



**Università degli Studi di Roma “La Sapienza”**

Dottorato di Ricerca in Processi Chimici Industriali

XVII Ciclo

**Frazionamento di oli di pesce con  
anidride carbonica supercritica**

Autore:  
**Ing. Marco Maschietti**

Relatore:  
**Prof. Fausto Gironi**

Roma, Dicembre 2004

*Ai miei genitori*

# Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Fausto Gironi per la sua disponibilità, per i suoi insegnamenti e per il contributo fornito, mediante continue discussioni ed approfondimenti, allo svolgimento di questa Tesi. Ringrazio inoltre Claudio Capparucci, senza il quale le ore trascorse in laboratorio sarebbero state meno fruttuose e divertenti, per l'assistenza e l'aiuto che mi ha continuamente fornito con la sua esperienza ed infinita pazienza. Ringrazio infine la Prof. Annesini ed il Prof. Marrelli per gli scambi di idee che hanno contribuito indirettamente alla realizzazione di questa Tesi.

# Prefazione

Negli ultimi decenni la ricerca scientifica in campo medico e biochimico ha messo in luce l'importanza degli acidi grassi polinsaturi  $\omega 3$ , in special modo l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), nell'alimentazione umana e nella terapia di alcune patologie molto diffuse. Per questo motivo, negli ultimi anni la produzione di oli ad alto contenuto di EPA e DHA, detti *oli pharmaceutical grade*, è in continuo aumento. Tali oli sono utilizzati, sia in forma di miscele di trigliceridi che di miscele di esteri etilici di acidi grassi, come integratori alimentari oppure vengono prescritti nella terapia di alcune patologie dell'apparato cardiocircolatorio e di talune patologie infiammatorie croniche.

Ad oggi, la fonte più importante degli oli ricchi in EPA e DHA è senza dubbio costituita dagli oli di pesce. A partire dagli oli di pesce, mediante processi di raffinazione e frazionamento, si possono ottenere miscele di esteri etilici ad alto contenuto di EPA e DHA, adatte ad essere usate come base nella formulazione degli *oli pharmaceutical grade*. Dal momento che gli oli di pesce, per il loro elevato tenore in composti ad alto grado di insaturazione, sono fortemente soggetti a fenomeni di termodegradazione ed ossidazione, con conseguente formazione di composti nocivi per la salute umana, è di massima importanza sviluppare dei processi di raffinazione e frazionamento che escludano il contatto degli oli con l'ossigeno ed adoperino temperature di esercizio moderate (inferiori a  $100^{\circ}C$ ). E' inoltre richiesto, dato il campo di utilizzo degli *oli pharmaceutical grade*, che il prodotto finito non conservi tracce di eventuali solventi utilizzati nella lavorazione. Queste necessità rendono inattuabile la maggior parte dei processi di frazionamento convenzionali in quanto richiedono o temperature di esercizio eccessivamente elevate (come nella distillazione sotto vuoto) oppure l'utilizzo di solventi organici nocivi che non possono venire integralmente eliminati dal prodotto finito.

Uno dei processi più promettenti per frazionare miscele di esteri etilici derivate da oli di pesce, è il frazionamento con anidride carbonica supercritica come solvente. L'impiego dell'anidride carbonica in condizioni supercritiche è favorito dal fatto che si tratta di un solvente non infiammabile, non nocivo e completamente separabile dal prodotto finito mediante una semplice riduzione di pressione in quanto, in condizioni di bassa pressione, l'anidride carbonica ha una solubilità praticamente nulla nell'olio. Inoltre, il basso valore della temperatura critica dell'anidride carbonica ( $31.1^{\circ}C$ ) consente di realizzare il processo a valori di temperatura moderati ( $40 - 80^{\circ}C$ ) che non causano fenomeni di termodegradazione dell'olio.

In questo lavoro viene presentato uno studio teorico-sperimentale riguardante il frazionamento di miscele di esteri etilici, derivate da olio di pesce, con

anidride carbonica supercritica. Dal momento che l'EPA ed il DHA costituiscono una frazione rilevante degli acidi grassi a 20 e 22 atomi di carbonio (C20 e C22) contenuti nell'olio, l'obiettivo del processo è stato indirizzato alla separazione dei diversi componenti dell'olio sulla base della lunghezza della catena.

