

Obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados por el método de los compuestos de inclusión de urea

Por A. Robles Medina, A. Giménez Giménez, E. Molina Grima y J.L. García Sánchez

Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Experimentales.

Universidad de Almería, 04071 Almería.

RESUMEN

Obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados por el método de los compuestos de inclusión de urea.

En este trabajo se estudia la influencia de la relación urea/ácidos grasos y de la temperatura de cristalización (con metanol y etanol como disolventes de la urea) sobre las concentraciones y rendimientos en los ácidos grasos estearidónico (SA, 18:4n-3), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) y docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3), utilizando ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao. Las máximas concentraciones y rendimientos en SA (8,5% y 71,6%, respectivamente) y en DHA (59,8% y 100%) se han obtenido con metanol, una relación urea/ácidos grasos 4:1 p/p y 4°C; sin embargo, si se desean obtener altas concentraciones y rendimientos en EPA es preferible cristalizar a 28°C (rendimiento 76%, concentración 29%). A temperaturas por debajo de -12°C también los PUFAs forman compuestos de inclusión en un porcentaje elevado, sobre todo el EPA. Mediante un análisis de la varianza se ha puesto de manifiesto que la variable con mayor influencia sobre las concentraciones es la relación urea/ácidos grasos, observándose que a medida que aumenta dicha relación la influencia del disolvente es cada vez mayor y más favorable para la utilización de metanol.

PALABRAS-CLAVE: Aceite de hígado de bacalao — Ácido grasso poliinsaturado (obtención) — Método de los compuestos de inclusión de urea.

SUMMARY

Obtaining of polyunsaturated fatty acids concentrates by the urea complexes method.

A concentration process for polyunsaturated fatty acids (PUFAs n-3) stearidonic (18:4 n-3), eicosapentaenoic (20:5 n-3) and docosahexaenoic (22:6 n-3) from cod liver oil using urea method has been thoroughly studied. The influence of urea/fatty acid ratio and crystallization temperature have been studied on both fatty acids recovery yield and fatty acid concentration. Methanol and ethanol have been used as urea solvent. The use of methanol and an urea/fatty acid ratio of 4:1, and 4°C were found to be the best conditions for SA (concentration 8,5%, yield 71,6) and DHA (59,8% and 100%, respectively). However, 28°C was found to be the best temperature for EPA (28,7% and 75,6%, respectively). At temperatures below -12°C, PUFAs also developed adduct compounds, mainly adducts derived from EPA. A variance analysis showed the urea/fatty acid ratio as the main factor affecting fatty acid concentration. At the same time, high urea/fatty acid ratios resulted in increased influence of the solvent used, being more favourable for methanol.

KEY-WORDS: Cod liver oil — Polyunsaturated fatty acid (obtaining) — Urea complexes method.

1. INTRODUCCIÓN.

El grupo de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFAs n-3) está compuesto por los ácidos α -linolénico (LA, 18:3 n-3), estearidónico (SA, 18:4 n-3), eicosapenta-

enóico (EPA, 20:5 n-3) y docosahexaenóico (DHA, 22:6 n-3). De ellos sólo el LA se encuentra en las plantas superiores, siendo los demás fundamentalmente de origen marino (1) y, por tanto, son los aceites de pescado la fuente comercial tradicional.

Estos productos han sido reconocidos últimamente como sustancias esenciales en la alimentación humana y tienen una importancia cada vez más creciente en la prevención y tratamiento de determinadas patologías. Su efecto positivo en la salud humana ha sido estudiado en varias áreas: prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares (2), inflamaciones (3) y determinados tipos de cáncer (4). El DHA es el ácido grasso estructural predominante en la materia gris del cerebro y tejidos de la retina y se ha puesto de manifiesto que es un componente esencial en la leche materna que contribuye al normal desarrollo del cerebro y del sistema nervioso (5). Estos estudios se llevaron a cabo inicialmente con dietas ricas en PUFAs n-3, pasándose a finales de los años 70 y a principios de los 80 a ensayos clínicos con concentrados de SA, EPA y DHA (6)(7).

El aislamiento de estos PUFAs n-3 a partir de aceites de pescado ha de llevarse a cabo mediante un proceso de al menos tres etapas: saponificación de los aceites, concentración de los PUFAs mediante un método de fraccionamiento adecuado y separación de fracciones ricas en los PUFAs de interés. Posteriormente aún puede realizarse una purificación final, por ejemplo para la obtención de patrones.

De los diferentes métodos de fraccionamiento de ácidos grasos y concentración de PUFAs n-3 (8), el método de los compuestos de inclusión de urea parece el más apropiado ya que permite manejar grandes cantidades de materia prima con un equipo experimental sencillo y en unas condiciones de operación muy moderadas que no afectan a la estructura de los PUFAs (9). Esta técnica fue descubierta por Bengen en 1940 (10) estableciendo su principal aplicación, la separación de compuestos de cadena recta de compuestos ramificados o cíclicos. La urea, en presencia de estas sustancias, cristaliza con una estructura hexagonal formando canales donde quedan ocluidas fundamentalmente moléculas de estructura lineal (10) (11), por ejemplo ácidos grasos saturados y monoinsaturados, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados, quedan en disolución

debido a que la presencia de dobles enlaces introduce irregularidades estéricas en su estructura y como consecuencia desviaciones de las distancias óptimas intermoleculares (12), disminuyendo la fuerza de atracción neta que estabiliza los compuestos de inclusión de urea. La tendencia a formar compuestos de inclusión de urea es menor cuanto menor es la longitud de la cadena y mayor el número de insaturaciones (9).

La gran mayoría de los estudios realizados sobre esta técnica o bien la utilizan como herramienta, para lo cual operan en unas determinadas condiciones previamente conocidas, o bien se limitan a hacer una investigación parcial sobre la influencia de la temperatura de cristalización y/o de la relación urea/ácidos grasos. En definitiva se hecha de menos un trabajo sistemático que estudie la influencia de estas variables, en un intervalo suficientemente amplio, sobre el grado de concentración en PUFAs alcanzado, así como sobre el rendimiento en su recuperación en el concentrado final, puesto que en estos trabajos todo el énfasis se pone en la concentración de estos PUFAs.

