



Universidad de Valladolid

Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias Campus de Palencia

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
Trabajo Fin de Máster

Julio 2013

Extracción de Ácido Ferúlico Presente en el Salvado de Trigo Mediante CO₂ Supercrítico

Alumno: Luis García Juárez

Tutora: María José Cocero

Cotutor: Alexander Navarrete

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis tutores, María José Cocero y Alexander Navarrete por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo y por depositar su confianza en mí, permitiéndome desde un primer momento manejar la planta de extracción con total libertad y atendiendo gustosamente a mis consultas. Gracias a todos mis compañeros de laboratorio de ingeniería química, que por su buena acogida han hecho de mi estancia en el laboratorio una experiencia para recordar.

Mi agradecimiento también para la harinera Emilio Esteban por facilitarnos desinteresadamente el salvado con el que realizar el estudio.

Por último, un especial agradecimiento a Sagrario Beltrán Calvo y su equipo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos por su colaboración en el proyecto realizando el análisis cromatográfico las muestras extraídas.

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ANTECEDENTES	5
2.2. Influencia del ácido ferúlico en el perfil aromático del pan.	5
2.3. Tecnologías de extracción de compuestos naturales.	6
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.2. Extracción con dióxido de carbono supercrítico.	9
4.2.1. Método.....	11
4.3. Determinación del ácido ferúlico por HPLC.....	11
4.3.1. Materiales	11
4.3.2. Preparación de las muestras	11
4.3.3. Método.....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.1. Masa total extraída.....	12
5.2. Concentración de ácido ferúlico en el extracto.....	15
6. CONCLUSIONES	17
7. BIBLIOGRAFÍA	18
ANEXO I - TABLAS DE DATOS.....	20
ANEXO II - PUESTA A PUNTO DE LA PLANTA DE EXTRACCIÓN.....	24
ANEXO III - PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN	26

1. RESUMEN

Se ha realizado un estudio empleando una planta piloto de extracción con dióxido de carbono supercrítico a 400 bares, a temperaturas de 50, 60 y 70°C y tiempos de 30, 60 y 120 minutos. Se buscaban las mejores condiciones de extracción del ácido ferúlico presente en el salvado de trigo. Este antioxidante ejerce un efecto inhibitorio sobre la formación de algunos compuestos formados por efecto de las reacciones de Maillard, durante el proceso de cocción del pan. Los compuestos inhibidos están íntimamente relacionados con el desarrollo de los aromas característicos del pan blanco recién horneado, y su ausencia desemboca en la formación del olor a rancio. La extracción de los aceites ricos en ácido ferúlico serviría de base para la siguiente fase del proyecto, consistente en formular una encapsulación de dichos aceites que evite su interferencia en las reacciones de Maillard durante el cocinado, otorgando al pan integral el perfil aromático del pan hecho con harinas refinadas. Los resultados obtenidos reflejan la imposibilidad de extraer el ácido ferúlico, presente en el salvado de trigo, mediante la técnica de extracción con dióxido de carbono supercrítico, a 400 bares. Se plantea por tanto la necesidad de continuar la experimentación con otras condiciones de presión más elevadas o incluyendo co-solventes de baja toxicidad.

ABSTRACT

A study was performed using a pilot plant by extraction with supercritical carbon dioxide to 400 bars, at temperatures of 50, 60 and 70 °C and times of 30, 60 and 120 minutes. We looked for the best conditions of ferulic acid extraction present in wheat bran. This antioxidant exerts an inhibitory effect on the formation of some compounds formed by Maillard reactions, during the baking of bread. The inhibited compounds are closely related to the development of the characteristic aromas of freshly baked white bread and its absence leads to the formation of musty odor. The extraction of ferulic acid rich oils serve as the basis for the next phase of the project, consistent to formulate an encapsulation of these oils to avoid their interference at the Maillard reactions during cooking, giving the bread flavor profile of bread made with refined flour. The results show the inability to remove the ferulic acid present in the wheat bran, using the technique of extraction with supercritical carbon dioxide at 400 bars. Hence arises the need to continue experimenting with other higher pressure conditions or including low toxicity co-solvents.

2. ANTECEDENTES

En España, se consumen diariamente una media de 4,95 g/día de pan integral y 1,25 g/día de pan integral de molde, esto supone el 6% del consumo total de pan de trigo y el 12,4% del total de pan de molde respectivamente (AESAN, 2011). A diferencia del pan blanco, realizado con harinas provenientes únicamente del endospermo del grano de trigo, el pan integral se realiza a partir de harinas que contienen, además del endospermo, las capas externas englobadas bajo el nombre de salvado, ricas en fibra y compuestos fenólicos y el germen, rico en ácidos grasos. Las dietas ricas en fibra dietética pueden tener efectos beneficiosos para la salud, tales como la prevención de enfermedades coronarias, diabetes, obesidad, hipertensión y trastornos gastrointestinales (Redgwell, 2005)

El principal problema que afecta al consumo de pan integral es su escasa aceptación por parte del consumidor. En un estudio realizado, los participantes seleccionados por su preferencia por panes elaborados con harinas refinadas continuaron prefiriéndolos, no obstante, aquel grupo que, en principio, prefería los panes elaborados con harinas integrales, se decantaron en varias ocasiones por panes de harinas refinadas (Bakke & Vickers, 2007).

2.2. Influencia del ácido ferúlico en el perfil aromático del pan.

La mayor proporción de compuestos fenólicos presentes en el salvado de trigo la componen los ácidos hidroxicinámicos de los que el ácido ferúlico (AF) (4-hidroxi-3-metoxi ácido cinámico) un derivado del ácido cinámico, es el predominante. (Verma, Hucl, & Chibbar, 2009)

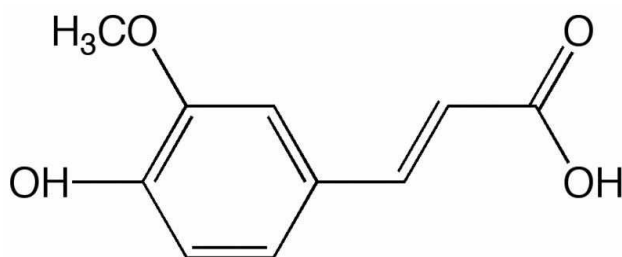


Fig. 1. Estructura molecular del Ácido Ferúlico

En las gramíneas, las moléculas de AF se encuentran en la pared celular, unidas a los polímeros de hemicelulosa mediante enlaces tipo éster e intervienen en los procesos de lignificación. Otra forma de encontrarlo es formando enlaces entre proteínas y

polisacáridos. (Barros-Ríos, Malvar, & Santiago, 2011). En el caso del trigo, el AF constituye alrededor del 0,66% del peso seco del salvado (Smith & Hartley, 1983). Se ha demostrado que la cantidad de AF presente en los granos está relacionada con una mayor resistencia al ataque de insectos y otras enfermedades (Abdel-Aal et al., 2001)

Adicionalmente, se ha comprobado que la presencia de AF incide negativamente en el desarrollo de algunos compuestos formados por efecto de las reacciones de Maillard, durante el proceso de cocción del pan, principalmente sobre la 2-acetil-1-pirrolina. No se observó en cambio influencia alguna sobre la generación de productos derivados de la oxidación de lípidos (Moskowitz, Bin, Elias, & Peterson, 2012). Estos compuestos inhibidos por la presencia de AF coinciden con aquellos cuya pérdida, durante el almacenamiento de pan blanco, desemboca en la aparición del característico olor a pan rancio (Schieberle & Grosch, 1992). Dentro de este contexto, se deriva la necesidad de investigar un método que permita la extracción total del AF y su posterior encapsulación. Esto debe servir para que, sin perder las propiedades antioxidantes del AF, se evite la modificación del perfil aromático del pan integral, asemejándolo al del pan blanco.

