



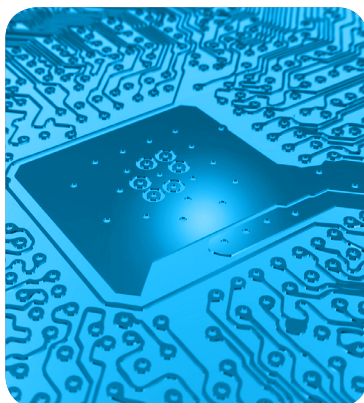
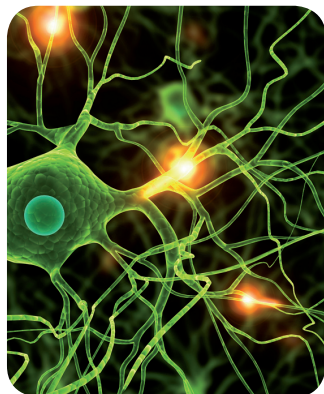
# MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /13-14

Máster en Química  
Agrícola y Nuevos  
Alimentos



excelencia Campus Internacional  
UAM  
CSIC+



**Reacciones de  
Etanolisis de Aceites  
Ricos en Ácidos Gra-  
sos Poliinsaturados:  
Evolución de la Con-  
versión y del Estado  
Oxidativo**

*Pablo Arranz*

*Martínez*

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, quiero agradecer a los Drs. Diana Martín, Carlos Torres y Luis Vázquez por haberme aceptado en su grupo de investigación para llevar a cabo el trabajo fin de máster, y por supuesto por su total implicación y confianza a lo largo de estos meses.*

*También quiero dar las gracias a Inés Morán por su ayuda y disponibilidad en el laboratorio durante toda mi estancia.*

*Gracias a quienes han compartido conmigo lo que ha sido un buen año, y en especial a Raquel, por ser el eje principal del mismo.*

*Por último, quiero dar las gracias a mi familia por su incondicional apoyo y por hacer posible que continúe con mi formación.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1 Acidos grasos omega-3.....	3
1.2 Transesterificación de triglicéridos .....	5
1.2.1 Efecto de la relación molar del alcohol utilizado .....	7
1.2.2 Efecto del tiempo de reacción y temperatura sobre la cinética de la reacción .	8
1.2.3 Efecto del tipo de catalizador .....	8
1.3 Estabilidad oxidativa de los aceites .....	10
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Materiales .....	17
3.2 Equipos y métodos .....	17
3.2.1 Reacción de etanolisis a escala laboratorio .....	17
3.2.2 Caracterización química .....	18
3.2.2.1 Análisis de FAEE por cromatografía de gases .....	18
3.3.2.2 Determinación de índices de oxidación.....	19
A. Índice de peróxidos (conforme al método oficial AOCS Cd 8-53).....	19
B. Test de p-anisidina (conforme al método oficial AOCS Cd 18-90) .....	19
3.3.2.3 Determinación del grado e índice de acidez .....	20
3.3.2.4 Determinación del contenido de humedad .....	20

3.3.3 Escalado en planta piloto.....	20
3.3.4 Comparativa con aceites de origen vegetal de alto contenido en PUFA n-3 .	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
4.1 Caracterización química del aceite de partida .....	23
4.2 Optimización del proceso de transesterificación .....	24
4.2.1 Estudio del efecto de la relación molar EtOH:aceite.....	24
4.2.2 Estudio del efecto de la temperatura y tiempo de reacción .....	26
4.2.3 Estudio del tipo y cantidad de catalizador.....	29
4.2.4 Estudio de la evolución del estado de oxidación.....	32
4.3 Escalado del proceso en planta piloto.....	41
4.4 Comparativa con aceites de origen vegetal de alto contenido en PUFA n-3 .....	43
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>51</b>
Índice de tablas .....	51
Índice de figuras .....	51
Índice de ecuaciones .....	52
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>54</b>

## NOMENCLATURA

AGL	Ácido graso libre
ALA	Ácido $\alpha$ -linolénico
AnV	Índice de anisidina
AV	Índice de acidez
DG	Diglicérido
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAEE	Ácido graso etil éster
LA	Ácido linoleico
MG	Monoglicérido
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
PV	Índice de peróxidos
SDA	Ácido estearidónico
TG	Triglicérido

## RESUMEN

El enriquecimiento y purificación de ácidos grasos bioactivos a partir de aceites y grasas requiere una etapa previa de ruptura de la molécula de triglicérido. En este sentido, una de las reacciones que ha despertado un gran interés es la transesterificación por etanolisis, en la que se transforma el triglicérido en sus correspondientes ácidos grasos etil ésteres (FAEE) y glicerina, mediante el uso de un catalizador.

En el presente trabajo se estudió la influencia de distintas variables implicadas en el proceso de etanolisis de un aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de origen marino sobre el grado de conversión en FAEE y el estado oxidativo. En concreto, se investigó el efecto de la temperatura (30-60 °C), el tipo y cantidad de catalizador químico empleado (hidróxido potásico y etóxido sódico), la relación molar etanol:aceite (4:1 – 6:1) y el tiempo de reacción. Para ello, a lo largo de los tiempos de reacción, se monitorizó el grado de conversión del aceite hacia FAEE, así como los índices de oxidación, tanto oxidación primaria, como oxidación secundaria. A partir de los datos obtenidos, se establecieron como condiciones óptimas de reacción, una temperatura de 50 °C, una relación molar etanol:aceite 6:1 y el uso de 1% (p/p ajustado según inactivación) de etóxido sódico como catalizador. La monitorización de los índices de oxidación desveló una reducción en los valores iniciales para todas las condiciones estudiadas.

En base a los resultados obtenidos a escala laboratorio, se llevó a cabo un escalado en planta piloto de las condiciones óptimas de reacción, del que se obtuvieron resultados análogos a lo obtenido a escala laboratorio. Posteriormente, se realizó una comparativa del proceso optimizado aplicado a otro aceite de origen vegetal rico en PUFA.

El producto obtenido mediante el procedimiento optimizado supone un material de partida fácilmente fraccionable que puede dar lugar a concentrados de alto valor añadido que se pueden emplear en la producción de lípidos funcionales.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### 1. INTRODUCCIÓN

#### *1.1 Ácidos grasos omega-3*

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos consistentes en una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxílico. Suelen encontrarse unidos a través de este grupo a una molécula de glicerol, formando así los acilglicéridos (mono-, di- o triglicéridos). Dependiendo de la naturaleza de la cadena hidrocarbonada, los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, pudiendo ser estos últimos ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados (PUFA) (Rubio Rodriguez et al., 2010).

La mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados de manera natural por el ser humano, sin embargo, hay un grupo de PUFA, denominados ácidos grasos esenciales, que no pueden ser producidos en el metabolismo humano: el ácido linoleico (C18:2 n-6; LA) y el ácido alfa linolénico (C18:3 n-3; ALA). Estos dos ácidos grasos son los precursores metabólicos de los ácidos grasos omega-6 y omega-3 de cadena larga, respectivamente. Sin embargo, el proceso de conversión de ALA en ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3; EPA), ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3; DPA) y ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3; DHA), es poco eficiente, por lo que el aporte de estos PUFA es recomendable hacerlo a través de la dieta. El ácido estearidónico (C18:4 n-3; SDA) es también un PUFA n-3 que está despertando gran interés por ser un intermedio metabólico en la ruta de conversión de ALA a EPA y DHA.

En una revisión publicada por Ruxton et al. (2005) se destacan las evidencias que existen en los beneficios clínicos de los PUFA n-3 sobre las enfermedades cardiovasculares o la artritis reumatoide, así como las posibles repercusiones sobre otros procesos inflamatorios como asma o fibrosis quística. De manera adicional, se han estudiado los efectos sobre psoriasis (Zulkafar et al., 2007), enfermedades intestinales (Razack & Seidner, 2007; Diamond et al., 2008; Turner et al., 2008) y su uso en tratamientos para la prevención de enfermedades mentales (Horrobin et al., 1991; Stillwell & Wassall, 2003; McNamara, 2006) y cáncer (MacLean et al., 2006; Chen et al., 2007; Calviello et al., 2007).

Existe una relación recomendada entre la cantidad consumida de n-6 y n-3, que se establece en 5:1 según expertos nutricionistas (WHO/FAO, 1994). Sin embargo, debido



a los hábitos alimenticios modernos, esta relación puede llegar a ser muy superior y esto, unido a una ingesta elevada de ácidos grasos saturados, puede conllevar a un aumento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, hipertensión, desórdenes inflamatorios, autoinmunes y depresión.

Debido a estas carencias en las dietas tradicionales, una manera de incrementar la ingesta de PUFA n-3 se basa en el consumo de suplementos alimenticios ricos en estos ácidos grasos. En este sentido, los preparados comerciales a base de aceites de pescado son los productos más conocidos, dado el elevado contenido en PUFA n-3 que presentan los lípidos de estos animales (Martín et al., 2012). Dentro del reino vegetal, existen numerosas plantas oleaginosas cuyo aceite contiene ALA y LA, aunque la familia *Boraginaceae* es la fuente más común de SDA en la naturaleza, siendo el aceite obtenido a partir de especies del género *Echium* (comúnmente denominado aceite de echium) el aceite comercialmente disponible con un mayor contenido en este ácido graso.

Las fuentes de origen marino se usan como material de partida para procesos de concentración y purificación, obteniendo así compuestos de alta riqueza en PUFA n-3, tanto en forma de triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (AGL) o alquil-ésteres. Sin embargo, en el caso de aceites vegetales de *Echium*, su uso como material de partida para obtención de concentrados de ALA, LA o SDA ha sido poco explorada, pudiendo resultar de gran interés.

Los métodos de concentración de PUFA n-3 son numerosos, pero sólo algunos de ellos son escalables a producciones de mayor volumen. Los métodos disponibles incluyen la cromatografía de adsorción, destilación molecular y fraccionada, cristalización a bajas temperaturas, extracción con fluidos supercríticos, formación de complejos de inclusión con urea y reacciones de transesterificación enzimática o química (Shahidi & Wanasundara, 1998).

Esta última técnica se aplica en las etapas intermedias dentro del proceso de obtención de concentrados de PUFA n-3. Estas reacciones de transesterificación son también el fundamento de los procesos de obtención de biodiésel. El biodiésel se trata de un combustible biodegradable, menos tóxico y con menos emisiones que otros combustibles, lo que deriva en un gran interés tanto en el aspecto económico como en el medioambiental (Stamenkovic et al., 2011).

### 1.2 Transesterificación de triglicéridos

La transesterificación de aceites mediante alcoholisis consiste en la reacción entre un glicérido y un alcohol de cadena corta. En el caso de un triglicérido, esta reacción tiene lugar en tres etapas, en las que la molécula de TG se convierte en diglicérido (DG), que pasa a monoglicérido (MG) y por último a glicerol. En cada etapa, se consume un mol de alcohol y se produce un mol de ácido graso etil éster (FAEE) (Figura 1).

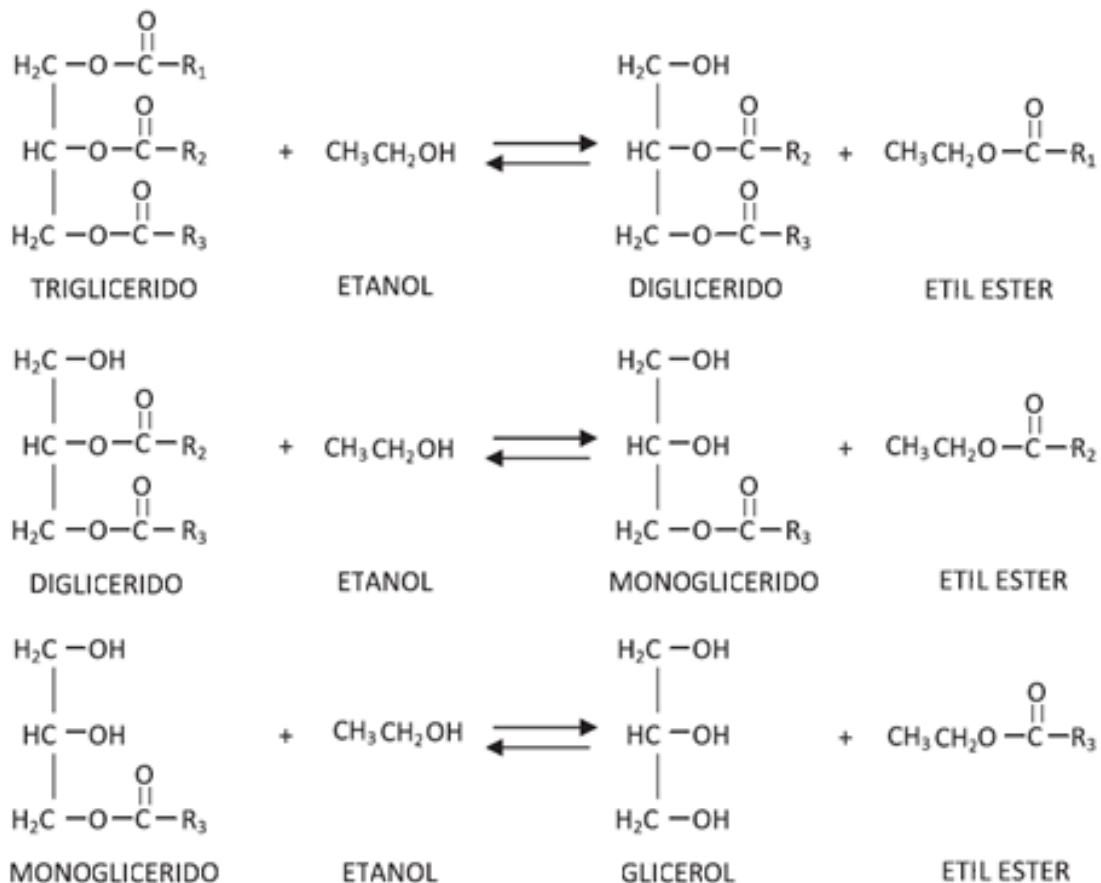


Figura 1. Esquema de las reacciones de etanolisis a partir de una molécula de triglicérido (Issariyakul & Dalai, 2014).

Además, durante la reacción de transesterificación, pueden llevarse a cabo reacciones no deseables de manera paralela, que pueden resultar en una disminución del rendimiento total de la reacción. En la

Figura 2 se representan de manera esquemática estas posibles reacciones. La formación de jabones a partir de las reacciones de saponificación (Figura 2.a y Figura 2.b) puede incrementar la viscosidad del medio de reacción, lo que interfiere en la separación del

glicerol y por tanto en el desarrollo de la reacción de transesterificación (Meher et al., 2006). La presencia de agua en el medio de reacción puede interaccionar con los etil ésteres ya generados provocando su hidrólisis y disminuyendo el rendimiento (Figura 2.c). La acumulación de glicerol durante la etanolisis puede revertir la reacción, por lo que es preferible que exista una separación de fases entre el glicerol formado y la fase oleosa donde se encuentra el catalizador (Meher et al. 2006).

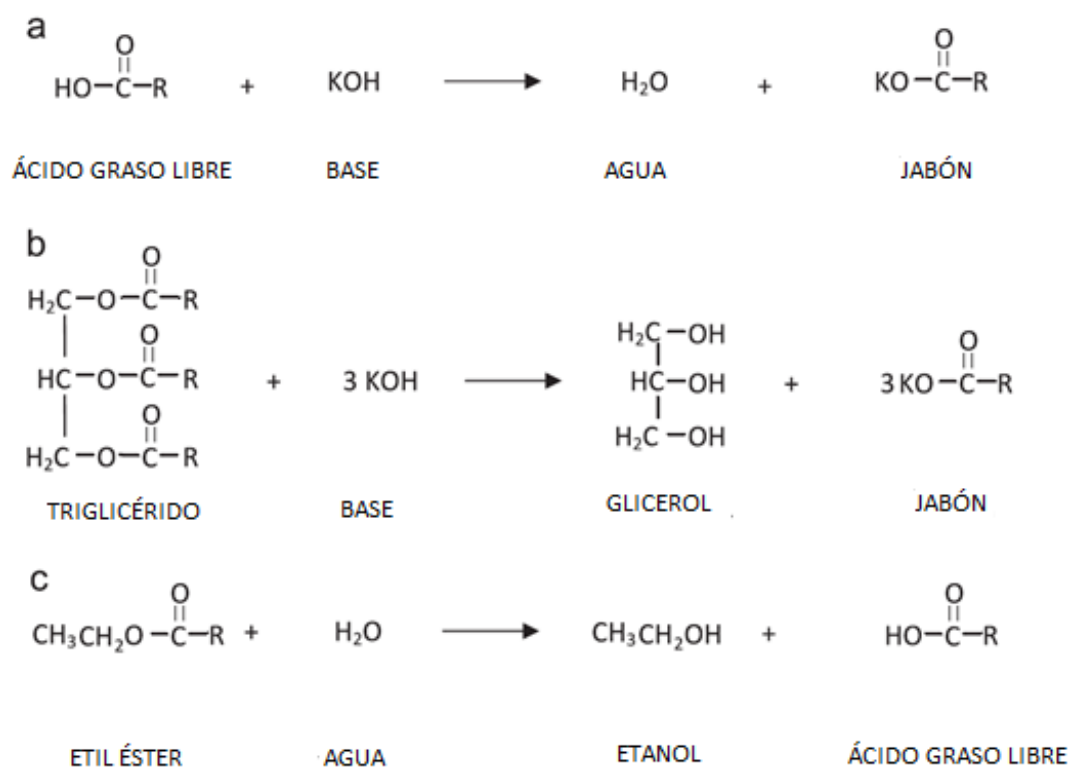


Figura 2. Hidrólisis y saponificación durante la transesterificación. a) saponificación de ácidos grasos libres, b) saponificación de triglicéridos y c) hidrólisis de etiléster (Issariyakul & Dalai, 2014).