In primo luogo è stato studiato il frazionamento di una miscela sintetica di esteri etilici costituita da cinque componenti, che differiscono sulla base della lunghezza della catena del corrispondente acido grasso (da C14 a C22). Tale miscela è stata sottoposta a frazionamento in un'apparecchiatura di tipo semicontinuo a singolo stadio di equilibrio, per valori di pressione compresi fra 9 e 16 *MPa* e temperatura fra 42 e 60 °C. L'obiettivo di tali prove sperimentali consiste nel verificare la capacità del solvente supercritico di frazionare differenti esteri etilici di acidi grassi sulla base della lunghezza della catena e di selezionare i valori più promettenti per i parametri operativi pressione-temperatura in vista della realizzazione del processo di separazione sulla matrice naturale. Inoltre, i risultati di questa fase della sperimentazione sono stati utilizzati per testare l'affidabilità di una modellizzazione del processo basata sull'equazione di stato di Peng-Robinson con regole di mescolamento di van der Waals e parametri di interazione binaria determinati per via empirica.

In una seconda fase, il processo appena descritto è stato applicato ad una miscela naturale derivante dalla transesterificazione di una miscela di oli di pesce con alcool etilico. In questo modo è stato possibile validare, sia in termini sperimentali che modellistici, i risultati ottenuti sulla miscela sintetica che rappresenta uno schema semplificato, per il ridotto numero di componenti, della matrice naturale. Con l'obiettivo di sviluppare un processo dalle potenzialità produttive, nell'ultima parte del lavoro è stato messo a punto un impianto di laboratorio adatto a realizzare un processo semicontinuo che preveda il riflusso di parte dell'olio estratto in una colonna, dotata di un riempimento strutturato ad alta efficienza, controcorrente multistadio. Questo impianto ha consentito di studiare le condizioni ottimali di pressione, temperatura e rapporto di riflusso al fine di ottenere un raffinato ricco in componenti pesanti con valori di recupero decisamente superiori a quelli ottenibili con un processo a singolo stadio di equilibrio. Infine, è stata sviluppata una modellizzazione anche per quanto riguarda il processo multistadio, schematizzando la colonna a riempimento come una successione di stadi ideali di equilibrio. Data la non stazionarietà del processo studiato, la modellizzazione ha richiesto l'implementazione di un sistema di equazioni differenziali rappresentative dei bilanci dei singoli componenti nei vari stadi. Le condizioni di equilibrio nel generico stadio sono state modellizzate mediante l'equazione di stato di Peng-Robinson, con parametri di interazione

binaria determinati dalle prove sperimentali a singolo stadio di equilibrio. Il modello proposto è stato implementato mediante il software Matlab 6.5 e consente di calcolare, al variare del tempo, i profili di concentrazione dei vari componenti lungo la colonna, i profili di densità delle fasi a contatto e le portate circolanti in colonna. Dato l'elevato numero di parametri che è possibile variare in un processo di tipo non stazionario e semicontinuo (temperatura e pressione di esercizio, portata di solvente, portata di riflusso e sua legge di variazione nel tempo, quantità di alimentazione caricata e sua suddivisione fra saturatore ed accumulatore di riflusso, durata dell'operazione) la disponibilità di un modello affidabile di simulazione è un elemento fondamentale per ridurre il numero di prove sperimentali necessarie a selezionare i valori operativi ottimali per una data specifica di separazione e per il progetto delle apparecchiature necessarie per realizzare il processo.

# Indice

<b>1</b>	<b>Gli acidi grassi polinsaturi</b>	<b>1</b>
1.1	I grassi e gli acidi grassi . . . . .	1
1.1.1	I grassi: generalità . . . . .	1
1.1.2	Nomenclatura degli acidi grassi . . . . .	3
1.1.3	Gli acidi grassi in natura e le loro proprietà . . . . .	5
1.2	Il metabolismo degli acidi grassi . . . . .	7
1.2.1	Introduzione . . . . .	7
1.2.2	La $\beta$ – ossidazione degli acidi grassi . . . . .	9
1.2.3	La sintesi degli acidi grassi . . . . .	12
1.3	Acidi grassi alimentari e salute umana . . . . .	15
1.3.1	Gli acidi grassi negli alimenti . . . . .	15
1.3.2	Studi epidemiologici relativi al consumo di $\omega 3$ . . . . .	20
1.3.3	Assunzione ottimale di AGPI $\omega 3$ e $\omega 6$ . . . . .	23
1.4	Applicazioni terapeutiche degli $\omega 3$ . . . . .	26
1.4.1	Malattie cardiovascolari . . . . .	26
1.4.2	Malattie infiammatorie croniche . . . . .	30
1.5	Oli arricchiti in $\omega 3$ : prospettive commerciali . . . . .	33
<b>2</b>	<b>Estrazione, raffinazione ed arricchimento dell’olio di pesce</b>	<b>43</b>
2.1	L’olio di pesce . . . . .	43
2.1.1	Composizione dell’olio di pesce . . . . .	43
2.1.2	Produzione ed utilizzi: cenni storici . . . . .	45
2.1.3	Produzione ed utilizzi: prospettiva odierna . . . . .	47
2.2	Processi di estrazione dell’olio dal pesce . . . . .	50
2.2.1	Conservazione del pesce . . . . .	51
2.2.2	Wet Reduction Process . . . . .	52
2.2.3	Estrazione con solvente convenzionale . . . . .	55
2.2.4	Estrazione con anidride carbonica supercritica . . . . .	56
2.3	Raffinazione dell’olio di pesce . . . . .	61
2.4	Frazionamento dell’olio di pesce . . . . .	64
2.4.1	Considerazioni generali . . . . .	64