2.3. Tecnologías de extracción de compuestos naturales.

La industria alimentaria emplea diversos métodos para la extracción de los aceites contenidos en productos naturales. Los métodos clásicos, empleados aún hasta hoy día, son el Soxhlet, la sonicación y diversas variantes del primero. El método Soxhlet, aunque eficaz y sencillo consume mucho tiempo y no es apto para la extracción de compuestos termolábiles (Jenkins & Walsh, 1994), la sonicación, al no renovar el disolvente, pierde una eficacia que ha de ser compensada mediante la inclusión de co-disolventes que incrementen su polaridad (Guillen, Blanco, Canga, & Blanco, 1991). Otra tendencia ha sido la de asistir el Soxhlet mediante microondas para reducir el tiempo de extracción y la cantidad de disolvente requerido (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998). Estos métodos precisan de disolventes de demostrada toxicidad como el n-hexano (Dunnuck, 1991), que han de ser separados posteriormente a la extracción, especialmente tratándose de alimentos.

Frente a estos métodos surge la técnica de extracción mediante fluidos supercríticos ya empleada por algunos autores para la extracción de AF (Sovova, 2001). Ésta tecnología se basa en el empleo de compuestos, mezclas o elementos a temperatura y presión superiores a los valores críticos pero por debajo de la presión que se requiere para condensarlos en sólidos (Jessop & Leitner, 1998).

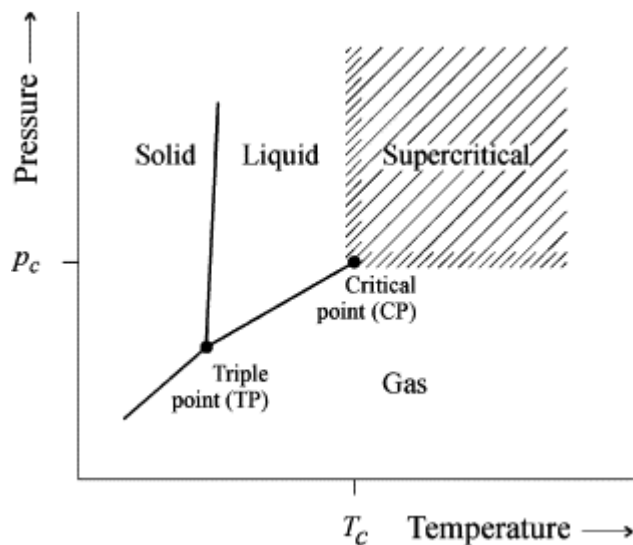


Fig. 2. Gráfica de estados de un elemento (G. Brunner, 1994)

En estado supercrítico, las densidades de los compuestos son próximas a las del estado líquido, mientras que la viscosidad es cercana a la de los gases. La difusividad es aproximadamente dos órdenes de magnitud más alta que la de los líquidos (Gerd Brunner, 2005). A consecuencia de estas propiedades, los fluidos supercríticos adquieren el poder solvente de los líquidos pero fluyen de manera próxima a la de los gases.

Entre la gran variedad de disolventes disponibles (dióxido de carbono, óxido nitroso, etano, propano, *n*-pentano, amoníaco, fluoroforno, hexafluoruro de azufre y agua) el CO₂ es el que se emplea con más frecuencia debido a su reducida toxicidad, bajo costo, y por poseer unas constantes críticas (31,3°C y 73,8 bares) fácilmente alcanzables. No obstante, la apolaridad del dióxido de carbono lo convierte en un disolvente inadecuado para extraer analitos altamente polares. (Zougagh, Valcárcel, & Ríos, 2004).

El descenso de la temperatura o presión por debajo del punto crítico disminuye bruscamente las propiedades solventes del fluido, permitiendo separar disolvente y soluto con facilidad. Las variaciones de temperatura y presión permiten realizar un fraccionamiento de los solutos o una extracción selectiva de los mismos (King & Bott, 1992), como se observa en la figura 3, el incremento de la temperatura no tiene el mismo efecto sobre la solubilidad del soluto, si se realiza a presiones elevadas, que si se realiza a bajas presiones. En condiciones isobáricas de alta presión, prevalece el efecto que tiene la temperatura sobre el incremento de la presión de vapor del soluto, por el contrario, a bajas presiones lo que prevalece es el efecto de disminución de la densidad del disolvente y, por tanto, de la solubilidad del soluto. Se han demostrado

también diferencias en los fenómenos de transferencia de masa entre la escala analítica y la escala de una planta piloto (del Valle et al., 2004), de aquí surge la necesidad de determinar, a través de la experimentación en la propia planta, las condiciones más favorables de extracción.

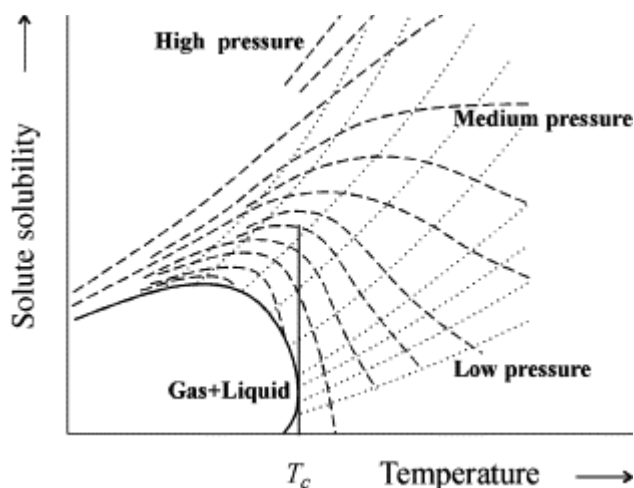


Fig. 3. Solubilidad de una sustancia poco volátil (Gerd Brunner, 2005)

3. OBJETIVOS

El presente estudio forma parte de un proyecto global que pretende la extracción de la mayor cantidad posible de AF del salvado de trigo, diseñar una formulación para encapsularlo y emplearlo en panificación evitando, gracias a la encapsulación, su actuación inhibitoria de la formación de compuestos de interés organoléptico durante las reacciones de Maillard. Se trata de desarrollar panes integrales que, conservando todas sus propiedades nutricionales y antioxidantes, modifiquen positivamente su perfil aromático y por tanto incrementen la aceptabilidad por parte de los consumidores.

Este estudio inicial pretende la localización, bajo una presión de 400 bares, de las mejores condiciones de temperatura y tiempo, que resulten en la máxima extracción de AF de la muestra.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El salvado empleado fue facilitado por la harinera Emilio Esteban, con la siguiente caracterización.

GRANULOMETRÍA (Micras)	1480	1149	670	500	212	PASA 212
	8,60	19,20	34,30	16,86	19,29	1,54
Humedad	12,48%				Método NIR	
Proteína	16,32 % sss				Método NIR	
Grasa	5,51 % ssh/ con hidrólisis ácida				Método NIR	
Fibra	45,89 % ssh				Método NIR	

Tabla 1. Caracterización del salvado

Se obtuvo una humedad media de 11,53% tras su reposo en el laboratorio.

Para el arrastre de la muestra adherida se empleó acetona Dávila de pureza 99,5% y se separó mediante un rotavapor Heidolph Instruments modelo Basis Hei-VAP Value.

4.2. Extracción con dióxido de carbono supercrítico.

La planta de extracción sigue el esquema definido en la figura 4.

