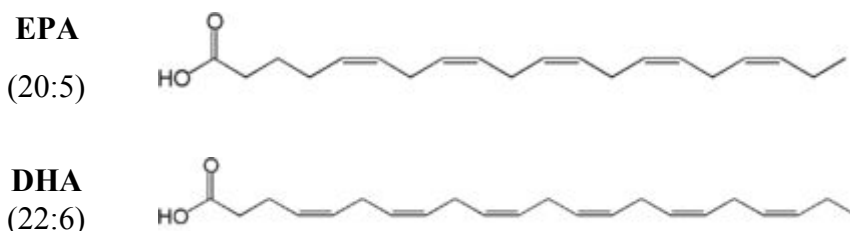


Figura 1. Estructuras químicas de los PUFAs omega-3 EPA y DHA.

Hay grandes evidencias de que los omega-3 son beneficiosos en varios casos clínicos, como las enfermedades cardiovasculares o la artritis reumatoide. Tiene efectos positivos en desorden autoinmune, diabetes, en el desarrollo cerebral de los niños, en casos de cáncer, en los casos de déficit de atención o desorden de hiperactividad, dislexia, desorden de piel o en el asma. También puede beneficiar en los casos de fibrosis quística y enfermedades intestinales. Además, puede tener su rol en el tratamiento de enfermedades mentales. Las funciones del EPA están relacionadas con la salud cardiovascular y tiene propiedades anti-inflamatorias y anticoagulantes, mientras que las funciones del DHA están relacionadas con la salud mental.

3.2. PROCESO DE OBTENCIÓN DE PUFAs

A continuación, se citan las etapas convencionales de la producción de omega-3:

1. **Extracción:** El pescado o sus derivados se presionan o se centrifugan tras una cocción para extraer el aceite de los pescados. Este aceite es un aceite de baja calidad y no es conveniente para el consumo humano, pero sirve como materia prima de las industrias químicas para producir aceites concentrados en omega-3.
2. **Refinado:** El aceite de pescado extraído en la etapa anterior tiene un elevado contenido de impurezas (ácidos grasos libres, glicéridos, fosfolípidos, esteroides, pigmentos, etc.), componentes tóxicos (metales pesados, dioxinas, PCBs, etc.) y componentes olorosos. Estas sustancias no deseadas se eliminan mediante métodos físicos y químicos.
3. **Concentración:** En el aceite de pescado, aunque puede haber más de un ácido graso de cadena larga en una misma columna del glicerol (esto es minoritario), tanto el EPA como el DHA se sitúan preferencialmente en el carbono central de la columna del glicerol [Nilsson et al.]. Esta configuración de triglicéridos evita obtener aceites de alta concentración de EPA y DHA en el fraccionamiento, por lo que se transesterifica mediante un alcohol para lograr monoésteres de ácidos grasos [Alkio et al.]. Para eliminar las cadenas saturadas y los mono- y di- enos desde el aceite transesterificado se suele mezclar con urea caliente disuelto en etanol, ya que al enfriarse se cristaliza junto con los saturados. El resto de la disolución se puede fraccionar mediante técnicas como destilación molecular, cromatografía líquida, SFE o SFC. Este trabajo se desarrollará en esta etapa, concentrando el contenido de EPA y DHA desde el aceite etil éster usando la SFC piloto.
4. **Formulación:** el aceite de pescado es muy susceptible a la oxidación, lo que es un problema, ya que se forman productos tóxicos como peróxidos o compuestos volátiles que generan unos sabores indeseados. Por eso, son muy importantes las estrategias para mejorar la estabilidad y prolongar la vida media del aceite de pescado durante el procesamiento, almacenamiento y empaquetamiento.

3.3. SFC

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una técnica cromatográfica de separación en la que se usan fluidos en estado supercrítico como fase móvil para transportar al analito a través de una fase estacionaria, donde se retienen de manera selectiva los componentes del analito, logrando un fraccionamiento. La *Figura 2* muestra, de manera general, los componentes de la SFC piloto. Esta técnica es una alternativa interesante a las técnicas tradicionales de cromatografía como la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Un fluido está en estado supercrítico (FS) cuando se encuentra a temperaturas y presiones por encima de las de su punto crítico, siendo 31 °C y 73 bares en el caso del CO₂. En el estado supercrítico desaparecen las distinciones entre las fases de gas y líquido, apareciendo un medio de densidad uniforme. La SFC reúne las características tanto de la cromatografía líquida como de gases; aumentando la presión, la densidad del fluido supercrítico se aproxima a un disolvente líquido, dándole propiedades de solvatación equivalentes a los medios líquidos. Además, el FS posee viscosidades parecidas a un gas, los cuales aceleran la transferencia de masa del analito proporcionando una buena eficiencia de separación. Las densidades y el poder de solvatación del FS se pueden variar de manera fácil controlando la presión y la temperatura. Esto permite la separación cromatográfica de muchos analitos de diferentes polaridades y pesos moleculares [Turner et al.].