La calidad del aceite de partida en términos de acidez, contenido en agua, y estado oxidativo resulta trascendental a la hora de conseguir un correcto desarrollo de la reacción de etanolisis. En lo relativo a las características del aceite, Ma et al., (1998) describieron que la acidez libre y el contenido en agua deberían mantenerse por debajo de 0.50 y 0.06 % peso respectivamente. Por otro lado, Hoy y Xu (2001) estudiaron de manera conjunta el efecto del contenido en agua, acidez libre e índice de peróxidos de la muestra de aceite sobre catalizadores derivados de alcóxidos alcalinos. Establecieron que estos tres factores pueden producir una inactivación del catalizador, aunque ésta puede ser compensada por la adición de una cantidad extra del mismo.

Además de las características del aceite, en general, el desarrollo de la reacción de transesterificación se ve influenciado por diversos factores, entre los que encontramos el tipo de alcohol, la relación molar entre el alcohol y el aceite, la temperatura de la reacción, el tiempo de reacción y el tipo y cantidad de catalizador.

### *1.2.1 Efecto de la relación molar del alcohol utilizado*

La estequiometría de la reacción requiere un mínimo de una relación molar alcohol:aceite 3:1. Sin embargo, de manera generalizada, las reacciones de transesterificación se llevan a cabo con una relación molar 6:1 (alcohol:aceite) para conseguir conversiones cercanas al 100%. Este exceso de reactivo se utiliza con el fin de desplazar la reacción hacia la generación de productos, sin embargo un incremento en esta relación no siempre conduce hacia conversiones cuantitativas (Freedman et al., 1984). Otros autores llevaron a cabo estudios en los que se analizaron relaciones molares crecientes. Como ejemplo, Encinar et al., (2001), utilizaron relaciones molares de 3:1 hasta 15:1, mientras que en reacciones catalizadas en medio ácido se llegaron a utilizar relaciones de 30:1 (Canakci & Van Gerpen, 1999).

La elección del alcohol utilizado también ejerce una influencia sobre el desarrollo de la reacción. Metanol y etanol son los alcoholes más utilizados, aunque también se han realizado estudios en los que se utilizan alcoholes de cadena más larga, como propanol o incluso butanol (Lang et al., 2001). Debido principalmente a cuestiones económicas, el metanol es el más utilizado (Ma & Hanna, 1999). Sin embargo, en lo que a cuestiones técnicas se refiere, la elección entre metanol y etanol se basa en distintas ventajas e inconvenientes. El uso de metanol permite condiciones suaves de reacción y una separación de fases más fácil. Por el contrario, la principal desventaja en el uso de metanol radica en su baja miscibilidad con el aceite, lo que dificulta la transferencia de masa entre ambos compuestos, así como la mayor toxicidad de este alcohol, de cara al uso en aplicaciones alimentarias (Stamenkovic et al., 2011). El etanol por su parte, tiene una menor reactividad. Su menor polaridad favorece el inicio de la reacción en comparación con el metanol, sin embargo, mejora la miscibilidad del glicerol y los ésteres, favoreciendo las reacciones de saponificación (Mendow et al., 2011).

### *1.2.2 Efecto del tiempo de reacción y temperatura sobre la cinética de la reacción*

La conversión progresa favorablemente conforme los tiempos de reacción aumentan. Freedman et al., (1984) observaron conversiones cercanas al 80% en el primer minuto de reacción. Tras 1 h, las reacciones se habían estabilizado en conversiones entre 93-98%. De manera similar, Alamu et al., (2007), y Yeung y Guo, (2006) obtuvieron conversiones máximas de reacción en tiempos inferiores a 90 min. En el caso de catálisis ácidas, los tiempos de reacción pueden llegar a ser de 48-96 h (Canakci & Van Gerpen, 1999).

Los procesos de transesterificación son altamente dependientes de la temperatura de reacción, y se ven favorecidos al utilizar altas temperaturas. El rango de temperaturas más utilizado se establece entre 50 y 60 °C (Yeung et al., 2010). No obstante, las reacciones catalizadas en medio alcalino pueden llevarse a cabo incluso a temperatura ambiente, mientras que los catalizadores ácidos requieren temperaturas más elevadas. Encinar et al., (2001) observaron porcentajes de conversión similares a 25, 50 y 75 °C en medio alcalino, aunque la cinética de reacción fue ligeramente superior a temperaturas más elevadas. A la hora de establecer la temperatura más adecuada, es importante no sobrepasar la temperatura de ebullición del alcohol que se utilice (Freedman et al., 1984).

### *1.2.3 Efecto del tipo de catalizador*

El tipo de catálisis y la elección del catalizador resultan puntos clave dentro de los criterios para optimizar el proceso. La mayoría de los procesos a escala industrial utilizan catalizadores básicos homogéneos, debido principalmente al alto porcentaje de conversión que se consigue, los cortos tiempos de reacción, las bajas temperaturas y los menores costes del catalizador (Ma & Hanna, 1999).

Los catalizadores básicos homogéneos más utilizados son los hidróxidos y alcóxidos de metales alcalinos, como el NaOR ( $R = -(CH_2)_nCH_3$ ), KOR, NaOH o KOH. Existe cierta controversia sobre la conveniencia en el uso de unos u otros. Ma et al. (1998) describen concentraciones mínimas más bajas para el caso de los hidróxidos, mientras que otros autores destacan la mejor actividad del NaOR (Freedman et al., 1984). Durante el desarrollo de la reacción, en presencia de ácidos libres, el resto -OH de los hidróxidos puede generar agua, pudiendo acarrear los problemas descritos anteriormente, mientras que los -OR dan lugar al alcohol correspondiente. Sin embargo, el uso de los catalizadores derivados de alcóxidos alcalinos es menos popular, debido principalmente a su mayor

toxicidad, su mayor precio y sus problemas a la hora de eliminarlos (Issariyakul & Dalai, 2014; Stamenkovic et al., 2011).

Los procesos de transesterificación catalizados por bases siguen un mecanismo de tres etapas, como se detalla en la Figura 3. Existe en primer lugar un ataque del ion alcóxido proveniente del catalizador a la molécula de TG, para formar un intermedio tetraédrico. A continuación, el intermedio formado reacciona con el alcohol, de modo que se recupera el ion alcóxido. Por último, se produce un reordenamiento del intermedio para producir el alquiléster y la molécula de DG (Issariyakul & Dalai, 2014).

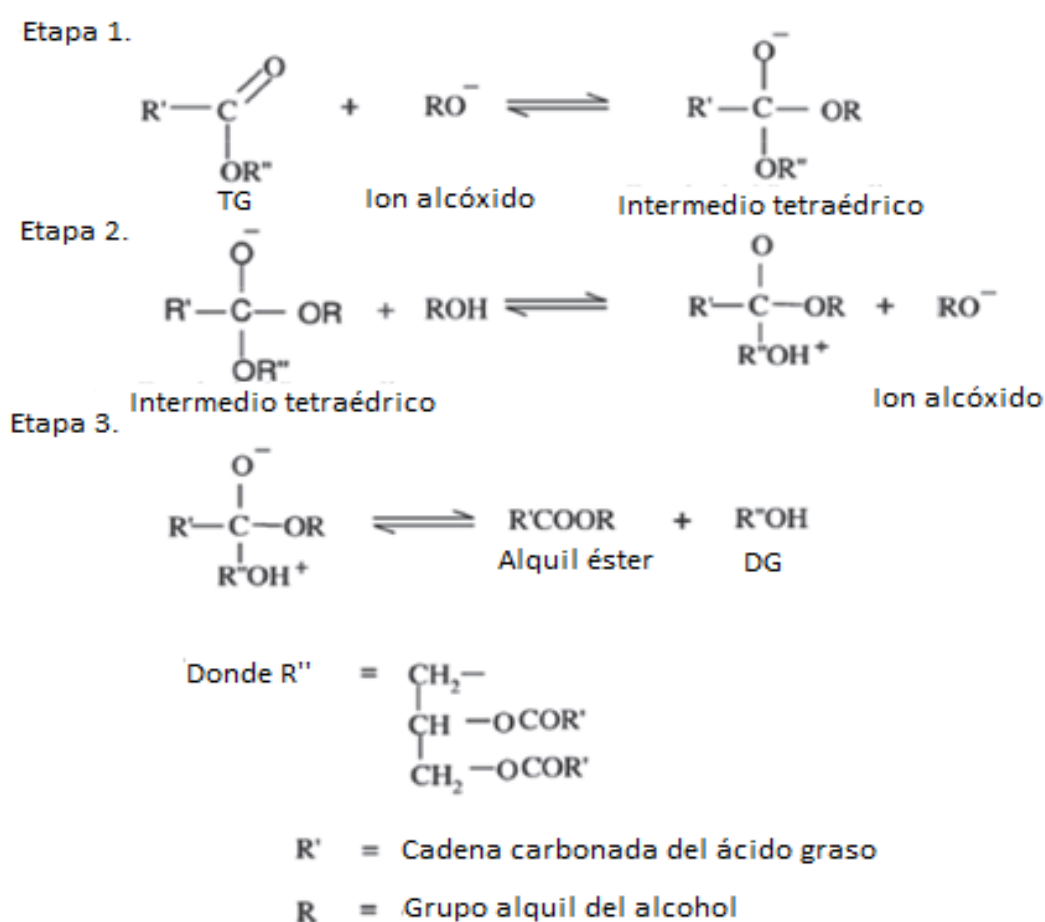


Figura 3. Mecanismo de acción de un catalizador básico homogéneo en la transesterificación (Issariyakul & Dalai, 2014).

De manera complementaria, se opta por el uso de catalizadores ácidos cuando el aceite de partida tiene elevados contenidos de acidez y agua, evitando así procesos de saponificación (Issariyakul et al., 2007). Las principales desventajas en el uso de

catalizadores ácidos son que requiere un mayor tiempo de reacción, temperaturas más elevadas y equipos resistentes a ácidos (Liu, 1994). Algunos ejemplos dentro de los catalizadores ácidos utilizados son el  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{BF}_3$  y  $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ , siendo el primero de ellos el más frecuentemente empleado (Issariyakul & Dalai, 2014).

Recientemente la catálisis heterogénea está despertando interés dentro de los procesos de transesterificación, principalmente porque simplifican el proceso de purificación, eliminan la generación de agua y posibilitan la producción en continuo, sin embargo es necesario una mayor profundización en este campo, ya que son necesarios mayores tiempos y temperaturas de reacción (Jacobson et al., 2008; Srilatha et al., 2010).

De manera alternativa a la etanolisis química se postula el uso de enzimas como catalizadores del proceso. La principal ventaja reside en que es un proceso controlado que permite llevar a cabo la reacción en condiciones más suaves y con mayor selectividad, evitando la formación de jabones y facilitando el proceso de purificación. Sin embargo, tiene costes de operación más elevados y condiciones de reacción muy estrictas (Leung et al., 2010). Por otra parte, el uso de procesos enzimáticos, dependiendo del biocatalizador empleado, puede discriminar frente a algunos ácidos grasos, especialmente frente a ácidos grasos omega-3 de cadena larga, limitando su conversión a los correspondientes FAEE.

También se ha descrito que estas reacciones de transesterificación pueden llevarse a cabo evitando el uso de catalizadores y con tiempos de reacción cortos en condiciones supercríticas (Saka & Kusdiana, 2001). Sin embargo, la temperatura y presión a la que se debe someter la mezcla es alta, lo que puede suponer dificultades ya que se ven favorecidas reacciones de polimerización que pueden dificultar el proceso posterior de purificación (D'Ippolito et al., 2007).

### ***1.3 Estabilidad oxidativa de los aceites***

Los aceites y grasas, especialmente aquellos que presentan un alto contenido en ácidos grasos insaturados, como son los PUFA n-3, tienen una mayor susceptibilidad a sufrir procesos auto-oxidativos y de fotooxidación, dando lugar inicialmente a hidroperóxidos y posteriormente a compuestos de oxidación secundaria. La generación de estos compuestos de oxidación puede conducir a una pérdida de calidad del producto, tanto

tecnológica como nutricional, y a la generación de olores y sabores no deseados. De manera adicional, los productos generados en la peroxidación están señalados como perjudiciales para la salud debido a su potencial capacidad de generar aterosclerosis y carcinomas (Chow, 2008). De este modo, el estado oxidativo y la estabilidad oxidativa son criterios fundamentales a tener en cuenta en la caracterización de aceites y grasas en general, pero particularmente en aceites altamente susceptibles a la oxidación, como son los aceites ricos en PUFA n-3.

El proceso de peroxidación lipídica (Figura 4) se inicia por el ataque de alguna especie química capaz de reaccionar y retirar un átomo de hidrógeno de un carbono de la cadena carbonada de un ácido graso. Un mayor número de dobles enlaces en la molécula hace que sea más fácil retirar el hidrógeno y sea por tanto más fácil de oxidar (Halliwell & Chirico, 1993).

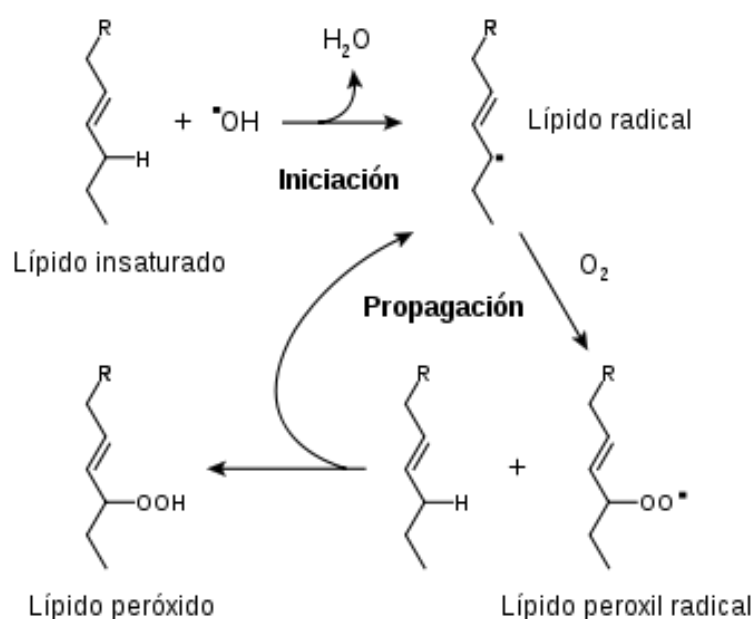


Figura 4. Proceso de peroxidación lipídica.

En la etapa de iniciación, el radical lipídico se forma a partir del lípido, usualmente por el ataque de radicales, y siendo catalizado por factores como exposición a la luz, calor, irradiaciones o por trazas de metales. El radical lipídico formado reacciona rápidamente con oxígeno para dar un radical peroxilo, el cual ataca a otra molécula de lípido y sustrae un átomo de hidrógeno para formar un hidroperóxido lipídico ROOH, y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación. De esta manera, muchas



moléculas de lípidos pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos por muchas formas de iniciación. Los hidroperóxidos lipídicos son moléculas muy inestables que se degradan fácilmente hacia otros derivados a medida que progresa la secuencia de propagación. Finalmente, el ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación, en las cuales hay consumo de los radicales (Rojano, 1997).

La Figura 5 esquematiza el desarrollo del proceso de oxidación de un aceite o grasa, y cómo evoluciona este proceso a lo largo del tiempo en cuanto al nivel y tipo de compuestos de oxidación; así como otras consecuencias que tienen lugar a medida que progresa la oxidación, como es la percepción sensorial de rancidez, o el incremento de la viscosidad.