En este trabajo se utilizan ácidos grasos de aceite de hígado de bacalao con el objetivo de obtener las mejores condiciones en cuanto a la relación urea/ácidos grasos y la temperatura de cristalización, estudiando la influencia de estas variables sobre las concentraciones de PUFAs n-3 y sobre los rendimientos en la recuperación de estos ácidos en los concentrados, empleando como disolventes metanol y etanol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

La saponificación del aceite de hígado de bacalao (Acofarma, Barcelona) se ha llevado a cabo en un reactor encamisado de 2,5 l de capacidad, agitando a 60°C durante 30 min, 350 g de aceite con 700 ml de una disolución hidroalcohólica de NaOH (120 g de NaOH y 1,25 g de sal sódica de EDTA disueltos en 400 ml de agua y 400 ml de etanol del 96% v/v) en atmósfera inerte de nitrógeno. A continuación se añaden 140 ml de agua y 275 ml de HCl del 35%. Los ácidos grasos se extraen añadiendo 875 ml de hexano, se separan ambas fases y la capa inferior hidroalcohólica vuelve a extraerse con 200 ml de hexano. Ambos extractos se unen, se lavan con agua destilada hasta neutralidad y se secan con sulfato sódico anhidro. El hexano se elimina por evaporación a vacío en un rotavapor.

La formación de los compuestos de inclusión de urea se ha realizado en un reactor encamisado preparando en primer lugar una disolución de urea en metanol o etanol del 96% v/v de concentración 375 g/l ó 188 g/l, respectivamente, a la cual se le añaden 25 g de ácidos grasos. Se han ensayado las relaciones urea/ácidos grasos (U/A) 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1 p/p. La mezcla se agita hasta obtener una disolución clara y homogénea y a continuación la disolución se vierte a un cristizador, se desplaza el aire mediante nitrógeno y se deja cristalizar durante 12 h a temperatura constante. Las temperaturas de cristalización ensayadas han sido: -36°C, -28°C, -20°C, -12°C, -4°C, 4°C, 12°C, 20°C, 28°C y 36°C. Finalizada la cristalización los cristales se separan del líquido por filtración a vacío y se lavan

con una disolución saturada de urea en metanol o etanol a la temperatura de cristalización.

El filtrado (concentrado de PUFAs) se concentra retirando la mayor parte del disolvente por evaporación a vacío, se añaden 125 ml de HCl 0,1 N y 125 ml de hexano para la extracción de los PUFAs; se agita suavemente y se deja decantar obteniéndose dos capas, la inferior hidroalcohólica se vuelve a extraer con 50 ml de hexano, uniéndose este extracto a la capa superior hexánica anterior. Este concentrado de PUFAs se lava con agua hasta neutralidad. El extracto se seca sobre sulfato sódico anhidro durante varias horas a 4-8°C, se filtra a presión reducida y se evapora el disolvente en un rotavapor hasta pesada constante.

Los PUFAs n-3 se conservan añadiéndoles 1 mg de galato de octilo (antioxidante) por cada 10 g de concentrado, a -20°C, en frasco de topacio, disueltos en hexano, bajo atmósfera inerte de nitrógeno.

Los ácidos grasos se determinaron por cromatografía de gases siguiendo el método de transesterificación directa descrito por Lepage y Roy (1984) (13) que se ha adaptado en nuestro laboratorio. El método de determinación y cuantificación de ácidos grasos se ha descrito en trabajos previos (14). Determinadas las concentraciones se calculan los rendimientos en la recuperación de ácidos grasos totales (R_U) e individuales (R_A) tras la concentración por el método de la urea en la forma:

$$R_U = \frac{U}{E} 100 \quad [1]$$

$$R_A = \frac{x_U U}{x_E E} 100 = \frac{x_U}{x_E} R_U = f \cdot R_U \quad [2]$$

donde U y E son, respectivamente, las cantidades de ácidos grasos totales en el concentrado de PUFAs y en la mezcla de ácidos grasos que procede de la saponificación del aceite, determinados ambos por gravimetría, x_U y x_E son, respectivamente, las fracciones másicas (concentraciones) del ácido graso considerado (SA, EPA o DHA) en el concentrado de urea y en la mezcla inicial de ácidos grasos, ambos determinados por cromatografía de gases, y f es el factor de concentración (relación entre las concentraciones de ácidos grasos en el concentrado de urea y en la mezcla inicial).

Todos los experimentos de concentración se han repetido al menos dos veces, haciéndose una o varias determinaciones más cuando las diferencias entre las concentraciones y/o rendimientos obtenidas han sido superiores al 5%.

Las concentraciones de SA, EPA, DHA y PUFAs n-3 (suma de las concentraciones de los tres ácidos anteriores) se han sometido a un análisis multifactorial de la varianza que incluye las interacciones de segundo orden entre los factores considerados (relación U/A, temperatura y tipo de disolvente). Así mismo, se han ajustado estas concentraciones a un modelo polinomial de segundo orden. Las tablas y figuras se han obtenido con el paquete estadístico Statgraphics, versión 5 (15). En este análisis se han utilizado los resultados obtenidos entre -12°C y 36°C a las cuatro relaciones urea/ácidos grasos.

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

En la Figura 1 se han representado las concentraciones y los rendimientos en PUFAs obtenidos utilizando como disolvente metanol. De forma similar en la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos con etanol. La dis-

cusión de los resultados se va a hacer comentando de manera independiente la influencia de las tres variables estudiadas (relación U/A, temperatura y tipo de disolvente), si bien, como se observará en seguida, se dan interacciones importantes entre la influencia de estas variables.