2.4.2	Frazionamento di miscele derivate da oli di pesce con anidride carbonica supercritica . . . . .	68
<b>3</b>	<b>Frazionamento di una miscela sintetica di esteri etilici</b>	<b>78</b>
3.1	Introduzione . . . . .	78
3.2	Descrizione dell'impianto sperimentale . . . . .	79
3.3	Metodologia della sperimentazione . . . . .	81
3.4	Materiali della sperimentazione . . . . .	82
3.5	Analisi gascromatografica . . . . .	84
3.6	Risultati sperimentali . . . . .	87
3.7	Modellizzazione dell'equilibrio di fase . . . . .	100
3.8	Calcolo dei parametri critici e del fattore acentrico . . . . .	104
3.9	Equilibrio di fase dei sottosistemi binari . . . . .	107
3.10	Modellizzazione del processo di estrazione semicontinuo a singolo stadio . . . . .	111
3.11	Conclusioni . . . . .	117
<b>4</b>	<b>Frazionamento dell'olio naturale</b>	<b>120</b>
4.1	Introduzione . . . . .	120
4.2	Materiali della sperimentazione . . . . .	121
4.2.1	Caratterizzazione della matrice naturale . . . . .	121
4.2.2	Altri materiali . . . . .	125
4.3	Descrizione dell'impianto sperimentale . . . . .	125
4.4	Metodologia della sperimentazione . . . . .	128
4.4.1	Prove a singolo stadio di equilibrio . . . . .	128
4.4.2	Prove multistadio con riflusso esterno . . . . .	130
4.5	Prove a singolo stadio di equilibrio . . . . .	132
4.5.1	Risultati sperimentali . . . . .	132
4.5.2	Modellizzazione . . . . .	145
4.6	Prove semicontinue con riflusso esterno . . . . .	147
4.6.1	Risultati sperimentali . . . . .	147
4.6.2	Modellizzazione delle prove multistadio . . . . .	151
4.6.3	Risultati e discussione . . . . .	158
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>176</b>
<b>A</b>	<b>Programmi di calcolo</b>	<b>178</b>
A.1	Calcolo del volume specifico . . . . .	178
A.2	Calcolo dei coefficienti di fugacità . . . . .	179
A.3	Calcolo del Flash . . . . .	182
A.4	Calcolo delle condizioni iniziali . . . . .	184

A.5 Simulazione del processo semicontinuo a singolo stadio . . . . 185  
A.6 Calcolo del sistema multistadio a riflusso esterno . . . . . 188

# Elenco delle figure

2.1	Schema a blocchi del Wet Reduction Process . . . . .	53
2.2	Schema a blocchi del processo di raffinazione per un olio di pesce destinato al frazionamento . . . . .	63
3.1	Impianto di laboratorio per la realizzazione delle prove sperimentali in modalità semicontinua a singolo stadio di equilibrio . . . . .	80
3.2	Tipico tracciato gascromatografico della miscela sintetica di esteri etilici utilizzata come alimentazione . . . . .	85
3.3	Olio estratto a temperatura di $42^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello (* $90\ atm$ ; $\nabla$ $100\ atm$ ; $\circ$ $120\ atm$ ) . . .	89
3.4	Olio estratto a temperatura di $50^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello (* $110\ atm$ ; $\nabla$ $120\ atm$ ; $\circ$ $140\ atm$ ) . .	89
3.5	Olio estratto a temperatura di $60^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello (* $130\ atm$ ; $\nabla$ $140\ atm$ ; $\circ$ $160\ atm$ ) . .	90
3.6	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $42^{\circ}C$ e $90\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$ $EE - C14$ ; $\nabla$ $EE - C16$ ; $\square$ $EE - C18$ ; $\circ$ $EE - C20$ ; * $EE - C22$ ) . . .	91
3.7	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $42^{\circ}C$ e $100\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$ $EE - C14$ ; $\nabla$ $EE - C16$ ; $\square$ $EE - C18$ ; $\circ$ $EE - C20$ ; * $EE - C22$ ) . . .	92
3.8	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $42^{\circ}C$ e $120\ atm$ . Punti sperimentali. ( $\diamond$ $EE - C14$ ; $\nabla$ $EE - C16$ ; $\square$ $EE - C18$ ; $\circ$ $EE - C20$ ; * $EE - C22$ ) . . . . .	92
3.9	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$ $EE - C14$ ; $\nabla$ $EE - C16$ ; $\square$ $EE - C18$ ; $\circ$ $EE - C20$ ; * $EE - C22$ ) . . .	93