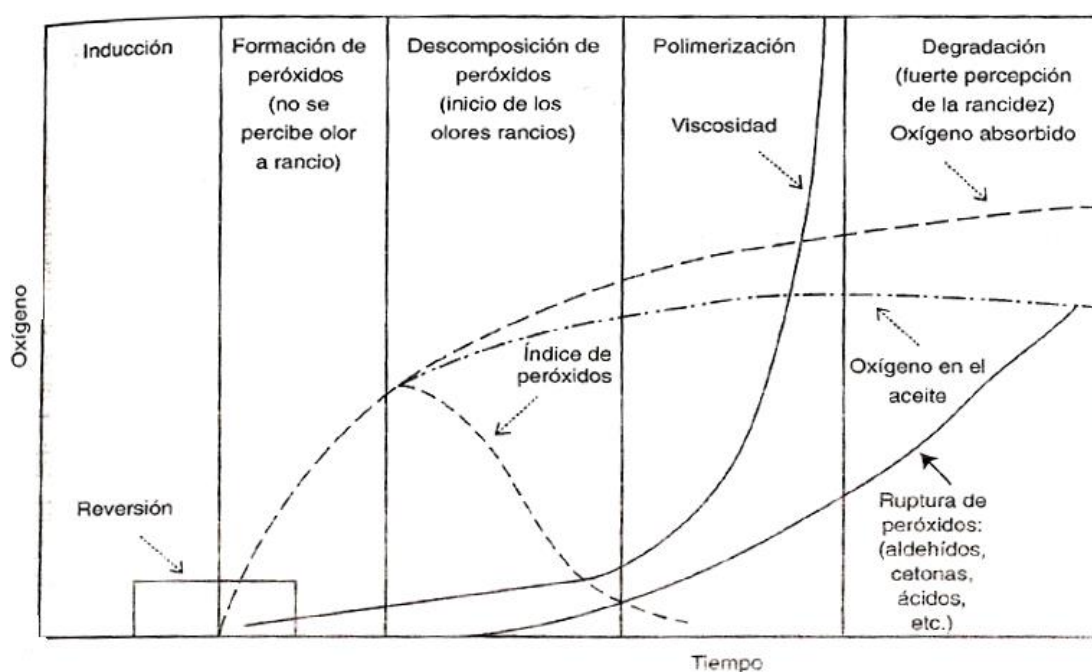


Figura 5. Desarrollo del proceso de oxidación en aceites (Matissek et al., 1998).

Teniendo en cuenta la elevada susceptibilidad oxidativa de los aceites altamente insaturados, es importante señalar que durante las reacciones de transesterificación de los mismos, pueden darse condiciones catalizadoras de los procesos de oxidación, como la presencia de oxígeno, luz y temperatura. En la revisión llevada a cabo por Yaakob et al., (2014), se analizan los distintos aspectos que pueden contribuir a la degradación del biodiesel durante su almacenamiento. En lo relativo a la estructura de los alquil ésteres, se ha observado que los FAEE saturados son más estables que aquellos

mononinsaturados, y esta susceptibilidad se acrecenta en el caso de presentar más de una insaturación (Neff et al., 1997), siendo los FAEE derivados de PUFA n-3 más propensos a sufrir procesos autooxidativos que los n-6 (Canacki et al., 1999). Los FAEE por su parte, presentan una mayor estabilidad oxidativa que los derivados metanólicos (Issariyakul & Dalai, 2010).

Hay que señalar que estos estudios mencionados se centran en la estabilidad oxidativa una vez obtenido el producto final, y no contemplan la evolución sucedida durante la reacción, lo cual sería un aspecto importante a evaluar, ya que la oxidación es un proceso continuo. Sin embargo, existe escasa bibliografía que reporte los niveles de oxidación a lo largo de reacciones de transesterificación o inmediatamente después. Ikwuagwu et al., (2000) observaron un pequeño descenso en los valores de peroxidación de los metil ésteres respecto al aceite original, crudo y refinado. Este resultado fue análogo al reportado en el estudio realizado por Xin et al., (2008). En reacciones de interesterificación, donde también se aplican condiciones prooxidantes, se observaron la misma tendencia de disminución de los valores de peróxidos a tiempo final de reacción sobre aceites de origen vegetal (Basturk et al., 2007).

Por otro lado, pese a que la oxidación lipídica es un proceso difícil de evitar, existen métodos que consiguen reducir la velocidad de este proceso, siendo la opción más efectiva evitar las condiciones prooxidantes. Esto se consigue minimizando el contacto con el aire, con almacenamientos a bajas temperaturas, en condiciones de oscuridad y en atmósferas inertes (Sheehan et al., 1998). Sin embargo, estos métodos pueden resultar insuficientes para prevenir la oxidación lipídica en aceites altamente susceptibles a la oxidación, o en procesos altamente prooxidantes, lo que hace necesario utilizarlos de manera conjunta con la adición de antioxidantes (Yaakob et al., 2014). En este sentido, existe gran variedad en el uso de antioxidantes para la estabilización de aceites ricos en omega-3, aunque los más utilizados son los tocoferoles, dentro de la categoría de los antioxidantes primarios. Sin embargo, la estabilización de aceites con antioxidantes tras un proceso de transesterificación suele realizarse sobre el producto final una vez obtenido, mientras que el efecto de la incorporación de antioxidantes durante el desarrollo de este tipo de reacciones no ha sido ampliamente explorado, pudiendo resultar de interés.

## **2. OBJETIVOS**

### 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la influencia de distintas variables implicadas en el proceso de etanolisis de un aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados de origen marino sobre el grado de conversión en ácidos grasos etil ésteres y la evolución del estado oxidativo.

Para alcanzar este objetivo general, se investigó el efecto de los siguientes parámetros del proceso:

- Efecto de la temperatura.
- Efecto del tipo y cantidad de catalizador químico empleado.
- Efecto de la relación molar etanol:aceite.
- Efecto del tiempo de reacción.

Además, se plantearon los siguientes objetivos complementarios:

- Escalado en planta piloto de las condiciones óptimas de reacción para el aceite de origen marino.
- Comparativa del proceso optimizado para aceite de origen marino, aplicado a un aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados de origen vegetal.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 *Materiales*

El aceite de pescado (*Brevoortia spp.*) fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). El aceite de echium (*Echium spp.*) fue suministrado por Harke Nutrition (Mülheim an der Ruhr, Alemania).

Los reactivos hidróxido potásico, sulfato sódico anhidro, cloruro sódico y etanol absoluto fueron suministrados por Panreac (Castellar del Vallés, España). Los disolventes hexano (HPLC), cloroformo (HPLC) e isopropanol (HPLC) se obtuvieron de Lab Scan (Dublin, Irlanda). El reactivo etóxido sódico y el tamiz molecular (4Å) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). El patrón interno hexadecano se adquirió a Merck (New Jersey, Estados Unidos). El oleato de etilo fue suministrado por Acros Organics (New Jersey, Estados Unidos) y los reactivos del equipo FoodLab Fat fueron suministrados por CDR s.r.l. (Ginestra, Italia).

#### 3.2 *Equipos y métodos*

##### 3.2.1 *Reacción de etanolisis a escala laboratorio*

La reacción se llevó a cabo en condiciones de oscuridad, en un incubador de agitación orbital IKA 4000 ic (Staufen, Alemania) a 200 rpm durante 90 min. Las variables analizadas para la optimización del proceso fueron las siguientes:

- Temperatura: 30, 40, 50 y 60 °C.
- Tipo de catalizador: hidróxido potásico (KOH) y etóxido sódico (NaOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).
- Cantidad de catalizador.
- Relación molar etanol:aceite: 4:1 y 6:1.
- Tiempo de reacción.

La elección de las condiciones de reacción y las variables estudiadas se basó en lo expuesto en la bibliografía presente (Issariyakul & Dalai, 2014; Ma & Hanna, 1999; Leung et al., 2010).

Para ello, se preparó una mezcla de 12 g de aceite con 0.6 g de hexadecano (utilizado como estándar interno) y se atemperó durante 5 min hasta alcanzar la temperatura de reacción. De manera paralela, se disolvió la cantidad correspondiente de catalizador en etanol absoluto previamente desecado con tamiz molecular, utilizando la relación molar de etanol:aceite definida para cada reacción individual. Esta disolución se añadió a la mezcla previamente preparada, se agitó vigorosamente y se introdujo en el incubador de agitación orbital para iniciar la reacción.

Se tomaron alícuotas de 150  $\mu\text{L}$  de volumen, en los tiempos de reacción 0, 1, 4, 8, 12, 16, 20, 40, 60 y 90 min. Estas alícuotas se diluyeron en 1 mL de hexano y 0.5 mL de agua destilada, se agitó en vortex y se centrifugó en una microcentrífuga ScanSpeed MINI (Lyngge, Dinamarca) a 12.000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fracción lipídica, se diluyó en 1 mL de hexano y se eliminó el posible contenido en agua mediante la adición de sulfato sódico anhidro. La disolución se almacenó en ausencia de luz durante 2 h.

Una vez transcurrido este tiempo, una alícuota de 0.5 mL de dicha disolución se diluyó en 0.5 mL de hexano, y se cuantificó el contenido en FAEE mediante cromatografía de gases. De manera paralela, una alícuota de 1 mL de la misma disolución se evaporó bajo corriente de nitrógeno para la determinación de los valores de oxidación lipídica.

#### 3.2.2 Caracterización química

##### 3.2.2.1 Análisis de FAEE por cromatografía de gases

El análisis de FAEE se realizó en base al método desarrollado por Tenllado et al. (2011). La cuantificación de FAEE se llevó a cabo en un CG Agilent (Avondale, PA) (6850 Network GC System) acoplado a un inyector automático (Agilent 6850) con columna capilar 30 m HP-88 (Avondale, Pennsylvania) (0.25 mm i.d.) y detector FID. Se utilizó un volumen de inyección de 1  $\mu\text{L}$  y split con ratio 20:1. Las temperaturas del inyector y del detector fueron 220  $^{\circ}\text{C}$  y 250  $^{\circ}\text{C}$  respectivamente. El programa de temperaturas empleado fue el siguiente: inicio a 50  $^{\circ}\text{C}$  con una subida hasta 220  $^{\circ}\text{C}$  a 15  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . La temperatura final, 220  $^{\circ}\text{C}$ , se mantuvo durante 10 min. En la cuantificación, se empleó una recta patrón diseñada a partir de distintas concentraciones de oleato de etilo.

Adicionalmente, con el fin de describir el perfil de ácidos grasos de la muestra lipídica, definir el peso molecular promedio y estimar el contenido total de material saponificable,

se realizó una derivatización en medio básico del aceite de partida, utilizando etóxido sódico 5% como agente derivatizante, obteniendo así los FAEE correspondientes. Para ello, se utilizó una disolución de concentración 50 mg/mL de aceite en cloroformo, a la que se añadieron 10 mg de hexadecano como patrón interno. A 0.5 mL de esta disolución se le añadió 1 mL de agente derivatizante y se dejó reaccionar en ausencia de luz a 60 °C en un incubador de agitación orbital IKA 4000 ic (Staufen, Alemania) durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción mediante la adición de 400 µL de agua destilada. La fracción lipídica se extrajo 2 veces mediante la adición de 1 mL de hexano cada vez. Se eliminó el posible contenido en agua mediante la adición de sulfato sódico anhidro, que se dejó actuar durante 2 h en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo, se analizó la muestra a través del equipo GC-FID siguiendo el método expuesto anteriormente.

#### 3.3.2.2 Determinación de índices de oxidación.

Se determinaron los índices de oxidación primaria (índice de peróxidos - PV) y secundaria (índice de p-anisidina - AnV) mediante el equipo de medida rápida FoodLab Fat (CDR s.r.l., Ginestra, Italia), basado en el método espectrofotométrico Oxiester (Kamvissis et al., 2008).

##### A. Índice de peróxidos (conforme al método oficial AOCS Cd 8-53)

Se adicionaron 5 µL de muestra a la cubeta de medida previamente preparada con los reactivos necesarios. Al cabo de 3 min de incubación a 37 °C, se procedió a la medida de la absorbancia a 505 nm. Los resultados se expresaron en meq O<sub>2</sub>/kg muestra a partir de las rectas de calibración específicas del equipo de medida.

##### B. Test de p-anisidina (conforme al método oficial AOCS Cd 18-90)

Se adicionaron 10 µL de muestra a la cubeta de medida previamente preparada con los reactivos necesarios. Al cabo de 1 min de incubación a 37 °C, se procedió a la medida de absorbancia a 366 nm. Los resultados se expresaron en unidades de p-anisidina a partir de las rectas de calibración específicas del equipo de medida.



#### 3.3.2.3 Determinación del grado e índice de acidez

Para la determinación del grado de acidez, se utilizó el equipo de medida FoodLab Fat (CDR s.r.l., Ginestra, Italia). Para ello, se realizó una medida espectrofotométrica inicial de los reactivos necesarios a 630 nm, denominada blanco. A continuación, se adicionaron 2.5 µL de muestra a la cubeta de medida y se realizó el análisis a 630 nm, expresando los resultados en grado de acidez a partir de las rectas de calibración específicas del equipo de medida.

Para la determinación del índice de acidez (AV), se utilizó la siguiente fórmula:

$$AV (mg KOH/g grasa) = \frac{56.1 \times {}^{\circ}Acidez \times 10}{M}$$

siendo M el peso molecular promedio de los triglicéridos del aceite analizado.

#### 3.3.2.4 Determinación del contenido de humedad

La determinación del contenido de humedad del aceite de partida y de los reactivos utilizados se llevó a cabo a través de una valoración Karl-Fischer en un titulador volumétrico Metrohm 877 Titrino Plus (Herisau, Suiza), utilizando para ello el reactivo valorante “hydranal composite 2” (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos). Las medidas se llevaron a cabo por triplicado y se expresaron en porcentaje de agua presente en la muestra.

#### 3.3.3 Escalado en planta piloto

Para el escalado en planta piloto, se utilizaron las condiciones óptimas obtenidas durante el desarrollo del proceso a escala laboratorio. Para ello, se mezclaron 400 g de aceite con 134 g de una mezcla que contenía EtOH (125 g) y catalizador (9 g). La reacción se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación constante, en un kiloclave Buchi (Uster, Suiza), utilizando un tanque de doble camisa de 1 L de volumen, acoplado a un criotermostato Julabo FP-50 (Seelbach, Alemania).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, ésta se detuvo mediante la adición de un 40% (p/p) de una disolución de cloruro sódico 0.5 M a 50 °C. Se trasvasó la mezcla a un embudo de decantación de 2 L de volumen y se dejó decantar durante 5 min. Una vez producida la separación de fases, se recuperó la fracción lipídica (fase superior) y se lavó

con un 40% (p/p) de agua destilada a 50 °C. La mezcla se dejó decantar en un embudo de decantación de 2 L durante 5 min y se recuperó la fracción lipídica. Dicha fracción fue posteriormente desecada en un rotavapor Buchi B-480 (Uster, Suiza) acoplado a un sistema controlador de vacío Buchi B-721 (Uster, Suiza), a 40 °C, y 10 mbar, en ausencia de luz y rompiendo el vacío con corriente de nitrógeno, obteniendo así la mezcla de FAEE de interés.

Se analizó el grado de conversión del aceite de partida mediante GC-FID, utilizando el método expuesto en el apartado 3.2.2.1. Para ello, se utilizó una disolución de 25 mg/mL de FAEE en hexano, usando hexadecano como patrón interno.

Adicionalmente, con el fin de evaluar la evolución en el proceso de oxidación durante la obtención de los FAEE, se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción tras la finalización de la misma (previamente al lavado con cloruro sódico), tras el lavado con agua destilada y una vez finalizado el proceso de evaporación. Se analizó el estado oxidativo de estas alícuotas de manera análoga a lo expuesto en el apartado 3.3.2.2.

Por último, se estudió la estabilidad oxidativa del producto obtenido y se comparó con el aceite de partida mediante el método Rancimat de inducción de oxidación en condiciones aceleradas (Metrohm 743; Herisau, Suiza). Para ello, se pesaron 3 g de muestra y se oxidaron en condiciones de temperatura de 70 °C y flujo de aire de 20 L/h. Las medidas fueron realizadas por duplicado y el resultado se expresó como tiempo de inducción (h).

#### *3.3.4 Comparativa con aceites de origen vegetal de alto contenido en PUFA n-3*

Con el fin de evaluar la posible aplicación de los resultados de optimización obtenidos en la transesterificación de otros aceites, se realizó una reacción comparativa utilizando como material de partida un aceite vegetal obtenido a partir de semillas de *Echium*. Con este fin, se realizaron reacciones de etanolisis a escala laboratorio siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.1, utilizando como condiciones de reacción las obtenidas como óptimas en el estudio desarrollado con el aceite de pescado.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización química del aceite de partida

El perfil de ácidos grasos del aceite de partida (Tabla 1) se obtuvo a partir de la derivatización realizada en medio básico, según lo expuesto en el apartado 3.2.2.1.

