



MÁSTER EUROPEO EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS

**Extracción de alquilresorcinoles de
salvado de trigo con dióxido de carbono
en condiciones supercríticas**

SARA REBOLLEDA ALONSO

JULIO 2010



UNIVERSIDAD DE BURGOS
DPTO. DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Dña. Sagrario Beltrán Calvo y María Luisa González San José profesoras titulares del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos y profesoras del Máster Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en dicha Universidad,

INFORMAN

Que Dña. Sara Rebolleda Alonso ha realizado un trabajo experimental Fin de Estudios, titulado “Extracción de alquilresorcinoles de salvado de trigo con dióxido de carbono en condiciones supercríticas” en los laboratorios del Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos bajo la dirección de Sagrario Beltrán Calvo y María Luisa González San José.

Asimismo, informan que tras revisar la realización y memoria de dicho trabajo consideran que cumple los requisitos y características exigidos en la normativa vigente para ser considerado como Trabajo Experimental Fin de Estudios correspondiente a la Tesis de Máster Oficial en Seguridad y Biotecnología Alimentarias, impartido en la Universidad de Burgos.

Informe que, a los efectos oportunos extiende en Burgos a 16 de julio de 2010

Fdo.: Sagrario Beltrán Calvo

Fdo.: María Luisa González San José

El presente trabajo ha sido financiado mediante contrato, regulado por el artículo 83 de la Ley Orgánica de Universidades, de la Universidad de Burgos con la empresa HARINAS Y SEMOLAS DEL NOROESTE, S.A. (HASENOSA) firmado con fecha 29 de septiembre de 2009 y referencia interna A16J06.

Índice

1. Antecedentes	1
2. Objetivos	4
3. Parte experimental	5
3.1. Extracción de alquilresorcinoles de salvado de trigo por métodos convencionales.....	5
3.2. Extracción de AR de salvado de trigo mediante extracción con CO ₂ en condiciones supercríticas.	5
3.2.1. <i>Descripción y operación de la planta de laboratorio de EFSC (PL)</i>	5
3.2.2. <i>Descripción y operación de la planta piloto de EFSC (PP)</i>	5
3.2.3. <i>Experimentación de EFSC de AR de salvado de trigo</i>	6
3.3. Determinación del contenido en AR totales	6
3.3.1. <i>Determinación del perfil de AR individuales</i>	8
3.3.2. <i>Determinación de la composición en ácidos grasos</i>	9
3.4. Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de salvado de trigo.....	9
3.4.1. <i>Método FRAP</i>	9
3.4.2. <i>Método DPPH</i>	9
3.5. Estudio de la evolución con el tiempo de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFSC.....	9
4. Resultados y discusión	10
4.1. Rendimientos de la extracción con métodos convencionales y caracterización de los extractos	10
4.2. Rendimientos de la extracción con fluidos supercríticos y caracterización de los extractos. Estudios realizados en planta de EFSC de laboratorio.	13
4.2.1. <i>Influencia del tiempo de maceración (tm)</i>	13
4.2.2. <i>Influencia del tamaño de partícula (tp)</i>	14
4.2.3. <i>Influencia de la temperatura de extracción (T)</i>	15
4.3. Rendimientos de la extracción con fluidos supercríticos y caracterización de los extractos. Estudios realizados en planta piloto de EFSC.....	16
4.3.1. <i>Influencia de la planta utilizada en la extracción</i>	16
4.3.2. <i>Influencia del tiempo de extracción (te)</i>	17
4.3.3. <i>Influencia de la temperatura de extracción (T)</i>	17
4.3.4. <i>Influencia de la presión de extracción (p)</i>	18

4.4. Comparación entre extracción con disolventes orgánicos y EFSC	19
4.5. Perfil de AR individuales de los extractos de salvado de trigo	19
4.6. Composición de ácidos grasos (AG) de los extractos de salvado de trigo	20
4.7. Estudio de la evolución de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFSC.....	20
5. Conclusiones.....	23
6. Bibliografía	24

1. Antecedentes

Las actividades biológicas (antioxidantes, inhibidores enzimáticas,...) atribuidas a los alquilresorcinoles (AR) son cada vez más numerosas y hacen que se incremente la investigación que tiene por objeto optimizar su extracción. Además, el interés de los alquilresorcinoles también reside en que son indicadores de la ingesta dietética de cereales al analizarse estos compuestos en el plasma sanguíneo [1, 2].

Las cantidades de AR que se extraen de las matrices que los contienen, son variables dependiendo del método de extracción, del disolvente utilizado para realizarla y sobre todo de la matriz en que se encuentran. En la Tabla 1 se muestran algunos datos sobre la extracción de AR recogidos de la bibliografía.

Tabla 1. Revisión bibliográfica del contenido de AR en diferentes cereales

Materia prima	Método de extracción	Método de cuantificación	Contenido en AR (mg/g)	Referencia bibliográfica
Trigo entero	Agitación con acetona	Colorimétrico	0.3 - 0.5	[3]
Trigo entero	Agitación con etil acetato	GC	0.23 - 0.64	[4]
Salvado de trigo	Agitación con etil acetato	GC	1.6 - 2.8	[4]
Salvado de centeno	Agitación con etil acetato	GC	2.0 - 3.4	[4]
Salvado de trigo	Agitación con acetona	GC	3.2	[5]
		HPLC	2.8	
Salvado de trigo	EFSC	GC	2.8 - 3.2	[6]
Salvado de trigo	EFSC	GC	0.6 - 0.7	[7]
Salvado de trigo	Agitación con acetona	Colorimétrico	2.7 - 3.2	[8]
		HPLC	2.4 - 2.6	

En la Tabla 2, se recogen los aspectos más relevantes de los diferentes trabajos encontrados en la bibliografía sobre extracción de AR por métodos convencionales. El objetivo de estos trabajos es, fundamentalmente, la optimización de diferentes métodos de análisis de alquilresorcinoles en cereales, principalmente centeno, y la evaluación de la eficacia de los distintos disolventes utilizados en la extracción. En ninguno de estos casos se plantea la extracción para la producción de extractos que puedan ser utilizados en la industria alimentaria aprovechando su actividad antioxidante.

En los últimos años, el creciente interés por la obtención de antioxidantes naturales para su utilización en la industria alimentaria, ha hecho que se planteen alternativas a la extracción con disolventes orgánicos con el fin de producir extractos de alto valor añadido.

Por otra parte, en los últimos años, se han implantado varios procesos industriales [9] que utilizan tecnologías de fluidos supercríticos ya que se trata de tecnologías limpias, que utilizan mayoritariamente como disolvente dióxido de carbono que no presenta restricciones de uso en la industria alimentaria [10].

En la Tabla 3 se recogen los aspectos más relevantes de los trabajos publicados sobre extracción con fluidos supercríticos (EFSC) del salvado de cereales.

Tabla 2. Revisión bibliográfica de los métodos de extracción de alquilresorcinoles por métodos convencionales

Materia prima	Disolvente	Objetivo del Trabajo	Condiciones del trabajo	Comentarios	Año	Referencia
Centeno 1 g de granos y/o 50-100 mg harina	Acetato de etilo 40 mL Metanol 40 mL Acetona 40 mL	Optimizar un método cromatográfico para cuantificación de AR	Temperatura ambiente; 24 h, estándar interno: metil behenato. Deshidratación por evaporación a vacío	Metanol no es práctico para extracción de AR Acetona poca extracción. Mejor utilizar acetato de etilo	2001	[11]
Cebada, trigo y maíz 80 g de granos enteros y/o molidos	Acetona 80 mL	Nuevo método de cuantificación de AR totales (<i>Fast Blue RR</i>)	Temperatura ambiente; agitación continua 48 h, filtración del extracto, deshidratación por evaporación a baja presión (evap. centrífugo). Residuo seco + 2 mL metanol	La extracción de AR se hace con acetona y el extracto se re-disuelve en metanol.	2009	[12]
Trigo y centeno 1.5 g de granos molidos	Metanol 50 mL Acetona 50 mL 80% Etanol en agua 50 mL	Optimización de métodos de análisis de AR. (Fluorescencia, GC, HPLC)	25°C agitación; centrifugación, deshidratación 36 °C Extracto se re-disuelve en metanol Con etanol (agitación y filtrado).	Para la extracción de AR, no hay diferencias significativas entre los 3 disolventes. Para el análisis de AR, es mejor acetona o metanol que 80 % etanol	1992	[13]
Trigo y centeno 1 g de granos y/o salvado y/o harina	Acetona 40 mL	Optimizar un método cromatográfico para cuantificación de AR	Temperatura ambiente; 24 h , estándar interno: metil behenato Deshidratación por evaporación a vacío	La extracción de AR se hace con acetona y el extracto se re-disuelve en acetato de etilo.	2008	[5]
Centeno 1 g de granos enteros y/o 0,5 g de harina	Acetato de etilo 40 mL (20 mL en harina)	Optimizar un método cromatográfico para cuantificación de AR	T ambiente; 24 h, estándar interno: metil behenato Deshidratación por evaporación a vacío	La extracción de AR se hace con acetato de etilo y el extracto se re-disuelve también en acetato de etilo	2009	[14]
Trigo y centeno 2,5 g de granos molidos	Metanol 50 mL	Determinación ác. fenólicos en cereales	25 °C agitación; centrifugación, deshidratación 36 °C.	La extracción y redisolución en metanol.	2009	[15]
Trigo y centeno 1 g de granos y/o salvado	Acetona 40 mL	Determinación de concentración de AR en cereales	T ambiente; 48 h, filtrado Deshidratación por evaporación a vacío 45 °C. Redisolución con acetato de etilo.	La extracción de AR se hace con acetona.	2009	[8]

Tabla 3. Revisión bibliográfica de la extracción con fluidos supercríticos (EFSC) de salvado de cereales