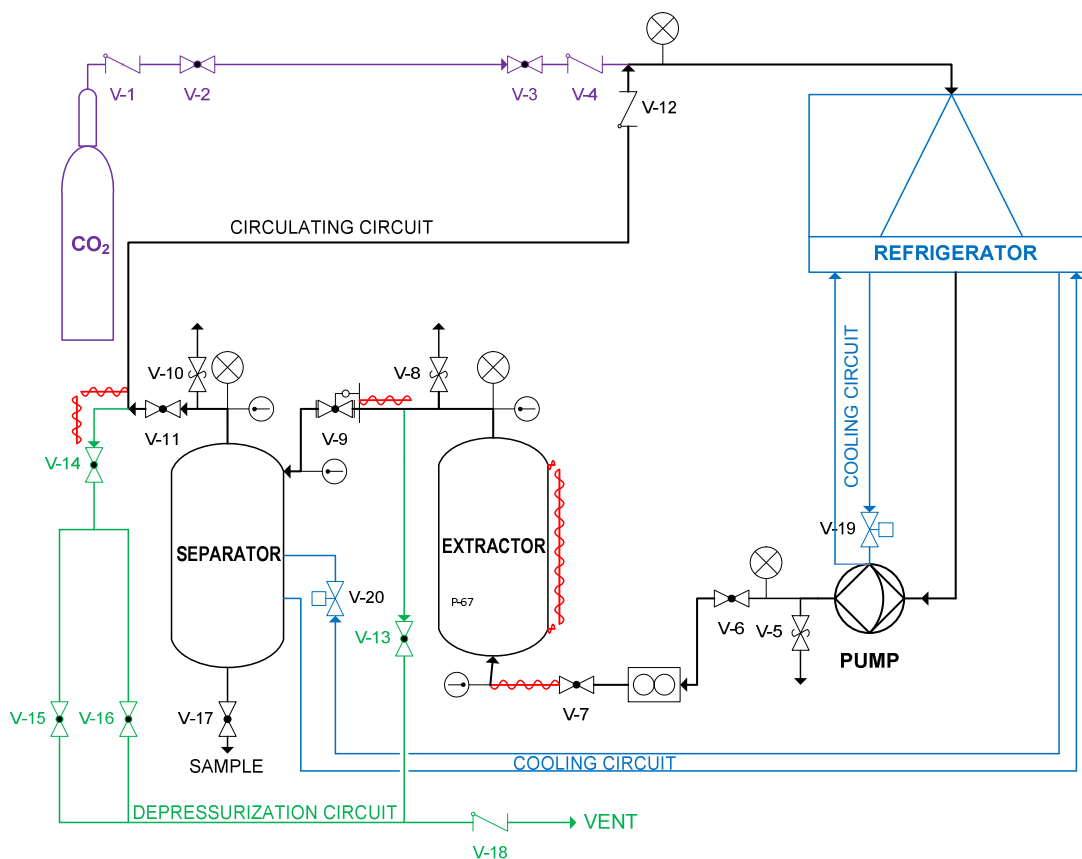


Fig. 4. Diagrama esquemático del proceso de extracción supercrítica.

Tipo	Marca	Referencia	Situación
Antirretorno	HOKE	6133-G4-Y	V-1, V-4, V-12 y V-18
Asiento	HOKE	6133-G4-Y	V-2, V-3, V-6, V-7, V-11, V-13, V-14,
	HOKE	1656-G4-YA	V-14
	HOKE	2232-G4-Y	V-15
	HOKE	1711-G4-Y	V-17
Seguridad	HOKE	HR6077-4G-DH	V-5 y V-10
	HOKE	HR6032-4G-DH	V-8
Impulsada	M&M	D189DBW	V-19
	M&M	D885DVU	V-20
Reductora	GO inc.	BP66 1D11Q4N151	V-9

Tabla 2. Identificación de las válvulas del sistema

El CO₂ proviene de una instalación común alimentada por bombonas de pureza 99,95% suministradas por Carbueros Metálicos. Dicha instalación está equipada con válvulas antirretorno para evitar la contaminación interplantas y de las botellas. Una vez que el sistema alcanza la presión de trabajo deseada la válvula v-3 se cierra permitiendo solamente el flujo en recirculación. El protocolo de operación para esta planta se detalla en el ANEXO III.

El flujo de CO₂ discurre hacia un refrigerador, programado a -21°C, para alcanzar una bomba de membrana de acero “DOSAPRO MILTON ROY 27360 FRANCE TYPE=MB 140 SL 10 M480/J ZVV1” de caudal máximo 16,30 l/h con carrera ajustable y presión máxima de 417 bares, refrigerada a -10°C mediante un circuito cerrado con paso a través del refrigerador, controlado por una electroválvula v-19 accionada mediante un termostato.

El CO₂ bombeado es contabilizado antes de entrar en el extractor mediante un flujómetro “MICRO MOTION MASS FLOW SENSOR TYPE D H0065 NPTF”

El extractor, de 5 litros de capacidad, se encuentra calefactado mediante una resistencia de hilo que recorre la tubería de entrada y una camisa que lo rodea externamente. El CO₂, que accede al extractor en fase supercrítica, atravesando el lecho contenido en la cesta de acero inoxidable, pasa a través de una válvula reductora “GO inc. BP66 1D11Q4N151” calefactada, a un separador de 2,5 litros de capacidad donde, la despresurización, disminuye su capacidad solvente separándolo de la muestra extraída. Ambos recipientes disponen de sondas de presión y temperatura monitorizadas en el sistema de adquisición de datos “PICO LOG for Windows Release 5.16.2”. Desde el separador, el CO₂ discurre por el circuito de recirculación nuevamente en dirección al refrigerador para, posteriormente ser bombeado de nuevo.

4.2.1. Método

Todos los ensayos se realizaron con cargas de 700 g de salvado de densidad aparente húmeda de 0,218 g/cm³. La carrera de la bomba estuvo siempre fijada en el 100% para obtener un flujo máximo y estable.

Las presiones en el extractor y separador fueron de 400 bares y 50 bares respectivamente.

Las variables fueron el tiempo de operación (30', 60' y 120') y la temperatura del extractor (50, 60 y 70°C). No se realizaron ensayos a temperaturas superiores a 70°C para evitar degradar la carga polifenólica de la muestra y por tanto su poder antioxidante (Larrauri, Rupérez, & Saura-Calixto, 1997).

Las muestras extraídas se recogieron en viales, conservadas en frío y protegidas de la luz. La fracción adherida a las paredes del separador se arrastró con acetona y posteriormente se separó en un rotavapor para determinar su masa.

Para poder realizar los ensayos fue necesaria una puesta a punto de la planta, recogida en el ANEXOII.

4.3. Determinación del ácido ferúlico por HPLC

4.3.1. Materiales

Para la preparación de muestras se utilizó metanol anhidro, 99,8% Sigma-Aldrich, un baño de ultrasonidos J.P. Selecta, de 50W y una centrífuga Fisher Bioblock Scientific 2-16P. Para la hidrólisis del salvado se empleó NaOH Sigma-Aldrich ACS Reagent. Las filtraciones se realizaron con filtros de jeringa de 0,22 micras. Se utilizó una balanza analítica Sartorius.

4.3.2. Preparación de las muestras

Se tomaron 2 g de alícuota de la muestra de aceite en viales de 10 ml, posteriormente se extrajo con 5 ml de metanol y agua (80: 20) y se agitó para su homogeneización durante 1 min. Se sometió a ultrasonidos en baño de agua durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se centrifugó a 5000 rev/min durante 25 minutos y la fase sobrenadante se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 micras antes del análisis por HPLC (Saber-Tehrani, Givianrad, Aberoomand-Azar, Waqif-Husain, & Jafari Mohammadi, 2012)

Las muestras para la determinación del AF total se prepararon a partir de 500 mg de salvado de trigo que fue hidrolizado en 30 mL de solución 2 molar de NaOH por litro durante 2 horas a 30°C en atmosfera de nitrógeno, se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 micras. (Barberousse et al., 2009)

4.3.3. Método

Las muestras se enviaron a Sagrario Beltrán Calvo, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos, desde donde nos remitieron los resultados sin reporte de los materiales y métodos del análisis HPLC

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cada ensayo se recogieron datos de CO₂ cargado, CO₂ recirculado, masa y humedad final del sustrato de salvado y masa total recogida en el separador. Estos datos se recogen en una tabla del ANEXO I.