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos en forma de etil ésteres obtenido tras el proceso de derivatización del aceite de pescado

Ácido Graso	%Peso
C14:0	7.5
C16:0	14.5
C16:1	10.8
C16:2	1.3
C16:3	1.5
C16:4	1.4
C18:0	2.5
C18:1	9.5
C18:2	1.2
C18:3	1.6
C20:1	1.1
C18:4	3.1
C22:1	1.2
C20:4	1.2
C20:5	12.8
C24:1	1.5
C22:5	2.2
C22:6	9.3
<b>Total</b>	<b>84.0</b>

La derivatización permitió cuantificar el 84.0% de la muestra en forma de FAEE. Asumiendo que este porcentaje corresponde al máximo saponificable y con el fin de hacer los datos obtenidos a continuación más fácilmente comparables entre sí, se utilizó este porcentaje en peso normalizado y se fijó el dato obtenido tras la derivatización como el 100% de FAEE de la muestra.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron análogos a los reportados en el artículo publicado por Joseph (1985), en el que se estudió la composición de los aceites provenientes de menhanden, destacando el alto contenido en PUFA n-3 de cadena larga, al igual que en el aceite utilizado en el presente trabajo (30.4%).

Por otro lado, según lo expuesto en el apartado 1.2, a la hora de llevar a cabo reacciones de transesterificación es necesario conocer algunos parámetros que influyen sobre la calidad inicial del aceite. Estos análisis iniciales permiten discernir sobre la necesidad de someter al aceite a tratamientos previos a la reacción de transesterificación (deshidratación o desodorización entre otros) o a la utilización de manera conjunta de un catalizador ácido (en el caso de aceites de partida con elevado índice de acidez). Con este fin, se analizaron los principales factores que pueden ejercer influencia sobre el desarrollo de la reacción (Tabla 2).

Tabla 2. Índices de calidad evaluados sobre el aceite de pescado

Contenido de humedad (% p/p)	Acidez libre (mg KOH/g grasa)	Índice de peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg grasa)
0.06	0.36	5.88

Los valores de humedad y acidez libre se situaron dentro del límite aconsejado por Ma et al., (1998) para llevar a cabo reacciones de transesterificación, con lo que no fueron necesarios tratamientos previos ni el uso de catalizadores ácidos.

#### **4.2 Optimización del proceso de transesterificación**

##### *4.2.1 Estudio del efecto de la relación molar EtOH:aceite*

Para evaluar el efecto de la relación molar EtOH:aceite sobre el desarrollo de la reacción de transesterificación, se utilizaron proporciones 4:1 y 6:1. Todas las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 50 °C y un 1% (p/p) de catalizador (Figura 6).

En ambos casos se observó una mayor velocidad de reacción para la relación molar 6:1 que para la relación molar 4:1.

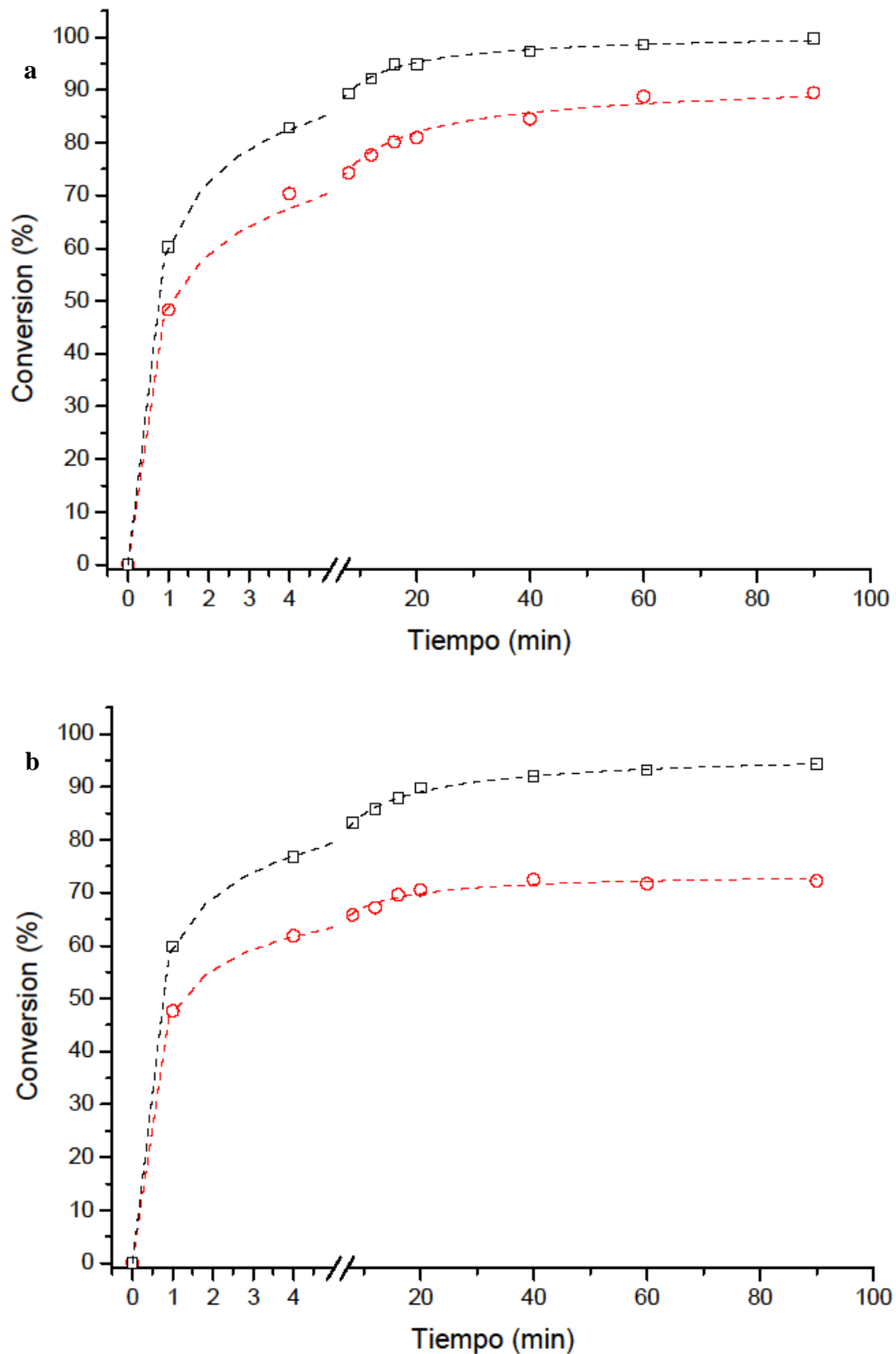


Figura 6. Evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para las distintas relaciones molares estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C. a) 1% (p/p) de etóxido sódico como catalizador;  $\square$  relación molar EtOH:aceite 6:1;  $\circ$  relación molar EtOH:aceite 4:1. b) 1% (p/p) de hidróxido potásico como catalizador;  $\square$  relación molar EtOH:aceite 6:1;  $\circ$  relación molar EtOH:aceite 4:1

En el caso de la reacción catalizada con etóxido sódico, se observó una estabilización en tiempos cercanos a 20 min para ambas relaciones molares evaluadas (Figura 6.a). Sin embargo, el uso de una relación molar mayor se tradujo en una conversión cercana al 100%, mientras que una reducción en la cantidad de etanol utilizado supuso que el grado de conversión no superase el 90%.

De manera análoga, las reacciones catalizadas con hidróxido potásico mostraron la misma tendencia, aunque las diferencias en este caso se produjeron de manera más acentuada (Figura 6.b). Sin embargo, a diferencia del etóxido sódico, el uso de una relación molar 6:1 para hidróxido potásico no supuso conversiones superiores al 95%. No obstante, la reacción progresó hasta tiempos cercanos a 60 min.

Esta diferencia entre ambas proporciones ya fue observada por otros autores. Encinar et al., (2001) observaron que el uso de una relación molar 3:1 era insuficiente, encontrando un óptimo de conversión en 9:1. En contraposición, Mendow et al., (2011), consiguieron resultados positivos ajustando la cantidad del disolvente a 4.25:1, sin embargo, se trata de casos minoritarios, y la proporción EtOH:aceite más frecuentemente utilizada es 6:1 (Fillieres et al., 1995; Anastopoulos et al., 2009). Este exceso se debe al carácter reversible de la reacción, que requiere que se desplace el equilibrio mediante un aporte extra de reactivo. Sin embargo, no se consideró el uso de una relación molar mayor, ya que también podría traducirse en el efecto contrario, debido a la reversión de la reacción, ya que produciría un aumento en la solubilidad de la glicerina producida, desplazando el equilibrio en sentido contrario a la formación de productos (Issariyakul & Dalai, 2014; Meher et al., 2006).

En base a los resultados obtenidos, se fijó la relación molar EtOH:aceite 6:1 como la óptima para alcanzar los puntos máximos de conversión.

### *4.2.2 Estudio del efecto de la temperatura y tiempo de reacción*

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la cinética de la reacción, se llevaron a cabo experimentos a 30, 40, 50 y 60 °C, utilizando un 1% de catalizador y una relación molar 6:1 EtOH:aceite, según los resultados obtenidos en el apartado anterior (Figura 7).

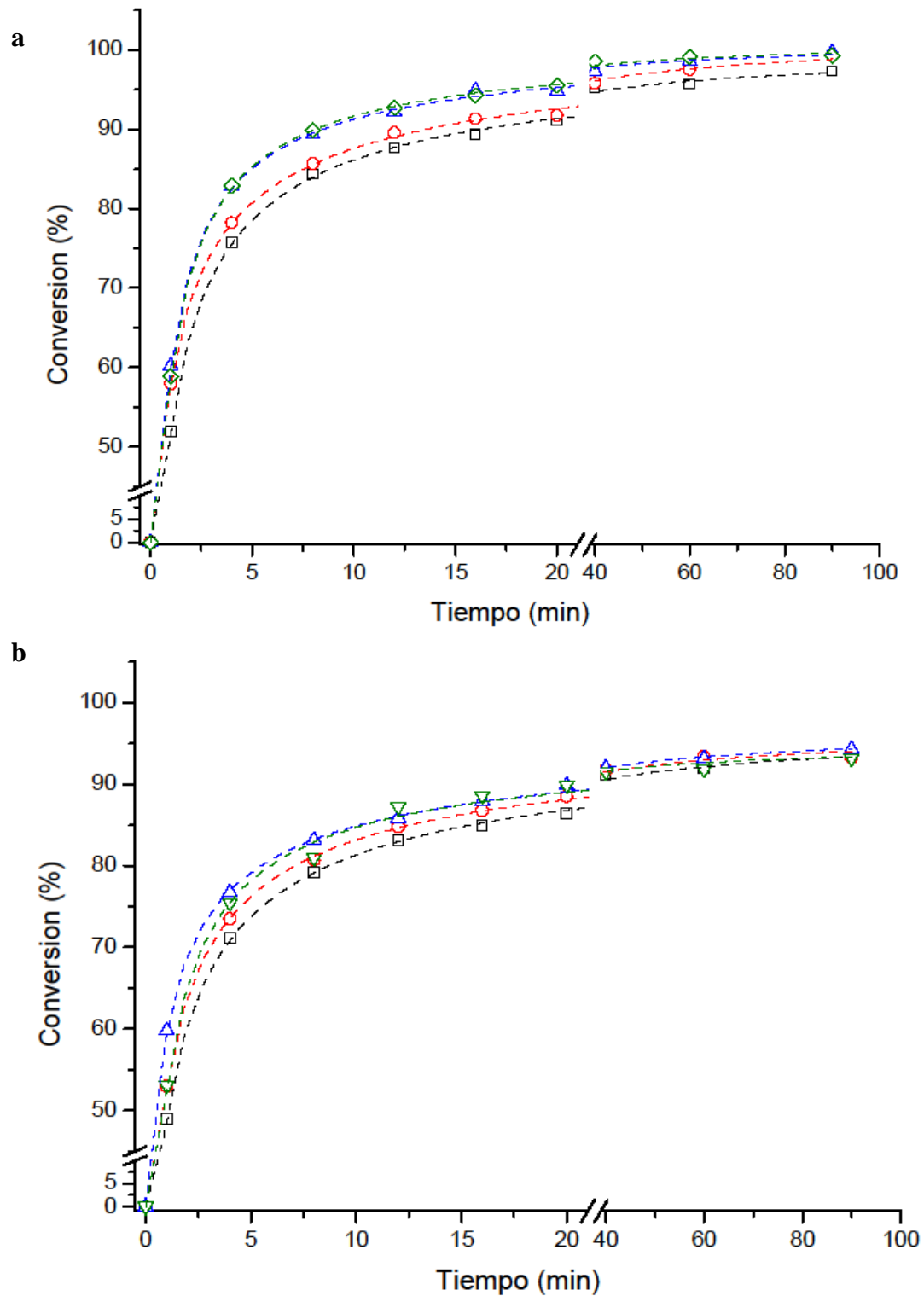


Figura 7. Evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para las distintas temperaturas estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. a) 1% (p/p) de etóxido sódico como catalizador; □ 30 °C, ○ 40 °C, △ 50 °C, ▽ 60 °C; b) 1% (p/p) de hidróxido potásico como catalizador; □ 30 °C, ○ 40 °C, △ 50 °C, ▽ 60 °C.



En las reacciones catalizadas por etóxido sódico, aquellas llevadas a cabo a 50 y 60 °C transcurrieron siguiendo la misma curva cinética, sin observarse diferencias apreciables (Figura 7.a). Para ambas temperaturas, una vez transcurridos 20 min, los porcentajes de conversión alcanzaron el 95%, mientras que a 30 y 40 °C se había alcanzado un 90%. Una vez transcurrido el tiempo máximo de reacción (90 min) estas diferencias se hicieron menos notorias, alcanzando conversiones superiores al 99%, a excepción de la transcurrida a 30 °C, que se detuvo en un 97% de conversión.

En el caso del uso de hidróxido potásico, las tendencias observadas fueron similares (Figura 7.b). A los 20 min de reacción, las cinéticas a 50 y 60 °C transcurrieron de manera similar, alcanzando una conversión del 89%. El comportamiento a 40 °C fue más parecido a las cinéticas de mayor temperatura que en el caso del etóxido sódico. Por último, a 30 °C, las diferencias encontradas a los 20 min (86% de conversión) desaparecieron una vez alcanzado el tiempo máximo de reacción, donde todas las cinéticas obtuvieron conversiones cercanas al 94%.

De manera análoga a lo reportado en la bibliografía, la conversión de la reacción se ve favorecida con un aumento de la temperatura. Las principales diferencias se observan en tiempos cortos de reacción, ya que la reacción transcurre de manera más rápida a temperaturas más elevadas. Sin embargo, no parece ejercer un efecto relevante sobre la conversión final, ya que una vez transcurridos 90 min, los porcentajes de conversión eran similares en todos los casos.

Leung y Guo (2006) analizaron la influencia de la temperatura sobre el porcentaje de conversión de manera conjunta con el tiempo de reacción necesario. Observaron resultados similares, estableciendo la temperatura óptima en 45 °C para aceite de canola, y 60 °C para aceites de fritura, aunque ambos pueden alcanzar máximos de conversión a temperatura ambiente. Otros estudios llegaron a estos mismo resultados, sin embargo, existen discrepancias sobre la conveniencia del empleo de altas temperaturas (Kucek et al., 2007; Encinar et al., 2001; Bikou et al., 1999) o tiempos más largos (Cernoch et al., 2010; da Silva et al., 2006).

En base a los resultados obtenidos, se observó que cualquiera de las temperaturas utilizadas podría ser válida para obtener una conversión máxima. Sin embargo, las reacciones llevadas a cabo a 50 y 60 °C se desarrollaron a una velocidad más alta,

obteniendo así máximos de conversión en tiempos más cortos de reacción. Entre estas dos cinéticas se valoraron aspectos económicos así como el efecto teórico de la temperatura sobre los compuestos de oxidación, estableciendo de este modo un óptimo de temperatura de 50 °C.

#### 4.2.3 Estudio del tipo y cantidad de catalizador

Una vez evaluadas las variables tiempo, temperatura y relación molar EtOH:aceite, se procedió a determinar la cantidad de catalizador idónea para optimizar el proceso de conversión, llevando a cabo las reacciones bajo las condiciones óptimas previamente obtenidas.

En los experimentos llevados a cabo anteriormente, se fijó una cantidad de catalizador de un 1%. Sin embargo, no se tuvo en cuenta el posible porcentaje de catalizador inactivado. Tal y como se ha descrito en el apartado 1.2, el contenido en agua y acidez libre del aceite puede producir reacciones no deseables, reduciendo el rendimiento del proceso. En el caso de la acidez, se ha observado que incluso pequeñas cantidades de ácidos grasos libres pueden reaccionar con el catalizador, neutralizando parte del mismo y reduciendo su disponibilidad para la reacción (Turck, 2002).

La presencia de agua en el medio de reacción se ha visto que reduce de manera significativa la conversión de la transesterificación (Ma et al., 1998). Por esta razón, es aconsejable mantener todos los reactivos en un estado lo más anhidro posible.