Materia prima	Objetivo del Trabajo	Condiciones del trabajo	Comentarios	Año	Referencia
Centeno, 25 gramos	Extracción de AR de centeno con SC-CO ₂ con y sin cosolventes	40 y 55 °C; 8, 15, 30, 35 MPa; etanol o metanol como cosolventes 5 g CO ₂ / min; 2 h	El CO ₂ puro no es eficiente para la extracción. La mayor cantidad de extracto se obtiene a 55 °C y 30 MPa. No hay diferencia entre cosolventes.	2005	[16]
Trigo y centeno (salvado y grano), 25 gramos	Comparar la extracción de AR con acetato de etilo y la extracción con CO ₂	70 °C; 350 bar; 5 g CO ₂ /min; 10 % de etanol como cosolvente 5 g CO ₂ /min; 6 h	No hay diferencia en el extracto total, ni en la cantidad y composición de los AR entre la extracción convencional y EFSC (3 mg AR/g salvado)	2007	[6]
Trigo y triticale (salvado), 100 g	Maximizar la extracción y recuperar AR de salvado de triticale y trigo en 2 etapas	70 °C; 350 bar; 5 g CO ₂ /min; 10 h etapa 10 % del CO ₂	En la etapa de extracción sin cosolvente se obtiene un extracto no polar prácticamente sin AR. La mayor parte se recuperan en la etapa con cosolvente (trigo: 0,68 mg AR/ g salvado)	2009	[7]
Centeno (salvado), 10 g	Aislar AR de salvado de centeno mediante extracción con CO ₂ combinada con HPLC	45, 55 y 70 °C; 250 bar; 10 g/min; 2-6 h; 1 con CO ₂ puro, etapa 2 con etanol 0.06- 10 %	La 1ª etapa se hace a elevada T y bajo cosolvente para remover compuestos más hidrofóbicos que los AR y la 2ª etapa a menor T y más cosolvente	2009	[17]

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es la obtención de extractos con elevada actividad antioxidante a partir del salvado de trigo. De este modo, se revaloriza un subproducto de las industrias harineras dando lugar a un producto de gran valor añadido.

Se propone optimizar técnicas de extracción limpias que utilizan disolventes sin restricciones en la industria alimentaria y evaluar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.

Para la consecución de este objetivo general se proponen los siguientes objetivos concretos

1. **Puesta a punto de las técnicas analíticas para el seguimiento y evaluación de la eficacia de los procesos EFSC.** Varias técnicas analíticas son necesarias para la caracterización de las materias primas que se desean procesar y de los extractos obtenidos por EFSC. En la caracterización de los extractos se incluye la determinación de alquilresorcinoles (AR) totales, el perfil de AR mediante HPLC/MS y el perfil lipídico mediante cromatografía de gases.
2. **Estudio de cinéticas de extracción en los procesos de EFSC:** Se ensayará la extracción directa de los AR contenidos en el salvado de trigo estudiando los principales parámetros que influyen en el proceso (tiempo de maceración tamaño de partícula, temperatura, presión, etc.)
3. **Estudio de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos.** Dada la naturaleza química de los AR se estudia la actividad antioxidante de los extractos a través de varios métodos químicos que han demostrado aportar información complementaria como son el método DPPH y el método FRAP.
4. **Estudio de la evolución de los extractos obtenidos con el tiempo.** Se estudia la evolución del contenido en AR totales e individuales así como su actividad antioxidante en función de las características de la extracción (principalmente temperatura) y las condiciones de almacenamiento (temperatura y presencia o no de luz).

3. Parte experimental

3.1. Extracción de alquilresorcinoles de salvado de trigo por métodos convencionales

Como estudio previo a la extracción con fluidos supercríticos se ha considerado de interés la extracción de alquilresorcinoles mediante técnicas de extracción convencionales. Para ello se han realizado extracciones (Tabla 4) por agitación a temperatura ambiente y con soxhlet. En el primer caso, se pone en contacto el salvado con el disolvente durante 24 h y posteriormente, se evapora el disolvente en rotavapor obteniéndose el extracto sólido. Los disolventes utilizados para realizar la extracción por agitación han sido acetona y etanol. La acetona es el disolvente más ampliamente utilizado para la extracción de alquilresorcinoles mientras que el etanol se considera interesante por ser el cosolvente que se ha utilizado mayoritariamente en la bibliografía para modificar las propiedades del dióxido de carbono puro en condiciones supercríticas.

Por otro lado, la extracción soxhlet se ha realizado en un equipo de extracción Büchi (modelo B-811), en 25 ciclos de extracción, en cada uno de los cuales el disolvente (acetona y éter de petróleo), a su temperatura de ebullición, entra en contacto con el salvado produciéndose la extracción hasta el agotamiento del salvado en AR.

Tabla 4. Relación de experiencias de extracción con disolventes orgánicos

Experiencia	Disolvente	Método	T (°C)	Réplicas
E1	Acetona	Agitación	20	2
E2	Etanol	Agitación	20	2
E3	Acetona	Soxhlet	56	2
E4	Éter de petróleo	Soxhlet	50	4

3.2. Extracción de AR de salvado de trigo mediante extracción con CO₂ en condiciones supercríticas.

Para el estudio de la extracción de los AR contenidos en salvado de trigo con dióxido de carbono en condiciones supercríticas (SC-CO₂), se han utilizado dos tipos de equipos: una planta de extracción con fluidos supercríticos (EFSC) a escala de laboratorio que no permite la recirculación del dióxido de carbono, y una planta piloto de EFSC que permite la recirculación del dióxido de carbono.

3.2.1. Descripción y operación de la planta de laboratorio de EFSC (PL)

La planta de EFSC de laboratorio [18] tiene unas especificaciones máximas de 400 bar, 120 °C y 5 kg de CO₂/h. El volumen del extractor utilizado en este equipo es de 40 mL (1,4 cm de diámetro x 26 cm de altura).

En las extracciones realizadas con esta planta se han obtenido las curvas de extracción, es decir se ha determinado la cantidad de extracto recogido a lo largo del tiempo, o en función de la cantidad de CO₂ circulado a través del salvado.

3.2.2. Descripción y operación de la planta piloto de EFSC (PP)

Otro grupo de experiencias se ha realizado en la planta semi-piloto [19]. Esta planta dispone de un extractor de 2 L de capacidad y permite trabajar a 650 bar y 150 °C en la zona de extracción y a 300 bar y 100 °C en la zona de separación. La capacidad máxima de la planta es de 20 kg de disolvente/h. El disolvente se recircula al proceso de forma continua una vez descargado el soluto en la zona de separación.

3.2.3. Experimentación de EFSC de AR de salvado de trigo

La totalidad de las experiencias de EFSC realizadas, tanto en la planta de laboratorio como en la planta piloto, se presentan en la Tabla 5.

A continuación se relacionan las variables cuya influencia en el rendimiento de la extracción y en la calidad de los extractos, se ha estudiado en el presente trabajo:

Tiempo de maceración. Habitualmente el contacto previo entre el sustrato y el disolvente hace que este último penetre en la matriz que contiene el soluto de interés, de modo que ésta suele sufrir un hinchamiento, que facilita la posterior extracción del soluto.

Con el fin de evaluar la influencia de este tiempo, se realizaron cuatro experiencias (E5-E8 de la Tabla 5) en las que una vez cargado el extractor con el salvado a extraer y el CO₂ a la presión y temperatura de trabajo, se mantuvo en estas condiciones, sin circulación del CO₂, durante un tiempo de maceración. Una vez transcurrido este tiempo de contacto se comienza la extracción propiamente dicha.

Tamaño de partícula. El pretratamiento del sustrato a extraer es una variable de interés para optimizar la eficacia de la EFSC ya que influye decisivamente en la velocidad de transferencia de materia interna, que en el caso de sustratos sólidos, suele ser la etapa limitante del proceso. Para ver la influencia de esta variable (tp) se procedió a tamizar el salvado obteniendo distintas fracciones con la distribución de tamaños que se indica en la Tabla 6. En esta tabla se observa que la mayor parte de las partículas de salvado tienen un tamaño entre 0,5 y 2 mm. Se obtuvieron las curvas de extracción para cada uno de los tamaños de partícula (E9-E11) y para el mayor tamaño de partícula (con menor contenido en harina) sometido a nueva molienda (E12).

Temperatura de extracción. La temperatura es una de las variables que influyen en la solubilidad y/o en la puesta en contacto entre el soluto y el disolvente y por tanto en la velocidad de extracción del soluto. Las experiencias diseñadas para evaluar la influencia de la temperatura se han realizado a 400 bar y 60 min de maceración en la planta de laboratorio (E7, E13-E16). También se ha estudiado la influencia de la temperatura en distintas experiencias realizadas en la planta piloto para confirmar los resultados obtenidos en la planta de laboratorio (E17-E19).

Presión de extracción. La presión modifica la solubilidad de los solutos a disolver en SC-CO₂ por lo que esta es una variable importante en extracción. Para estudiar la influencia de la presión en el rendimiento de la extracción se diseñaron las experiencias E18, E20-E22.

Tipo de planta EFSC utilizada. El tamaño de las plantas utilizadas para cualquier tipo de proceso influye de forma notable en el rendimiento del mismo, por ello, los estudios se realizan comenzando en plantas a escala de laboratorio, y se continúan en plantas piloto y de demostración antes de diseñar el proceso de producción. Para estudiar esta influencia se diseñaron las experiencias E14 y E23 en las que se mantuvieron condiciones de semejanza.

Tiempo de extracción. El análisis de las curvas de extracción permite determinar el tiempo de procesado de una sustancia que permite los mayores rendimientos con los menores costes posibles. Para estudiar la influencia del tiempo de extracción, además de determinar las curvas de extracción en distintas condiciones con la planta PL, se realizaron las experiencias E21, E23-E24 en la planta piloto PP. Técnicas analíticas para la determinación de la composición de los extractos de salvado de trigo.