La SFC es especialmente adecuada para la separación de los PUFAs omega-3, ya que combina la selectividad de la fase estacionaria hacia los dobles enlaces y la selectividad del scCO₂ hacia el número de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada. Por ejemplo, los PUFAs EPA y DHA se distinguen tanto por el número de insaturaciones (5 y 6 respectivamente) como por la longitud de la cadena (20 y 22 átomos de carbono respectivamente). Los FS tienen muchas ventajas en la aplicación de SFC debido a sus propiedades mencionadas: es más rápido que LC debido a su alta transferencia de masa; la fase móvil que se usa es el dióxido de carbono, un disolvente barato, no-tóxico, no-inflamable, gas a temperatura ambiente, químicamente inerte y con unas condiciones críticas suaves (disminuyendo el gasto en energía y evitando la oxidación del aceite); y no

se usan grandes cantidades de disolventes orgánicos (como co-solvente se usan en una proporción entre un 1 y un 10 %) [Turner et al.].

En este trabajo se usó una SFC piloto de la empresa Solutex. La solubilidad del soluto en un disolvente es un concepto que tiene gran importancia en la SFC. Para gestionar la solubilidad del analito en la fase móvil, se puede controlar la presión y la temperatura de la SFC piloto, que determinarán la densidad en el FS. Una subida de presión (a temperatura constante) aumenta la solubilidad del aceite en $scCO_2$, ya que lógicamente, el FS se vuelve más denso. Una subida de temperatura (a presión constante) es más compleja, debido a que depende de la presión en la que esté el FS y conlleva dos efectos: a bajas presiones el factor dominante es la densidad, por lo que un aumento de temperatura significa su disminución y consecuentemente, la reducción de la solubilidad del FS. En el caso de altas presiones el factor dominante es la presión de vapor del soluto, por lo que un aumento de la temperatura significa su incremento y consecuentemente, el aumento de la solubilidad del FS. [Brunner, G.]. Por otra parte, la adición de co-solventes polares como el etanol ayuda a aumentar la solubilidad de los analitos más polares en la fase móvil y suele afectar en gran medida a la retención en SFC [Catchpole et al.]. Finalmente, los ratios de flujo usados (disolvente-muestra inyectada) suelen ser grandes en SFC, ya que esto no suele significar grandes pérdidas de eficiencia de separación.

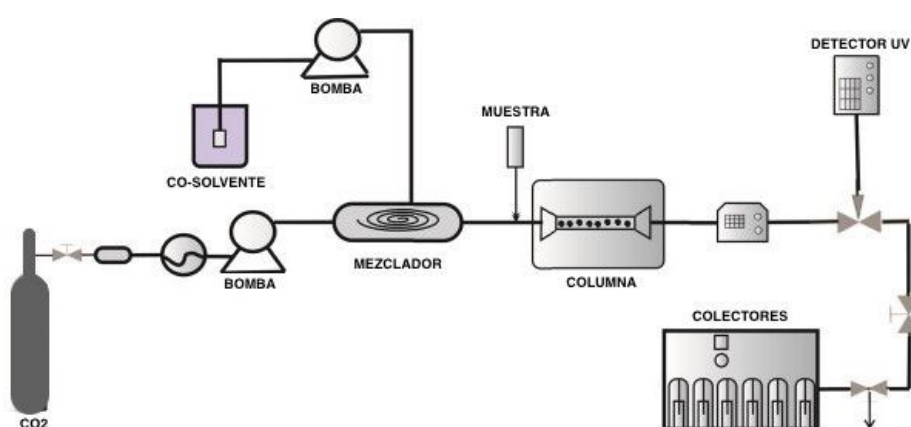


Figura 2. Representación esquemática de la SFC piloto.

4. METODOLOGÍA

4.1. BTO

El trabajo se realizó desde la Unidad de Desarrollo de la BTO (Business Technical Office) de la empresa Solutex (Mallén, Aragón).

4.2. MATERIA PRIMA

Como materia prima se seleccionó una fracción concentrada en omega-3 EPA y DHA en forma etil éster. Se trata de una fracción obtenida en un proceso de producción regular en Solutex. La materia prima usada en este trabajo es uno de los productos de este proceso y tiene una concentración aproximada de 70 % en EPA (ácido eicosapentaenoico) y 13 % en DHA (ácido docosahexaenoico). Usando la SFC, es posible fraccionar el aceite de pescado separando su contenido de ácidos grasos en varias fracciones de alta concentración. En la *Figura 3*, se muestran los porcentajes en peso de los componentes más detallados de la materia prima:

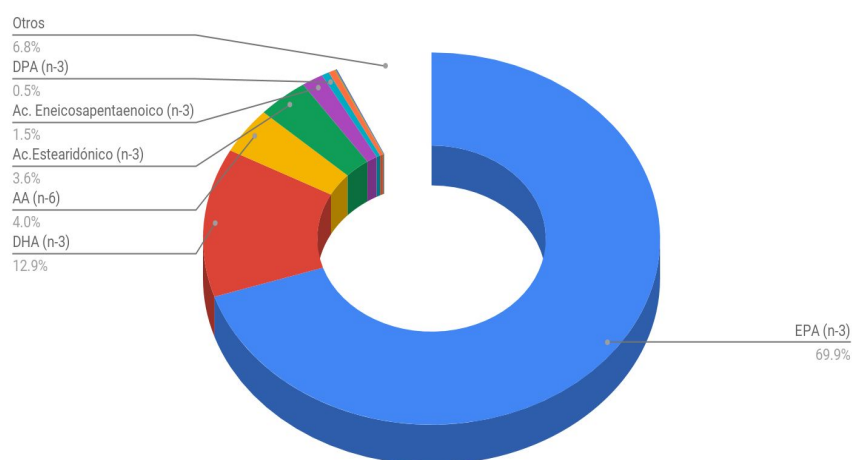


Figura 3. Composición de la materia prima empleada en las pruebas.

Como se puede ver en la gráfica anterior, los omega-3 son los PUFAs mayoritarios de la materia prima (sobre todo, por el contenido del EPA) formando un 89.1 % (en peso) de la concentración de la fracción. El 4.1 % de la composición de la materia prima corresponde

a los PUFAs omega-6 y el porcentaje restante lo forman otros ácidos grasos minoritarios. Partiendo de un 69.9 % de EPA, el propósito de este trabajo es concentrar su contenido en EPA. Para ello, se usará la instrumentación que se verá a continuación.

4.3. INSTRUMENTACIÓN

El equipo usado en este trabajo es la planta piloto de tecnología supercrítica de la Unidad de Desarrollo de la BTO, que puede adaptarse para trabajar en modo extracción (SFE piloto) o en modo cromatografía (SFC piloto), siendo este último el usado en este trabajo.

Los componentes del equipo de SFC piloto se listan en la *Tabla 3*. El funcionamiento de la SFC piloto es similar al de la planta industrial SFC. El CO₂ que entra al sistema se presuriza y se enfría (A-301) para poder ser bombeado (P-301) en estado líquido a un determinado caudal. Después, se calienta en un intercambiador de calor (BT-302) para pasar a las condiciones supercríticas elegidas para el experimento. La materia prima se inyecta en una determinada cantidad y se ve arrastrada por la fase móvil scCO₂. A medida que va atravesando la columna (C-1), se retienen los componentes de la materia prima en diferentes grados según la afinidad de los mismos con la fase estacionaria (interacciones débiles). Según van eluyendo de la columna, se pueden recoger en distintos colectores (Fr1, Fr2, Fr3 y Waste) obteniendo fracciones de gran concentración llamadas purificados.

Tabla 3. Lista de equipos pertenecientes al sistema de la SFC piloto.

Referencia del equipo	Ubicación	Descripción
A-301	Unidad de Desarrollo	Chiller
BT-301	Unidad de Desarrollo	Baño térmico/Unidad de calentamiento
BT-302	Unidad de Desarrollo	Baño térmico/Unidad evaporador CO ₂
C-1	Unidad de Desarrollo	Columna de SFC piloto
Fr1	Unidad de Desarrollo	Colector 1
Fr2	Unidad de Desarrollo	Colector 2
Fr3	Unidad de Desarrollo	Colector 3
P-301	Unidad de Desarrollo	Bomba de impulsión CO ₂
P-302	Unidad de Desarrollo	Bomba de alimentación aceite SFC
P-303	Unidad de Desarrollo	Bomba de alimentación SFE
Waste	Unidad de Desarrollo	Colector residual

4.4. PROCEDIMIENTO

El diseño de procesos de fraccionamiento de PUFAs EPA y DHA mediante la técnica de cromatografía supercrítica se ha llevado a cabo en distintas condiciones, para estudiar el efecto del diseño de la columna, elección de la fase estacionaria y el efecto de la capacidad de la instalación en la eficiencia de la separación. Las distintas pruebas experimentales realizadas a lo largo del trabajo se detallan a continuación, clasificándolas según el objetivo buscado.

4.4.1. ESTUDIO DEL EFECTO DEL DISEÑO DE LA COLUMNA EN EL PROCESO DE SEPARACIÓN

Con el fin de estudiar el efecto que tiene el diseño de la columna en el proceso de separación de SFC piloto, se usaron dos tipos de columna: columna A y columna B. Aunque las dos columnas tengan un volumen interior igual, cada una tiene una geometría distinta: la columna A es una columna más estrecha y más larga en comparación con la columna SFC industrial, salvando las escalas. En cambio, la columna B es más ancha y más corta que la columna A, y mantiene la similaridad geométrica de la SFC industrial.

En las pruebas A.1 y B.1 se usaron las mismas condiciones de trabajo y la misma fase estacionaria para poder comparar las dos columnas. Se usaron 68 g de sílica amino (estructura irregular, 32 μm), la misma que se usó en la parte productiva de Solutex con el fin de comparar también la SFC piloto con la SFC industrial. En la *Tabla 4* se pueden ver las características de las dos columnas:

Tabla 4. Características de la columnas A y la columna B.