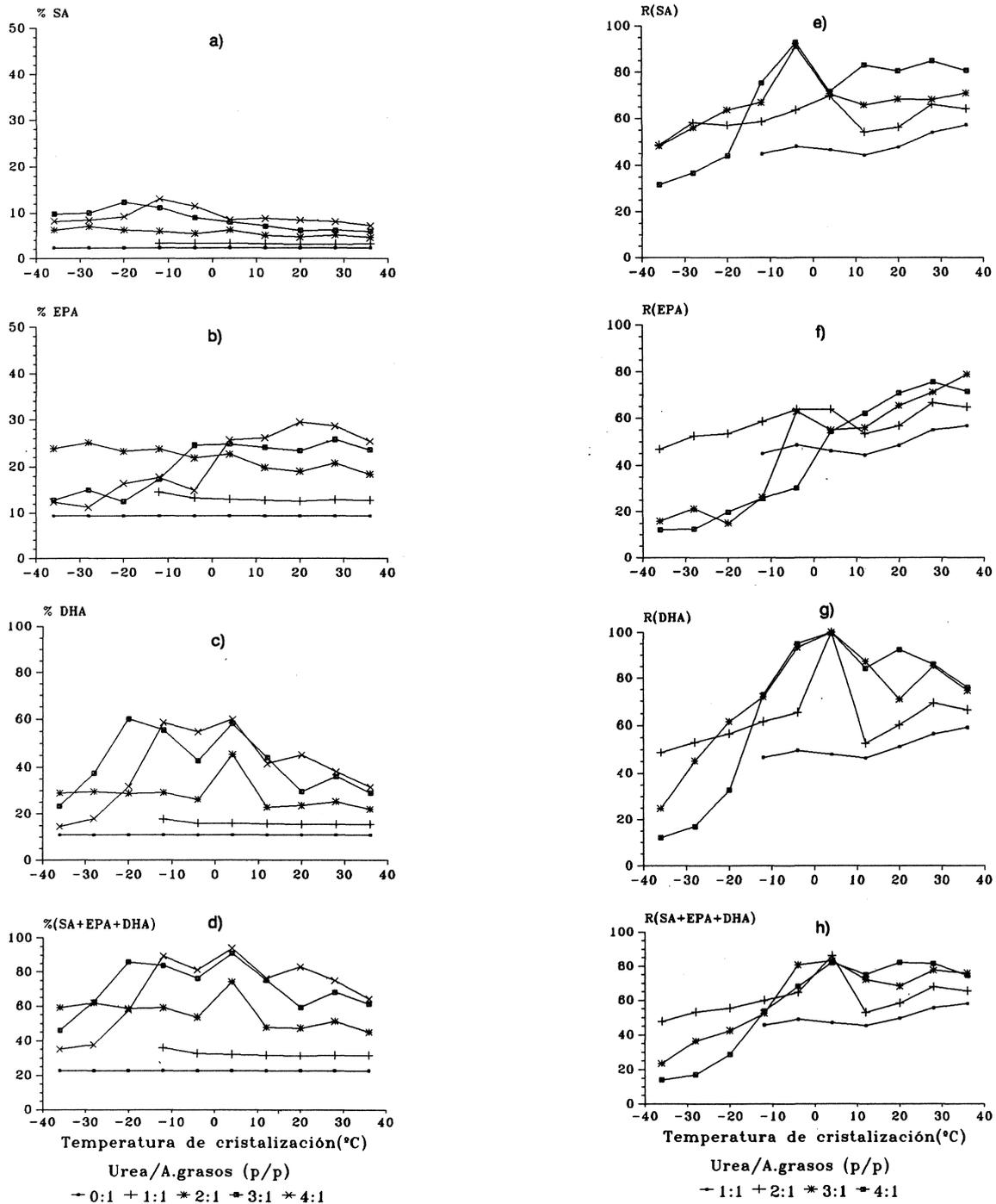


Figura 1

Influencia de la temperatura y de la relación urea/ácidos grasos sobre la concentración (x_A en % en peso sobre ácidos grasos totales) y sobre los rendimientos en la recuperación (R_A) de los PUFAs n-3. a) concentración de SA, b) concentración de EPA, c) concentración de DHA, d) concentración de PUFAs n-3 (SA+EPA+DHA), e) rendimiento en SA, f) rendimiento en EPA, g) rendimiento en DHA y h) rendimiento en PUFAs n-3 (SA+ EPA+DHA). Disolvente metanol.