3.3. Determinación del contenido en AR totales

Para la cuantificación de AR totales se ha utilizado un método colorimétrico [12] basado en la capacidad de los AR de unirse al Fast Blue RR $\frac{1}{2}$ ZnCl₂ en medio alcalino para formar derivados coloreados que pueden ser cuantificados colorimétricamente a 480 nm utilizando una curva de calibrado de olivetol [12].

Tabla 5. Condiciones experimentales aproximadas de las experiencias de EFSC de salvado de trigo

Experiencia	Planta ¹	P (bar)	T (°C)	Tiempo total de extracción, te (min)	Tiempo de maceración, tm (min)	Materia prima
E5	PL	400	40	67	0	salvado sin tamizar
E6	PL	400	40	127	30	salvado sin tamizar
E7	PL	400	40	132	60	salvado sin tamizar
E8	PL	400	40	99	135	salvado sin tamizar
E9	PL	400	40	150	0	tp < 500 μm
E10	PL	400	40	216	0	tp = 0.5-2 mm
E11	PL	400	40	198	0	tp > 2 mm
E12	PL	400	40	180	0	tp>2mm → <0,5mm
E13	PL	400	50	108	60	salvado sin tamizar
E14	PL	400	60	210	60	salvado sin tamizar
E15	PL	400	70	162	60	salvado sin tamizar
E16	PL	400	80	120	60	salvado sin tamizar o
E17	PP	600	40	180	0	salvado sin tamizar
E18	PP	600	60	180	0	salvado sin tamizar
E19	PP	600	80	180	0	salvado sin tamizar
E20	PP	300	60	180	0	salvado sin tamizar
E21	PP	400	60	180	0	salvado sin tamizar
E22	PP	500	60	140	0	salvado sin tamizar
E23	PP	400	60	60	60	salvado sin tamizar
E24	PP	400	60	120	0	salvado sin tamizar

(1) PL: Planta escala laboratorio. PP: Planta piloto

Tabla 6. Distribución de tamaños de partícula de salvado de trigo

Tamaño de partícula (tp)	Porcentaje en masa de cada fracción (%)	Densidad aparente (kg/m ³)
tp < 0,5 mm	14,01	234
0,5 mm < tp < 2 mm	81,24	141
tp > 2 mm	4,75	93

3.3.1. Determinación del perfil de AR individuales

Se ha determinado la proporción de cada uno de los AR de los extractos obtenidos, así como el contenido total, mediante HPLC (Hewlett Packard 1100 Series) con detección mediante DAD y espectrometría de masas. Se utilizó una columna de Kromasil C18-5 (250 x 4,6 mm) y fase móvil formada por metanol y agua. El detector DAD está directamente acoplado con un pulverizador donde se generan los iones mediante ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo de ionización positivo en un rango de m/z: 100-500.

El método utilizado es una modificación de los métodos propuestos por Knödler et al. [20] y Francisco et al. [16].

Para la cuantificación de los AR mediante HPLC se han realizado curvas de calibrado con diferentes AR suministrados por Sigma Aldrich y cuyos factores de respuesta se presentan en la Tabla 7. Para calcular el factor de respuesta de los AR que no se han utilizado para realizar el calibrado, se ha representado la pendiente de las curvas de los compuestos patrón de los cuales se dispone en función del número de carbonos de la cadena de los AR utilizados. Esta gráfica se presenta en la Figura 1, y en ella se observa que hay una tendencia lineal de los factores de respuesta cromatográficos de los distintos AR y el número de carbonos de su cadena hidrocarbonada. Esto nos permite proponer factores de respuesta para los AR que no se han utilizado como patrones.

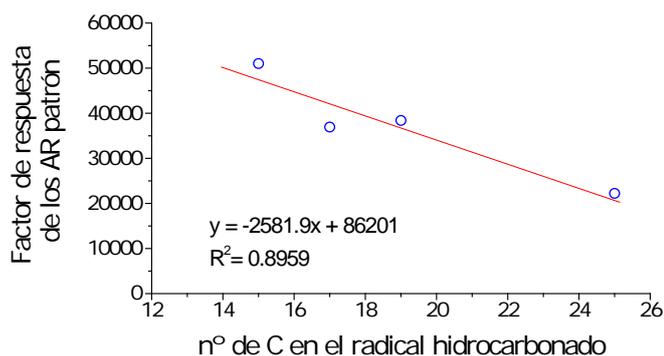


Figura 1. Representación del factor de respuesta de los AR en función del n^o de carbonos de su cadena hidrocarbonada

Tabla 7. Factores de respuesta de los distintos AR en HPLC

Radical de los AR	Nombre de los AR	Factor de respuesta
AR-C ₁₅ H ₃₁	5-n-pentadecilresorcinol	51019
AR-C ₁₇ H ₃₅	5-n-heptadecilresorcinol	36933
AR-C ₁₉ H ₃₉	5-n-nonadecilresorcinol	38404
AR-C ₂₁ H ₄₃	5-n-heneicosilresorcinol	31981*
AR-C ₂₃ H ₄₇	5-n-tricosilresorcinol	26817*
AR-C ₂₅ H ₅₁	5-n-pentacosilresorcinol	22245

* valores predichos

3.3.2. Determinación de la composición en ácidos grasos

El contenido en ácidos grasos se determina por el método oficial AOAC [21]. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizan por cromatografía de gases (Hewlett Packard 6890N Network GC system) con detector de ionización de llama (FID) y helio como gas portador. Se utiliza una columna capilar OmegawaxTM-320, 30m x 0,32mm.

Para la identificación se han utilizado sustancias patrón (Sigma Chemical Co.) y para la cuantificación se utiliza como patrón interno el metil tricosanato.

3.4. Métodos para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de salvado de trigo

Existen muchos métodos para la determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos y en particular del extracto de salvado de cereales. Los más utilizados en alimentos son DPPH, ORAC y ABTS [22, 23], así como el FRAP. Para el presente trabajo se han elegido los métodos FRAP y DPPH que aportan información complementaria y cuya evaluación sobre muestras lipolíticas no presenta complicaciones adicionales.

3.4.1. Método FRAP

El mecanismo básico de reacción en el método FRAP (ferric reducing antioxidant power) es la transferencia de electrones [24]. La reacción consiste en la reducción del reactivo TPTZ, para dar el correspondiente compuesto coloreado, presentando un máximo de absorción a 595 nm, medible por espectrofotometría UV-VIS.

3.4.2. Método DPPH

Este método toma el nombre del radical base de la reacción, el DPPH (radical libre de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). El mecanismo básico de reacción en el método DPPH es la transferencia de electrones. Para evaluar la actividad antioxidante del extracto de AR, éste [25] se hace reaccionar con el radical estable, DPPH•, en una solución de metanol. En su forma radical el DPPH• absorbe a 517 nm, pero la reducción por un agente antioxidante (AH) o radical (R•) hace que la longitud de onda a la que se produce la absorbancia máxima disminuya [25].



3.5. Estudio de la evolución con el tiempo de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFSC

El estudio de la evolución de la actividad antioxidante de los extractos se considera de interés debido a que, la temperatura es una variable clave en la EFSC, la cual puede aumentar el rendimiento de la extracción pero debido a la naturaleza de los extractos, puede tener un efecto negativo sobre su capacidad antioxidante. Los extractos y condiciones de almacén estudiadas se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Extractos objeto de estudio de la evolución de la actividad antioxidante

Experiencia	Presión de extracción (bar)	Temperatura de extracción (°C)	Condiciones de almacenamiento
E17	600	40	Temperatura ambiente y luz
E17	600	40	Congelador y oscuridad
E18	600	60	Temperatura ambiente y luz
E18	600	60	Congelador y oscuridad

4. Resultados y discusión

4.1. Rendimientos de la extracción con métodos convencionales y caracterización de los extractos

En la Tabla 9 se presentan los resultados de las experiencias de extracción de salvado de trigo mediante disolventes convencionales. Las experiencias E1 y E2 se corresponden con la extracción por agitación con acetona y con etanol respectivamente. En el caso de la extracción soxhlet se han realizado dos experiencias (E3 y E4).

Si se compara la extracción por agitación y la extracción soxhlet para un mismo disolvente como es la acetona (ver Tabla 9, experiencias E1 y E3), se observa que, aunque por agitación se obtiene mayor cantidad de extracto por gramo de salvado, este extracto tiene menor cantidad de AR. Esto se corresponde también con la actividad antioxidante obtenida para estos dos extractos, siendo mayor en el caso de la extracción por el método soxhlet.

Una de las principales ventajas que presenta la extracción por soxhlet frente a la agitación es el tiempo de operación que se reduce de 24 h a 3-4 h, además de que se evitan etapas posteriores como la evaporación. El principal inconveniente de la extracción soxhlet, a priori, es que se opera a temperaturas más elevadas, lo que hace pensar que puede ser negativo para la actividad antioxidante de los alquilresorcinoles. Sin embargo, en este ensayo, se ha visto que los extractos obtenidos por el método soxhlet, a pesar de estar sometidos a mayores temperaturas que los obtenidos por agitación, presentan mayor actividad antioxidante por los dos métodos de medida utilizados en el presente trabajo (DPPH y FRAP). Este resultado indica que la temperatura puede ser una variable a optimizar en el estudio de la EFSC.

El extracto obtenido en la experiencia E2, realizada utilizando etanol como disolvente, presenta un contenido en AR ligeramente superior que el extracto obtenido en la experiencia paralela con acetona (E1), si bien la actividad antioxidante es similar en ambos casos lo que parece indicar que la acetona puede extraer otros compuestos, además de los AR, que no presentan actividad antioxidante. En todo caso, las diferencias no son demasiado importantes.