5.1. Masa total extraída.

La cantidad de masa extraída, obtenida por diferencia entre la masa inicial y final del sustrato de salvado, refleja la cantidad de masa transferida durante el proceso. En la figura 5 se observa la evolución de la transferencia de masa respecto al tiempo de recirculación.

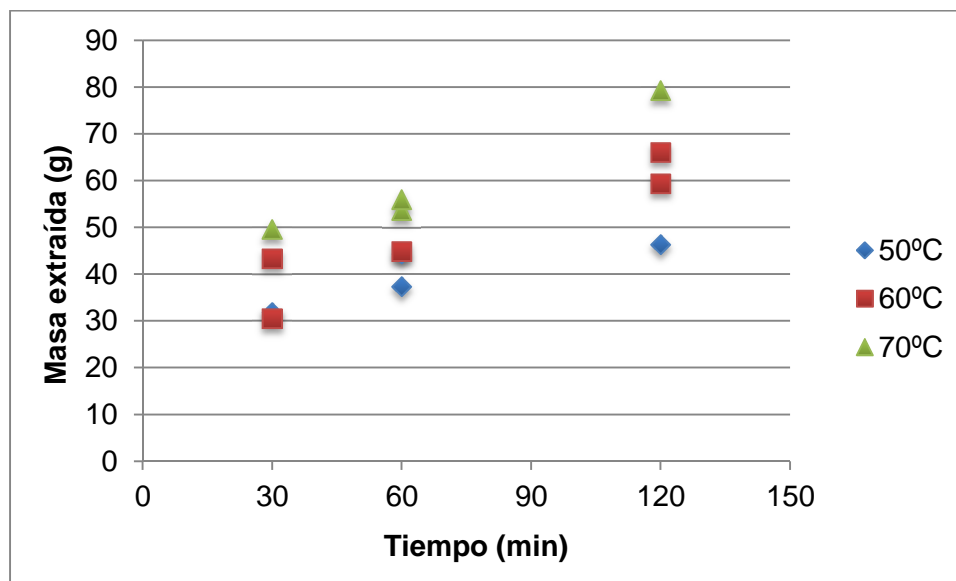


Fig. 5. Extracto total sobre tiempo de extracción

A la vista de la gráfica se deduce la tendencia ascendente conforme al tiempo de extracción, la temperatura también se refleja como una variable importante en el proceso, produciéndose una mayor transferencia de materia conforme la temperatura se eleva. Aunque en todos los casos, la carrera de la bomba estuvo fijada en el 100%, con la intención de obtener un flujo estable, la acusada influencia que tiene la refrigeración sobre la eficacia de bombeo, ha sido causa de variaciones en el flujo de

CO₂ durante las experiencias. Abortadas aquellas experiencias, en las que se llegó incluso a perder todo el flujo, a consecuencia de la cavitación por disminución de la densidad del CO₂, en las demás se observaron diferencias tales, que obligan a estudiar el desarrollo de la extracción sobre el CO₂ recirculado tal como se muestra en la figura 6.

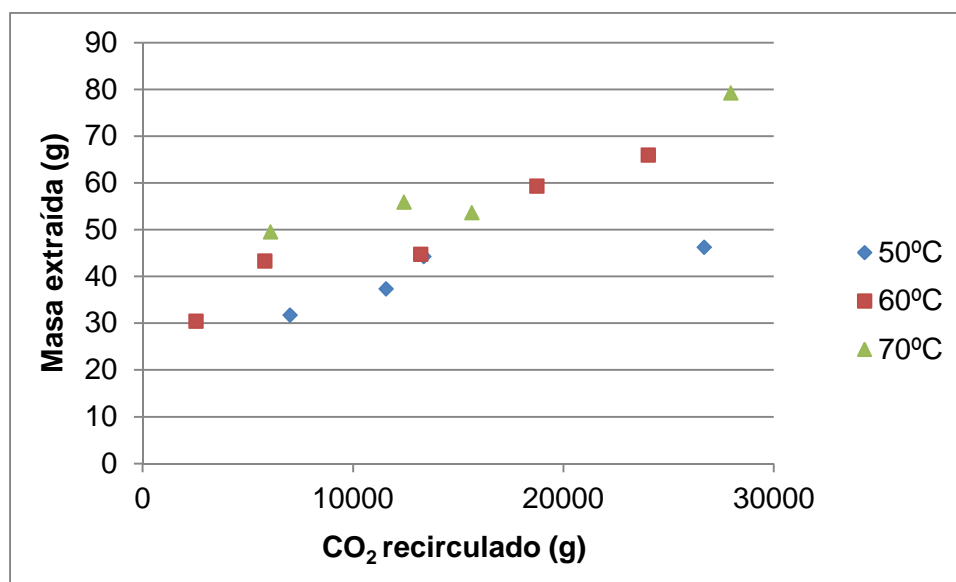


Fig. 6. Extracto total sobre CO₂ recirculado

Las primeras fracciones de soluto extraído son aquellas que se encuentran libres, envolviendo el salvado externamente, así como la fracción más próxima al exterior y por tanto la menos ligada al sustrato. Durante la primera etapa de extracción, dominada por el equilibrio de disolución, se genera una extracción lineal. En la gráfica apenas se advierte el final de esta etapa por haber ocurrido casi en su totalidad durante la primera media hora de recirculación. Son muy diversos los modelos que han intentado describir la extracción con fluidos supercríticos y se han realizado sobre sustratos y condicionantes diferentes (Perrut, Clavier, Poletto, & Reverchon, 1997). Es difícil identificarlo literalmente con alguno de ellos aunque si se advierten algunos comportamientos parecidos.

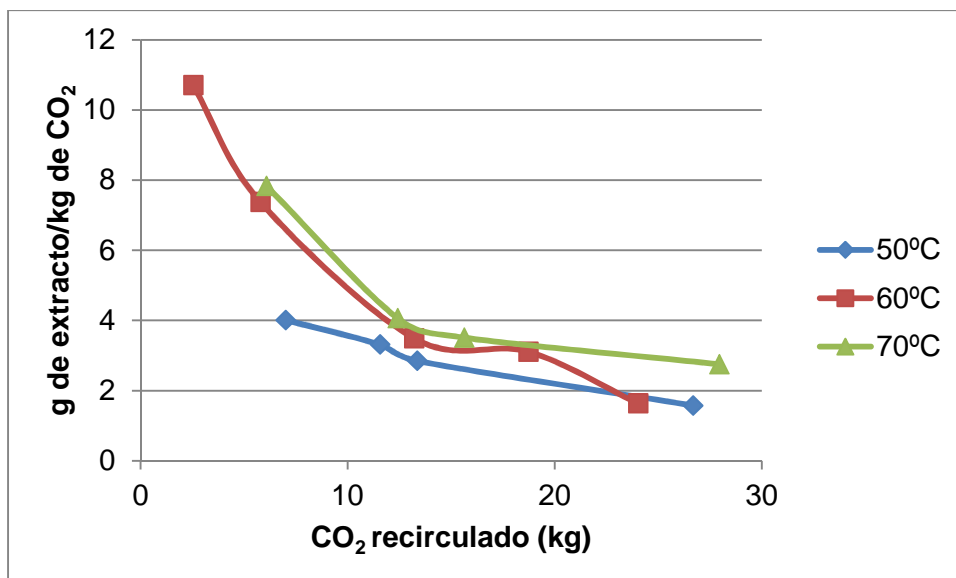


Fig. 7. Gramos de extracto por kg de CO₂ sobre CO₂ recirculado.

La figura 7 nos indica la cantidad de extracto que arrastra el disolvente a lo largo de la extracción. Entre los 10 y 13 kg de CO₂ recirculado se observan inflexiones que marcan el inicio de la etapa en la que predomina la transferencia de masa. Agotado el soluto menos ligado, el fluido comienza a difundir más interiormente en la cascarilla de trigo extrayendo la fracción más ligada. Se observa que, a mayor temperatura, el punto de inflexión se produce habiendo recirculado una masa mayor de CO₂, coincidiendo con una cantidad de masa extraída también mayor (Fig. 6). Se deduce por tanto, que a mayor temperatura se incrementa la solubilidad del soluto, merced a la prevalencia del efecto del incremento de la presión de vapor del soluto, sobre el efecto de disminución de la densidad del solvente.