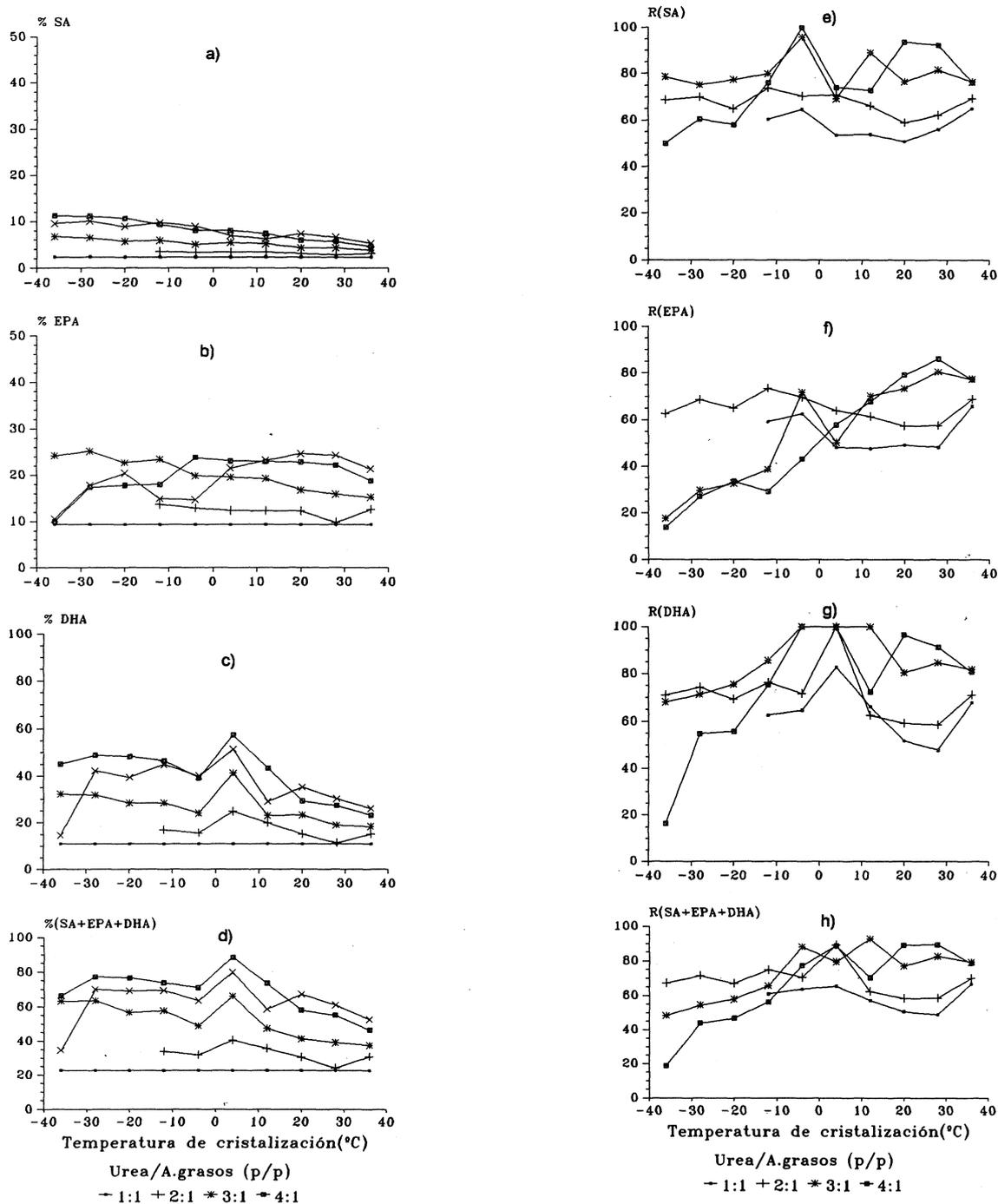


Figura 2

Influencia de la temperatura y de la relación urea/ácidos grasos sobre la concentración (x, en % en peso sobre ácidos grasos totales) y sobre los rendimientos en la recuperación (R) de los PUFAs n-3. a) concentración de SA, b) concentración de EPA, c) concentración de DHA, d) concentración de PUFAs n-3 (SA+EPA+DHA), e) rendimiento en SA, f) rendimiento en EPA, g) rendimiento en DHA y h) rendimiento en PUFAs n-3 (SA+ EPA+DHA). Disolvente etanol.

a) Influencia de la relación urea/ácidos grasos (U/A)

En la Figura 1 se observa que la forma en que varían las composiciones y los rendimientos con la relación U/A es diferente en el rango de bajas y altas temperaturas. Así, en la Figura 1d se observa que a temperaturas mayores o

iguales a -12°C, la concentración en los tres PUFAs de interés aumenta con la relación U/A, mientras que por debajo de esta temperatura ocurre lo contrario. También se observa que por encima de -12°C la relación urea/ácidos grasos óptima es 4:1.

Aunque el rendimiento en ácidos grasos totales en el concentrado (R_U), lógicamente, disminuye al aumentar U/A; en las Figuras 1e a 1h se observa que, en general, a altas temperaturas ($T \geq -12^\circ\text{C}$), a medida que aumenta U/A aumenta el rendimiento en PUFAs (R_A), este hecho se debe al gran incremento del factor de concentración (f) cuando aumenta U/A (ecuación [2]). A bajas temperaturas ocurre lo contrario, es decir, disminuye el rendimiento en PUFAs al aumentar U/A, lo que obviamente indica que en estas condiciones también los PUFAs forman compuestos de inclusión. Por tanto, a altas temperaturas interesa operar a una relación U/A de 4:1, ya que tanto el contenido de los concentrados en cada uno de los PUFAs como el rendimiento en su recuperación son los más elevados.

Por otra parte, la relación U/A puede utilizarse para segregar determinados tipos y/o pares de ácidos grasos, tal

como se observa en la Tabla I. En ella se aprecia que con una relación 1:1 la concentración de ácidos grasos saturados disminuye desde el 17,6% al 6,5%, mientras que los monoinsaturados prácticamente mantienen su concentración (del 48,5% se pasa al 45,6%); a una relación 2:1 se eliminan algo más los monoinsaturados (23,6%) y para 4:1 la eliminación de ambos es prácticamente total (se pasa del 66,1% al 4,6%). Estos mismos hechos se comprueban con mayor facilidad comparando los cocientes S_1/S_2 y $(S_1+S_2)/S_3$ (Tabla I). También se observa que un aumento de U/A aumenta ligeramente la selectividad de la separación entre el EPA y el DHA, ya que el cociente EPA/DHA disminuye al aumentar esta relación, lo que parece indicar que el EPA tiene mayor tendencia a formar compuestos de inclusión que el DHA.

Tabla I
Influencia de la relación U/A en la composición en ácidos grasos de los concentrados y sobre las relaciones EPA/DHA, $(S_1+S_2)/S_3$ y S_1/S_2 . Temperatura 20°C . Disolvente: metanol