3.10	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $120\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	93
3.11	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $140\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	94
3.12	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $60^{\circ}C$ e $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	94
3.13	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $60^{\circ}C$ e $140\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	95
3.14	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $60^{\circ}C$ e $160\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	95
3.15	Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $42^{\circ}C$ e $100\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	96
3.16	Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	97
3.17	Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $120\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	97
3.18	Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $60^{\circ}C$ e $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ )	98

3.19	Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO <sub>2</sub> -EE-C14:0. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond 40^{\circ}C$ ; $\nabla 50^{\circ}C$ ; $\circ 60^{\circ}C$ ) . . . . .	109
3.20	Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO <sub>2</sub> -EE-C16:0. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond 40^{\circ}C$ ; $\nabla 50^{\circ}C$ ; $\circ 60^{\circ}C$ ) . . . . .	109
3.21	Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO <sub>2</sub> -EE-C18:1. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond 40^{\circ}C$ ; $\nabla 50^{\circ}C$ ; $\circ 60^{\circ}C$ ) . . . . .	110
3.22	Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO <sub>2</sub> -EE-EPA. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond 40^{\circ}C$ ; $\nabla 50^{\circ}C$ ; $\circ 60^{\circ}C$ ) . . . . .	110
3.23	Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO <sub>2</sub> -EE-DHA. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond 40^{\circ}C$ ; $\nabla 50^{\circ}C$ ; $\circ 60^{\circ}C$ ) . . . . .	111
3.24	Schema simbolico del processo di estrazione semicontinuo a singolo stadio di equilibrio . . . . .	112
4.1	Tipico tracciato gascromatografico dell'olio naturale utilizzato come alimentazione . . . . .	122
4.2	Spettro di massa del C20:0 . . . . .	123
4.3	Spettro di massa del C20:1 $\omega$ 9 . . . . .	123
4.4	Spettro di massa del C20:3 $\omega$ 7 . . . . .	124
4.5	Spettro di massa del C20:4 $\omega$ 6 . . . . .	124
4.6	Impianto di laboratorio per la realizzazione delle prove sperimentali in modalità semicontinua a singolo stadio di equilibrio e multistadio con riflusso esterno . . . . .	127
4.7	Olio naturale estratto a temperatura di $42^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $* 100 atm$ ; $\nabla 110 atm$ ) . . .	133
4.8	Olio naturale estratto a temperatura di $50^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $* 110 atm$ ; $\nabla 120 atm$ ; $\circ 130 atm$ ) . . . . .	134
4.9	Olio naturale estratto a temperatura di $60^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $* 130 atm$ ; $\nabla 140 atm$ ; $\circ 150 atm$ ) . . . . .	134
4.10	Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a $42^{\circ}C$ e $100 atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . . . .	136

- 4.11 Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $42^{\circ}C$  e  $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello. ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 136
- 4.12 Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $50^{\circ}C$  e  $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 137
- 4.13 Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $50^{\circ}C$  e  $120\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 137
- 4.14 Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $50^{\circ}C$  e  $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 138
- 4.15 Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $60^{\circ}C$  e  $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 138
- 4.16 Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $60^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 139
- 4.17 Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $60^{\circ}C$  e  $150\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 139
- 4.18 Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $42^{\circ}C$  e  $100\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ ) . . . . . 140