	Columna A	Columna B
Diámetro (cm)	2.1	3.41
Longitud (cm)	25	9.49
Área (cm ²)	3.5	9.1
Volumen (cm ³)	86.6	86.7
Material	Acero inoxidable	Acero inoxidable

A continuación se describen las pruebas que se realizaron en cada columna:

- **Prueba A.1:** en la primera prueba del trabajo se usó la columna A, que es una columna con una geometría más estrecha y más larga que la columna B como se ha comentado. La columna fue rellena con la fase estacionaria sílica amino, se instaló en la planta SFC piloto y se encendió la planta con las siguientes condiciones de proceso: una temperatura de columna de 44° C, una presión de trabajo de 80 bares y un caudal de fase móvil CO₂ de 168 g/min. Se inyectó 0.12 mL de aceite como materia prima cuya concentración en EPA y DHA es 70 % y 13 % respectivamente. Los diferentes PUFAs presentes en la materia prima inyectada se retuvieron más o menos en la fase estacionaria del sistema de SFC piloto, según la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido graso. Así, con el detector ultravioleta (UV) del sistema a la salida de la columna, se detectaron distintos picos de PUFAs del aceite a distintos tiempos de retención. El tiempo de operación de cada inyección fue de 30 minutos para que la materia prima finalizara totalmente el paso a través de la columna y alcanzara el detector. Para calcular los tiempos iniciales y finales aproximados de las recogidas de los PUFAs, cada vez que se encendió la planta SFC piloto se tuvieron que hacer varias pruebas de inyección para estabilizar la fase estacionaria y poder anotar tiempos en una señal cromatográfica estable. Tras 14 recogidas, se desmontaron los 4 colectores (Fr1, Fr2, Fr3 y Waste) del sistema SFC piloto y se guardó en viales lo obtenido en cada colector. Para recuperar la máxima muestra posible de los interiores de los colectores, se hizo un arrastre de etanol y una posterior evaporación del alcohol en las muestras mediante soplado de nitrógeno o mediante el uso del rotavapor en el caso de las muestras de gran cantidad de etanol.

- **Prueba B.1:** en la prueba B.1 se usó la columna B, una columna con la misma relación diámetro-longitud a la columna industrial SFC de Solutex y con una geometría más ancha y más corta que la columna A, pero del mismo volumen que esta última. Se aplicaron 150 bares a columna vacía para ver si soportaba bien la presión. Una vez comprobado que aguantaba bien, se relleno con la fase estacionaria sílica amino y se instaló en la planta SFC piloto. Las inyecciones posteriores se realizaron a condiciones idénticas a las empleadas con la columna A durante operaciones de 45 minutos: temperatura de columna de 44° C, 80 bares, volumen de inyección de la materia prima de 0.12 mL y un caudal de 168 g CO₂/min. Como en el anterior caso, primero se hicieron

pruebas de inyección antes de las recogidas. El detector UV analizó las muestras a la salida de la columna B. Se acumularon un total de 16 recogidas en los colectores Fr1, Fr2, Fr3 y Waste, que fueron almacenadas en viales y recuperadas lo máximo posible de los interiores de estos colectores como en el caso anterior.

La prueba B.2 que se describe a continuación se hizo con la intención de poder comparar con la prueba B.1 y ver cómo influye el cambio de las condiciones de trabajo en el proceso de separación. Para ello, se usó la misma columna y la misma fase estacionaria: columna B y fase sílica amino.

- **Prueba B.2:** Con el fin de escalar las condiciones de la columna A a la columna B, que tiene la similaridad geométrica a la SFC industrial, se cambiaron las condiciones subiendo el caudal de CO₂ a 545 g/min y el volumen de inyección a 0.15 mL (condiciones adaptadas a través de una ecuación de escalado en el que se relacionan los radios y de ambas columnas). Se mantuvieron tanto la temperatura de los colectores (44 °C) como la presión de trabajo (80 bar). No se recogió ninguna muestra, ya que los picos de los PUFAs salieron demasiado rápido y juntos, no dando tiempo a recoger adecuadamente y no pudiendo separar los picos entre sí. Es decir, no se produjo separación cromatográfica.

4.4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FASE ESTACIONARIA EN EL PROCESO DE SEPARACIÓN

La elección de la fase estacionaria en la SFC es muy importante, ya que determina los tiempos de retención de los PUFAs del aceite y la calidad de separación del sistema. Con el fin de comparar las distintas fases estacionarias, se llevaron a cabo las pruebas A.1 y A.2 con la columna A y las mismas condiciones, pero con diferentes fases. Además, se varió el tamaño de partícula de una fase estacionaria particular para ver su influencia en el proceso de separación entre las pruebas A.2 y A.3.