En el caso del éter de petróleo (E4), se obtienen cantidades menores de AR y menor actividad antioxidante si se compara con el extracto obtenido con acetona lo que puede ser una evidencia de que los disolventes apolares extraen peor los AR que disolventes como la acetona.

Tabla 9. Resultados de la experiencias de extracción de salvado de trigo por métodos convencionales

Experiencia	Disolvente	Método	T (°C)	Número de réplicas	mg extracto/ g salvado seco	mg AR/ g salvado seco (colorimetría)	mg AR/ g salvado seco (HPLC)	mmol trolox/ g salvado seco	mmol Fe (II)/ g salvado seco
E1	Acetona	Agitación	20	2	42 ± 12	1.7 ± 0.1	-	0.7 ± 0.1	6.0 ± 0.5
E2	Etanol	Agitación	20	2	34 ± 1	2.2 ± 0.1	-	0.8 ± 0.1	5.2 ± 0.5
E3	Acetona	Soxhlet	56	2	26 ± 9	3.1 ± 0.1	5.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	10.4 ± 0.6
E4	Éter de petróleo	Soxhlet	50	4	24 ± 3	1.3 ± 0.2	2.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1	5.1 ± 0.5

Tabla 10. Resultados de la experiencias de extracción de salvado de trigo con dióxido de carbono supercrítico

Experiencia	Materia prima	Plant ^a (1)	P (bar)	T (°C)	Caudal de CO ₂ (kg/h)	te ⁽²⁾ (min)	tm ⁽³⁾ (min)	kg CO ₂ /kg de salvado seco	Número de réplicas	mg extracto /g salvado seco	mg extracto seco/g salvado seco	mg AR/g salvado seco (colorimetría)	mg AR/g salvado seco (HPLC)	mmol trolox /g salvado seco	mmol Fe (II)/g salvado seco
E5	Sin tamizar	PL	400	40,7	0,069	67	0	13	1	-	13,2	0,4 ± 0,1	-	-	-
E6	Sin tamizar	PL	403	40,8	0,056	127	30	16	1	-	15	0,3 ± 0,1	-	-	-
E7	Sin tamizar	PL	402	40,7	0,040	132	60	13	1	-	14,8	0,2 ± 0,1	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,02	1,4 ± 0,1
E8	Sin tamizar	PL	404	40,5	0,055	99	135	15	1	-	16,3	-	-	-	-
E9	tp < 500 µm	PL	403	40,4	0,069	150	0	42	1	-	21,7	-	-	-	-
E10	tp = 0,5-2 mm	PL	403	40,6	0,056	216	0	36	1	-	19,0	0,7 ± 0,1	-	-	-
E11	tp > 2 mm	PL	403	40,5	0,067	198	0	49	1	-	18,7	-	-	-	-
E12	tp>2mm → <0,5mm	PL	400	40,6	0,081	180	0	46	1	-	20,9	-	-	-	-
E13	Sin tamizar	PL	403	50,2	0,115	108	60	32	1	-	19,9	0,5 ± 0,1	0,91 ± 0,01	0,21 ± 0,01	2,7 ± 0,1
E14	Sin tamizar	PL	402	58,4	0,142	210	60	23	1	-	23,4	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,29 ± 0,01	3,4 ± 0,1
E15	Sin tamizar	PL	402	69,6	0,080	162	60	26	1	-	26,9	0,5 ± 0,2	0,99 ± 0,01	0,16 ± 0,01	1,1 ± 0,1
E16	Sin tamizar	PL	400	79,3	0,116	120	60	32	1	-	33,8	1,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	0,30 ± 0,02	2,2 ± 0,1
E17	Sin tamizar	PP	595 ± 6	40,5 ± 0,3	5,6 ± 0,1	180	0	82 ± 1	2	63 ± 3	35,6 ± 1	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,3	0,7 ± 0,2	7,4 ± 3,3
E18	Sin tamizar	PP	587 ± 8	59,4 ± 0,4	5,0 ± 0	180	0	76 ± 5	2	76 ± 3	49,7	2,1 ± 0,4	4,2 ± 0,1	1,3 ± 0,2	11,6 ± 3,0
E19	Sin tamizar	PP	588 ± 13	79,1 ± 0,5	5,3 ± 0,3	180	0	77 ± 4	2	92 ± 2	63,6 ± 1,3	3,6 ± 0,6	5,6 ± 0,9	2,4 ± 0,6	12,3 ± 0,4
E20	Sin tamizar	PP	303	60,2	5,2	180	0	84	1	77,1	60,7	2,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1	1,7 ± 0,2	10,7 ± 0,4
E21	Sin tamizar	PP	401 ± 2	59,9 ± 0,4	6,1 ± 0,8	180	0	99 ± 10	2	83,0 ± 0,2	60,3 ± 0,1	3,6 ± 0,1	5,1 ± 0,2	3,1 ± 0,4	11,4 ± 1,2
E22	Sin tamizar	PP	478	59,7	3,5	140	0	44	1	59	31,0	3,7 ± 0,3	4,7 ± 0,3	2,8 ± 0,3	17,5 ± 0,9
E23	Sin tamizar	PP	387	61,3	7,7	60	60	41	1	50,2	41,7	1,00 ± 0,03	1,8 ± 0,2	0,58 ± 0,02	3,6 ± 0,1
E24	Sin tamizar	PP	392	60,0	6,9	120	0	74	1	66,7	51,1	2,4 ± 0,1	3,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1	8,2 ± 0,2

(1) PL: Planta escala laboratorio. PP: Planta piloto

(2) te: tiempo total de extracción

(3) tm: tiempo de maceración

4.2. Rendimientos de la extracción con fluidos supercríticos y caracterización de los extractos. Estudios realizados en planta de EFSC de laboratorio.

Los resultados de las experiencias de extracción de salvado de trigo utilizando dióxido de carbono en condiciones supercríticas se presentan en la Tabla 10. En esta sección se analizan dichos resultados.

4.2.1. Influencia del tiempo de maceración (tm)

En la Figura 2 se presentan las curvas de extracción obtenidas para las experiencias E5-E8 realizadas con el fin de estudiar la influencia del tiempo de maceración (tm)

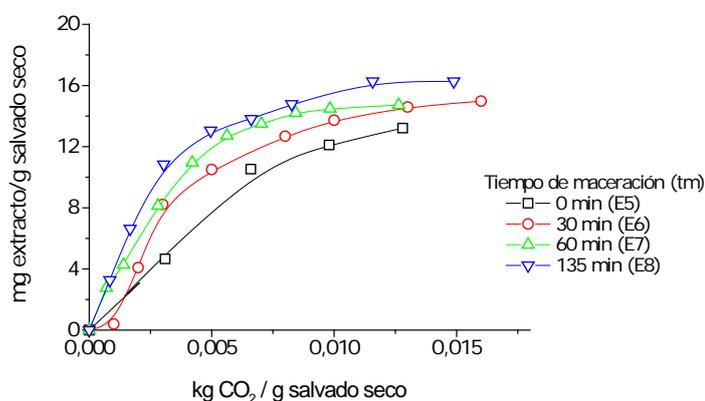


Figura 2. Influencia del tiempo de maceración en el rendimiento de la EFSC del salvado de trigo (Curvas de extracción obtenidas a 400 bar, 40 °C y distintos tiempos de maceración).

Se observa que a medida que el tiempo de maceración aumenta, la extracción inicial de los AR se produce de una forma más rápida hasta un tiempo de maceración de unos 60 minutos. A partir de 60 minutos de maceración no se observa influencia significativa en las velocidades iniciales de extracción. La cantidad total de extracto obtenida varía en función de la velocidad de extracción y la cantidad de dióxido de carbono utilizada por unidad de masa de salvado.

Se observa que las curvas de extracción presentan dos zonas claramente diferenciadas. Al inicio de la extracción la pendiente es elevada, lo que indica una alta velocidad de extracción, y al final de la extracción la pendiente de la curva es más baja, lo que indica que la velocidad de extracción disminuye de forma importante. Las curvas de extracción no llegan a alcanzar la situación de pendiente igual a cero, es decir, de velocidad de extracción nula, por lo que si se prolongara la duración de las extracciones se obtendrían mayores rendimientos.

No se observan diferencias significativas en la cantidad de AR totales en los extractos obtenidos con distintos tiempos de maceración (ver Tabla 10, experiencias E5-E8).

4.2.2. Influencia del tamaño de partícula (tp)

Las curvas de extracción obtenidas para el salvado de distintos tamaños se presentan en la Figura 3. La cantidad total de extracto obtenida en cada caso, junto con el contenido medio en AR de los extractos, se presentan en la Tabla 10.

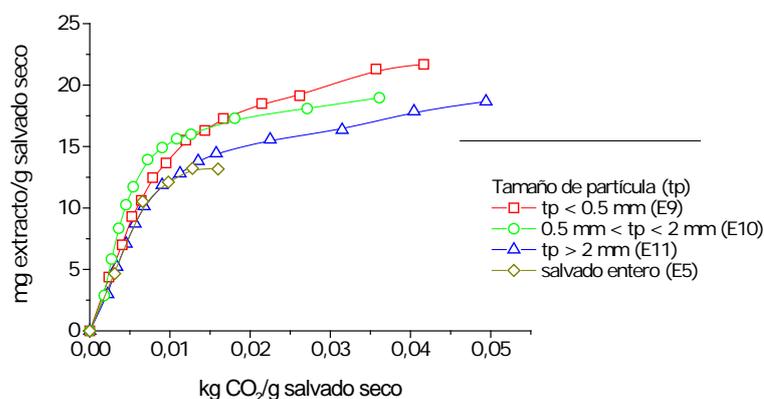


Figura 3. Influencia del tamaño de partícula en el rendimiento de la EFSC de salvado de trigo. (Curvas de extracción obtenidas a 400 bar, 40 °C, $t_m = 0$ y con salvado tamizado para obtener diferentes tamaños de partícula)

Las curvas de extracción indican que la extracción es más lenta cuando el tamaño de partícula es mayor, si bien esto se observa fundamentalmente al final de la extracción, no tanto en las etapas iniciales donde las velocidades de extracción son muy similares.