A.graso	Aceite	Relación U/A			
		1:1	2:1	3:1	4:1
14:0	4,20	2,89	1,00	0,56	0,32
16:0	10,63	2,56	0,58	0,29	0,24
16:1n7	7,79	9,16	9,12	6,12	0,76
18:0	2,57	0,81	1,17	1,43	2,07
18:1n9	16,95	17,86	8,12	2,10	0,48
18:1n7	4,64	5,14	3,41	0,99	0,00
18:2n6	1,47	1,96	2,60	2,50	0,74
18:3n3	0,78	1,05	1,46	1,52	0,78
20:1n9	10,76	9,40	2,01	1,50	0,62
18:4n3 (SA)	2,36	3,12	4,75	6,21	8,45
20:4n6	0,52	0,72	1,06	1,24	1,22
22:1n11	8,25	3,99	0,91	0,00	0,00
20:5n3 (EPA)	9,36	12,53	18,99	23,40	29,45
22:4n6	0,51	0,67	1,00	1,30	1,78
22:5n3	1,17	1,55	2,23	2,49	1,78
22:6n3 (DHA)	10,98	15,45	23,60	29,70	45,14
S1=Σ Saturados	17,64	6,50	3,05	2,55	2,71
S2=Σ Monoinsat.	48,50	45,61	23,57	10,72	1,87
S1+S2	66,14	52,12	26,63	13,27	4,58
S3=Σ(SA+EPA+DHA)	22,70	31,10	47,34	59,31	83,04
EPA/DHA	0,85	0,81	0,80	0,78	0,65
$(S_1+S_2)/S_3$	2,91	1,67	0,56	0,22	0,05
S_1/S_2	0,36	0,14	0,14	0,23	1,45

b) Influencia de la temperatura de cristalización

El rendimiento en la recuperación de ácidos grasos (R_U) aumenta con la temperatura de cristalización (Tabla II), lo que es lógico ya que la disminución de la temperatura aumenta la tendencia a formar compuestos de inclusión (10).

En las Figuras 1a a 1d se observa que el contenido en PUFAs de los concentrados no varía de manera uniforme

ni de manera similar para los tres PUFAs en todo el intervalo de temperaturas ensayado. Considerando los tres ácidos en conjunto (Figura 1d) la temperatura óptima es de 4°C . Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores. Traitler y cols. (18) obtienen 0°C como temperatura óptima de cristalización para el ácido γ -linolénico y Wille y cols. (19) obtienen -5°C para el SA, 15°C para el EPA y 0°C para el DHA.

En la figura 1h se observa que los rendimientos en la recuperación de los tres PUFAs de interés son máximos a 4°C; esta temperatura resulta apropiada si se desean obtener altos rendimientos en SA y DHA. Si se pretende recuperar al máximo el EPA es preferible cristalizar a 28°C (Figura 1f), temperatura que prácticamente coincide con la de máxima concentración (Figura 1b).

Si se observan los rendimientos en la recuperación de SA, EPA y DHA a cualquier U/A (por ejemplo 4:1, Tabla II) y a todas las temperaturas ensayadas, parece lógico pensar que por debajo de -12°C los tres PUFAs forman compuestos de inclusión, aunque es el EPA el que queda ocluido en un mayor porcentaje. Por encima de -4°C el SA y el DHA se recuperan casi totalmente mientras que el EPA no aparece en proporción elevada en el filtrado hasta los

28°C. Así pues, 4°C es la temperatura óptima para el SA y el DHA ya que por encima de ella la tendencia a formar compuestos de inclusión de todos los ácidos disminuye, por lo que baja la concentración de los PUFAs, y por debajo de 4°C también estos PUFAs forman compuestos de inclusión. Sin embargo el EPA tiene mayor tendencia a formar compuestos de inclusión a medida que desciende la temperatura, por lo que su temperatura óptima es de 28°C. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ratnayake y cols. (9) que comprobó que el EPA tiene una gran tendencia a formar compuestos de inclusión y esta tendencia aumenta bruscamente por debajo de -18°C. Este hecho justifica los bajos rendimientos en la recuperación de EPA a bajas temperaturas obtenidos tanto en este trabajo como por Haagsma y cols. (20) y Ratnayake y cols. (9).

Tabla II
Influencia de la temperatura de cristalización sobre los rendimientos de los ácidos SA, EPA y DHA en los concentrados y sobre la recuperación de ácidos grasos totales. Relación U/A 4:1. Disolvente: metanol

Temperatura (°C)	Rendimiento, R _A					Recup. total R _U
	SA	EPA	DHA	SA+EPA+DHA		
-36	31,7	12,1	12,1	14,1	9,12	
-28	36,8	12,4	16,9	17,1	10,3	
-20	44,1	19,9	32,8	28,7	11,3	
-12	75,5	25,8	72,8	53,7	13,6	
-4	93,0	30,4	95,1	68,2	19,1	
4	71,6	54,3	100	82,1	19,8	
12	83,2	62,0	84,2	75,0	22,3	
20	80,5	70,8	92,5	82,3	22,5	
28	84,9	75,6	86,0	81,6	24,7	
36	80,7	71,5	75,9	74,6	26,4	

c) Cristalización utilizando etanol como disolvente.

En la Figura 2 se observa que tanto la relación U/A como la temperatura influyen de manera similar a como lo

hacen cuando el disolvente es metanol y que las condiciones óptimas son similares para ambos disolventes. Sin embargo, las concentraciones obtenidas con etanol son inferiores a las obtenidas con metanol.

Tabla III
Resultados del análisis multifactorial de la varianza para la influencia de la temperatura, relación U/A y tipo de disolvente sobre las concentraciones de SA, EPA, DHA y PUFAs n3

Fuente de variación	GL	F-ratio			
		SA	EPA	DHA	PUFAs n-3
A) Temperatura	6	54,9 ***	13,4 ***	84,8 ***	67,1 ***
B) Relación U/A	3	480,4 ***	456,5 ***	381,2 ***	668,1 ***
C) Disolvente	1	56,7 ***	92,4 ***	42,5 ***	95,3 ***
Interacciones					
AB	18	10,6 ***	31,7 ***	10,1 ***	6,7 ***
AC	6	1,4 ns	4,3 **	1,7 ns	2,3 ns
BC	3	18,9 ***	5,8 **	15,3 ***	19,6 ***
SSQ (error)	18	2,7	11,6	94,9	130
SSQ (total)	55	318,0	1410,0	10278,0	19674,0

SSQ: suma de cuadrados. GL: Grados de libertad. ns: estadísticamente no significativo.