4.19	Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $42^{\circ}C$ e $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ ) . . . . .	141
4.20	Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ ) . . . . .	141
4.21	Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $120\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ ) . . . . .	142
4.22	Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $50^{\circ}C$ e $120\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ ) . . . . .	142
4.23	Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $60^{\circ}C$ e $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ ) . . . . .	143
4.24	Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $60^{\circ}C$ e $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ ) . . . . .	143
4.25	Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a $60^{\circ}C$ e $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ; $\nabla EE - C16$ ; $\square EE - C18$ ; $\circ EE - C20$ ; $* EE - C22$ ) . . . . .	144
4.26	Schema simbolico del sistema: saturatore + colonna a $n$ stadi di equilibrio . . . . .	152
4.27	Schema simbolico della risoluzione della Fase 1 del piatto di testa . . . . .	154
4.28	Schema simbolico della risoluzione della Fase 3 del piatto di testa . . . . .	154

4.29	Schema simbolico della risoluzione della Fase 1 del piatto generico . . . . .	156
4.30	Schema simbolico della risoluzione della Fase 3 del piatto generico . . . . .	156
4.31	Portata di olio estratta dalla testa della colonna a 60 °C e 140 atm. Colonna $n = 2$ . . . . .	159
4.32	Portata di olio estratta dalla testa della colonna a 60 °C e 140 atm. Colonna $n = 3$ . . . . .	159
4.33	Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a 60 °C e 140 atm. Colonna $n = 2$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . . . .	160
4.34	Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a 60 °C e 140 atm. Colonna $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . . . .	160
4.35	Portata di olio estratta dalla testa della colonna a 42 °C e 100 atm. Colonna $n = 3$ . . . . .	161
4.36	Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a 42 °C e 100 atm. Colonna $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . . . .	162
4.37	Portata di olio estratta dalla testa della colonna a 50 °C e 120 atm. Colonna $n = 3$ . . . . .	162
4.38	Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a 50 °C e 120 atm. Colonna $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . . . .	163
4.39	Composizione del raffinato a 42 °C e 100 atm. Colonna $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . .	164
4.40	Composizione del raffinato a 50 °C e 120 atm. Colonna $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . .	165
4.41	Composizione del raffinato a 60 °C e 140 atm. Colonna $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE-C14$ ; $\nabla EE-C16$ ; $\square EE-C18$ ; $\circ EE-C20$ ; $* EE-C22$ ) . . .	165
4.42	Profilo di concentrazione della classe EE-C16 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 42 °C, 100 atm	168
4.43	Profilo di concentrazione della classe EE-C16 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 50 °C, 120 atm	168

- 4.44 Profilo di concentrazione della classe EE-C16 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$ ,  $140\ atm$  169
- 4.45 Profilo di concentrazione della classe EE-C18 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $42^{\circ}C$ ,  $100\ atm$  169
- 4.46 Profilo di concentrazione della classe EE-C18 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $50^{\circ}C$ ,  $120\ atm$  170
- 4.47 Profilo di concentrazione della classe EE-C18 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$ ,  $140\ atm$  170
- 4.48 Profilo di concentrazione della classe EE-C20 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $42^{\circ}C$ ,  $100\ atm$  171
- 4.49 Profilo di concentrazione della classe EE-C20 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $50^{\circ}C$ ,  $120\ atm$  171
- 4.50 Profilo di concentrazione della classe EE-C20 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$ ,  $140\ atm$  172
- 4.51 Profilo di concentrazione della classe EE-C22 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $42^{\circ}C$ ,  $100\ atm$  172
- 4.52 Profilo di concentrazione della classe EE-C22 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $50^{\circ}C$ ,  $120\ atm$  173
- 4.53 Profilo di concentrazione della classe EE-C22 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$ ,  $140\ atm$  173
- 4.54 Profilo di densità delle due fasi circolanti in colonna a  $60^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . . . . . 174

# Elenco delle tabelle

1.1	Composizione di alcuni grassi naturali in termini degli acidi costituenti . . . . .	2
1.2	Nomenclatura di alcuni fra i più frequenti acidi grassi . . . . .	4
1.3	Proprietà fisiche di alcuni acidi grassi . . . . .	6
1.4	Composizione in acidi grassi del tuorlo di diversi tipi di uova .	18
1.5	Composizione in acidi grassi di pescato e del pesce di acquacoltura . . . . .	19
1.6	Rapporto $\omega 6/\omega 3$ nella dieta di diverse popolazioni . . . . .	21
1.7	Relazione fra la composizione delle membrane dei trombociti e mortalità da malattia cardiovascolare . . . . .	22
1.8	Razione giornaliera adeguata di alcuni acidi grassi . . . . .	24
1.9	Composizione in acidi grassi di prodotti commerciali venduti nelle farmacie italiane . . . . .	34
1.10	Quantitativo equivalente alla AI per EPA e DHA per vari prodotti marini . . . . .	35
2.1	Composizione di alcuni fra i più diffusi oli naturali in termini degli acidi grassi costituenti (frazione in massa) . . . . .	44
2.2	Produzione mondiale dei più importanti oli vegetali e dell'olio di pesce (in milioni di tonnellate) . . . . .	49
2.3	Coefficienti di partizione per i principali componenti dell'olio in diverse condizioni operative per il sistema anidride carbonica-esteri etilici derivati da olio di menhaden . . . . .	69
2.4	Variazione percentuale dei coefficienti di partizione per i principali componenti dell'olio al variare della temperatura (da $70^{\circ}C$ a $90^{\circ}C$ ) a pressione costante ( $151\ bar$ ) . . . . .	70
3.1	Specifiche relative agli esteri etilici utilizzati per la realizzazione della miscela sintetica di alimentazione . . . . .	83
3.2	Composizione dei prodotti ricchi in EPA e DHA forniti dalla K.D.-Pharma . . . . .	83