Una explicación a este comportamiento puede ser que hay algunos AR extracelulares, y por tanto más accesibles al disolvente, mientras que el resto de los AR podrían ser intracelulares y por tanto menos accesibles al disolvente. En este caso, es la resistencia a la transferencia de materia interna la que controla el proceso de extracción. Esta resistencia hace que la velocidad de extracción sea más lenta cuando el tamaño de partícula es mayor, pero dado que sigue habiendo lípidos en el salvado, la extracción continúa.

El análisis de AR totales indica que el contenido en AR es ligeramente inferior en el caso de las partículas más pequeñas de salvado aunque la cantidad total de extracto obtenido es ligeramente superior. Esta tendencia se confirma con los resultados obtenidos al evaluar los extractos mediante HPLC de forma semicuantitativa. Una explicación puede ser que las partículas más pequeñas contienen una mayor proporción de harina de pequeño tamaño. La harina de trigo tiene un mayor contenido en lípidos (solubles en CO₂) que el salvado, si bien presenta un menor contenido en AR [26]. En la Tabla 10 se presenta el contenido medio de AR de las experiencias evaluadas en este apartado (E9-E11).

Con el fin de aislar la influencia del tamaño de partícula de la influencia de la composición del salvado, en el rendimiento de la extracción, se ha obtenido la curva de extracción de la fracción de salvado de tamaño $tp > 2$ mm utilizada en la experiencia de extracción E11 (que no es probable que contenga partículas de harina) triturada hasta un tamaño $tp < 0,5$ mm.

La curva de extracción obtenida en este caso, se ha representado junto con la curva obtenida en la extracción E11 en la Figura 4. Se observa en este caso una mayor diferencia en las curvas de extracción lo que indica que una reducción del tamaño de partícula aumenta la velocidad de extracción. Esto puede ser debido a dos causas. Por una parte, una reducción de tamaño hace que el soluto esté más accesible al disolvente y por otra, el lecho se puede fluidizar con mayor facilidad.

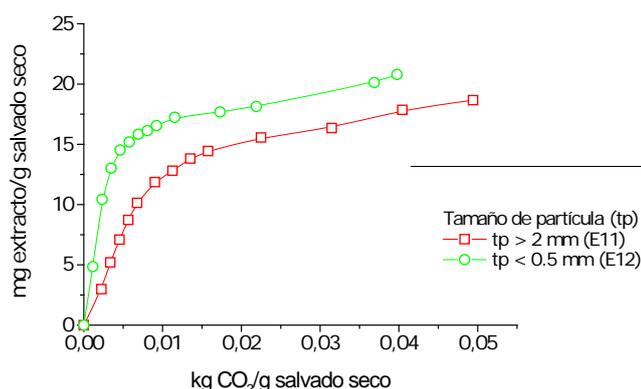


Figura 4. Curvas de extracción obtenidas en la EFSC de la fracción gruesa del salvado de trigo suministrado por HASENOSA y de dicha fracción triturada a un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm.

4.2.3. Influencia de la temperatura de extracción (T)

Las curvas de extracción obtenidas en las experiencias dirigidas al estudio de la influencia de la temperatura (Figura 5) muestran que la velocidad de extracción aumenta con la temperatura. La cantidad de extracto final obtenida es diferente en cada caso y se observa que también lo sería si se hubieran utilizado los mismos kg de dióxido de carbono por unidad de masa de salvado. Al igual que se observó en la Figura 2, las curvas de extracción de la Figura 5 muestran que, aunque la velocidad de extracción disminuye significativamente a lo largo del tiempo, no se llega a anular, por lo que si se prolongara la duración de las extracciones se obtendrían mayores rendimientos.

En la Tabla 10 se observa que la cantidad de AR obtenida por masa de salvado seco y la actividad antioxidante también presentan la tendencia general de aumento al aumentar la temperatura (E7, E13-E16). Esto parece indicar, que en este tipo de extractos, la temperatura no afecta a su actividad, o bien que el aumento del rendimiento en la extracción, compensa la posible pérdida de actividad antioxidante que las temperaturas más elevadas pudieran ocasionar.

Debido a la pequeña cantidad de extracto con la que se trabaja en la PL, la influencia de la temperatura se confirma en la PP (E17-E19, ver apartado 5.3.3).

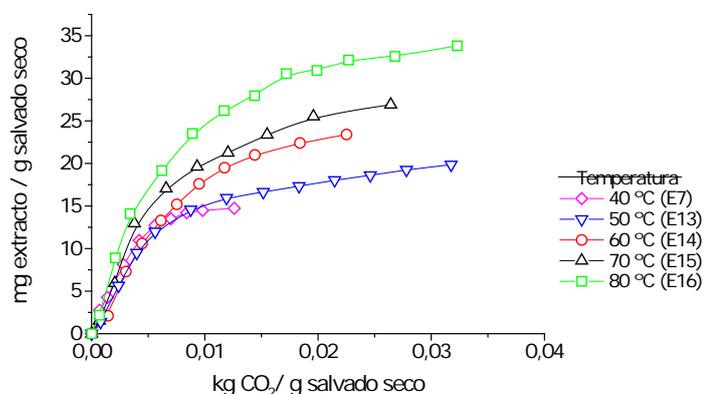


Figura 5. Influencia de la temperatura en el rendimiento de la EFSC de salvado de trigo. Curvas de extracción obtenidas a 400 bar y diferentes temperaturas de extracción.

4.3. Rendimientos de la extracción con fluidos supercríticos y caracterización de los extractos. Estudios realizados en planta piloto de EFSC.

4.3.1. Influencia de la planta utilizada en la extracción

Se ha realizado una experiencia (E23) en la planta piloto de EFSC (PP), en condiciones semejantes a la experiencia E14 realizada en la planta de laboratorio (PL) con el fin de comparar la diferencia entre ambas plantas. La diferencia entre ambas plantas es fundamentalmente de tamaño y capacidad.

Se han buscado las mismas condiciones de trabajo en ambas plantas (ver Tabla 11) en lo que se refiere a presión, temperatura, velocidad de paso de dióxido de carbono, tiempo de maceración y cantidad total de dióxido de carbono utilizado por unidad de masa de salvado. De este modo, se han utilizado caudales diferentes (0,145 kg/h en la planta PL y 7,65 kg/h en la planta PP) y tiempos totales de extracción diferentes (122 min en la planta PL y 60 min en la planta PP).

Tabla 11. Características de experiencias semejantes en las dos plantas de EFSC utilizadas

	Parámetro	Planta de laboratorio (E14)	Planta piloto (E23)
Parámetros del extractor y condiciones de extracción	Altura del extractor (cm)	26	25,5
	Diámetro interno extractor (cm)	1,4	10
	Volumen extractor	40 mL	2 L
	Caudal CO ₂ (kg/h)	0,145	7,65
	Velocidad CO ₂ (kg/h cm ²)	0,093	0,093
	kg CO ₂ /(h × g salvado)	0,020	0,038
	Presión extracción (bar)	400	400
	Temperatura extracción (°C)	60	60
	Tiempo de maceración	60	60
	Tiempo extracción (min)	210	60
	Masa de salvado (g)	7,13	200
Parámetros del extracto obtenido	g extracto/kg salvado seco	23,4	41,7
	g AR/kg salvado seco (colorimetría)	0,6 ± 0,1	1,00 ± 0,03
	g AR/kg salvado seco (HPLC)	1,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2
	mol trolox/kg salvado seco	0,29 ± 0,01	0,58 ± 0,02
	mol Fe (II)/kg salvado seco	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,1

Los resultados, indican que en la planta PP se recoge junto con el extracto parte del agua del salvado. Esto puede ser debido a que en la planta PL el agua es arrastrada por el dióxido de carbono cuando se despresuriza para lanzarlo a la atmósfera, mientras que en la planta PP el dióxido de carbono se recircula y el agua precipita en el separador acumulándose hasta el final.

Dado que el extracto obtenido en la planta piloto contiene elevada cantidad de agua, se realiza una estimación de la misma midiendo la humedad del salvado antes y después de la extracción con el objeto de determinar la cantidad de agua que ha perdido y así poder expresar los resultados en referencia al extracto seco.

Si se compara la cantidad de extracto seco por cada gramo de salvado (ver Tabla 10, experiencias E14 y E23) se observa que bajo condiciones equivalentes de extracción se obtienen mayores rendimientos en la PP, lo cual se observa también en el contenido en AR y su actividad antioxidante. Esto puede deberse fundamentalmente a la diferencia de volumen de los extractores con respecto al volumen de salvado que se sitúa en ellos. En el caso de la PL, el salvado ocupa todo el espacio mientras que en la PP no es así, lo que favorece la posible formación de un lecho fluidizado que aumenta el contacto entre el salvado y el CO₂ aumentando los rendimientos de la extracción.

4.3.2. Influencia del tiempo de extracción (te)

Las curvas de extracción obtenidas en las experiencias realizadas en la planta PL mostraron que la velocidad de extracción disminuía a lo largo del tiempo pero no llegaba a anularse. En la planta PP se ha estudiado la influencia del tiempo de extracción (E21, E23-E24). Los resultados se recogen en la Tabla 10 y se han representado en la Figura 6 donde se observa que a medida que aumenta el tiempo, aumenta el rendimiento de la extracción, el contenido en AR del extracto y su capacidad antioxidante.

El estudio no se ha ampliado a tiempos de extracción más prolongados debido a que con un tiempo total de extracción de 180 minutos se alcanzan rendimientos similares a los obtenidos mediante extracción con disolventes convencionales.