*: significativo (0,01 < P < 0,05). **: significativo (0,001 < P < 0,01). ***: significativo (P < 0,001).

d) Análisis estadístico y ajuste de los resultados experimentales a un modelo polinomial de segundo orden

Con las concentraciones de SA, EPA, DHA y PUFAs n-3 (entre -12°C y 36°C) se ha realizado el análisis multifactorial de la varianza cuyos resultados aparecen en la Tabla III.

Por otra parte, las concentraciones de SA, EPA, DHA y PUFAs n-3 (X_U) se han ajustado a un modelo polinomial de 2° orden representado por la ecuación:

$$X_U = B_0 + B_1(T) + B_2(R) + B_{12}(T.R) + B_{11}(T)^2 + B_{22}(R)^2 + B_{dte}(X_d) \quad [3]$$

donde T es la temperatura, R la relación urea/ácidos grasos y X_d es una variable binaria que toma el valor cero si el disolvente es metanol y uno si es etanol. Esta variable introduce efectos cualitativos en el modelo de regresión, como es el caso del cambio de disolvente. En la Tabla IV se muestran los valores de los coeficientes para cada una de las respuestas estudiadas.

Tabla IV
Coeficientes del modelo polinomial de segundo orden representado por la ecuación [3]; codificaciones del nivel de significación y coeficiente r^2 para comprobar la bondad del ajuste.

Parámetros	Variables dependientes			
	SA	EPA	DHA	PUFAs n-3
B_0	6,2 10 ⁻¹ ns	6,2 **	3,5 10 ⁻¹ ns	9,4 ns
B_1	4,0 10 ⁻³ ns	-1,2 10 ⁻¹ ns	2,1 10 ⁻¹ ns	5,0 10 ⁻² ns
B_2	3,2 ***	1,1 10 ⁻¹ ***	2,1 10 ⁻¹ ***	3,6 10 ⁻¹ ***
B_{12}	-3,0 10 ⁻² ***	9,0 10 ⁻² ***	-1,6 10 ⁻¹ **	-7,0 10 ⁻² ns
B_{11}	8,0 10 ⁻⁴ ns	-3,0 10 ⁻³ **	-6,0 10 ⁻³ ns	-9,0 10 ⁻³ *
B_{22}	-2,1 10 ⁻¹ *	-1,8 ***	-2,1 *	-4,4 ***
B_{dte}	-7,8 10 ⁻¹ ***	-2,1 **	-4,0 *	-7,0 ***
r^2 (aj.)	91,04 %	78,67 %	77,93 %	85,06 %

ns: estadísticamente no significativo.

*: significativo (0,01 < P < 0,05). **: significativo (0,001 < P < 0,01). ***: significativo (P < 0,001).

r^2 (aj.): Coeficiente de determinación (ajustado para los grados de libertad).

Este análisis confirma buena parte de las conclusiones ya comentadas observando los resultados obtenidos. En la Tabla III se observa que las tres variables estudiadas tienen un efecto estadísticamente significativo, lo que indica que las tres variables deben ser tenidas en cuenta a la hora de obtener valores elevados de la concentración de los PUFAs estudiados. La más influyente es la relación U/A, que presenta la mayor F-ratio en todas las respuestas consideradas. Se incluyen en esta tabla la suma de cuadrados (SSQ) total y la del error para dar una idea del margen de error experimental, el cual puede considerarse aceptable en las condiciones de operación seleccionadas. Los resultados de la Tabla IV confirman que la relación U/A es la variable de mayor influencia, puesto que los coeficientes más altos de los términos lineales son los de esta variable.

En la Figura 3a se observa que la relación U/A óptima es 4:1, como ya se ha puesto de manifiesto, si bien la diferencia entre las concentraciones en PUFAs n-3 obtenidas con las relaciones U/A 3:1 y 4:1 es escasa, lo cual también se aprecia observando las Figuras 1 y 2 (a temperaturas superiores a -12°C). Este resultado ayuda a justificar el hecho de que la relación en peso en que la urea y los ácidos grasos forman estos compuestos tiene un valor medio de 3:1 (su valor exacto depende de cada ácido graso) y un aumento de esta relación aumenta el ren-

dimiento en la formación de los compuestos de inclusión de todos los ácidos grasos, tanto más cuanto mayor es su estabilidad (10). Por tanto, el aumento de la relación U/A de 3:1 a 4:1 debe aumentar la concentración de PUFAs en el filtrado (16)(17) (Figuras 1a a 1d), pero también aumentará la cantidad de ácidos grasos que forman compuestos de inclusión, incluidos los PUFAs, por lo que pueden disminuir los rendimientos, tal y como se observa en algún caso en las figuras 1e a 1h. Esto se aprecia sobre todo a bajas temperaturas, a las que aumenta mucho la tendencia a formar compuestos de inclusión.

El diferente comportamiento de la influencia de U/A sobre las composiciones y rendimientos a temperaturas inferiores y superiores a -12°C se debe a la influencia de las bajas temperaturas de cristalización en presencia de un exceso de urea. En estas condiciones se produce una disminución del contenido de los filtrados en PUFAs, puesto que están siendo incluidos éstos en los cristales de urea, tanto más cuanto menor es la temperatura y mayor el exceso de urea.

Cuando se opera con defecto de urea (por ejemplo a una relación 2:1, Figura 1) se produce un descenso más homogéneo del contenido de los concentrados en PUFAs a medida que aumenta la temperatura, es decir, en este caso no tiene lugar un descenso de estos contenidos a

bajas temperaturas (como ocurre con 3:1 y 4:1) debido a que a todas las temperaturas ensayadas quedan ácidos grasos distintos de los PUFAs sin formar complejos con la

urea. Operando con defecto de urea también la temperatura se puede utilizar como variable selectiva para segregar los ácidos saturados de los monoinsaturados.