La posible inactivación del catalizador utilizado derivado de alcóxidos de metales alcalinos por el contenido en agua, acidez libre e índice de peróxidos puede ser compensada por la adición de una cantidad extra del mismo. Para este fin, Hoy y Xu, (2001) estimaron que el porcentaje de metóxido sódico inactivado en base a la mezcla podía ser determinado por la Ecuación 1:

$$NaOCH_3 \text{ inactivado (\%p/p)} = 3 \times Wc + 0.1 \times AV + 0.054 \times PV$$

*Ecuación 1. Porcentaje de catalizador inactivado (Hoy & Xu, 2001).*

donde  $Wc$  es el contenido en agua del aceite de partida (% p/p),  $AV$  es el valor de acidez (mg KOH/g aceite) y  $PV$  es el índice de peróxidos (mEq O<sub>2</sub>/kg aceite).

Para la optimización del etóxido sódico, se procedió a ajustar el aporte adicional necesario en base a la Ecuación 1. De este modo, según los resultados obtenidos en la caracterización previa del aceite, se estimó una inactivación de un 0.77%, con lo que se utilizó una cantidad total de 1.77% (p/p) de catalizador.

En lo relativo a las reacciones catalizadas por hidróxido potásico, se procedió a ajustar la cantidad en función de la pureza del reactivo (54.5%), determinada a partir de la metodología descrita en el apartado 3.3.2.4. Adicionalmente, se preparó una disolución del reactivo en etanol según las proporciones fijadas, y se deshidrató mediante la adición de tamiz molecular durante 8 h.

Los resultados de conversión de las reacciones llevadas a cabo tras el ajuste de las cantidades necesarias de catalizador se muestran en la Figura 8.

El ajuste del contenido en etóxido sódico incrementó de manera sustancial la velocidad de la reacción (Figura 8.a). En el primer minuto, la conversión sobrepasó el 81%. Se alcanzó una conversión completa a los 16 min, y se mantuvieron estos valores durante todo el transcurso, hasta alcanzar el tiempo final de reacción. Este ajuste por tanto permite obtener resultados positivos en intervalos de tiempos de reacción más cortos que la reacción usando el catalizador sin ajustar.

En el caso del hidróxido potásico, se observaron resultados similares (Figura 8.b). Ambos ajustes aumentaron la velocidad de reacción, consiguiendo un punto máximo de conversión en torno a los 12 min. En la reacción desarrollada con el catalizador sin deshidratar, el máximo de conversión no consiguió superar a los obtenidos en experimentos anteriores. Además, se observó un ligero descenso en la conversión cuando se superaron los 20 min de reacción. Sin embargo, el efecto de la deshidratación del catalizador fue muy positivo. En este caso, se consiguió una conversión cuantitativa una vez transcurridos 12 min de reacción, y se mantuvo estable a lo largo del tiempo.

Al ajustar el contenido de hidróxido potásico según la pureza, el aporte de agua fue mayor. Al evaluar la evolución de esta reacción, se puede observar que ese aporte de agua limita el porcentaje final de conversión, alcanzándose máximos de 94%, facilitando además la reacción adversa de saponificación de los FAEE obtenidos y disminuyendo el rendimiento, tal y como se puntualizó en el apartado 1.2. Los resultados obtenidos

corroboran por tanto la necesidad de mantener los reactivos en condiciones anhidras (Meher et al., 2006).

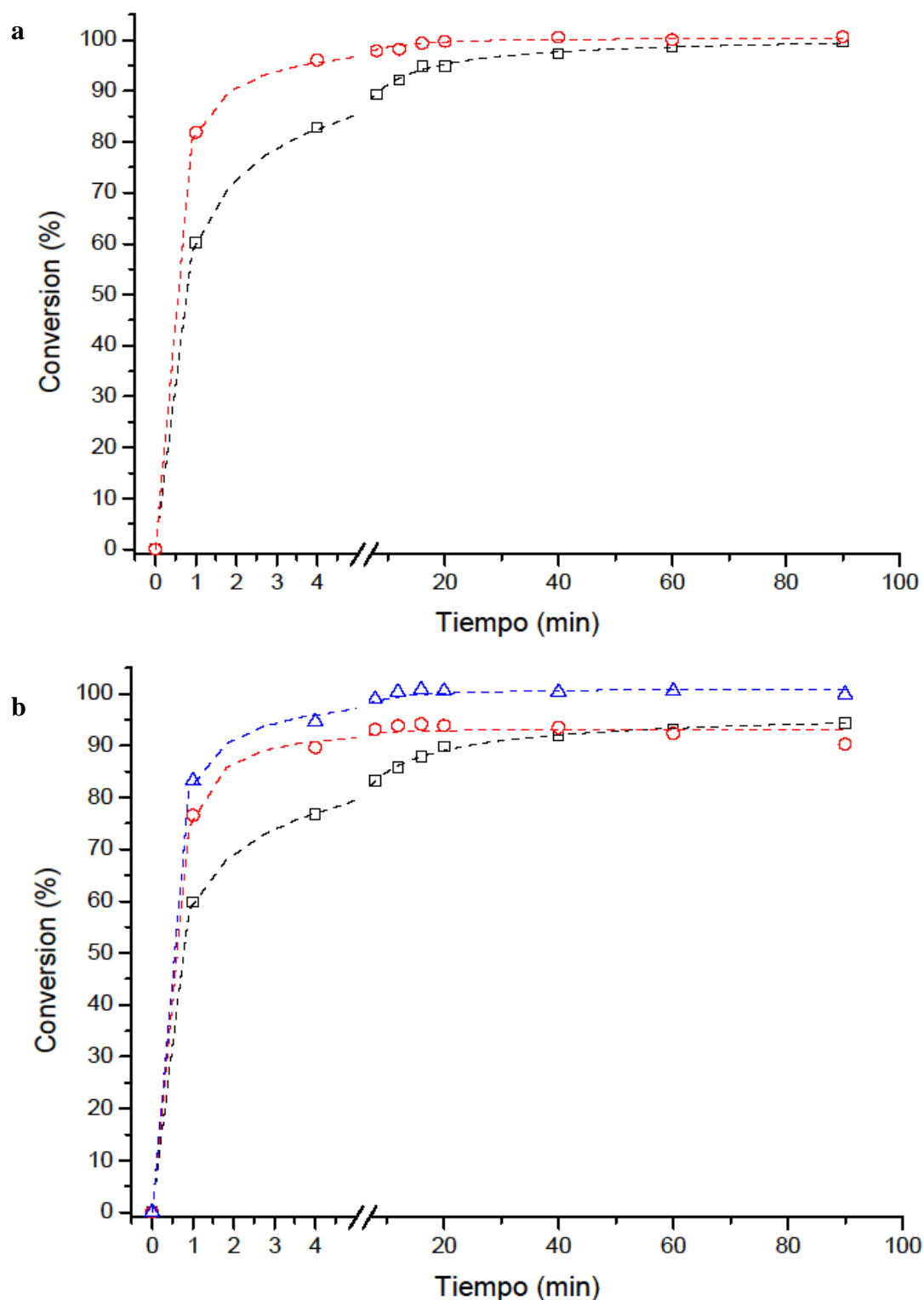


Figura 8. Evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para las distintas cantidades de catalizador estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. a) Etóxido sódico  $\square$  1% (p/p),  $\circ$  1.77% (p/p) (ajustado según la Ecuación 1); b) Hidróxido potásico  $\square$  1% (p/p),  $\circ$  1% (p/p) (ajustado según pureza),  $\triangle$  1% (p/p) (deshidratado).

Al comparar esta influencia según el tipo de catalizador, se observó que las cinéticas optimizadas para ambos reactivos transcurrieron de manera análoga, y no se encontraron diferencias apreciables. Estos resultados corroboran las dificultades que existen en la elección del catalizador para los procesos de transesterificación.

En nuestro caso, la elección del catalizador se basó en los tratamientos previos necesarios para la consecución de los mejores resultados. Pese a que la cantidad final necesaria de etóxido sódico fue mayor que el hidróxido potásico, tiene especial relevancia que con el primer catalizador no se requirió ningún tratamiento de deshidratación. Además, el ajuste de etóxido se realizó según la ecuación dependiente de las características del aceite de partida, con lo que ese dato teórico podría ser reducido con un aceite de mayor calidad inicial. Sin embargo, el hidróxido potásico, debido a su elevada higroscopicidad es muy susceptible de necesitar el tratamiento de deshidratación. Por tanto, y según lo expuesto anteriormente, se estableció el etóxido sódico como catalizador óptimo entre los dos utilizados.

#### *4.2.4 Estudio de la evolución del estado de oxidación*

El índice de peróxidos (PV), que mide la concentración de hidroperóxidos como productos de oxidación primaria; y el índice de anisidina (AnV), que mide los niveles de  $\alpha$ - y  $\beta$ -alquenes como productos de oxidación secundaria, constituyen los parámetros más utilizados para determinar la calidad de un aceite o grasa. La suma de  $2 \times PV$  y AnV se conoce como el valor total de oxidación (TOTOX) y es un parámetro que proporciona una lectura más fidedigna del estado global de oxidación (Wai et al., 2009).

En líneas generales, y para todos los parámetros evaluados, se observó un descenso en los valores de PV y AnV a lo largo del tiempo de las reacciones de transesterificación. Además, este descenso se produjo de manera muy marcada en los primeros minutos de reacción, y se estabilizó con el tiempo. En el caso concreto de PV, se observó mayor dispersión de valores durante el inicio de la reacción, aunque por regla general, una vez alcanzados 20 min, los resultados fueron más homogéneos. La caída descrita para los valores obtenidos de AnV fue igualmente acentuada en el primer minuto de reacción, sin embargo, se produjo un leve decremento constante a lo largo del tiempo.

Pese a que la tendencia fue la misma para todos los parámetros evaluados, se encontraron ligeras diferencias en la evolución temporal de los valores TOTOX cuando se compararon para cada condición individual.

En el caso de las reacciones llevadas a cabo con distintas relaciones molares etanol:aceite, el valor TOTOX fue prácticamente el mismo en el tiempo final de reacción. Sin embargo, esta caída pareció producirse más rápidamente en la reacción catalizada con etóxido sódico y relación molar 6:1 (Figura 9).

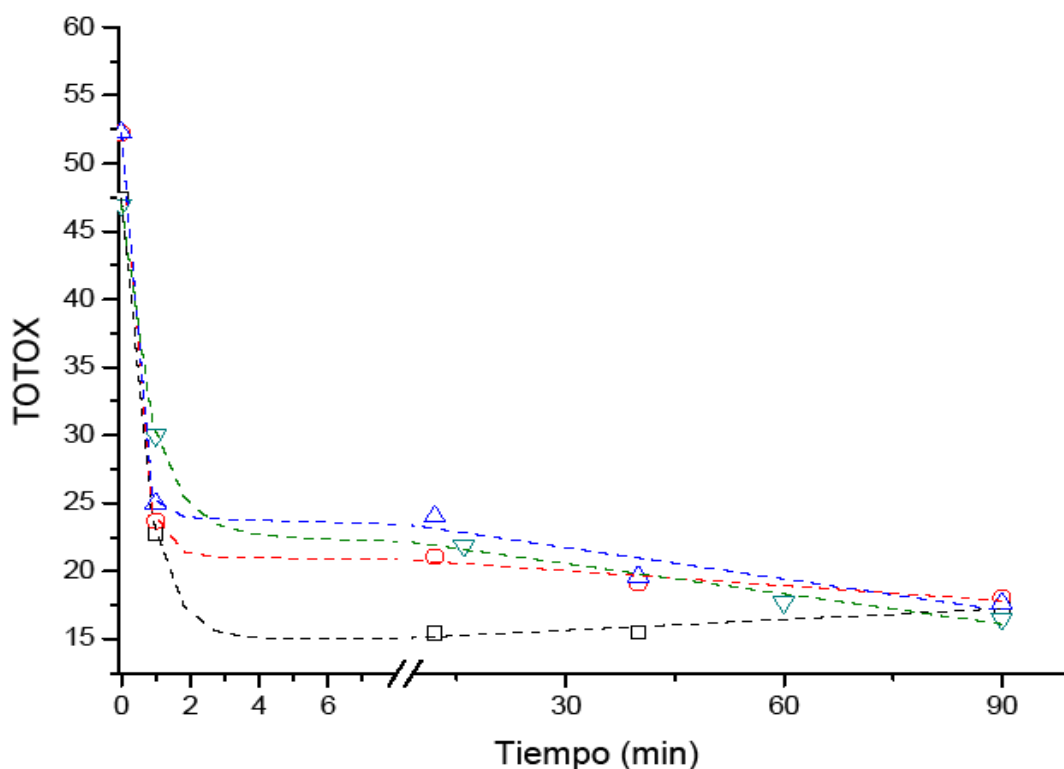


Figura 9. Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las distintas relaciones molares estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C. Δ relación molar etanol:aceite 4:1 - 1% NaEtOx, □ relación molar etanol:aceite 6:1 - 1% NaEtOx, ○ relación molar etanol:aceite 4:1 - 1% KOH, ▽ relación molar etanol:aceite 6:1 - 1% KOH.

Tabla 3. Índice de peróxidos (PV) y de anisidina (AnV) obtenidos durante distintos tiempos de la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C según la relación molar EtOH:aceite utilizada.

Tiempo	1% NaEtOx				1% KOH			
	relación molar etanol: aceite 4:1		relación molar etanol: aceite 6:1		relación molar etanol: aceite 4:1		relación molar etanol: aceite 6:1	
	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV
0	9.8	32.7	8.4	30.5	9.8	32.7	8.2	30.5
1	2.0	20.9	2.4	18.0	2.0	19.7	4.5	21.0
4	1.5	-	1.5	-	1.3	-	2.0	-
8	1.1	-	1.0	-	1.5	-	1.3	-
12	1.0	22.0	0.5	14.4	1.3	18.4	4.8	-
16	1.1	-	1.4	-	1.2	-	1.9	18.0
20	0.7	-	1.8	-	1.0	-	3.1	-
40	1.3	17.1	0.7	14.1	1.3	16.5	2.5	-
60	1.8	-	1.6	-	1.3	-	1.0	15.8
90	1.0	15.6	1.6	14.2	1.4	15.3	1.1	14.4

La comparativa de los valores de oxidación llevada a cabo a distintas temperaturas de reacción, reflejó resultados dispares. La tendencia pareció ser la misma y se vio un descenso en los valores TOTOX en los minutos iniciales de reacción. Sin embargo, en el caso del uso de hidróxido potásico, este descenso pareció producirse de manera continuada a 30, 40 y 50 °C hasta tiempos finales de reacción, hecho que no se observó ni a 60 °C con hidróxido potásico, ni tampoco en las reacciones con etóxido sódico para ninguna temperatura (Figura 10).

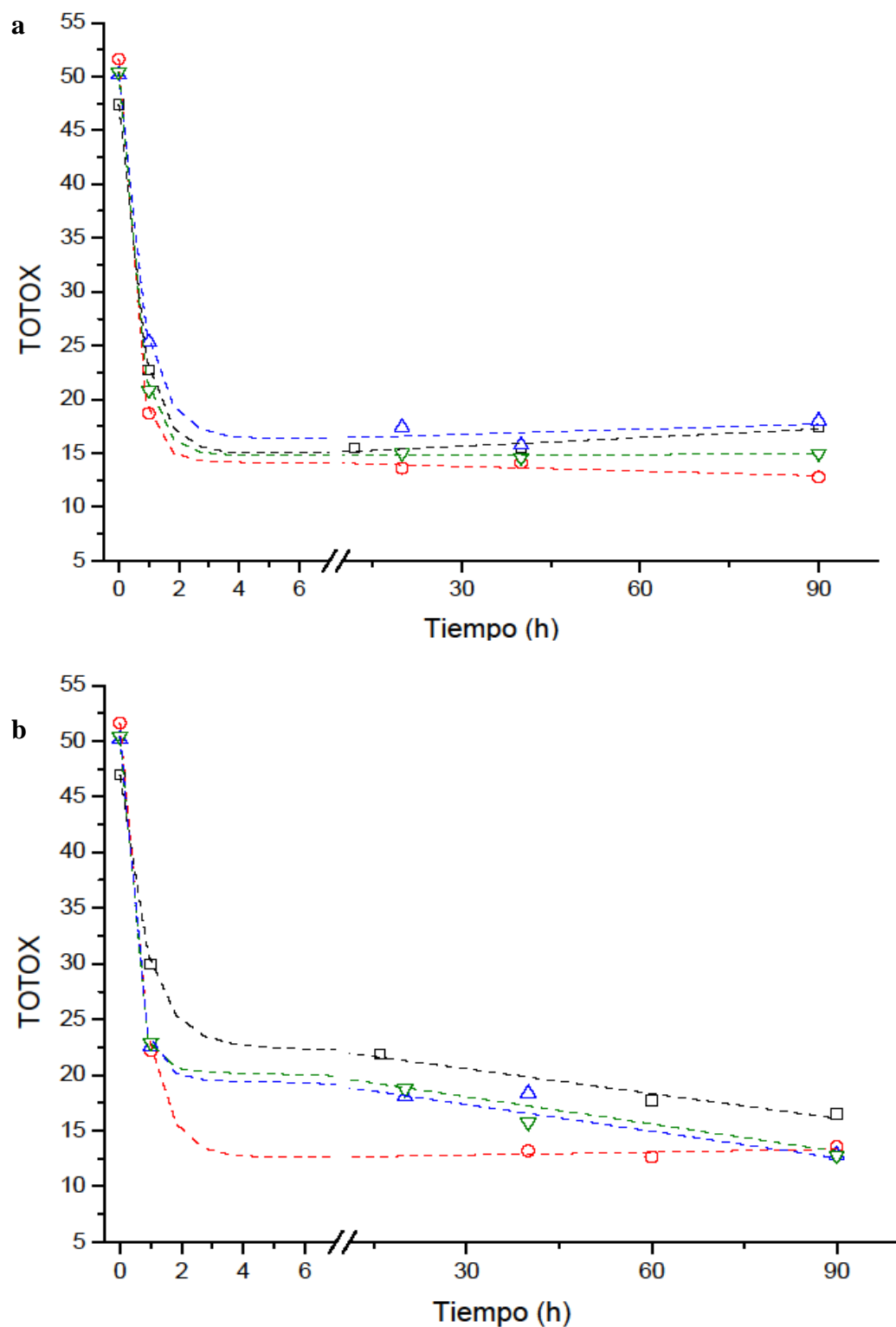


Figura 10. Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las distintas temperaturas estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. a) 1% (p/p) etóxido sódico como catalizador; ▽ 30 °C, △ 40 °C, □ 50 °C, ○ 60 °C; b) 1% (p/p) hidróxido potásico como catalizador; ▽ 30 °C, △ 40 °C, □ 50 °C, ○ 60 °C.