- **Prueba A.2:** La columna A se rellenó de 72 g de la fase estacionaria sílica funcionalizada con plata (estructura irregular, 50 µm), se instaló en la planta SFC piloto y se inyectó el material de partida testado anteriormente para poder comparar la diferencia que puede haber en la separación entre esta fase estacionaria y la sílica

amino. Se inyectaron 0.12 mL de materia prima y se operó con las siguientes condiciones de trabajo durante operaciones de 20 minutos en cada inyección: temperatura de columna de 37° C, presión de trabajo de 80 bares y un caudal de CO₂ de 200 g/min. La elección de estas condiciones se debe a la experiencia previa del departamento de BTO de Solutex con esta fase estacionaria. Se vio que con esta fase el aceite inyectado quedaba retenido completamente en la columna y por tanto, no aparecía ninguna señal en el cromatograma. Sin embargo, añadiendo un co-solvente como el etanol junto al dióxido de carbono supercrítico se observó que era una ayuda eficaz para transportar la materia prima a través de la columna y dar con la señal del cromatograma. El co-solvente es un compuesto soluble en CO₂ supercrítico que adicionando a este en una proporción entre un 1 y un 10 %, es capaz de variar su polaridad y mejorar su poder de solvatación. Por lo tanto, en cada prueba e inyección en la columna B con la fase sílica funcionalizada con plata se inyectó un 5 % de caudal de etanol (10 mL/min). Los colectores usados fueron Fr1, Fr2 y Waste, y se acumularon un total de 12 recogidas.

- **Prueba A.3:** La columna A se rellenó de 40 g de fase estacionaria sílica funcionalizada con plata de diferente granulometría a la usada en la Prueba B.3 (estructura irregular, 5-20 µm) y se operó con las mismas condiciones que en el caso de Prueba B.3: temperatura de columna de 37° C, presión de trabajo de 80 bares y un caudal de CO₂ de 200 g/min. Como en el anterior caso, se comprobó que la materia prima se quedaba completamente retenida en la fase sílica y no daba ninguna señal cromatográfica. Por eso, en este caso también se vio que al añadir un 5 % de EtOH ayudaba a eluir el aceite. Se usaron los colectores Fr1, Fr2 y Waste y se acumularon un total de 12 recogidas.

Tras probar el etanol como co-solvente, se preparó una disolución materia prima-EtOH (0.12 mL de aceite + 0.5 mL de EtOH) y se inyectó en el sistema SFC piloto para ver si se podría operarse sin usar una corriente semicontinua de co-solvente. La mezcla inyectada mostró una primera señal pequeña al inicio (que correspondería al etanol y algún ácido graso no retenido) y a continuación no daba intensidad de señal por lo que quedó totalmente retenida en la columna. Inyectando co-solvente transcurrido un tiempo comenzó a detectarse la elución de los ácidos grasos retenidos, demostrando que al trabajar con la fase sílica funcionalizada con plata no se puede prescindir de la corriente de co-solvente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. FRACCIONAMIENTO DE PUFAS OMEGA-3

La elección de una columna, de una fase estacionaria o de unas condiciones de trabajo no se basa solo en la pureza obtenida en las fracciones del sistema SFC piloto. Los tiempos empleados, la energía consumida, el costo de inversión de la columna, el nivel de separación lograda, etc. son otros de los muchos factores que hay que tener en cuenta en el diseño de la SFC piloto. La *Figura 4* muestra los tiempos de retención (t_r) del EPA obtenidos en las pruebas realizadas y que se han empleado para comparar los resultados de las mismas.

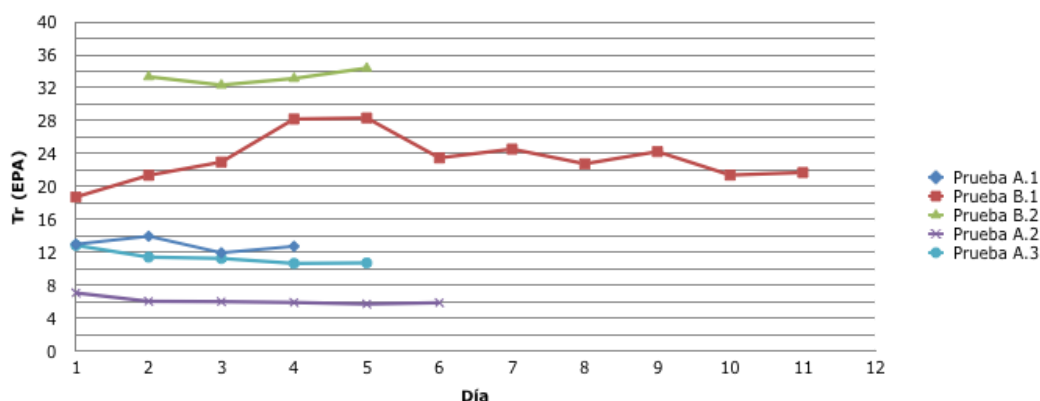


Figura 4. La evolución de los tiempos de retención del pico del EPA en los distintos experimentos.