3.3	Tempi di ritenzione dei 5 componenti principali e delle 6 impurezze . . . . .	86
3.4	Composizione effettiva e gascromatografica dell'alimentazione . . . . .	86
3.5	Condizioni operative delle prove sperimentali sulla matrice sintetica . . . . .	87
3.6	Solubilità media [ $g_{olio}/kg_{CO_2}$ ] della miscela sintetica calcolata dai risultati sperimentali . . . . .	90
3.7	Selettività media nelle varie condizioni operative calcolata dai risultati sperimentali. I valori in parentesi tonda sono riferiti alla selettività media calcolata dalle simulazioni . . . . .	99
3.8	Termini di contributo di gruppo per il calcolo dei parametri critici e della temperatura di ebollizione normale . . . . .	105
3.9	Gruppi costituenti gli esteri etilici da utilizzare per l'applicazione dei metodi a contributo di gruppo. I valori in parentesi tonda vanno utilizzati per l'applicazione del metodo di Cordes e Rarey . . . . .	105
3.10	Valori dei parametri utilizzati nella modellizzazione . . . . .	107
3.11	Parametri di interazione binaria $CO_2$ -esteri . . . . .	108
3.12	Componenti rappresentativi delle singole classi . . . . .	113
3.13	Parametri di interazione binaria utilizzati nella modellizzazione del processo semicontinuo a singolo stadio di equilibrio. I parametri $\kappa_{1j}$ si calcolano dalla relazione: $\kappa_{1j} = \alpha_{1j} + \beta_{1j} T$ , dove $T$ è la temperatura espressa in kelvin. . . . .	116
4.1	Composizione gascromatografica dell'alimentazione naturale . . . . .	125
4.2	Condizioni operative delle prove sperimentali di frazionamento di tipo semicontinuo a singolo stadio di equilibrio sulla matrice naturale . . . . .	132
4.3	Solubilità media [ $g_{olio}/kg_{CO_2}$ ] dell'olio naturale in anidride carbonica supercritica calcolata dai risultati sperimentali . . . . .	135
4.4	Selettività media nelle varie condizioni operative calcolata dai risultati sperimentali delle prove a singolo stadio di equilibrio su olio naturale . . . . .	144
4.5	Componenti rappresentativi delle singole classi di esteri dell'olio naturale . . . . .	146
4.6	Parametri di interazione binaria relativi all'olio naturale. I parametri $\kappa_{1j}$ si calcolano dalla relazione: $\kappa_{1j} = \alpha_{1j} + \beta_{1j} T$ , dove $T$ è la temperatura espressa in kelvin. . . . .	147
4.7	Massa e composizione di alimentazione e prodotti relativamente alla prova con riflusso a $42^{\circ}C$ e $100 atm$ . . . . .	149

4.8	Massa e composizione di alimentazione e prodotti relativamente alla prova con riflusso a $50^{\circ}C$ e $120\ atm$ . . . . .	150
4.9	Massa e composizione di alimentazione e prodotti relativamente alla prova con riflusso a $60^{\circ}C$ e $140\ atm$ . . . . .	150
4.10	Qualità del prodotto, recupero e spesa di solvente nelle tre prove sperimentali con riflusso esterno . . . . .	150
4.11	Confronto fra il recupero ottenuto nelle prove con riflusso e senza riflusso . . . . .	150
4.12	Confronto fra la composizione del raffinato ottenuta sperimentalmente e calcolata. Le composizioni sono espresse come percentuale in massa. $\epsilon$ rappresenta l'errore percentuale fra dato calcolato e sperimentale. . . . .	164