Tabla 4. Índice de peróxidos (PV) y de anisidina (AnV) obtenidos durante distintos tiempos de la reacción de etanolisis química de aceite de pescado según la temperatura estudiada, utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1.

Tiempo	1% NaEtOx							
	30 °C		40 °C		50 °C		60 °C	
	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV
0	9.0	32.5	8.4	33.3	8.4	30.5	9.6	32.5
1	1.6	17.7	3.7	18.0	2.4	18.0	0.5	17.7
4	0.8	-	2.3	-	1.5	-	0.5	-
8	0.7	-	0.9	-	1.0	-	0.3	-
12	0.7	-	1.4	-	0.5	14.4	0.3	-
16	1.3	-	4.8	-	1.4	-	0.3	-
20	0.6	13.8	1.3	14.8	1.8	-	0.3	13.0
40	0.4	13.9	1.0	13.8	0.7	14.1	0.3	13.5
60	0.3	-	2.1	-	1.6	-	0.3	-
90	0.8	13.5	1.8	14.5	1.6	14.2	0.4	12.0

Tiempo	1% KOH							
	30 °C		40 °C		50 °C		60 °C	
	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV
0	9.0	32.5	8.4	33.3	8.2	30.5	9.6	32.5
1	2.0	19.0	2.4	17.7	4.5	21.0	1.8	18.6
4	1.5	-	1.6	-	2.0	-	1.4	-
8	1.4	-	1.6	-	1.3	-	2.2	-
12	1.2	-	1.6	-	1.8	-	-	-
16	1.5	-	1.8	-	1.9	18.0	-	-
20	1.2	16.3	1.5	15.1	3.1	-	-	-
40	1.0	13.8	1.8	14.7	2.5	-	0.5	12.1
60	1.1	-	0.8	-	1.0	15.8	0.6	11.4
90	0.3	12.2	0.6	11.6	1.1	14.4	0.9	11.8

Por último, el uso de una cantidad superior de hidróxido potásico en la reacción derivó en una caída aparentemente mayor de los niveles de TOTOX, debido especialmente a un descenso de AnV. Esta caída no fue tan marcada en el caso del hidróxido potásico deshidratado. Por el contrario, no se observaron diferencias relevantes en la evolución de los niveles de oxidación al ajustar el contenido de etóxido sódico (Figura 11).

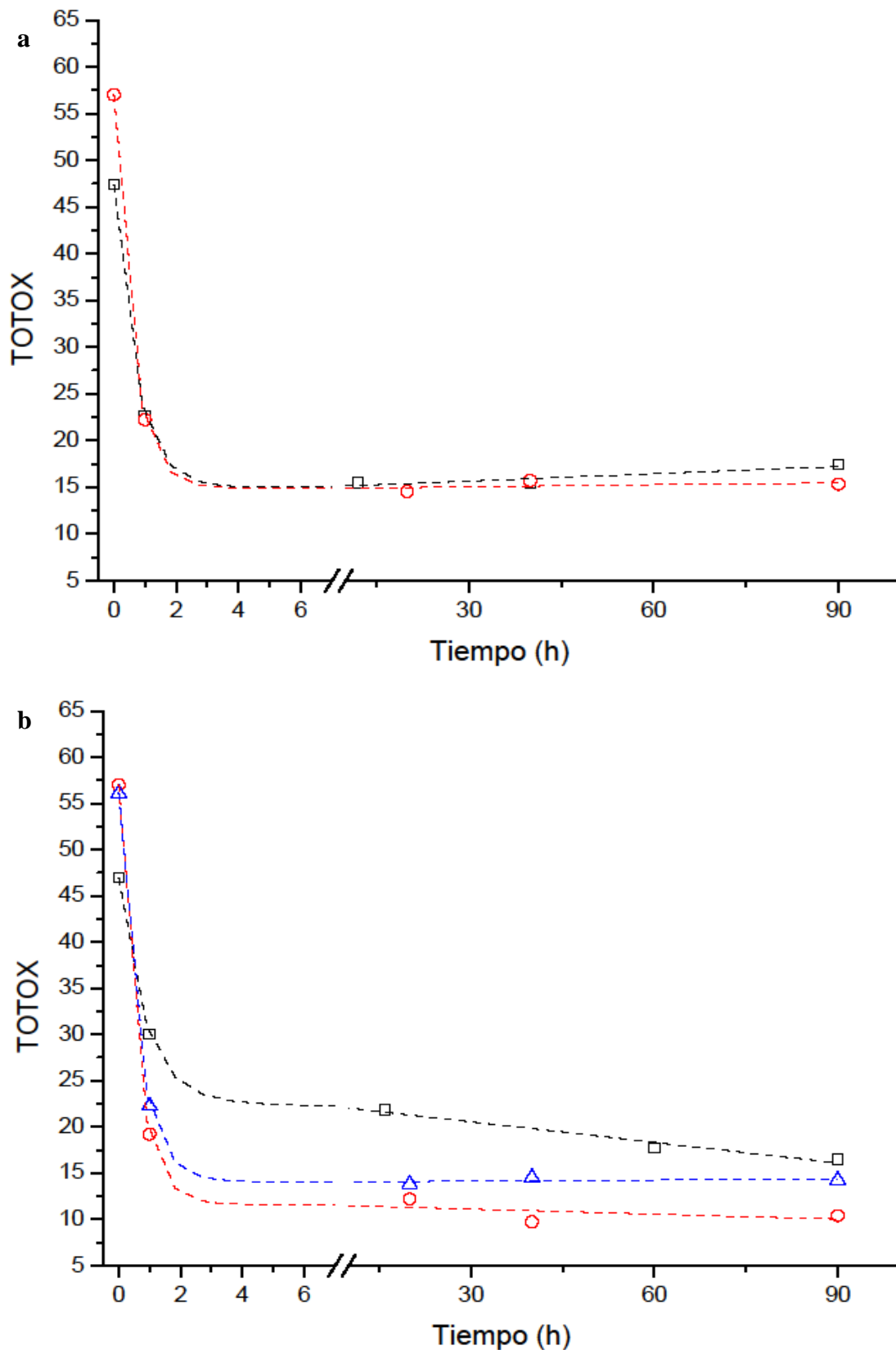


Figura 11. Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las distintas cantidades de catalizador estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. a) Etóxido sódico □ 1% (p/p), ○ 1.77% (p/p) (ajustado según la Ecuación 1); b) Hidróxido potásico □ 1% (p/p), ○ 1% (p/p) (ajustado según pureza), △ 1% (p/p) (deshidratado).

Tabla 5. Índice de peróxidos (PV) y de anisidina (AnV) obtenidos durante distintos tiempos de la reacción de etanolisis química de aceite de pescado según la cantidad de catalizador estudiada a 50 °C, utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1.

Tiempo	KOH						NaEtox			
	1%		1% pureza		1% deshidratado		1%		1% fórmula	
	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV	PV	AnV
0	8.2	30.5	11.4	34.2	10.8	34.5	8.4	30.5	11.4	34.2
1	4.5	21.0	2.4	14.4	2.6	17.0	2.4	18.0	2.7	16.8
4	2.0	-	1.3	-	1.8	-	1.5	-	2.0	-
8	1.3	-	1.2	-	1.2	-	1.0	-	0.8	-
12	-	-	1.5	-	1.0	-	0.5	14.4	0.6	-
16	1.9	18.0	0.9	-	1.1	-	1.4	-	1.6	-
20	3.1	-	1.1	10.0	1.0	11.8	1.8	-	0.9	12.7
40	2.5	-	0.5	8.8	1.3	11.9	0.7	14.1	1.3	13.2
60	1.0	15.8	1.0	-	1.2	-	1.6	-	1.5	-
90	1.1	14.4	1.4	7.6	1.3	11.7	1.6	14.2	1.2	12.9

Como se explicó en el apartado 1.3, en una primera etapa la oxidación de los PUFA da lugar a hidroperóxidos lipídicos. El proceso continúa con la degradación de estos hidroperóxidos debido a su inestabilidad, de tal manera que en estados avanzados de oxidación, o bien en situaciones altamente catalizadoras de oxidación, el nivel de hidroperóxidos tiende a disminuir a costa de un aumento en las concentraciones de productos volátiles y de productos de finalización no volátiles (Figura 12).

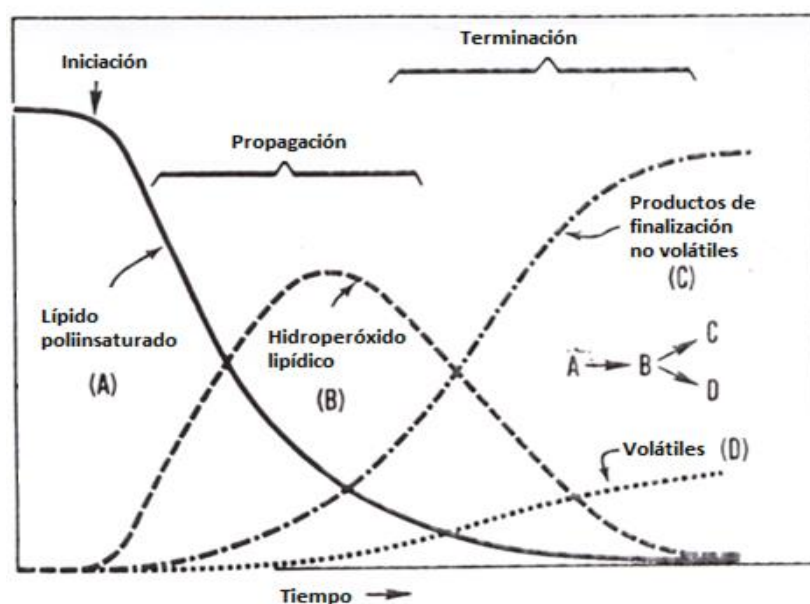


Figura 12. Desarrollo del proceso de oxidación y evolución de los distintos compuestos de oxidación.

Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestros experimentos, no reflejaron un aumento de los hidroperóxidos ni de los compuestos volátiles, sino todo lo contrario, observándose una caída generalizada de ambos índices.

Una de las posibles razones que podrían explicar la caída en compuestos de oxidación podría estar relacionada con el carácter más polar que tienden a presentar los compuestos de oxidación. Este hecho podría hacer pensar que en la etapa de lavado de las muestras tomadas a lo largo de las reacciones se eliminaran estos compuestos en la fase acuosa. Con el fin de poder valorar más en detalle esta hipótesis, se realizó un experimento adicional en el que se midieron los niveles de oxidación sobre las muestras sin llevar a cabo la etapa de lavado. Para ello, en los tiempos de reacción establecidos, se tomaron muestras por duplicado; una de ellas siguió el proceso descrito en el apartado 3.2.1 mientras que la otra se sometió al análisis de los valores de oxidación sin tratamientos previos de lavado.

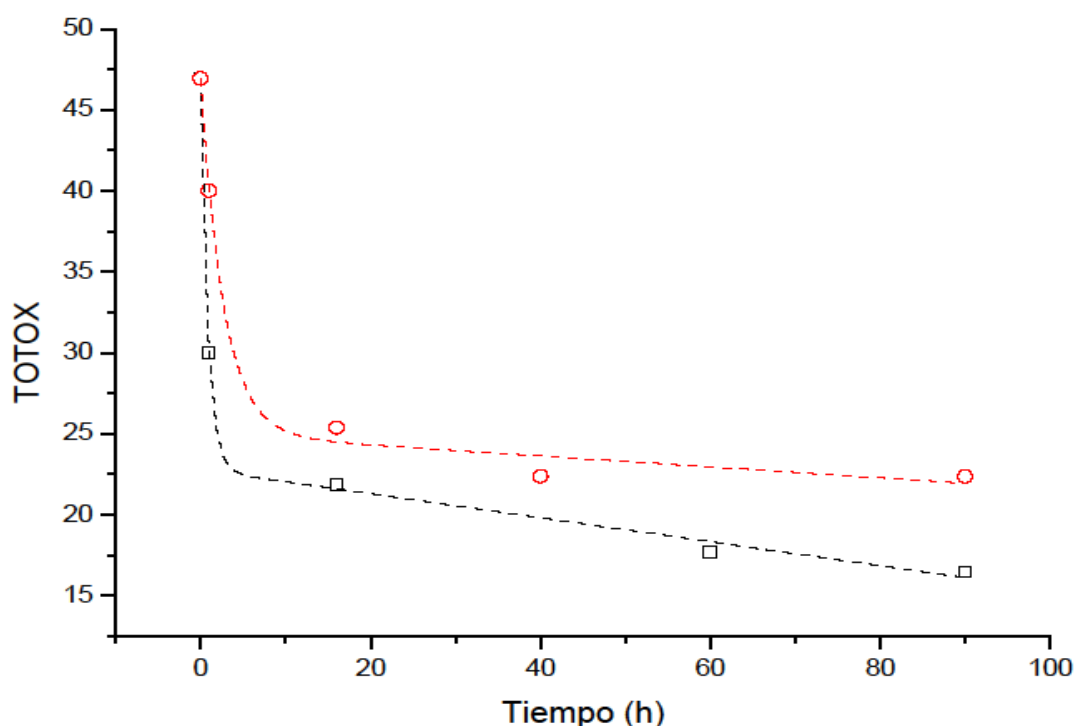


Figura 13. Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las reacciones de etanolisis química llevadas a cabo a 50 °C, una relación molar EtOH:aceite 6:1 y un 1% de hidróxido potásico como catalizador; □ muestra sometida a lavado ○ muestra sin lavar.

Si bien las muestras que no fueron lavadas describieron una caída menos marcada, los valores fueron igualmente en descenso respecto a los valores iniciales de oxidación del aceite de partida (Figura 13). Esta diferencia sí podría deberse a que durante la etapa de lavado se elimina una parte de estos compuestos de oxidación, sin embargo no podría definirse como la causa principal del descenso observado.

Por tanto, teniendo en cuenta que la caída en los índices de oxidación estuvo relacionada con la propia reacción de transesterificación, queda pensar que en nuestro caso es posible que los productos iniciales de oxidación se hayan degradado hacia productos de finalización no volátiles (Figura 12) y que no serían detectados mediante la metodología utilizada. En este sentido, Gardner et al., (1996) describieron la formación de hidroxiácidos a partir de reacciones de hidroperóxidos de ácido linoleico con álcali. Fournier et al., (2006) evaluaron la influencia del tratamiento térmico sobre aceites ricos en PUFA, verificando la formación de monómeros cíclicos de ácidos grasos, polímeros e isómeros. Además, corroboraron la mayor susceptibilidad de los PUFA a sufrir estos procesos de degradación.

Independientemente de la causa de la disminución en los índices de oxidación, estudios previos han mostrado esta caída de los valores de oxidación. Ikwuagwu et al., (2000) observaron un ligero descenso de los valores de PV. Xin et al. (2008) por su parte observaron que, independientemente del nivel inicial de oxidación, tras el proceso de transesterificación, los valores finales de PV disminuyeron en todos los casos estudiados hasta valores similares. Sin embargo, es importante señalar que las referencias previas en la bibliografía, además de ser limitadas respecto a esta información, únicamente indican valores finales de oxidación tras el proceso de transesterificación. El presente estudio muestra por primera vez la monitorización de los índices de oxidación a lo largo de una reacción de transesterificación química.