Se puede observar que en la prueba A.1, las señales de la columna A con la fase sílica amino se mantuvieron estables desde el primer momento con un t_r medio para el pico del EPA de 12 minutos. Por otro lado, el cambio de columna en la prueba B.1 provocó una variación en la retención de la materia prima. Como se puede notar, los resultados de los primeros 6-7 días de experimentos con esta columna B y la fase sílica amino fueron muy dispares. Luego, los tiempos de retención y señales se empezaron a asemejar debido a que se estabilizó la fase estacionaria, dando un t_r para el EPA en torno a los 23 minutos. Los experimentos de la prueba B.2 fueron los más duraderos, con una media de t_r del EPA de 33 minutos. La prueba A.2 tuvo los tiempos de retención más cortos de todas las pruebas realizadas, con una media de 6 minutos. Finalmente, la prueba A.3 tuvo unos tiempos de retención parecidos a los de la prueba A.1, con una media de 11 minutos.

En resumen, la geometría de la columna afecta en la retención de la materia prima; cuanto más ancha sea la columna, hay más difusión transversal del CO₂ y los analitos en la columna, afectando a la separación y aumentando el tiempo de retención de los ácidos grasos en la columna. Cuanto más estrecha sea la columna, disminuye la difusión transversal de la fase móvil y los analitos y atraviesan la fase estacionaria de la columna, resultando en una retención más baja.

Por otro lado, se calcularon unos parámetros para determinar la calidad de separación de cada prueba. La *Tabla 5* contiene los siguientes parámetros: el factor de capacidad (k') es un parámetro que describe las velocidades de migración de los analitos en las columnas; el factor de capacidad de la columna (α) define cómo de selectiva es una columna para separar dos picos; la resolución de la columna (R) es una medida cuantitativa de la capacidad para separar dos analitos; y el número de platos teóricos (N) es un parámetro de eficiencia de una columna. Las fórmulas de cada uno de los parámetros se muestran a continuación, siendo t_R el tiempo de retención, t_M el tiempo muerto, W la anchura del pico y Wh la anchura a la mitad de la altura del pico:

Factor de capacidad	$k'_{analito} = \frac{t_{R\ analito} - t_M}{t_M}$
Factor de capacidad de la columna	$\alpha_{analito1, analito2} = \frac{t_{R\ analito2} - t_M}{t_{R\ analito1} - t_M}$
Resolución de la columna	$R = \frac{2 \cdot (t_{R\ analito2} - t_{R\ analito1})}{W_2 - W_1}$
Número de platos teóricos	$N = 5.545 \cdot \left(\frac{t_{R\ analito}}{Wh_{analito}}\right)^2$

Tabla 5. Parámetros de la calidad de separación de cada prueba. Las casillas marcadas de color más oscuro representan los mejores resultados de cada parámetro.

Factor de Capacidad (k')	Factor de Capacidad de la columna (α)	Resolución de la columna (R)	Número de platos teóricos (N)
------------------------------	--	----------------------------------	-----------------------------------

	k'_{ASA}	k'_{EPA}	k'_{DHA}	α_{A-E}	α_{E-D}	R_{A-E}	R_{E-D}	N_{ASA}	N_{EPA}	N_{DHA}
Prueba A.1	0.57	1.06	2.37	1.98	2.28	0.85	1.55	312.52	123.86	232.61
Prueba B.1	0.84	1.68	3.38	2.00	2.02	1.33	1.71	276.61	209.00	209.7
Prueba B.2	15.15	31.30	189.6	2.04	8.43	0.57	2.21	60.87	6.60	57.75
Prueba A.2	1.31	0.30	1.4	1.54	7.08	0.41	1.45	44.29	39.89	49.96
Prueba A.3	0.40	1.63	2.88	4.27	1.77	1.05	0.42	135.01	34.81	13.39

Las velocidades más altas de migración las presentó la fase estacionaria sílica funcionalizada con plata, viendo que se lograron los menores factores de capacidad (pero mayor que la unidad, si no, no presentan una resolución adecuada) de los analitos. En este sentido, la prueba B.2 tuvo las velocidades de migración más bajas por mucho en las tres especies. Las condiciones más altas de la columna B con la fase sílice amino fueron las más selectivas para separar los picos EPA y DHA, mientras que para separar los picos ASA y EPA la prueba A.3 fue la más selectiva. La columna B fue la que mejor resolución tuvo en la separación de los picos. Finalmente, la fase sílica amino en condiciones moderadas fueron las pruebas más eficientes.

5.2. EFECTO DEL DISEÑO DE LA COLUMNA EN EL PROCESO DE SEPARACIÓN

Las composiciones de las fracciones obtenidas en la prueba A.1 y en la prueba B.1 se determinaron por cromatografía de gases (siguiendo el método de la Farmacopea Europea) y se muestran en la *Tabla 6* y *Tabla 7* respectivamente. Dichas tablas indican los porcentajes de EPA y DHA de las muestras obtenidas desde los colectores Fr1, Fr2, Fr3 y Waste.