Durante la fase inicial se observa similitud en el comportamiento a temperaturas de 60 y 70°C, con equilibrios de disolución muy superiores al de 50°C. Posteriormente, en las fases donde domina la transferencia de materia, la cantidad de soluto arrastrado se aproxima aunque la extracción a 70°C mantiene unos niveles sensiblemente superiores a los registrados a 50 y 60°C. Esta caída anticipada significa que se están acercando a la máxima extracción posible mucho antes que a 70°C. Aún deberían realizarse ensayos más largos para lograr agotar la extracción.

El menor flujo obtenido en uno de los ensayos a 60°C ha dado lugar al punto más elevado de la gráfica. Observando la pendiente, podría pensarse que una menor cantidad de flujo no afectaría sustancialmente a la curva de extracción y seguramente a la cantidad final extraída. Esta hipótesis debería de comprobarse mediante la comparación con experiencias en las que la carrera de la bomba se reduzca para obtener menores flujos.

5.2. Concentración de ácido ferúlico en el extracto.

Los resultados recibidos de la Universidad de Burgos, recogidos en el ANEXO II vienen dados en μg de AF / mL de muestra. En la figura 8 se muestran en μg de AF / g de extracto frente al CO_2 recirculado para tener una idea de la concentración de AF lograda durante la extracción.

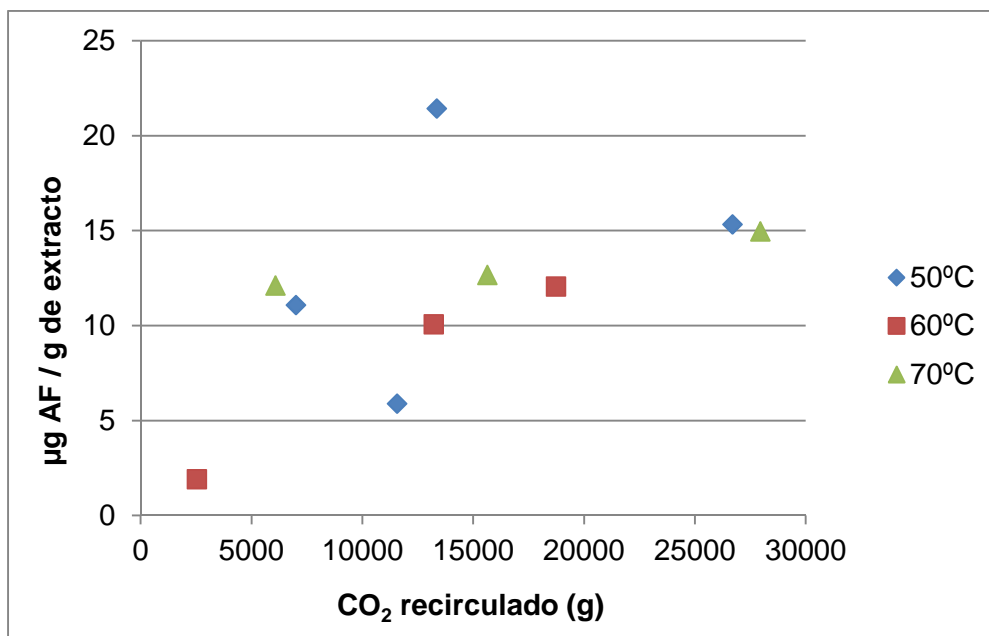


Fig. 8. Concentración de AF en el extracto sobre CO_2 recirculado.

Los resultados muestran cierta linealidad en la extracción de AF a 60 y 70°C pero una dispersión notable de las extracciones a 50°C. Para explicar este fenómeno se descartan las hipótesis de una degradación térmica del AF ya que se ha reportado una resistencia a temperaturas muy superiores a 70°C (Fiddler, Parker, Wasserman, & Doerr, 1967). La hipótesis de que el incremento de temperatura estuviese disminuyendo la densidad del disolvente y por tanto la solubilidad del soluto tampoco es válida, ya que a presiones de 400 bares se hace más prevalente el efecto de incremento de la presión de vapor del soluto (Sun, Li, & Quan, 2005). Otra hipótesis es que pueda deberse a la heterogeneidad del extracto recogido, que en el momento de tomar la alícuota, las diferentes fases no estuviesen perfectamente mezcladas recogiendo una fase más rica o menos rica en AF, según el caso.

Para ver la evolución de la cantidad de AF extraída según se desarrolla el ensayo, representamos los μg de AF extraído / g de salvado por kilo de CO_2 recirculado frente al mismo CO_2 recirculado (Fig. 9).

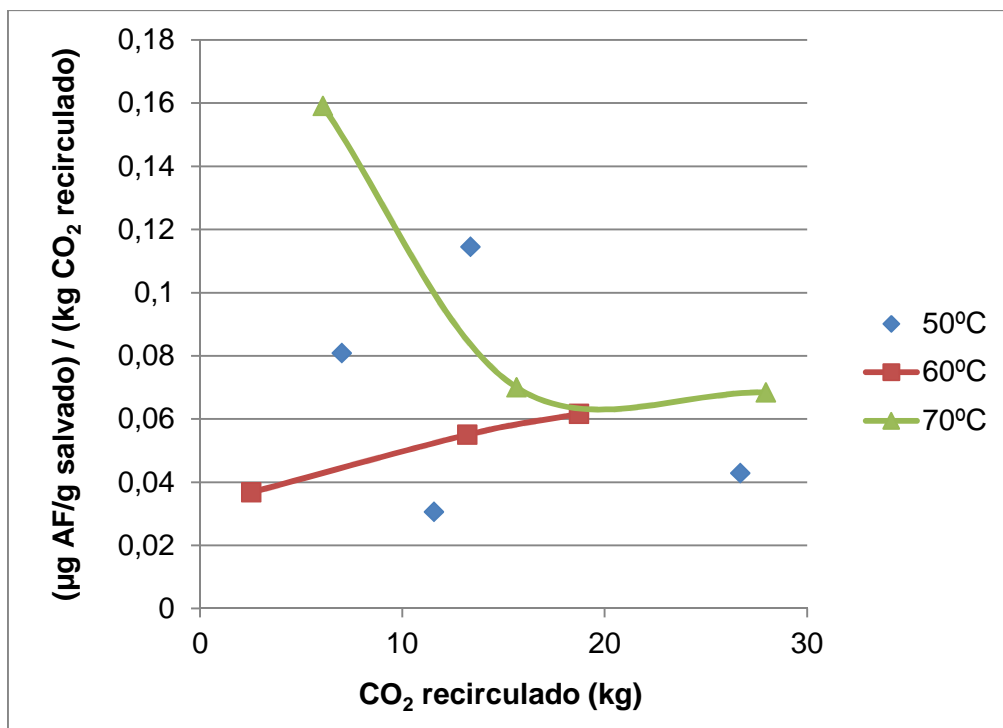


Fig. 9. Concentración de AF extraído por g de salvado por kilogramo de CO₂ sobre CO₂ recirculado.

Se ha obviado la línea para 50°C debido a la gran dispersión de los puntos. Una hipótesis se puede extraer al observar la disparidad entre las cantidades de ferúlico a 70 y 60°C. Recordemos que, por una deficiente refrigeración, el ensayo correspondiente a las variables (60°C, 30 min) se realizó con apenas la mitad de flujo que cabía esperar. A la vista de la figura. 9, se observa la bajísima proporción de AF que se corresponde con dicho ensayo, cuando posteriormente los demás valores tienden a asemejarse. Esto podría estar reflejando la gran influencia que podría estar teniendo la cantidad de flujo de CO₂ sobre la extracción de AF, mientras que no parecía influir sobre la cantidad de masa extraída.