Ya se mencionó en el apartado 1.3 la importancia de la adición de antioxidantes a muestras lipídicas altamente susceptibles a la oxidación como forma de estabilización oxidativa de las mismas. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos evidenciaron la degradación de compuestos de oxidación a lo largo del tiempo de transesterificación, este dato sería indicativo de que la reacción de oxidación efectivamente progresó como consecuencia de las condiciones aplicadas. Por tanto, se quiso valorar el efecto que podría ejercer la presencia de antioxidantes en el medio de reacción. Con este fin, siguiendo la

metodología descrita en el apartado 3.2.1, se añadieron 300 ppm de  $\alpha$ -tocoferol a la mezcla aceite-hexadecano, previamente a la adición del etanol y el catalizador. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se observó que el grado de conversión así como la cinética descrita fueron similares a aquellas muestras que no contenían antioxidante. Igualmente, en lo relativo a los niveles de oxidación, no se encontraron diferencias apreciables. No obstante, dada la falta de información disponible en la bibliografía sobre el uso de antioxidantes en el curso de reacciones de transesterificación química, serían interesantes estudios adicionales más profundos en este sentido, explorando un rango de concentración más amplio de antioxidante, así como otros tipos de antioxidantes y/o combinaciones de los mismos.

### ***4.3 Escalado del proceso en planta piloto***

Se llevó a cabo la reacción según lo expuesto en el apartado 3.3.3. Para ello, se seleccionaron las condiciones óptimas obtenidas anteriormente, esto es, una relación molar EtOH:aceite 6:1, una temperatura de 50 °C y el uso de etóxido sódico como catalizador, ajustando la cantidad según la Ecuación 1. En base a los resultados obtenidos en la optimización, se detuvo la reacción una vez transcurridos 40 min.

Tras un primer lavado de la mezcla de reacción con NaCl, las fases acuosa y oleosa se separaron correctamente mientras la mezcla continuaba en caliente. Tras esta separación, se recuperó un 97.1% de la fase oleosa. De manera análoga, un segundo lavado con agua destilada produjo una clara separación de fases, de la que se recuperó un 95% de fase oleosa. Por último, tras la evaporación en rotavapor, se obtuvo un balance final de materia de 93.6% (375 g).

El porcentaje de conversión del aceite de partida en FAEE fue del 99.9%. El perfil de FAEE se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos en forma de etil ésteres obtenido tras el proceso de escalado en planta piloto del aceite de pescado.

Ácido Graso	% peso
<b>C14:0</b>	7.3
<b>C16:0</b>	14.3
<b>C16:1</b>	10.7
<b>C16:2</b>	1.0
<b>C16:3</b>	1.5
<b>C16:4</b>	1.5
<b>C18:0</b>	2.4
<b>C18:1</b>	9.6
<b>C18:2</b>	1.3
<b>C18:3</b>	1.2
<b>C20:1</b>	1.2
<b>C18:4</b>	2.9
<b>C22:1</b>	1.3
<b>C20:4</b>	1.3
<b>C20:5</b>	13.2
<b>C24:1</b>	1.3
<b>C22:5</b>	2.3
<b>C22:6</b>	9.7
<b>Total</b>	84.0

Los índices de oxidación obtenidos en las distintas etapas del proceso se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de oxidación y estabilidad oxidativa del aceite de pescado y del FAEE obtenido tras el proceso de escalado en planta piloto.

Alicuota	PV	AnV	TOTOX	Estabilidad oxidativa (h)
<b>Aceite de partida</b>	9.4	28.5	47.3	6.6
<b>Previo a la etapa de lavado</b>	4.5	9.1	18.1	-
<b>Tras la etapa de lavado</b>	1.5	7.2	13.4	-
<b>Tras la evaporación</b>	0.3	9.4	10.0	8.1

De manera análoga a lo ocurrido en los experimentos a escala laboratorio, el producto obtenido reflejó un descenso marcado en los niveles de oxidación primaria y secundaria.

Los valores de PV disminuyeron de manera progresiva después de cada etapa. En cuanto a los niveles de AnV, tras la etapa final de evaporación, hubo un ligero aumento, que pudo ser debido a la exposición a la temperatura a la que se llevó a cabo el proceso,

estando así de acuerdo con la caída paralela que se produjo en el valor de PV en esta misma etapa.

Por otra parte, se observó una mayor estabilidad oxidativa de los FAEE frente al aceite de partida de acuerdo con los valores de tiempo de inducción obtenidos (Tabla 7). Sin embargo, estos resultados son opuestos a los reportados por Ikwuagwu et al., (2000) donde se observó que tanto el proceso de refinado como el de transesterificación supuso un descenso en la estabilidad oxidativa del producto obtenido, justificado por una disminución en la viscosidad del producto, lo que permite una mayor difusión y un mayor contacto entre el oxígeno y las moléculas de FAEE. No obstante, tras el proceso de interesterificación llevado a cabo por Basturk et al., (2007), se observó que los niveles de oxidación después de una etapa de almacenamiento a temperaturas prooxidantes, fueron superiores en el aceite de partida que en el producto derivado de la interesterificación.

Por tanto, después de evaluar todos los parámetros, se puede concluir que el proceso de transesterificación en las condiciones obtenidas fue escalable a producciones de mayor volumen, sin verse alterados negativamente los valores finales de conversión ni de oxidación. En cualquier caso, teniendo en cuenta la degradación de compuestos de oxidación que fue evidenciada, serían necesarios estudios adicionales que permitieran caracterizar qué tipo de compuestos de oxidación finales existirían en el producto final diferentes a hidroperóxidos y aldehídos volátiles, para poder garantizar así la seguridad del producto obtenido, o bien plantear la necesidad de etapas posteriores de procesado que permitieran purificar el producto eliminando dichos productos residuales de oxidación.

### ***4.4 Comparativa con aceites de origen vegetal de alto contenido en PUFA n-3***

De manera análoga al apartado 4.1, se realizó en primer lugar una derivatización en medio básico del aceite de partida con el fin de describir el perfil de ácidos grasos presente en la muestra de aceite de echium (Tabla 8)



Tabla 8. Perfil de ácidos grasos en forma de etil ésteres obtenido tras el proceso de derivatización del aceite de echium.

Ácido Graso	%Peso
<b>C16:0</b>	6.3
<b>C18:0</b>	3.1
<b>C18:1</b>	13.8
<b>C18:2</b>	13.6
<b>C18:3 n-6</b>	10.3
<b>C18:3 n-3</b>	29.9
<b>C18:4</b>	13.0
<b>Total</b>	90.0

El perfil de ácidos grasos en el aceite de echium es muy dependiente de la variedad con la que se trabaje. Los datos obtenidos fueron análogos a los reportados por Berti et al., (2007), en los que se destaca el alto porcentaje en SDA y ALA.

Al igual que con el aceite de pescado, y asumiendo que el porcentaje total de FAEE obtenido tras la derivatización corresponde al máximo saponificable, con el fin de hacer los datos obtenidos a continuación más fácilmente comparables entre sí, se utilizó este porcentaje en peso normalizado y se fijó el dato obtenido tras la derivatización como el 100% de FAEE de la muestra.

Los resultados de los análisis previos realizados sobre el aceite de partida se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Índices de calidad evaluados sobre el aceite de echium

Contenido de humedad (% p/p)	Acidez libre (mg KOH/g grasa)	Índice de peróxidos (mEq O <sub>2</sub> /kg grasa)
0.02	0.10	0.52

Para el proceso de etanolisis, se ajustó el contenido de etóxido sódico según la Ecuación 1, obteniéndose un porcentaje de catalizador inactivado de 0.1%, con lo que se utilizó un 1.1% (p/p) de etóxido sódico en la mezcla de reacción. La curva obtenida se expresa en la Figura 14.

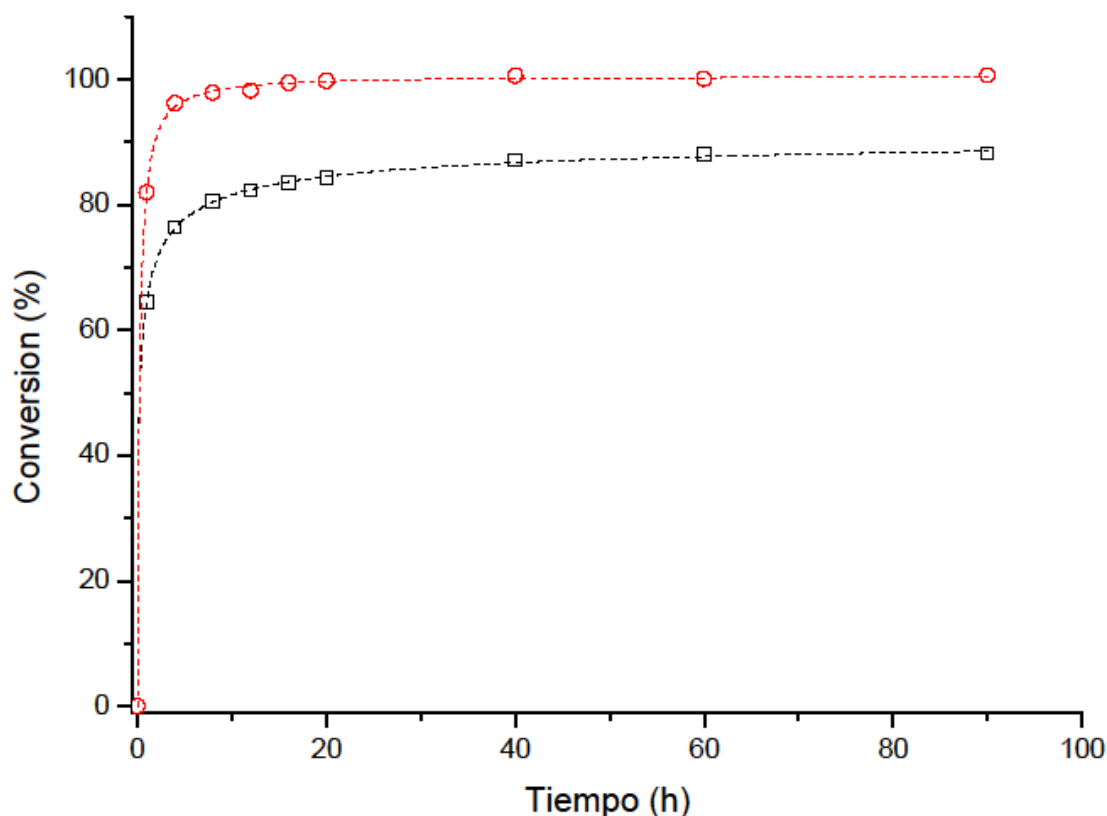


Figura 14 Comparativa en la evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para la reacción de etanolisis química de aceite de echium y aceite de pescado a 50 °C utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1 y etóxido sódico como catalizador; □ aceite de echium ○ aceite de pescado

Al contrario que lo observado para las muestras de aceite de origen marino, la reacción de etanolisis discurrió de manera incompleta, alcanzando un máximo de conversión de un 88%. Además, este máximo no se obtuvo hasta pasados 60 min, con lo que la cinética de la reacción fue sustancialmente más lenta.

Durante el desarrollo de la reacción, y una vez finalizada esta, se observó que no se produjo una separación de fases tan clara como la ocurrida en la reacción homóloga con aceite de pescado. Issariyakul y Dalai (2014) ya puntualizaron que una vez iniciado el proceso de transesterificación, se forman DG y MG como compuestos intermedios, que mejoran la solubilización de la mezcla de reacción. En este punto, la reacción puede llevarse a cabo en una o dos fases, lo que condiciona la velocidad y conversión del proceso. Si la reacción se desarrolla de manera homogénea, la formación de glicerol según avanza la reacción, conllevará una disolución del catalizador y un descenso del rendimiento.

En lo relativo al grado de oxidación, se observaron resultados contrapuestos a lo obtenido durante la transesterificación con aceite de pescado. Los niveles de oxidación más bajos en el aceite de echium dieron lugar a un ligero aumento de estos valores tras la reacción de transesterificación (Figura 15).

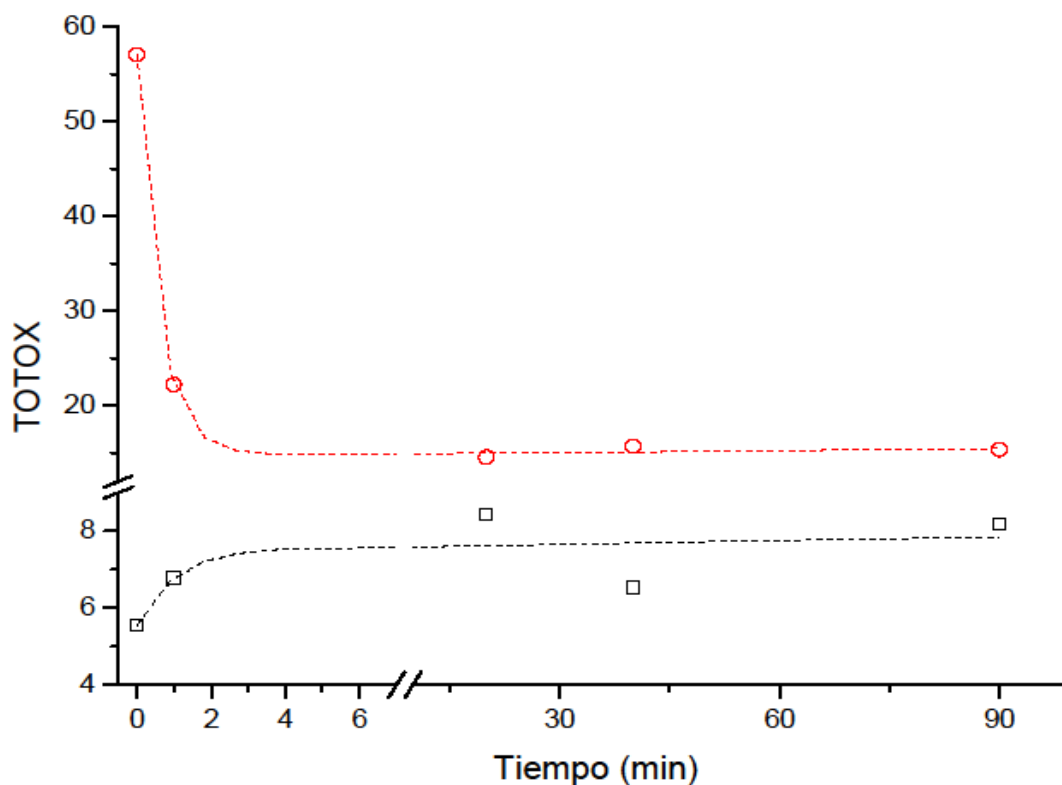


Figura 15. Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para la reacción de etanolisis química de aceite de pescado y aceite de echium a 50 °C, utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1 y etóxido sódico como catalizador; □ aceite de echium ○ aceite de pescado.

Tabla 10. Índice de peróxidos (PV) y de anisidina (AnV) obtenidos durante distintos tiempos de la reacción de etanolisis química de aceite de echium estudiada a 50 °C, utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1 y etóxido sódico como catalizador.

Tiempo	Aceite de echium	
	PV	AnV
0	0.5	4.5
1	1.3	4.1
4	1.3	-
8	2.0	-
12	1.1	-
16	1.9	-
20	2.1	4.3
40	1.2	4.2
60	2.0	-
90	1.6	5.0

En general, las diferencias observadas en la evolución de la oxidación entre el aceite de pescado y aceite de echium resultan complicadas de explicar. Como posibles razones se podrían plantear diferentes factores. Por un lado, los niveles de oxidación de partida fueron muy diferentes entre ambas muestras, siendo más elevados en el caso de aceite de pescado que de echium, lo cual pudo marcar un curso muy diferente de la evolución de los compuestos de oxidación. Por otro lado, el diferente perfil de ácidos grasos entre ambas muestras podría condicionar también la diferente susceptibilidad oxidativa de ambas muestras y por tanto el curso de la oxidación. Así, es destacable que el nivel total de PUFA del aceite de pescado fue próximo al 40%, mientras que este valor era superior al 70% para el aceite de echium. Finalmente, la presencia de otros compuestos minoritarios con propiedades antioxidantes más abundantes en aceites de origen vegetal que origen animal también pudo marcar los comportamientos tan diferentes observados.

A la luz de los resultados obtenidos, las condiciones optimizadas para el aceite de pescado aplicadas en el aceite de echium no fueron las adecuadas para conseguir una conversión cuantitativa. En lo relativo al estado oxidativo del aceite, el comportamiento fue diferente, con lo que serían necesarios estudios adicionales para poder comprobar el efecto de las distintas variables sobre estos valores, así como para conseguir una conversión cuantitativa.