Tal y como se esperaba en la prueba A.1, en el colector Fr2 hay una alta pureza de EPA, ya que se recogió en los momentos de aparición máxima del pico de EPA. Así, partiendo de un 69.9 % de EPA, se logró un producto concentrado con un contenido de 92.8 % de EPA. En cuanto a la fracción rica en DHA en el colector Fr3, se obtuvo un producto con una concentración de 68.4 % de DHA partiendo de un 13 %.

Tabla 6. Resultados analíticos de las recogidas de la prueba A.1.

	% EPA	% DHA
Fr1	76.68	11.58
Fr2	92.8	0.04
Fr3	25.17	68.36
Waste	73.67	12.03

La *Tabla 7* muestra los resultados analíticos de las fracciones Fr2, Fr3 y Waste de la prueba B.1. Se puede observar que en la fracción Fr2 de la columna B se logró una concentración de 93.4 % de EPA, un poco más alta que la obtenida con la columna A. En cuanto al DHA, se obtuvo una concentración de 58.2 % en el colector Fr3.

Tabla 7. Resultados analíticos de las recogidas de la prueba B.1.

	% EPA	% DHA
Fr2	93.4	0.16
Fr3	22.59	58.2
Waste	72.67	10.66

Comparando las dos columnas con la misma fase y con las mismas condiciones de trabajo e inyección (A.1 vs B.1), se puede decir que la columna A dio mejores resultados, ya que aunque la columna B diese unas concentraciones algo más altas de EPA y DHA, los tiempos de retención de la columna A fueron la mitad que en la otra columna. Cuanto menor sean los tiempos de retención, menor será el consumo en CO₂, se disminuirá el consumo de energía y los tiempos de proceso serán más cortos. Por lo tanto, este dato es muy importante en la comparación de las dos columnas. Aunque la columna B presentó una resolución y unas velocidades de migración mayores, la eficiencia de la columna A fue el parámetro determinante en la comparación de ambas columnas.

5.3. EFECTO DE LA FASE ESTACIONARIA EN LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

El uso de la fase estacionaria sílica funcionalizada con plata en la columna A se hizo usando un 5 % de etanol como co-solvente, ya que se vió que sin él retenía completamente el aceite. Esto se puede comprobar en la *Figura 5*, donde la señal permanece nula durante 23 minutos hasta que se introduce el etanol como co-solvente.

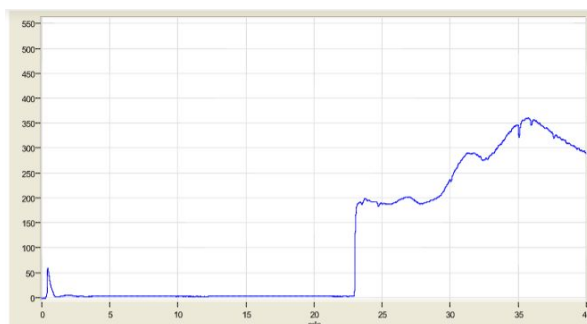


Figura 5. Cromatograma en el que se introduce el etanol como co-solvente en el minuto 23.

Las recogidas de la fracción del colector Fr2 (ver *Tabla 8*) dieron una concentración de 99.2 % en EPA, consiguiendo una gran pureza de EPA, la mejor fracción concentrada obtenida hasta entonces. Por otra parte, se logró una concentración de 60.5 % en DHA en las recogidas de la fracción del colector Fr1.

Tabla 8. Resultados analíticos de las recogidas de la prueba A.2.

	% EPA	% DHA
Fr1	26.01	60.48
Fr2	99.24	0.06
Waste	71.07	10.92

Observando los tiempos de retención del EPA ilustrados en la *Figura 4*, se puede ver que en los experimentos de la columna A y la fase sílica funcionalizada con plata empleando co-solvente fueron de 6 minutos, siendo los tiempos más bajos hasta entonces. Se trata de la mitad de tiempo que la misma columna con la fase sílica amino (A.1) o la cuarta parte de la prueba B.1.

Por otro lado, los resultados de la prueba A.3 reunidos en la *Tabla 9* muestran que se obtuvo un 84.8 % de EPA, un resultado inferior a las anteriores pruebas. Esto puede ser

debido a que la columna solo se rellenó hasta la mitad, al contrario de las otras pruebas, que se llegó a ocupar todo el interior de la columna. Así, el fraccionamiento conseguido en la prueba A.3 es peor que en las otras pruebas.

Tabla 9. Resultados analíticos de las recogidas de la columna A con la fase sílica funcionalizada con plata diferente a la usada en la Prueba B.3.