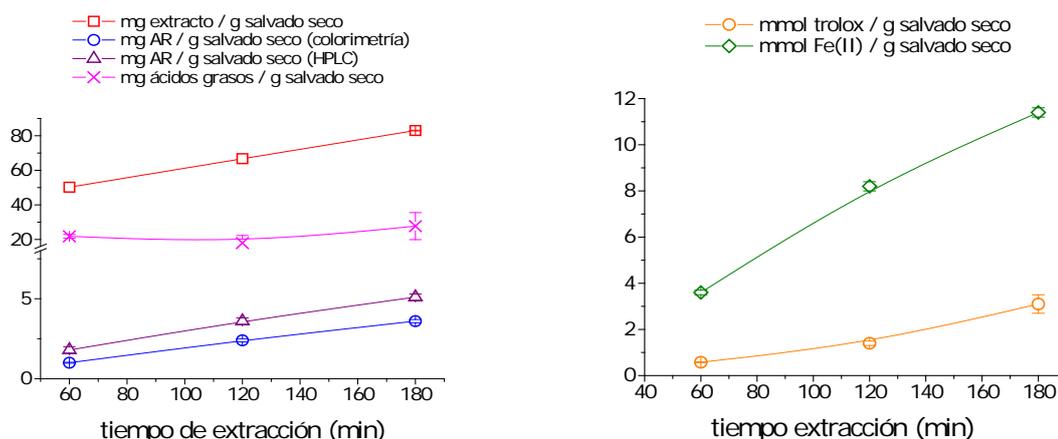


Figura 6. Influencia del tiempo de extracción en el rendimiento de la EFSC de salvado de trigo. Extracciones realizadas en la planta PP a $p = 400$ bar, $T = 60$ °C, con un caudal de $6,9 \pm 0,8$ kg CO₂/kg salvado seco y diferentes tiempos de extracción. (E21, E23 y E24)

La experiencia E23, con un tiempo de extracción de 60 minutos, se realizó con un tiempo adicional de maceración de 60 minutos, sin embargo, como se describió en el apartado 3.2.1, el tiempo de maceración solo marca diferencias en la velocidad de extracción al comienzo de la misma, cuando la extracción avanza, las diferencias de velocidad se reducen.

4.3.3. Influencia de la temperatura de extracción (T)

Con el fin de evaluar la influencia de la temperatura y confirmar las tendencias obtenidas en la experimentación en la planta de laboratorio (ver apartado 4.2.3), se han realizado experiencias en la PP (E17-E19). Los resultados se han recogido en la Tabla 10 y Figura 7.

Se observa de nuevo un mayor rendimiento al aumentar la temperatura así como un mayor contenido en AR y una mayor capacidad antioxidante.

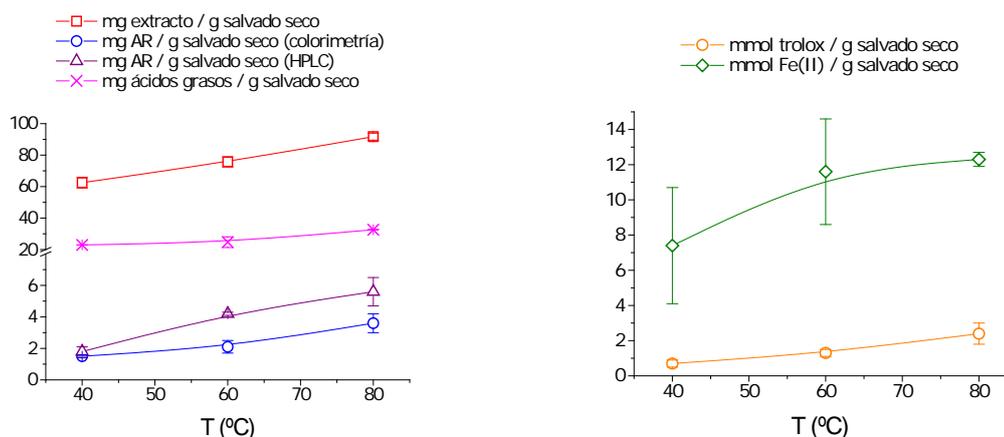


Figura 7. Influencia de la temperatura en el rendimiento de la EFSC de salvado de trigo. Experiencias realizadas en la planta PP a $p = 600$ bar, $t_e = 180$ min, con un caudal de $5,3 \pm 0,3$ kg CO₂/kg salvado seco y a diferentes temperaturas de extracción. (E17 – E19)

4.3.4. Influencia de la presión de extracción (p)

Los resultados correspondientes a las experiencias diseñadas para la evaluación de la influencia de la presión (Tabla 10, Figura 8) muestran que aunque la cantidad de extracto total obtenida no varía apreciablemente, la cantidad de AR parece encontrar un máximo entre 400 y 500 bar.

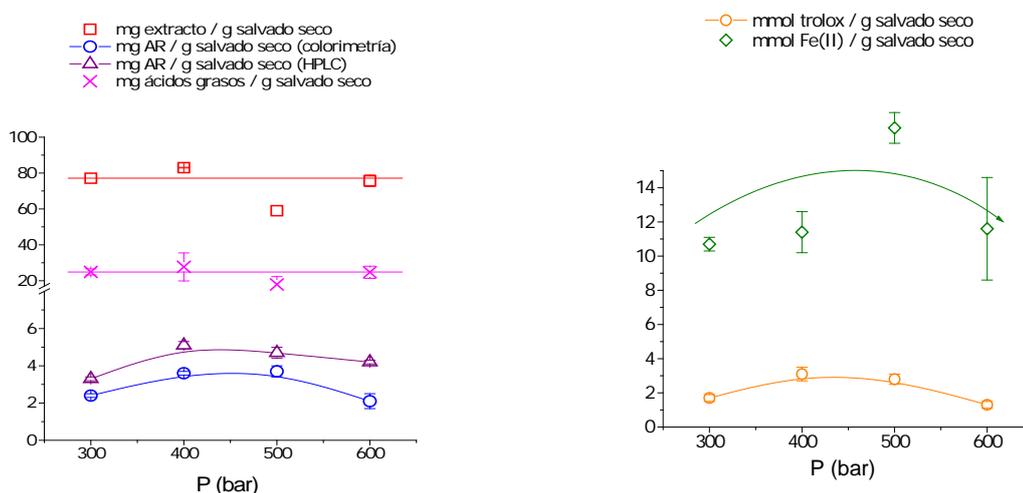


Figura 8. Influencia de la presión en el rendimiento de la EFSC de salvado de trigo. Experiencias realizadas en la planta PP: E18 (600 bar, 60 °C, 5 kg CO₂/h, 180 min); E20 (300 bar, 60°C, 5,2 kg CO₂, 180 min); E21 (400 bar, 60°C, 6,1 kg CO₂, 180 min); E22 (500 bar, 60 °C, 3,5 kg CO₂/h, 140 min)

Esta tendencia es común en EFSC ya que, aunque es cierto que un aumento de presión conlleva generalmente un aumento de la solubilidad de los solutos de interés en el FSC utilizado como disolvente, también es cierto que provoca un aumento de la viscosidad del disolvente y una disminución de su difusividad por lo que, la transferencia de materia puede

hacerse lenta y contrarrestar el efecto del aumento de solubilidad en el aumento del rendimiento de la extracción dando lugar a una reducción de los rendimientos.

En todo caso, las diferencias no son demasiado importantes por lo que la elevada inversión en equipamiento requerida para trabajar a presiones superiores a 500 bar, puede hacer más rentable la operación ente 300 y 400 bar.

4.4. Comparación entre extracción con disolventes orgánicos y EFSC

Si se comparan los resultados obtenidos mediante extracción con disolventes convencionales (ver Tabla 9) y mediante EFSC con la planta PL (ver Tabla 10), se observa que, en general, se obtiene menor cantidad de AR por masa de salvado seco mediante EFSC. Lo mismo sucede con la actividad antioxidante. Sin embargo, cuando se trabaja con la planta PP, más cercana en dimensiones a una planta de producción, se pueden obtener extractos con un contenido en AR y actividad antioxidante mayor a los obtenidos mediante extracción con disolventes convencionales, dependiendo de la presión y temperatura a la que se efectúa la extracción.

4.5. Perfil de AR individuales de los extractos de salvado de trigo

En la Figura 9 se presenta el perfil de AR de los extractos obtenidos utilizando como disolventes dióxido de carbono (E5, E6, y E7), éter de petróleo (E4) y acetona (E3). Este perfil se ha obtenido calculando el porcentaje en área de cada AR respecto al total de AR de cada extracto. En el caso de la EFSC se ha realizado una media de los perfiles de los extractos obtenidos en las experiencias E5, E6 y E7.

Se observa que los perfiles de AR no presentan diferencias significativas al modificar el método o el disolvente de extracción. Solo en el AR C19 se aprecia un ligero aumento cuando el extracto se obtiene con dióxido de carbono supercrítico disminuyendo ligeramente los AR C23 y C25 respecto a las muestras extraídas por el método soxhlet.

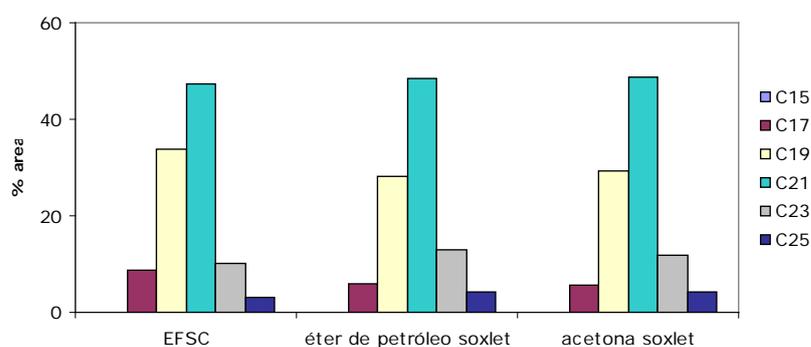


Figura 9. Perfil de AR obtenido por HPLC para diferentes métodos y disolventes de extracción

4.6. Composición de ácidos grasos (AG) de los extractos de salvado de trigo

En la Tabla 12 se presenta la composición de ácidos grasos mayoritarios de los extractos obtenidos en las experiencias realizadas en la planta piloto (E17-E24) así como un extracto obtenido con acetona en soxhlet.