## **5. CONCLUSIONES**

### 5. CONCLUSIONES

El presente estudio ha permitido describir el comportamiento de un aceite rico en ácidos grasos poliinsaturados a lo largo de la reacción de transesterificación con etanol y cómo distintas variables pueden influir sobre el desarrollo del proceso. El principal aspecto a destacar ha sido la alta eficiencia del proceso desarrollado bajo las condiciones óptimas de reacción, llegando a alcanzar conversiones cuantitativas en tiempos de reacción inferiores a 40 min.

En cuanto a las variables estudiadas, el uso de etanol ha resultado ser efectivo para el desarrollo de la reacción de transesterificación, aunque se ha corroborado la necesidad de utilizar un exceso de alcohol para poder conseguir conversiones cuantitativas. El efecto de la temperatura no ha sido tan relevante para conseguir una conversión cuantitativa sino para que ésta se alcance en tiempos de reacción cortos. La relación tiempo-temperatura es por tanto un factor a evaluar de manera conjunta. En lo que a la elección del catalizador se refiere, se ha visto que tanto alcóxidos como hidróxidos de metales alcalinos catalizan la reacción de manera efectiva.

Se ha podido verificar la importancia del estado inicial del aceite así como de los reactivos que se han utilizado, en especial en lo que a contenido en humedad, acidez libre e índice de oxidación se refiere. Estos factores han influenciado especialmente sobre la inactivación del catalizador utilizado.

Además, el presente estudio ofrece datos relevantes sobre el comportamiento de los valores de oxidación a lo largo de la reacción de etanolisis. Los cambios ocurridos en estos índices sugieren una formación de productos secundarios que hacen necesarias investigaciones posteriores para su elucidación.

El proceso de optimización llevado a cabo a escala analítica sirvió como referencia para la producción de 375 g de ácidos grasos etil ésteres a escala en planta piloto, consiguiendo un comportamiento similar a lo ocurrido en el laboratorio.

Por último, la aplicación de estos resultados a aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados de origen vegetal no consiguió un desarrollo análogo a lo ocurrido durante el proceso de optimización de la reacción, siendo necesarios estudios adicionales para poder evaluar el comportamiento según el tipo de aceite.

## **6. ANEXOS**

## 6. ANEXOS

### *Índice de tablas*

<b>Tabla 1.</b> Perfil de ácidos grasos en forma de etil ésteres obtenido tras el proceso de derivatización del aceite de pescado.....	23
<b>Tabla 2.</b> Índices de calidad evaluados sobre el aceite de pescado.....	24
<b>Tabla 3.</b> Índice de peróxidos (PV) y de anisidina (AnV) obtenidos durante distintos tiempos de la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C según la relación molar EtOH:aceite utilizada. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Índice de peróxidos (PV) y de anisidina (AnV) obtenidos durante distintos tiempos de la reacción de etanolisis química de aceite de pescado según la temperatura estudiada, utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Índice de peróxidos (PV) y de anisidina (AnV) obtenidos durante distintos tiempos de la reacción de etanolisis química de aceite de pescado según la cantidad de catalizador estudiada a 50 °C, utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. ....	38
<b>Tabla 6.</b> Perfil de ácidos grasos en forma de etil ésteres obtenido tras el proceso de escalado en planta piloto del aceite de pescado.....	42
<b>Tabla 7.</b> Valores de oxidación y estabilidad oxidativa del aceite de pescado y del FAEE obtenido tras el proceso de escalado en planta piloto.....	42
<b>Tabla 8.</b> Perfil de ácidos grasos en forma de etil ésteres obtenido tras el proceso de derivatización del aceite de echium.....	44
<b>Tabla 9.</b> Índices de calidad evaluados sobre el aceite de echium.....	44

### *Índice de figuras*

<b>Figura 1.</b> Esquema de las reacciones de etanolisis a partir de una molécula de triglicérido .....	5
<b>Figura 2.</b> Hidrólisis y saponificación durante la transesterificación. a) saponificación de ácidos grasos libres, b) saponificación de triglicéridos y c) hidrólisis de etiléster.....	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de un catalizador básico homogéneo en la transesterificación.....	9



---

<b>Figura 4.</b> Proceso de peroxidación lipídica. ....	11
<b>Figura 5.</b> Desarrollo del proceso de oxidación en aceites. ....	12
<b>Figura 6.</b> Evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para las distintas relaciones molares estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C . 25	
<b>Figura 7.</b> Evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para las distintas temperaturas estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. ....	27
<b>Figura 8.</b> Evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para las distintas cantidades de catalizador estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50 °C utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1. ....	31
<b>Figura 9.</b> Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las distintas relaciones molares estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50°C.....	33
<b>Figura 10.</b> Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las distintas temperaturas estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1.....	35
<b>Figura 11.</b> Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las distintas cantidades de catalizador estudiadas en la reacción de etanolisis química de aceite de pescado a 50°C utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1.....	37
<b>Figura 12.</b> Desarrollo del proceso de oxidación y evolución de los distintos compuestos de oxidación.....	38
<b>Figura 13.</b> Evolución del valor de oxidación combinado (TOTOX) con el tiempo para las reacciones de etanolisis química llevadas a cabo a 50 °C, una relación molar EtOH:aceite 6:1 y un 1% de hidróxido potásico como catalizador.....	39
<b>Figura 14</b> Comparativa en la evolución de la conversión en FAEE con el tiempo para la reacción de etanolisis química de aceite de echium y aceite de pescado a 50 °C utilizando una relación molar EtOH:aceite 6:1 y etóxido sódico como catalizador .....	45
<b>Índice de ecuaciones</b>	
<b>Ecuación 1.</b> Porcentaje de catalizador inactivado .....	29

## **7. REFERENCIAS**

---

**7. REFERENCIAS**

1. Alamu, O. J., Waheed, M. A., Jekayinfa, S. O. & Akintola, T. A., 2007. Optimal transesterification duration for biodiesel production from nigerian palm kernel oil. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, Volumen IX.
2. Anastopoulos, G., Zannikou, Y., Stournas, S. & Kalligeros, S., 2009. Transesterification of vegetable oils with ethanol and characterization of the key fuel properties of ethyl esters. *Energies*, Volumen 2, pp. 362-376.
3. Basturk, A., Javidipour, I. & Boyaci, I. H., 2007. Oxidative stability of natural and chemically interesterified cottonseed, palm and soybean oils. *Journal of Food Lipids*, Volumen 14, pp. 170-188.
4. Berti, M. y otros, 2007. Echium: A source of stearidonic acid adapted to the northern great plants in the US. *Industrial Oilseeds*, pp. 120-125.
5. Bikou, E., Louloudi, A. & Papayannakos, N., 1999. The effect of water on the transesterification kinetics of cotton seed oil with ethanol. *Chemical Engineering & Technology*, Volumen 22, pp. 70-75.
6. Calviello, G., Serini, S. & Piccioni, E., 2007. n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 14(29), pp. 3059-3069.
7. Canacki, M., Monyem, A. & Van Gerpen, J., 1999. Accelerated oxidation processes in biodiesel. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 42(6), pp. 1565-1572.
8. Canakci, M. & Van Gerpen, J., 1999. Biodiesel production via acid catalysis. *American Society of Agricultural Engineers*, Volumen 99, pp. 1203-1210.
9. Cernoch, M., Hájek, M. & Skopal, F., 2010. Ethanolysis of rapeseed oil - distribution of ethyl esters, glycerides and glycerol between ester and glycerol phases. *Bioresource Technology*, 101(7), pp. 2071-2075.
10. Chen, Y. Q. y otros, 2007. Dietary fat - Gene interaction in cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, Volumen 26, pp. 535-551.

11. Chow, C., 2008. *Fatty acids in foods and their health implications*. Third ed. New York: Chow C..
12. Chow, C. K., 2007. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Boca Ratón: CRC Press.
13. da Silva, N. L., Maciel, M. R. W., Batistella, C. D. & Filho, R. M., 2006. Optimization of biodiesel production from castor oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Volumen 129, pp. 405-414.
14. Diamond, I. R., Sterescu, A., Pencharz, P. B. & Wales, P. W., 2008. The rationale for the use of parenteral omega-3 lipids in children with short bowel syndrome and liver disease. *Pediatric Surgery Technology*, Volumen 24, pp. 773-778.
15. D'Ippolito, S. A. y otros, 2007. Analysis of a two-step, noncatalytic, supercritical biodiesel production process with heat recovery. *Energy Fuels*, 21(1), pp. 339-346.
16. Encinar, J. M., Gonzalez, J. F., Rodríguez, J. J. & Tejedor, A., 2001. Biodiesel fuels from vegetable oils: Transesterification of *Cynara cardunculus L.* oils with ethanol. *Energy & Fuels*, Volumen 16, pp. 443-450.
17. Fillieres, R., Benjeloun-Mlayah, B. & Delmas, M., 1995. Ethanolysis of rapeseed oil: quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(4), pp. 427-432.
18. Fournier, V. y otros, 2006. Thermal degradation of long-chain polyunsaturated fatty acids during deodorization of fish oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Volumen 108, pp. 33-42.
19. Frankel, E. N., 1983. Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, 22(1), pp. 1-33.
20. Frankel, E. N., 1984. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(12), pp. 1908-1917.

21. Freedman, B., Pryde, E. H. & Mounts, T. L., 1984. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(10), pp. 1638-1643.
22. Gardner, H. W., Simpson, T. D. & Hamberg, M., 1996. Mechanism of linoleic acid hydroperoxide reaction with alkali. *Lipids*, Volumen 31, pp. 1023-1028.
23. Halliwell, B. & Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volumen 57, pp. 715-725.
24. Horrobin, D. F. y otros, 1991. Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. *Biological Psychiatry*, Volumen 30, pp. 795-805.
25. Hoy, C. & Xu, X., 2001. Structured triacylglycerols. En: M. D. Inc., ed. *Structured and modified lipids*. New York: Gunstone F.D., pp. 209-239.
26. Ikwuagwu, O. E., Ononogbu, I. C. & Njoku, O. U., 2000. Production of biodiesel using rubber [*Hevea brasiliensis* (Kunth. Muell.)] seed oil. *Industrial Crops and Products*, Volumen 12, pp. 57-62.
27. Issariyakul, T. & Dalai, A. K., 2010. Biodiesel production from greenseed canola oil. *Energy Fuels*, 24(9), pp. 4652-4658.
28. Issariyakul, T. & Dalai, A. K., 2014. Biodiesels from vegetable oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 31, pp. 446-471.
29. Issariyakul, T., Kulkarni, M. G., Dalai, A. K. & Bakshni, N. N., 2007. Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system. *Fuel Processes Technology*, Volumen 88, pp. 429-436.
30. Jacobson, K., Gopinath, R., Meher, L. C. & Dalai, A. K., 2008. Solid acid catalyzed biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Catalysis B: Environmental*, Volumen 85, pp. 86-91.
31. Jain, S. & Sharma, M. P., 2010. Stability of biodiesel and its blends: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), pp. 667-678.

32. Joseph, J. D., 1985. Fatty acid composition of commercial Menhaden, *Brevoortia spp.*, oils, 1982 and 1983. *Marine Fisheries Review*, 47(3), pp. 30-37.
33. Kamvissis, V. N., Barbounis, E. G., Megoulas, N. C. & Koupparis, M. A., 2008. A novel photometric method for evaluation of the oxidative stability of virgin olive oils. *Journal of AOAC International*, Volumen 91, pp. 794-801.
34. Kucek, K. T., Cesar-Oliverira, M. A. F., Wilhelm, H. M. & Ramos, L. P., 2007. Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxide. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(4), pp. 385-392.
35. Lang, X. y otros, 2001. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, Volumen 80, pp. 53-62.
36. Leung, D. Y. C. & Guo, Y., 2006. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, Volumen 87, pp. 883-890.
37. Leung, D. Y., Wu, X. & Leung, M. K., 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), pp. 1083-1095.
38. Liu, K. S., 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-cromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Volumen 11, pp. 1179-1187.
39. MacLean, C. y otros, 2006. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk. A systematic review. *Journal of the American Medical Association*, Volumen 295, pp. 403-416.
40. Ma, F., Clements, L. D. & Hanna, M. A., 1998. The effects of catalyst, free fatty acid, and water content on transesterification of beef tallow. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 41(5), pp. 1261-1264.
41. Ma, F. & Hanna, M. A., 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, Volumen 70, pp. 1-15.
42. Martín, D., Reglero, G. & Señoráns, F. J., 2010. Oxidative stability of structured lipids. *European Food Research Technology*, Volumen 231, pp. 635-653.

- 
43. Martín, D. y otros, 2012. Oxidative stabilization of ultra-high omega-3 concentrates as ethyl esters or triacylglycerols. *Food Research International*, Volumen 45, pp. 336-341.
44. Matissek, R., Schnepel, F. M. & Steiner, G., 1998. En: *Análisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones*. España: Acribia, pp. 47-59.
45. McNamara, R. K., 2006. The emerging role of omega-3 fatty acids in psychiatry. *Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids*, Volumen 75, pp. 223-225.
46. Meher, L. C., Sagar, D. V. & Naik, S. N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renew Sustain Energy Reviews*, Volumen 10, pp. 248-268.
47. Mendow, G., Veizaga, N. S. & Querini, C. A., 2011. Ethyl ester production by homogeneous alkaline transesterification: Influence of the catalyst. *Bioresource Technology*, Volumen 102, pp. 6385-6391.
48. Mendow, G., Veizaga, N. S., Sanchez, B. S. & Querini, C. A., 2011. Biodiesel production by two-stage transesterification with ethanol. *Bioresource Technology*, Volumen 102, pp. 10407-10413.
49. Neff, W. E., Mounts, T. L. & Rinsch, W. M., 1997. Oxidative stability as affected by triacylglycerol composition and structure of purified canola oil triacylglycerols from genetically modified normal and high stearic and lauric acid canola varieties. *LWT - Food Science and Technology*, Volumen 30, pp. 793-799.
50. Razack, R. & Seidner, D. L., 2007. Nutrition in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, Volumen 23, pp. 400-405.
51. Rojano, B. A., 1997. *Oxidación de lípidos y antioxidantes*, Medellín. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.
52. Rubio Rodriguez, N. y otros, 2010. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Volumen 11, pp. 1-12.

53. Ruxton, C. H. S., Calder, P., Reed, S. & Simpson, M. J. A., 2005. The impact of long-chain n-3 polyunsaturated acids on human health. *Nutrition Research Reviews*, Volumen 18, pp. 113-129.
54. Saka, S. & Kusdiana, D., 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel*, 80(2), pp. 225-231.
55. Shahidi, F. & Wanasundara, U. N., 1998. Omega-3 fatty acids: nutritional aspects and production technologies. *Food Science & Technology*, Volumen 9, pp. 230-240.
56. Sheehan, J. y otros, 1998. Final report, life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus. *NREL-SR-580-24089. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory*, pp. 206-261.
57. Srilatha, K. y otros, 2010. Efficient Esterification and Transesterification of Used Cooking Oil Using 12-Tungstophosphoric Acid (TPA)/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Catalyst. *Energy Fuels*, Volumen 24, pp. 4748-4755.
58. Stamenkovic, O. S., Velickovic, A. V. & Veljkovic, V. B., 2011. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: Current state and perspectives. *Fuel*, Volumen 90, pp. 3141-3155.
59. Stillwell, W. & Wassall, S. R., 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, Volumen 126, pp. 1-27.
60. Tenllado, D., Reglero, G. & Torres, C. F., 2011. A combined procedure of supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil. *Separation and Purification Technology*, Volumen 83, pp. 74-81.
61. Turck, R., 2002. *Method for producing fatty acid esters of monovalent alkyl alcohols and use thereof*. EEUU, Patente n° USP 0156305.
62. Turner, D., Zlotkin, S. H., Shah, P. S. & Griffiths, A. M., 2008. Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease, *Cochrane database of systematic reviews*, Volume 1.
63. Velasco, J., Andersen, M. L. & Skibsted, L. H., 2004. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron



- 
- spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85(4), pp. 623-632.
64. Wai, W. T., Saad, B. & Lim, B. P., 2009. Determination of TOTOX value in palm oleins using a FI-potentiometric analyzer. *Food Chemistry*, 113(1), pp. 285-290.
65. WHO/FAO, 1994. Fats and oils in human nutrition. *FAO*.
66. Xin, J., Imahara, H. & Saka, S., 2008. Oxidation stability of biodiesel fuel as prepared by supercritical methanol. *Fuel*, Volumen 87, pp. 1807-1813.
67. Yaakob, Z. y otros, 2014. A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volumen 35, pp. 136-153.
68. Yeung, D. Y. C. & Guo, Y., 2006. Transesterification of neat and used frying oil: Optimization for biodiesel production. *Fuel Processing Technology*, Volumen 87, pp. 883-890.
69. Yeung, D. Y. C., Wu, X. & Leung, M. K. H., 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, Volumen 87, pp. 1083-1095.
70. Zulkafar, M. H., Edwards, M. & Heard, C. M., 2007. Is there a role for topically delivered eicosapentaenoic acid in the treatment of psoriasis? *European Journal of Dermatology*, Volumen 17, pp. 284-291.