No obstante, aunque la dispersión de puntos no nos permita deducir con fiabilidad las mejores condiciones de extracción de AF, sí podemos concluir, al comparar con la concentración de AF en las muestras de salvado hidrolizado, si el sistema resulta apto para su extracción. La media obtenida del análisis de las muestras hidrolizadas arrojaba un valor de 3,667 mg de AF por gramo de salvado, valor que, a pesar de ser muy inferior a los 6,6 mg que recogen otros autores, como cantidad total de AF presente en el salvado de trigo (Smith & Hartley, 1983), es tres órdenes de magnitud superior a los registrados en los ensayos. Por tanto la extracción con CO₂ supercrítico, en las condiciones ensayadas, no constituye un método apto para extraer AF del salvado de trigo.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la planta piloto de extracción con dióxido de carbono supercrítico a 400 bares, a temperaturas de 50, 60 y 70°C y tiempos de 30, 60 y 120 minutos reflejan que, si bien se ha logrado realizar una transferencia de masa, ésta no ha arrastrado apenas un ínfima parte del AF presente en el salvado de trigo.

Dado que la planta no permite trabajar con presiones muy superiores a la empleada en el presente trabajo, las experimentaciones futuras deberían plantear el uso de co-solventes de baja toxicidad como el etanol, o la realización de tratamientos previos que faciliten la liberación del AF ligado, tales como hidrólisis enzimáticas o pretratamientos con ultrasonidos tal como se aplica en el caso de la extracción Soxhlet.

Se podrían también realizar nuevos estudios para constatar si la cantidad de flujo está relacionada con la capacidad de extracción de AF.

No obstante la siguiente fase del proyecto permitirá estudiar la influencia que pueda tener el empleo del extracto encapsulado y comprobar si alguno de los componentes extraídos tiene, al igual que el AF, relación con el desarrollo del perfil aromático negativo del pan integral.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E. S. M., Hucl, P., Sosulski, F. W., Graf, R., Gillott, C., & Pietrzak, L. (2001). Screening Spring Wheat for Midge Resistance in Relation to Ferulic Acid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3559-3566.
- AESAN. (2011). Encuesta nacional de ingesta dietética (ENIDE): Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad Madrid.
- Bakke, A., & Vickers, Z. (2007). Consumer Liking of Refined and Whole Wheat Breads. *Journal of Food Science*, 72(7), S473.
- Barberousse, H., Kamoun, A., Chaabouni, M., Giet, J. M., Roiseux, O., Paquot, M., Blecker, C. (2009). Optimization of enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran, using response surface methodology, and characterization of the resulting fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1634-1641.
- Barros-Ríos, J., Malvar, R. A., & Santiago, R. (2011). Función de la pared celular del maíz (*Zea Mays* L.) como mecanismo de defensa frente a la plaga del taladro (*Ostrinia Nubilalis* Hüb. y *Sesamia Nonagroides* Lef.). *Revista de Educación Bioquímica*, 30(4), 132-142.
- Brunner, G. (1994). Gas extraction. An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes. Springer, New York, NY (1994).
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 21-33.
- del Valle, J. M., Rivera, O., Mattea, M., Ruetsch, L., Daghero, J., & Flores, A. (2004). Supercritical CO₂ processing of pretreated rosehip seeds: effect of process scale on oil extraction kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 31(2), 159-174.
- Dunnuck, J. (1991). NTP technical report on the toxicity studies of of n-Hexane in B6C3F1 Mice (Inhalation Studies)(CAS No. 110-54-3). *Toxicity report series*, 2, 1.
- Fiddler, W., Parker, W. E., Wasserman, A. E., & Doerr, R. C. (1967). Thermal decomposition of ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15(5), 757-761.
- Guillen, M. D., Blanco, J., Canga, J. S., & Blanco, C. G. (1991). Study of the effectiveness of 27 organic solvents in the extraction of coal tar pitches. *Energy & Fuels*, 5(1), 188-192. Jenkins, T. F., & Walsh, M. E. (1994). Instability of tetryl to Soxhlet extraction. *Journal of Chromatography A*, 662(1), 178.
- Jessop, P. G., & Leitner, W. (1998). Supercritical Fluids as Media for Chemical Reactions.
- King, M., & Bott, T. R. (1992). *Extraction of natural products using near-critical solvents*: Springer.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1390-1393.
- Luque de Castro, M. D., & García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1.
- Moskowitz, M. R., Bin, Q., Elias, R. J., & Peterson, D. G. (2012). Influence of Endogenous Ferulic Acid in Whole Wheat Flour on Bread Crust Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11245-11252.
- Perrut, M., Clavier, J. Y., Poletto, M., & Reverchon, E. (1997). Mathematical Modeling of Sunflower Seed Extraction by Supercritical CO₂. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 36(2), 430-435.

- Redgwell, R. J. a. F. M. (2005). Dietary fiber as a versatile food component: An industrial perspective. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(6), 521--535.
- Saber-Tehrani, M., Givianrad, M., Aberoomand-Azar, P., Waqif-Husain, S., & Jafari Mohammadi, S. (2012). Chemical Composition of Iran's Pistacia atlantica Cold-Pressed Oil. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Schieberle, P., & Grosch, W. (1992). Changes in the concentrations of potent crust odourants during storage of white bread. *Flavour and Fragrance Journal*, 7(4), 213.
- Smith, M. M., & Hartley, R. D. (1983). Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydrate Research*, 118(0), 65-80.
- Sovova, H. (2001). Solubility of ferulic acid in supercritical carbon dioxide with ethanol as cosolvent. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 46(5), 1255-1257.
- Sun, Y., Li, S., & Quan, C. (2005). Solubility of Ferulic Acid and Tetramethylpyrazine in Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 50(4), 1125-1128.
- Verma, B., Hucl, P., & Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, 116(4), 947.
- Zougagh, M., Valcárcel, M., & Ríos, A. (2004). Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(5), 399-405.

ANEXO I - TABLAS DE DATOS

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Masa inicial (g)	Masa final (g)	masa extraída (g)	CO ₂ cargado (g)	CO ₂ recirculado (g)	muestra total (g)
50	30	700	668,3	31,7	5653	7008	17,717
50	60	700	655,8	44,2	7280	13356	21,927
50	60	700	662,7	37,3	6999	11560	20,968
50	120	700	653,8	46,2	6455	26693	24,089
60	30	700	669,6	30,4	6314	2532	31,802
60	30	700	656,7	43,3	6663	5791	-----
60	60	700	655,3	44,7	5958	13210	37,755
60	120	700	640,7	59,3	6395	18727	40,542
60	120	700	634,1	65,9	6890	24035	52,87
70	30	700	650,5	49,5	5907	6077	22,265
70	60	700	646,4	53,6	6717	15640	34,451
70	60	700	644,1	55,9	6574	12414	45,21
70	120	700	620,8	79,2	6508	27959	73,958

Tabla 3. Datos de la extracción.

Muestra	Área pico	µg/mL	Muestra	Área pico	µg/mL
F1A	20486	58,45	M1'	752,981	1,33
F1A'	19537	55,71	M1	716,072	1,22
F1B	19588	55,85	M2	2219,04	5,57
F1B'	19310	55,05	M2'	2145,1	5,36
F1C	18421,4	52,48	M3	1494,42	3,47
F1C'	18302	52,13	M3'	1535,34	3,59
F2	23209	66,34	M4	1374,23	3,12
F2'	23228	66,39	M4'	1398,18	3,19
F2A	20938,8	59,76	M5	1441,28	3,32
F2A'	20928,4	59,73	M5'	1449,75	3,34
F2B	21204,4	60,53	M6	1340,37	3,03
F2B'	21198,5	60,52	M6'	1281,67	2,86
F2C	20115,4	57,38	M7	1396,93	3,19
F2C'	20127,5	57,42	M7'	1401,8	3,20
F3A	18181	51,78	M8	1101,4	2,33
F3B	18271,5	52,04	M9	418,393	0,36
F3B'	18312,6	52,16	M9'	462,467	0,48
F3C	15800	44,89	M10	1356,78	3,07
F3C'	15933,9	45,28	M10'	1330	3,00

Tabla 4. Concentración de AF de las muestras analizadas.