# Capitolo 1

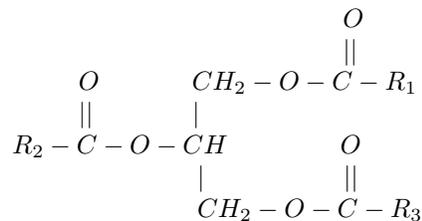
## Gli acidi grassi polinsaturi

### 1.1 I grassi e gli acidi grassi

#### 1.1.1 I grassi: generalità

I grassi sono i costituenti principali delle cellule di riserva degli animali e delle piante e costituiscono una delle più importanti provviste energetiche degli organismi viventi. Appartengono alla famiglia dei lipidi, ovvero quelle sostanze che possono essere estratte dalle cellule e che sono solubili in solventi organici a bassa polarità, come ad esempio etere o cloroformio, mentre sono insolubili in acqua. I grassi vengono comunemente estratti da animali, piante e semi di piante per svariati utilizzi e sono usualmente distinti in *grassi* propriamente detti ed *oli* a seconda che si presentino, in condizioni di pressione e temperatura ambiente, come solidi o come liquidi rispettivamente. Esempi di grassi di origine animale sono il burro ed il lardo, mentre un esempio di grasso vegetale è il burro di cacao; esempi di oli vegetali sono l'olio di oliva, di mais, di arachide, di soia, di cocco mentre oli di origine animale sono, ad esempio, gli oli di pesce.

Dal punto di vista chimico i grassi sono esteri della glicerina con tre acidi carbossilici e, per questo motivo, vengono anche comunemente chiamati *trigliceridi*. Un trigliceride presenta la seguente struttura chimica:



dove i gruppi  $R_1, R_2, R_3$ , caratterizzanti i rispettivi acidi carbossilici di provenienza, sono, in generale, diversi fra loro. Ciascun grasso od olio naturale è formato da soluzioni di un elevato numero di trigliceridi diversi e, in piccolissima parte, da altre molecole organiche. Per questo motivo, la caratterizzazione dei grassi e degli oli non può essere effettuata per mezzo della composizione effettiva del campione, ma si realizza per mezzo del contenuto percentuale dei singoli acidi carbossilici esterificati, oltre che per mezzo di una serie di parametri che scaturiscono da metodologie analitiche di riconoscimento sviluppate appositamente per questa classe di sostanze. Esempi di tali parametri sono il *numero di acidità*, il *numero di saponificazione* ed il *numero di iodio*; tali parametri forniscono rispettivamente la quantità di acidi liberi (ovvero non esterificati) presenti nel grasso, il peso molecolare medio dei trigliceridi costituenti la soluzione e la quantità di insaturazioni presenti nelle catene acide [1].

La proporzione dei vari acidi cambia da grasso a grasso e, spesso, le differenze fra grassi diversi sono notevoli. Ogni singolo grasso, invece, ha una composizione caratteristica che differisce poco da un campione ad un altro. Bisogna però notare che uno stesso organismo vivente può essere in grado di sintetizzare grassi con caratteristiche diverse a seconda dell'organo che li deposita. A meno di poche eccezioni, i grassi naturali contengono catene acide lineari con un numero di atomi di carbonio pari a 3, 5 oppure un numero pari generalmente compreso fra 4 e 22, risultando più frequenti le catene a 16 e 18 atomi di carbonio. Questi numeri pari trovano la loro ragione nel meccanismo naturale della biosintesi degli acidi carbossilici attuata dagli organismi viventi che si sviluppa mediante successive addizioni di unità di acetato, contenenti due atomi di carbonio. Gli acidi carbossilici generalmente rinvenuti nei grassi naturali vengono anche chiamati *acidi grassi*. La tabella 1.1 (adattata da [2]) mostra la composizione, espressa come percentuale riferita agli acidi grassi costituenti, di alcuni fra i più comuni grassi ed oli, di origine sia vegetale che animale.

Le proprietà fisiche riscontrabili nei grassi sono riconducibili alla composizio-

Grasso od olio	Acidi saturi %							Acidi insaturi %			
	<C10	C10	C12	C14	C16	C18	>C18	<C16	C16	C18	>C18
Burro	5-8	2-3	1-4	8-13	25-32	8-13	0,4-2	1-2	2-5	24-31	0,2-1,5
Lardo	0	0	0	1	25-30	12-16	0	0,2	2-5	44-59	2-3
Cocco	5-9	4-10	44-51	13-18	7-10	1-4	0	0	0	6-11	0-1
Oliva	0	0	0-1	0-2	7-20	1-3	0-1	0	1-3	53-91	0-3
Mais	0	0	0	0-2	8-10	1-4	0	0	1-2	64-90	0-2
Arachide	0	0	0	0,5	6-11	3-6	5-10	0	1-2	56-85	0
Merluzzo(fegato)	0	0	0	2,6	7-14	0-1	0	0-2	10-20	25-31	35-52