De los extractos analizados, el mayor contenido en ácidos grasos lo presenta el extracto obtenido con acetona mediante soxhlet.

Si se observa el contenido en grasa de los extractos obtenidos en la planta piloto, éste es similar en todas las condiciones de presión, temperatura y tiempo de extracción analizados. En todos los casos el ácido graso presente en mayor cantidad es el ácido linoleico (C18:2 n-6) seguido del oleico (C18:1 n-9) y palmítico (C16:0). Otros ácidos grasos que aparecen en menor cantidad son el ácido α -linolénico y el ácido esteárico.

En la Tabla 12 se recoge también el perfil de ácidos grasos en porcentaje respecto del total. En ella se observa que la composición en AG es similar en todos los extractos siendo los AG poliinsaturados los mayoritarios. Estos suponen más de la mitad del contenido total de AG. La otra mitad se reparte entre los AG saturados y los AG monoinsaturados suponiendo cada grupo alrededor del 20 % del total.

4.7. Estudio de la evolución de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFSC

El estudio de la evolución de los extractos a lo largo del tiempo se ha realizado con los extractos correspondientes a la extracción a 600 bar y 40 °C (E17) y la extracción de 600 bar y 60 °C (E18). Las condiciones de almacenamiento de cada uno de los extractos han sido por un lado temperatura ambiente y exposición a la luz natural y por otro -10 °C y oscuridad. La evolución de cada uno de los extractos durante 58 días se muestra en la Figura 10.

En la Figura 10 se presenta el contenido en AR totales, medidos tanto colorimétricamente como por HPLC, para cada uno de los extractos a lo largo del tiempo, junto con su actividad antioxidante determinada por los métodos DPPH y FRAP. En todos los casos se observa una buena correlación entre el contenido en AR y la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH. Además se observa que el contenido en todos los casos se mantiene más o menos estable con el tiempo así como su capacidad antioxidante evaluada por el método DPPH. Por el contrario, la capacidad antioxidante medida por el método FRAP muestra un descenso con el tiempo siendo este descenso mayor en el caso de las muestras que se conservan a temperatura ambiente y en presencia de luz. Esto puede ser debido a que cuando el extracto se conserva en presencia de luz y a temperatura ambiente sufre una degradación de compuestos que contribuyen a la capacidad reductora pura (método FRAP) como pueden ser otros polifenoles distintos de los AR e incluso otros compuestos de naturaleza antioxidante como carotenoides. Este hecho lo corroboran los datos que indican que el contenido total de AR no disminuye y tampoco se aprecian diferencias en el perfil obtenido por HPLC. Por otro lado, no se observa influencia de la temperatura de extracción en la estabilidad de los extractos con el tiempo.

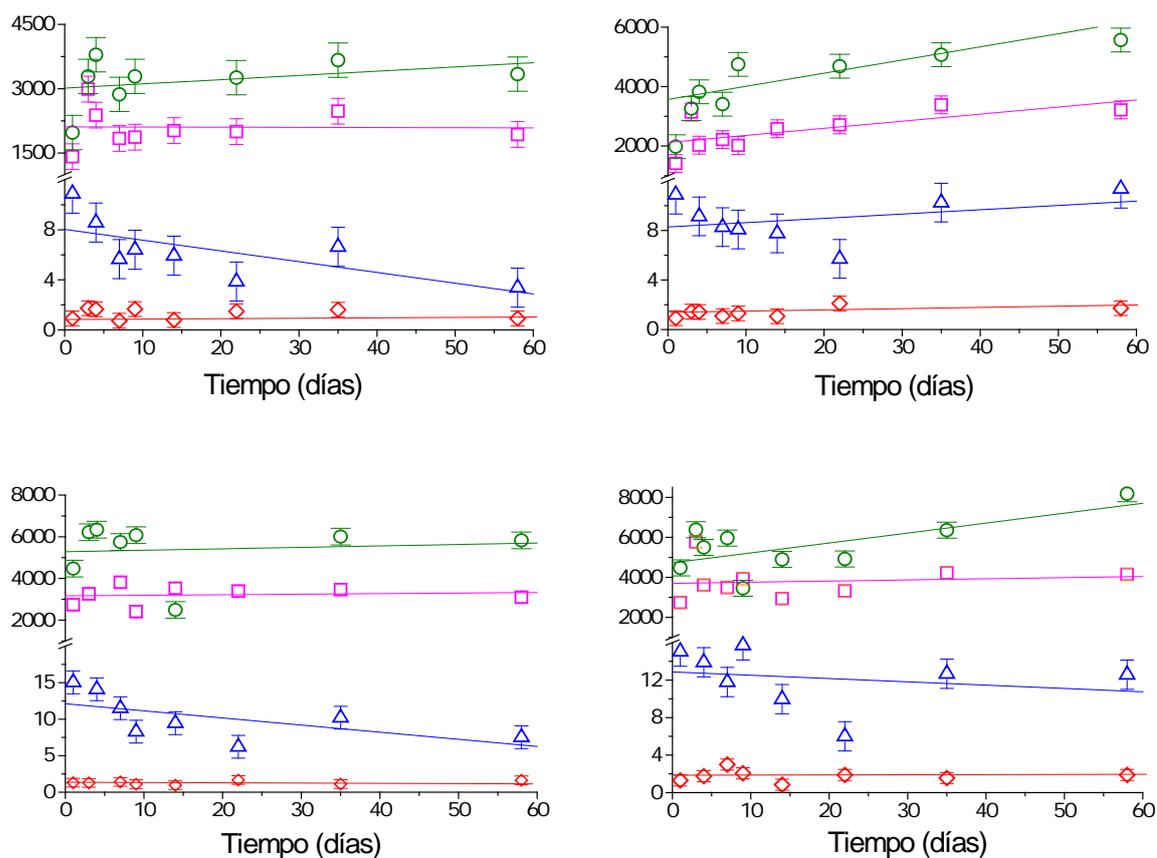


Figura 10. Caracterización de los extractos E17 y E18 a lo largo del tiempo. \circ μg AR / g salvado seco (HPLC). \square μg AR / g salvado seco (colorimetría). \triangle mmol Fe (II) / g salvado seco. \diamond mmol trolox / g salvado seco. (a) Extracto E17 conservado a T ambiente y luz. (b) E17 conservado a -10 °C y oscuridad. (c) E18 conservado a T ambiente y luz. (d) E18 conservado a -10 °C y oscuridad.

En la Figura 11 se puede observar el diferente aspecto que presentan las muestras conservadas en condiciones ambiente respecto a las muestras conservadas en frío y oscuridad.



Figura 11. Imagen de los extractos tras 37 días de conservación. 1: Extracto E17 conservado a T ambiente y luz. 2: E18 conservado a T ambiente y luz. 3: E17 conservado a -10 °C y oscuridad. 4: E18 conservado a -10 °C y oscuridad.

Tabla 12. Composición en ácidos grasos de los extractos de salvado de trigo

Ácido graso	Extracción acetona en Soxhlet (mg AG/g extracto)	EFSC 600 bar 40 °C 180 min (E17) (mg AG/g extracto)	EFSC 600 bar 60 °C 180 min (E18) (mg AG/g extracto)	EFSC 600 bar 80 °C 180 min (E19) (mg AG/g extracto)	EFSC 300 bar 60 °C 180 min (E20) (mg AG/g extracto)	EFSC 400 bar 60 °C 180 min (E21) (mg AG/g extracto)	EFSC 500 bar 60 °C 140 min (E22) (mg AG/g extracto)	EFSC 400 bar 60 °C 60 min (E23) (mg AG/g extracto)	EFSC 400 bar 60 °C 120 min (E24) (mg AG/g extracto)
ácido palmítico (C16:0)	97 ± 9	65 ± 2	58 ± 4	60 ± 3	57 ± 6	57 ± 12	57 ± 14	73 ± 4	64 ± 7
ácido esteárico (C18:0)	12 ± 4	7,6 ± 0,4	6,0 ± 0,3	5,9 ± 0,8	7 ± 2	7 ± 1	5 ± 1	8,6 ± 0,1	7 ± 1
ácido oleico (C18:1 n-9)	104 ± 5	61 ± 6	56 ± 4	63 ± 2	60 ± 10	64 ± 17	52 ± 3	74 ± 3	66 ± 9
ácido linoleico (C18:2 n-6)	298 ± 60	197 ± 21	181 ± 17	202 ± 3	172 ± 1	184 ± 56	168 ± 41	235 ± 13	215 ± 25
ácido α- linolénico (C18:3 n-3)	29 ± 6	21 ± 2	19 ± 3	20,3 ± 0,1	18 ± 2	19 ± 6	17 ± 4	25 ± 1	22 ± 2
AG saturados (SFA)	109 ± 6	75 ± 1	64 ± 4	66 ± 4	67 ± 8	63 ± 13	62 ± 15	83 ± 4	71 ± 8
AG monoinsaturados (MUFA)	106 ± 2	69 ± 5	61 ± 3	68 ± 3	66 ± 12	68 ± 20	56 ± 15	84 ± 4	71 ± 11
AG poliinsaturados (PUFA)	327 ± 66	223 ± 20	201 ± 19	222 ± 3	189 ± 2	203 ± 62	185 ± 45	267 ± 14	237 ± 28
Total AG	542 ± 7	367 ± 27	326 ± 25	356 ± 10	322 ± 22	334 ± 95	303 ± 75	434 ± 22	379 ± 47
AG saturados (SFA) (%)	21,5	20,3	19,6	18,6	20,7	19,0	20,4	19,2	18,7
AG monoinsaturados (MUFA) (%)	21,4	18,8	18,8	19,1	20,6	20,3	18,4	19,4	18,6
AG poliinsaturados (PUFA) (%)	57,1	60,9	61,6	62,3	58,7	60,7	61,2	61,4	62,7

5. Conclusiones

La extracción con CO₂ supercrítico aplicado al salvado de trigo da lugar a un extracto lipofílico con un contenido en AR y una capacidad antioxidante que varían en función de las condiciones del proceso. Operando en determinadas condiciones se han conseguido obtener rendimientos superiores en EFSC a los obtenidos mediante extracción con disolventes convencionales.