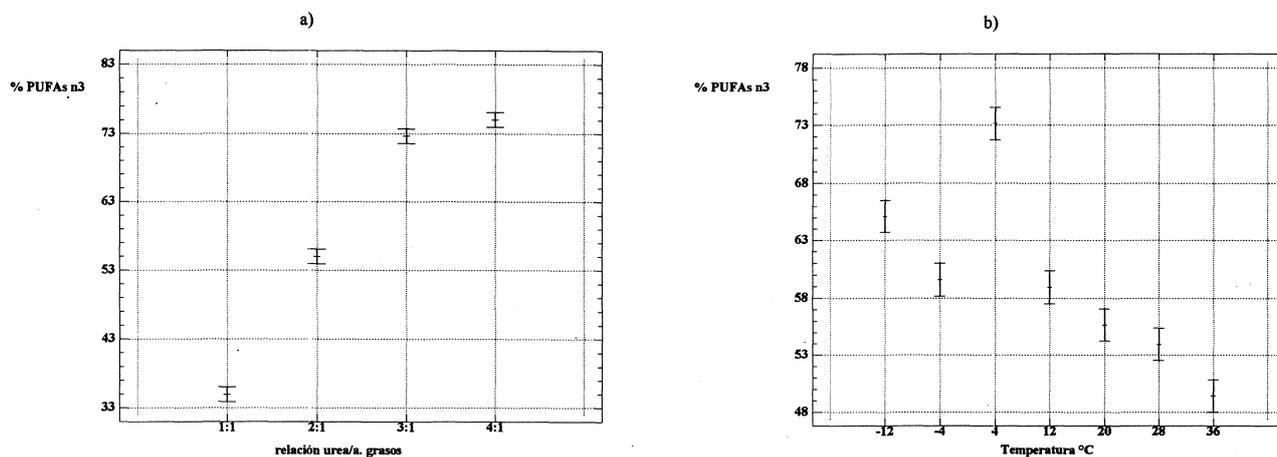


Figura 3

Intervalos de confianza del 95 % para las medias de las concentraciones de los PUFAs n-3 (SA+EPA+DHA) con respecto a: a) relación urea/ácidos grasos, b) temperatura de cristalización.

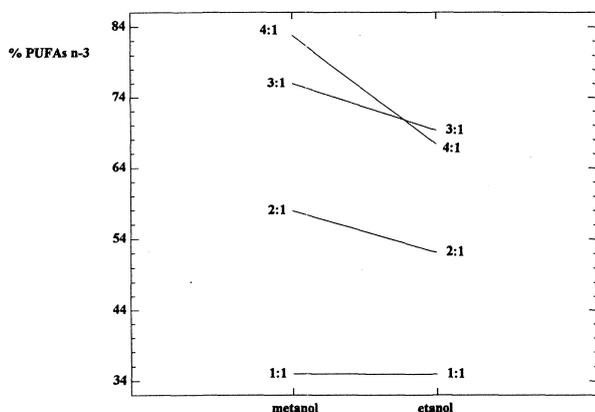


Figura 4

Interacciones entre las variables relación urea/ácidos grasos y el tipo de disolvente.

El análisis estadístico (figura 3b) también ha confirmado que, considerando los tres ácidos en conjunto, la temperatura óptima es de 4°C.

Por otra parte, en la Tabla III se observa que la interacción entre variables más importante es la que se da entre la relación U/A y el tipo de disolvente, lo cual también se aprecia en la Figura 4, donde claramente se observa que las concentraciones obtenidas con etanol son inferiores a las obtenidas con metanol, y que a medida que se aumenta la relación U/A la influencia del tipo de disolven-

te va siendo cada vez más importante y favorable para la utilización de metanol. También en la Tabla IV se observa que la respuesta predicha por el modelo polinomial es menor en todos los casos con etanol, como reflejan los valores de los coeficientes $B_{d_{et}}$, ya que todos son negativos y X_d toma el valor 1 si se utiliza etanol.

En la Tabla V se muestra un resumen de las concentraciones, factores de concentración y rendimientos obtenidos por otros autores junto con alguno de los mejores resultados obtenidos en este trabajo. Se observa que los factores de concentración son similares en todos los casos, si bien, en general son mayores cuanto menor es la concentración del ácido graso en la mezcla inicial (x_E). En cuanto a los rendimientos, no todos los autores dan sus resultados o datos para su cálculo; en general los rendimientos obtenidos en esta investigación son mayores que los referenciados en bibliografía; tan sólo Ratnayake y cols. (9) obtienen rendimientos muy elevados. No existe una razón clara para estos resultados, la única diferencia en cuanto al método experimental reside en que estos autores realizan la cristalización primero a temperatura ambiente durante una noche y a continuación a 1°C durante 24 h. Un bajo rendimiento en la recuperación de PUFAs puede no ser importante cuando los ácidos grasos de partida proceden de aceites de pescado, a un costo relativamente bajo. Sin embargo cuando se pretenden obtener PUFAs de otras fuentes, como microalgas marinas (22)(23) es importante que estos rendimientos sean lo más elevados posible. Así por ejemplo Fujita y Makuta (24) obtienen rendimientos muy bajos, lo cual puede hacer impracticable la aplicación de esas condiciones a ácidos grasos procedentes de microalgas o cualquier otra fuente de mayor costo.

Tabla V
Concentraciones (x_E y x_U , % sobre a.grasos totales), factores de concentración (f) y rendimientos en la recuperación de los PUFAs en los concentrados (R_A), obtenidos para los ácidos SA, EPA y DHA por el método de los compuestos de inclusión de urea. Comparación con los resultados referenciados por otros autores.