En la tabla 4. se presentan los resultados de concentración resultante de los análisis realizados en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos. Las muestras codificadas con "F" corresponden a las diversas repeticiones de las muestras de salvado hidrolizado, para la determinación del AF total.

Las muestras codificadas "M" corresponden a los resultados de 10 de las experiencias realizadas. Las unidades son µg de AF/mL de disolución.

En la siguiente página se incluyen las tablas 5 y 6, con todos los datos que han permitido los cálculos y elaboración de los gráficos del trabajo. En ella se ha tomado como concentración de AF a la función promedio de las repeticiones.

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Masa Salvado (g)	Masa extracto (g)	AF(µg)/mL	AF(µg)/g extracto	FA(µg)/g salvado	CO ₂ rec (g)
M1	50	60	700	1,083	1,27216	5,8733	0,354	11560
M2	50	60	700	1,275	5,46290	21,4232	1,529	13356
M3	60	60	700	1,754	3,53134	10,0665	0,727	13210
M4	70	60	700	1,248	3,15882	12,6555	1,095	15640
M5	50	120	700	1,087	3,33052	15,3198	1,143	26693
M6	70	30	700	1,216	2,94115	12,0935	0,967	6077
M7	70	120	700	1,069	3,19692	14,9528	1,912	27959
M8	50	30	700	1,054	2,33429	11,0735	0,567	7008
M9	60	30	700	1,109	0,42073	1,8969	0,093	2532
M10	60	120	700	1,259	3,03486	12,0527	1,154	18727

Tabla 5. Datos muestras analizadas por HPLC.

muestra	Masa muestra	masa seca	µg/mL	AF total(µg)/g de salvado	Promedio AF total(µg)/g de salvado
F1	0,520	0,46072	54,9455	3577,8003	3667,1955
F2	0,507	0,44920	61,0097	4074,5410	
F3	0,502	0,44477	49,6550	3349,2452	

Tabla 6. Datos muestras AF total.

ANEXO II - PUESTA A PUNTO DE LA PLANTA DE EXTRACCIÓN

Gran parte del trabajo del proyecto consistió en la adecuación de la planta para trabajar a presiones más elevadas a las habituales en anteriores usos.

Las válvulas de seguridad V-5 y V-8, se encontraban taradas a presiones inferiores a las de trabajo, adecuadas para proyectos anteriores. La inexistencia en el laboratorio de válvulas que se pudiesen tarar por encima de 400 bares, obligó a anular provisionalmente dichas válvulas quedando habilitada la válvula interna de la bomba.

La planta disponía de un sistema "PID (Proportional integral derivative) Controller BS-1100" para controlar la temperatura de entrada del CO₂ al extractor. La necesidad de mantener una temperatura estable en el propio extractor, obligó a la sustitución del interruptor simple de la camisa por otro PID Controller.

La gran cantidad de materia que es transferida a través de la válvula reductora hace que, en ocasiones, se atasque. Las nuevas presiones de trabajo hicieron recomendable instalar un sistema de alivio que permitiese despresurizar el extractor independientemente de la válvula reductora. Para esto se instaló la válvula V-13 comunicada con la tubería de venteo.

Se realizó una revisión exhaustiva de todas las conducciones ante las continuas fugas que se detectaban cuando se superaban los 350 bares de presión en el extractor, Fugas que conllevaban la necesidad de abortar las experiencias por no poder mantener estables las condiciones de operación.

De cara al futuro, sería interesante la instalación de otro medidor de flujo antes de la válvula de entrada de CO₂, lo que permitiría cargar durante el ensayo el CO₂ necesario para alcanzar el equilibrio, evitando tener que sobrecargar el sistema para que, posteriormente, se alcance el equilibrio en las condiciones de trabajo buscadas. Este flujómetro permitiría medir la cantidad de CO₂ cargada una vez iniciado el ensayo, pudiéndola diferenciar del recirculado.

ANEXO III - PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN

1º Llenado de la cesta de extracción

Se procede a llenar la cesta de acero inoxidable con el material del que se pretende extraer la muestra. Para ello se dispone una masa conocida en el interior de un cilindro, tomando medida de la distancia del lecho a la boca del cilindro, esto permite el posterior cálculo de la densidad aparente de la materia prima (Fig. 10.). Se coloca un tamiz para evitar que la materia prima migre libremente fuera de la cámara de extracción. El borde del tamiz se envuelve previamente con teflón para obtener un sellado perfecto. (Fig. 11.).



Fig. 10. Distancia al lecho.



Fig. 11. Ajuste de tamiz

La parte inferior del cilindro, por la que entra el dióxido de carbono, cuenta con un filtro de acero y una junta tórica. El cilindro se introduce en la cámara empujado por un resorte que garantiza el sellado de la junta tórica inferior (Fig. 12) y mediante una prensa hidráulica se acciona el sellado cónico (Fig. 13.).



Fig. 12. Colocación de aro y resorte



Fig. 13. Prensa de sellado

2º Preparativos para operar.

Se procede a activar la refrigeración del separador (si se estima necesario) y de la bomba (Fig. 14 y 15). Esta refrigeración garantiza la eficacia en el bombeo al mantener el dióxido de carbono en estado líquido en el momento de ser bombeado. Es recomendable activar la refrigeración al menos media hora antes de operar y asegurarse de que el tanque de refrigeración está lo suficientemente frío como para mantener la temperatura de la bomba por debajo de -7°C durante toda la experiencia, de lo contrario el flujo puede reducirse o hacerse inestable.



Fig. 14 y 15. Camisas de refrigeración de separador y bomba.

Los PID (Proportional integral derivative) Controller son dispositivos que, mediante procesos algorítmicos basados en los datos que va arrojando el sistema, aplican la medida correctora adecuada para el ajuste, en este caso, de la temperatura de la tubería de entrada y de la cámara de separación. Para su adecuado funcionamiento deben mantenerse programados a temperatura ambiente hasta que se inicie la carga ya que la ausencia de flujo provocaría errores en su autoajuste.

Cerramos la cámara de separación (Fig. 16) y procedemos a abrir la válvula de entrada de CO_2 permitiendo la circulación por todo el sistema y su posterior salida a través de la válvula de despresurización, de este modo arrastramos el aire existente en el sistema. Por último ponemos a cero el medidor de flujo (Fig. 17.).



Fig. 16. Tapa del separador



Fig. 17. Medidor de flujo

3º Carga del sistema

Cerciorarse de que las válvulas de despresurización y toma de muestras se hallan perfectamente cerradas. Abrir la válvula de entrada de CO₂ y permitir el acceso libre a la planta hasta alcanzar la presión de botella. Según nos aproximamos a la presión deseada en el separador vamos cerrando la válvula de expansión “GO” (Fig. 18).

Alcanzada la presión de botella, cerramos totalmente la válvula de recirculación y programamos los PID (Fig.19) de entrada y camisa de la cámara de extracción a la temperatura deseada, procediendo inmediatamente a accionar la bomba.



Fig. 18. Válvula de expansión “GO”



Fig. 19. PID Controller

Conforme asciende la presión se ha de ir cerrando progresivamente la válvula GO de modo que al final de la carga se encuentre justamente en el punto de equilibrio que permita mantener el ΔP apropiado.

Alcanzada la presión de trabajo se espera unos segundos hasta que dicha presión sea estable, pudiendo accionar nuevamente la bomba por pequeños intervalos de tiempo.

En aquellas experiencias en las que sea importante conocer la cantidad de CO₂ cargado es conveniente cargar con algo de sobrepresión ya que, iniciada la experiencia, la expansión en el separador genera la inmediata disminución de temperatura y presión hasta su estabilización. Otro método sería llevar a cabo un enfriamiento previo del separador. Se recomienda realizar ensayos previos para probar exactamente la sobrepresión necesaria.