	% EPA	% DHA
Fr1	32.18	6.94
Fr2	84.83	9.57
Waste	74.25	11.29

La alta purificación obtenida como el corto tiempo empleado hacen que la prueba A.2, que incluye la columna A y la fase estacionaria amino funcionalizada con plata, sea el mejor de los experimentos realizados. Por lo tanto, se puede concluir que la sílica funcionalizada con plata es la mejor fase que la sílica amino para la separación de los PUFAs para obtener altos concentrados. Sin embargo, aunque generalmente los parámetros de separación sean mejores que la fase sílica amino, la sílica funcionalizada con plata fue menos eficiente (número pequeño de platos teóricos y alto consumo de co-solvente). El uso de etanol en la prueba A.2 presenta desventajas, ya que aunque está admitido en la producción Food grade y medioambientalmente no es muy nocivo, presenta peligros de inflamabilidad y explosión en su manipulación, consume mucha energía y tiempo para retirar el etanol del aceite y controlar que las trazas que quedan, y riesgos humanos por la emisión de contaminantes orgánicos volátiles (COVs), aunque esto se puede evitar mediante la recuperación del mismo.

6. CONCLUSIONES

El aceite de pescado que se usó en este trabajo contiene los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3 EPA y DHA en una concentración de 69.9 % y 12.9 % respectivamente.

El objetivo principal de este TFM se basa en la concentración de este aceite en estos PUFAs, sobre todo en EPA. Se estudió el efecto que tiene el diseño de la columna, la elección de las condiciones de trabajo y la elección de la fase estacionaria en el proceso de separación mediante varias pruebas en la SFC piloto.

Se observó que la columna A, al ser más estrecha y larga que la columna B, disminuyen los tiempos de retención de los PUFAs del aceite empleando la misma fase estacionaria. Esto se debe a que esta geometría hace que haya menos difusión transversal del scCO_2 y de los analitos en la columna, afectando así a la separación y disminuyendo los tiempos de retención. Las concentraciones obtenidas en las fracciones de la SFC piloto, no muestran mucha diferencia entre ambas columnas. La columna A se caracteriza por ser más eficiente que la columna B, mientras que la columna B se identifica por ser más resolutivo en la separación de los picos que la columna A. El cambio de las condiciones de trabajo al aumentar tanto la presión de trabajo, como el caudal y el volumen de inyección significó el descenso de los tiempos de retención. Las condiciones moderadas significan una alta velocidad de migración y sobre todo, un ahorro en el gasto de la energía y tiempo durante el proceso del fraccionamiento.

La sílica amino es una fase estacionaria que se caracterizó por dar unos resultados eficientes, sin embargo, dio unas concentraciones de EPA y DHA inferiores y sus tiempos de retención resultaron ser más largos que los de la otra fase. La fase sílica funcionalizada con plata se usó junto con el etanol como co-solvente para permitir la elución de los componentes del aceite y mostró los mejores resultados con una alta velocidad de migración. La mayor pureza se consiguió mediante la adición del etanol, pudiendo compensar los aspectos técnicos, económicos y de seguridad que implica el co-solvente.

Aunque la eficacia del proceso de fraccionamiento del aceite de pescado es algo fundamental en la industria, también hay que tener en cuenta los gastos que esto conlleva y las perspectivas medioambientales. La SFC piloto sirve para estudiar todos estos aspectos y llevar a cabo un posterior escalado industrial.

7. REFERENCIAS

ALKIO, M., GONZALEZ, C., JÄNTTI, M., & AALTONEN, O., "Purification of polyunsaturated fatty acid esters from tuna oil with supercritical fluid chromatography", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(3), 315-321, 2000.

BRUNNER, G., "Gas Extraction an Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes". *Darmstadt: Steinkopff*, 1994.

CATCHPOLE, OWEN J., JOHN B. GREY, AND KIRSTINE A. NOERMARK. "Solubility of Fish Oil Components in Supercritical CO₂ and CO₂-Ethanol Mixtures", *Journal of Chemical & Engineering Data* 43.6, 1091-095, 1998.

MONTAÑÉS, F., CATCHPOLE, O. J., TALLON, S., MITCHELL, K., & LAGUTIN, K., "Semi-preparative supercritical chromatography scale plant for polyunsaturated fatty acids purification", *The Journal of Supercritical Fluids*, 79, 46-54, 2013.

NILSSON, W.B., "Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Fish Oils", *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, editado por J.W. King y G.R. List, *AOCS Press*, 180–212, 1996.

RUBIO-RODRÍGUEZ N., "Supercritical fluid technology for extraction, Concentration & formulation of Omega-3 rich oils: a novel strategy for valorization of fish by-products" Tesis PhD, Universidad de Burgos, Dirigida por S. Beltrán, 2011.

SHANMUGAM, K., & DONALDSON, A. A., "Extraction of EPA/DHA from 18/12EE Fish Oil Using AgNO₃(aq): Composition, Yield, and Effects of Solvent Addition on Interfacial Tension and Flow Pattern in Mini-Fluidic Systems", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(33), 8295-8301, 2015.

TURNER, CHARLOTTA & J.W, KING., "Supercritical fluid chromatography of lipids", *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*", 2005.