Se ha estudiado la influencia de varios parámetros en el rendimiento de la EFSC: tiempo de maceración (entre 30 y 135 minutos), diámetro de partícula, temperatura de extracción (entre 40 y 80 °C) y presión de extracción (entre 300 y 600 bar). Se ha estudiado asimismo la influencia del tipo de planta utilizado para realizar la extracción.

Se ha observado que la temperatura es uno de los parámetros que más influye en el rendimiento de la extracción, obteniéndose mayores cantidades de extracto, así como mayor cantidad de AR y mayor capacidad antioxidante cuando se trabaja a 80 °C.

Otro parámetro que influye en el proceso, aunque en menor medida, es el tiempo de maceración. Se ha observado que mantener el salvado en contacto con el CO₂ durante un tiempo, previamente a la extracción, aumenta la velocidad de la misma aunque se obtienen mayores rendimientos cuando durante este tiempo se recircula el CO₂.

Respecto a la influencia del tamaño de partícula, se ha observado que una reducción del tamaño de partícula aumenta la velocidad de extracción. Esto puede ser debido a dos causas. Por una parte, una reducción de tamaño hace que el soluto esté más accesible al disolvente y por otra, el lecho se puede fluidizar con mayor facilidad.

La influencia de algunas variables se ha estudiado en dos tipos de plantas, una planta de laboratorio (PL) y otra planta semi-piloto (PP) encontrando en todos los casos rendimientos superiores en la planta PP que en la PL. La dimensión del extractor es bastante diferente en ambas plantas y en un caso (PL) se ha trabajado con el extractor totalmente lleno, mientras que en el segundo caso (PP) quedaba volumen libre suficiente para que el lecho de salvado se pudiera fluidizar. La fluidización del lecho mejora el contacto soluto-disolvente y por tanto los rendimientos de la extracción. Este hecho puede explicar la diferencia de rendimientos en ambos casos.

La curvas de extracción determinadas con la planta PL, indican que la velocidad de extracción disminuye de forma importante una vez obtenido aproximadamente el 50 % del extracto contenido en el salvado, pero no se ha llegado a velocidad de extracción cero después de haber pasado hasta alrededor de 50 kg de CO₂ por cada kg de salvado seco en el extractor (E11 y E12).

Teniendo en cuenta, las experiencias realizadas en la planta piloto, donde la cantidad de sustrato ocupa únicamente la tercera parte del volumen del extractor, permitiendo por tanto la fluidización del lecho de salvado, se podría concluir de forma general respecto a la EFSC de AR del salvado de trigo, que podría realizarse de forma óptima utilizando SC-CO₂ puro, sin cosolventes, a una presión de 300 bar y temperatura de 80 °C utilizando un caudal de SC-CO₂ superior a 5 kg/h durante un tiempo de aproximadamente 3 h. Si el salvado se somete a maceración con SC-CO₂ durante un tiempo máximo de 60 minutos, el tiempo de extracción puede reducirse.

Además de por su contenido en AR el extracto que se obtiene se caracteriza por tener un contenido importante de ácidos grasos, principalmente poliinsaturados. El ácido linoleico es el ácido mayoritario seguido del ácido oleico y el ácido palmítico. En menor cantidad aparecen el ácido α -linolénico y el ácido esteárico.

Cuando se observa la evolución de los extractos obtenidos con SC-CO₂ a lo largo del tiempo (58 días), se observa una mayor disminución de la capacidad antioxidante cuando se

conservan a T ambiente y en presencia de luz frente a cuando se conservan a -10 °C y en oscuridad. Esta disminución se debe principalmente a la pérdida de la capacidad de transferencia de electrones (método FRAP), manteniéndose más o menos constante la capacidad "scavenger" (método DPPH) así como el contenido en AR, por lo que puede concluirse que existen otros compuestos además de los AR que contribuyen a la capacidad antioxidante y que son susceptibles de degradarse bajo condiciones de T ambiente y en presencia de luz. El estudio realizado sobre extractos obtenidos a 40 °C y 60 °C muestra que no existe influencia de la T de extracción en la evolución de los mismos con el tiempo.

6. Bibliografía

1. Aubertin-Leheudre*, M., et al., *Plasma alkylresorcinol metabolites as potential biomarkers of whole-grain wheat and rye cereal fibre intakes in women*. British Journal of Nutrition, 2010. **103**: p. 339-343.
2. Landberg, R., et al., *Dose response of whole-grain biomarkers: alkylresorcinols in human plasma and their metabolites in urine in relation to intake*. J. Clinical Nutrition, 2009. **89**: p. 290-296.
3. Andersson, A.A.M., et al., *Alkylresorcinols in Wheat Varieties in the HEALTHGRAIN Diversity Screen*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(21): p. 9722-9725.
4. Chen, Y., et al., *Alkylresorcinols as Markers of Whole Grain Wheat and Rye in Cereal Products*. J. Agric. Food Chem., 2004. **52**: p. 8242-8246.
5. Gajda, A., M. Kulawinek, and A. Kozubek, *An improved colorimetric method for the determination of alkylresorcinols in cereals and whole-grain cereal products*. Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **21**: p. 428-434.
6. Landberg, R., et al., *Comparison of supercritical carbon dioxide and ethyl acetate extraction of alkylresorcinols from wheat and rye*. Journal of Food Composition and Analysis, 2007. **20**: p. 534-538.
7. Athukorala, Y., F.S. Hosseinian, and G. Mazza, *Extraction and fractionation of alkylresorcinols from triticale bran by two-step supercritical carbon dioxide*. LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(4): p. 660-665.
8. Kulawinek, M., et al., *Alkylresorcinols in Selected Polish Rye and Wheat Cereals and Whole-Grain Cereal Products*. J. Agric. Food Chem., 2008. **56**(16): p. 7236-7242.
9. Cocero, M.J., *Procesos Industriales con Fluidos Supercríticos*. Ingeniería Química, 2006.
10. Europeas, E.C.d.I.C., *Directiva (88/344/CEE) del Consejo de 13 de junio de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y sus ingredientes*, E.C.d.I.C. Europeas, Editor. 1988.
11. Ross, A.B., et al., *Gas chromatographic analysis of alkylresorcinols in rye grains*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001. **81**: p. 1405-1411.
12. Sampietro, D.A., M.A. Vattuone, and C.A.N. Catalán, *A new colorimetric method for determination of alkylresorcinols in ground and whole-cereal grains using the diazonium salt Fast Blue RR*. Food Chemistry, 2009. **115**: p. 1170-1174.
13. Mullin, W.J., M.S. Wolynetz, and J.P. Emery, *A Comparison of Methods for the Extraction and Quantitation of Alk(en)ylresorcinols*. Journal of food composition and analysis, 1992. **5**(2): p. 16-223.

14. Ross, A.B., et al., *Alkylresorcinols in Cereals and Cereal Products*. J. Agric. Food Chem., 2003. **51**(14): p. 4111-4118.
15. Mattila, P., J.-m. Pihlava, and J. Hellström, *Contents of Phenolic Acids, Alkyl- and Alkenylresorcinols, and Avenanthramides...* J. Agric. Food Chem., 2005. **53**(21): p. 8290-8295.
16. Francisco, J.d.C., et al., *Application of supercritical carbon dioxide for the extraction of alkylresorcinols from rye bran*. J. of Supercritical Fluids, 2005. **35**: p. 220-226.
17. Dey, E.S. and K. Mikhailopulo, *A food grade approach for the isolation of major alkylresorcinols (ARs) from rye bran applying tailored supercritical carbon dioxide (scCO₂) extraction combined with HPLC*. J. of Supercritical Fluids, 2009. **51**: p. 167-173.
18. Murga, R., et al., *Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide*. The Journal of Supercritical Fluids, 2002. **23**(2): p. 113-121.
19. Ganado, O., E.M. Vaquero, and e. al., *Design of a SCFE pilot plant to be operated up to 70 MPa and 475 K and some applications, in 2nd International Meeting on High Pressure Chemical Engineering*. 2001: Hamburg (Germany).
20. Knödler, M., et al., *Profiling of Alk(en)ylresorcinols in cereals by HPLC-DAD-APCl-MS*. Anal Bioanal Chem., 2008. **391**: p. 221-228.
21. AOAC, *Fatty acids in encapsulated fish oils and fish oil methyl and ethyl esters. Gas chromatographic method*. AOAC, 1995.
22. Moore, J., et al., *Effects of Genotype and Environment on the Antioxidant Properties of Hard Winter Wheat Bran*. J. Agric. Food Chem., 2006. **54**: p. 5313-5322.
23. Zhou, K., J.J. Laux, and L.L. Yu, *Comparison of Swiss Red Wheat Grain and Fractions for Their Antioxidant Properties*. J. Agric. Food Chem. , 2004. **52**: p. 1118-1123.
24. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1996. **239**: p. 70-76.
25. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Food science and Technology, 1995. **28**(1): p. 25-30.
26. Kent, N.L., *Tecnología de los cereales*. 1987, Zaragoza: Acribia.