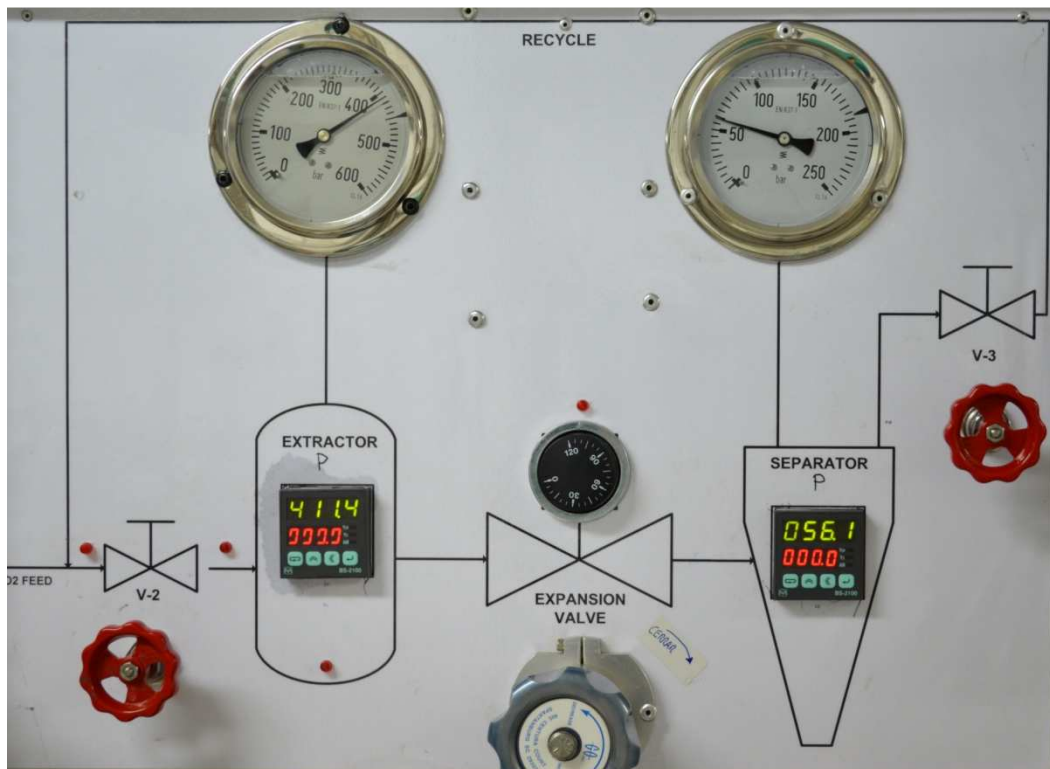


Fig. 20. Panel de control

Estabilizada la presión se cierra la válvula de entrada de CO₂ y se abre la que permite la recirculación del sistema.

4º Extracción

Antes de volver a accionar la bomba, se ajusta la carrera de ésta (Fig.21) en función del flujo deseado y se anota el CO₂ cargado en el sistema. Tras anotar también la hora de inicio y activar la grabación de datos se acciona la bomba para comenzar la recirculación. Durante los primeros minutos se produce un descenso generalizado de presión hasta alcanzar el equilibrio definitivo, mediante la válvula GO podemos realizar pequeños ajustes para conseguir las presiones deseadas. Acabado el tiempo de extracción se detiene la bomba y la grabación (Fig.22), tomando nota del CO₂ recirculado.

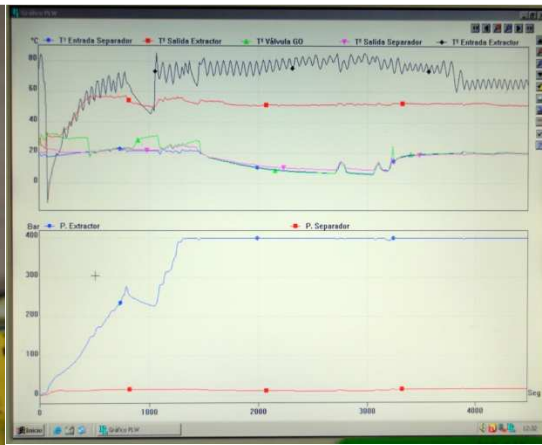


Fig. 21. Ajuste de la carrera de la bomba. Fig. 22. Registro gráfico de la grabación.

5º Despresurización

Para esta etapa disponemos de una válvula general de despresurización y dos de ajuste, una de ellas micrométrica. Mediante éstas últimas graduaremos la velocidad de despresurización en función de la muestra. Estas válvulas están calefactadas para evitar congelaciones y por tanto atascos o daños.

Progresivamente se va abriendo la válvula GO para que el CO₂ discorra al separador y de ahí al exterior por el canal de venteo.

Existe la posibilidad de despresurizar directamente desde la cámara de extracción en caso de atasco en la válvula GO o si se precisa una rápida despresurización.

6º Recogida de la muestra

Despresurizado el sistema, se abren ambas cámaras extrayendo el material de partida, que deberá ser pesado para estimar la cantidad de materia extraída.

La muestra de la cámara de separación suele encontrarse congelada (Fig. 11), se extrae de la cámara con instrumental diverso y la fracción adherida a las paredes se arrastra con un disolvente adecuado que, por sus características, permita su total separación posterior.

La fracción diluida se recoge a través de la válvula de toma de muestras situada en la parte inferior de la cámara de separación. La muestra se pesa así como la fracción extraída con solvente una vez purificada en el rotavapor.

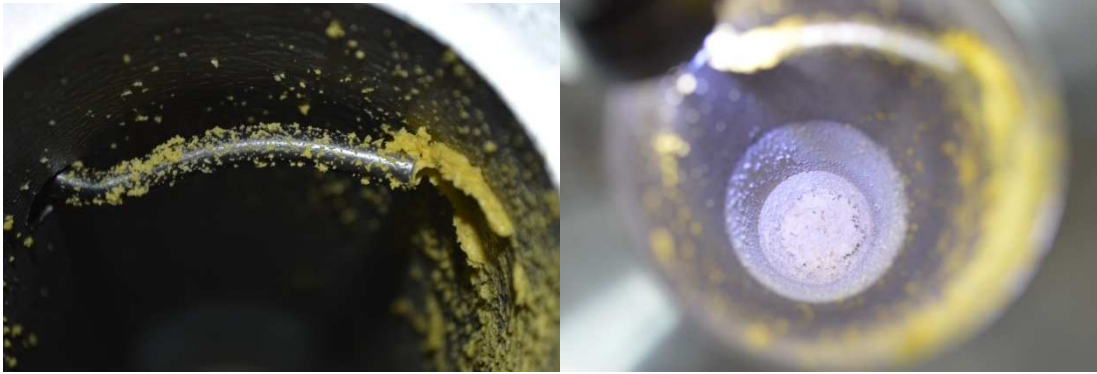


Fig. 23. Tubo de entrada al separador

Fig. 24. Muestra congelada

7º Limpieza y mantenimiento

Se debe hacer circular por todo el circuito CO₂ o aire comprimido con el mismo solvente empleado para arrastrar la muestra. Tras el proceso es muy importante dejar circular el aire comprimido durante varios minutos permitiendo que salga por las válvulas de despresurización, con la finalidad de eliminar totalmente cualquier traza de solvente. Asimismo se debe prestar especial atención acerca de la compatibilidad entre los disolventes empleados y los materiales con los que están hechas las juntas de las válvulas y demás componentes del sistema. En caso de verse obligado a utilizar un disolvente incompatible con las juntas de goma de las válvulas se podrá realizar una limpieza por etapas evitando la circulación del disolvente a través de dichos puntos sensibles o bien proceder a su sustitución tras la limpieza.