Referencia y condiciones	SA				EPA				DHA, GLA ^a			
	x_E	x_U	f	R_A	x_E	x_U	f	R_A	x_E	x_U	f	R_A
Ratnayake y cols. (9) 3:1, 1°C, etanol	3,6	11,2	3,1	100	12,6	32,9	2,6	91	4,4	11,1	2,5	88
Traitler y cols.(17) 3:1, 4°C, metanol	3,7	15,5	4,2	-	-	-	-	-	18,2	79,6	4,4 ^a	-
Wille y cols. (18) 3:1, 15°C, metanol	1,7	7,2	4,2	84,7	13,9	36,8	2,6	53	13,6	40,9	3	60,2
Haagsma (19) 3:1, 4°C, metanol	2,4	10	4,2	100	12,1	22,6	2,3	60	11,7	44,6	3,8	100
Ackman y cols. (20) 2,6:1, 5°C, etanol	0,8	5,1	6,4	-	5,4	32,5	6,0	-	3,9	29,2	7,5	64
Fujita y Makuta (24) 1,5:1, 35°C, etanol	1,7	61	3,6	56	14,5	57,3	4,0	51	4,3	17,5	4,1	49
Cohen y cols. (22) ^b 4:1, -15°C, metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	21,5	79,7	3,7 ^a	-
Cohen y Cohen (23) ^b 4:1, -15°C, metanol	-	-	-	-	47,5	81,9	1,7	-	-	-	-	-
Este trabajo 4°C, 4:1, metanol	2,4	8,5	3,6	71,6	9,4	25,6	2,7	54,2	10,9	59,8	5,5	100
28°C, 4:1, metanol	2,4	8,1	3,4	84,9	9,4	28,7	3,1	75,6	10,9	38,2	3,5	85,9
4°C, 4:1, etanol	2,4	7,0	3,0	74,1	9,4	21,5	2,3	57,9	10,9	51,4	4,7	100
28°C, 4:1, etanol	2,4	6,6	2,8	92,4	9,4	24,3	2,6	86,1	10,9	30,2	2,8	91,3

^b: Ácidos grasos procedentes de microalgas marinas. ^a: ácidos γ -linolénico

BIBLIOGRAFIA

- Herold, P.M. y Kinsella, J.E.- "Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feedings trials".- *Am. J. Clin. Nutr.* **43** (1986) 566-598.
- Dyerberg, J.- "Linoleate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis".- *Nutrition Rev.* **44** (1986) 125-134.
- Guichardant, M, H. Traitler, D. Spielmann, H. Sprecher y P-A Finot.- "Stearidonic acid, an inhibitor of the 5-lipoxygenase pathway. A comparison with timnodonic and dihomogammalinolenic acid".- *Lipids* **28** (1993) 321-324.
- Braden, L.M. y Carroll, K.K.- "Dietary polyunsaturated fat in relation to mammary carcinogenesis in rats".-*Lipids* **21** (1986) 285-288.
- Singh, M.D. y Chandra, M.D.- "Biochemical and cellular effects of fish and fish oils".- *Prog. Food Nutr. Sci.* **12** (1988) 371-419.
- Van Gent, C.M., Luten, J.B., Brongeeest-Shoute, H.C. y Ruiter, A.- "Effect on serum lipids levels of w3 fatty acids of infecting fish oil concentrates".- *Lancet* **December (8)** (1979) 1249-1250.
- Brongeeest-Shoute, H.C., van Gent, C.M., Luten, J.B. y Ruiter, A.- "The effect of various intakes of w3 fatty acids on the blood lipid composition in healthy human subjects".- *Am. J. Clin. Nutr.* **34** (1981) 1652-1757.
- Privet, O.S.- "Preparation of polyunsaturated fatty acids from natural sources". En "Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids".- Vol IX, part 3. Pergamon Press. (1968) 407-452.
- Ratnayake, W.M.N., Olsson, B., Matthews, D. y Ackman, R.G.- "Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea complexation".- *Fat Sci. Technol.* **10** (1988) 381-386.
- Schlenk, H.- "Urea inclusion compounds of fatty acids". En "Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids".- Vol II. Pergamon Press. (1954) 243-267.
- Smith, A.E.- "The crystal structure of the urea-hydrocarbon complexes".- *Acta Cryst.* **5** (1952) 224-235.
- Abu-Nasr, A.M., Potts, W.M. y Holman, R.T.- "Highly unsaturated fatty acids. II. Fractionation by urea inclusion compounds".- *J.A.O.C.S.* **31** (1954) 16-31.
- Lepage, G. y Roy, C.C.- "Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification".- *J. Lipid Res.* **25** (1984) 1391-1396.
- García Sánchez, J.L., Molina Grima, E., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J.A. y Giménez Giménez, A.- "Cuantificación de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal".- *Grasas y Aceites* **44** (1993) 348-353.
- Fry (1993)
- Gruger, E.H.- "Methods of separation of fatty acids from fish oils with emphasis on industrial applications".- *Fishery Industrial Research.* **2** (1962) 31.
- Domart, C., Miyauchi, D.T. y Sumerwell, W.N.- "The fractionation of marine-oil fatty acid with urea".- *J.A.O.C.S.* **32** (1955) 481-483.
- Traitler, H., Wille, H.J. y Studer, A.- "Fractionation of blackcurrant seed oil".- *J.A.O.C.S.* **65** (1988) 755-760.
- Wille, H.J. y Traitler, H.- "Production of polyenoic fish oil fatty acids by combined urea fractionation and industrial scale preparative HPLC".- *Revue Française des Corps Gras* **2** (1987) 69-74.
- Haagsma, N., van Gent, C.M., Luten, J.B., de Jong, R.W. y van Doorn, E.- "Preparation of an w3 fatty acid concentrate from cod liver oil".- *J.A.O.C.S.* **59** (1982) 117-118.
- Ackman, R.G., Ratnayake, W.M.N. y Olsson, B.- "The "basic" fatty acid composition of Atlantic fish oils: potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acid by urea complexation".- *J.A.O.C.S.* **65** (1988) 136-138.
- Cohen, Z., Reungjitachachawali, M., Siangdung, W. y Tanticharoen, M.- "Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*".- *J. Appl. Phycol.* **5** (1993) 109-115.
- Cohen, Z. y Cohen, S.- "Preparation of eicosapentaenoic acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*".- *J.A.O.C.S.* **68** (1991) 16-19.
- Fujita, T. y Makuta, M.- "Method of purifying eicosapentaenoic acid and its esters".- U.S. Patent n° 4377526 (1983).

Recibido: Enero 1995

Aceptado: Mayo 1995