Tabella 1.1: Composizione di alcuni grassi naturali in termini degli acidi costituenti.

ne in acidi grassi costituenti. Ad esempio, tanto più lunghe sono le catene derivanti dagli acidi, tanto più alto sarà il punto di fusione del grasso. Ancora più importante è l'effetto delle insaturazioni: i grassi che ne sono ricchi avranno, proprio come i rispettivi acidi carbossilici, dei punti di fusione più bassi e per questo motivo è frequente che si presentino come oli. La densità è inferiore a quella dell'acqua (dell'ordine di  $900\text{-}950\text{ kg/m}^3$ ) e tende a diminuire con l'allungarsi delle catene acide; la viscosità è generalmente compresa fra 20 e 50 cp (intervallo riferito ad una temperatura di circa  $40^\circ\text{C}$ ), avendosi i valori più elevati per gli oli con più alto tenore di catene lunghe e sature [3]. Anche le caratteristiche alimentari dei grassi, come anche gli effetti sui processi biochimici che avvengono nell'organismo umano a seguito della loro assunzione, sono determinate dalle proprietà degli acidi grassi costituenti. E' quindi impossibile scindere lo studio delle proprietà dei grassi da quello degli acidi grassi. Prima di passare ad esaminare le proprietà più rilevanti, almeno dal punto di vista dell'oggetto di questa Tesi, di questi importanti acidi carbossilici, è senza ombra di dubbio utile riassumere le varie modalità in uso per la loro nomenclatura. In effetti, la nomenclatura ufficiale (IUPAC) non è utilizzata frequentemente e spesso si incontrano nomi correnti o nomi basati su metodi sviluppati *ad hoc* per questa classe di sostanze, così da rendere a volte difficile la corretta identificazione di un acido grasso.

### 1.1.2 Nomenclatura degli acidi grassi

La nomenclatura IUPAC degli acidi carbossilici si realizza prendendo come base il nome dell'alcano o dell'alchene corrispondente, antepoendo la dicitura *acido* e sostituendo la desinenza in *-oico*. La presenza di eventuali gruppi sostituenti viene definita indicando l'atomo di carbonio cui il sostituito è legato, contando a partire dal carbonio carbossilico (atomo C-1), ed il nome del sostituito. La posizione delle insaturazioni viene definita mediante un numero progressivo che identifica il legame carbonio-carbonio insaturo, dove il numero 1 è riservato al legame coinvolgente il carbonio carbossilico. La configurazione delle insaturazioni è indicata premettendone il tipo (*cis* o *trans*). Nonostante la nomenclatura IUPAC sia generalmente da preferirsi perchè consente l'esatta e non ambigua identificazione di ogni specie chimica, è ancora molto diffuso l'utilizzo di nomi correnti che spesso hanno la loro origine nel nome della materia prima da cui l'acido proviene oppure in una qualche proprietà saliente dell'acido in questione. Esempi di questi nomi comuni sono riportati nella tabella 1.2. Altri due sistemi di nomenclatura molto utilizzati, e particolarmente comodi nel campo degli acidi grassi, prevedono di riportare la lunghezza della catena di atomi di carbonio seguita dal numero delle insaturazioni e dalla posizione della prima insaturazione; se

Nome corrente	IUPAC	Sintetico( $\omega$ )	Sintetico( $\Delta$ )
Acido butirrico	Acido butanoico	C4:0	C4:0
Acido valerianico	Acido pentanoico	C5:0	C5:0
Acido capronico	Acido esanoico	C6:0	C6:0
Acido caprilico	Acido ottanoico	C8:0	C8:0
Acido caprinico	Acido decanoico	C10:0	C10:0
Acido laurico	Acido dodecanoico	C12:0	C12:0
Acido miristico	Acido tetradecanoico	C14:0	C14:0
Acido palmitico	Acido esadecanoico	C16:0	C16:0
Acido stearico	Acido ottadecanoico	C18:0	C18:0
Acido arachidico	Acido eicosanoico	C20:0	C20:0
Acido beenico	Acido docosanoico	C22:0	C22:0
Acido palmitoleico	Acido <i>cis</i> -9-esadecenoico	C16:1 $\omega$ 7	C16:1 $\Delta$ 9
Acido oleico	Acido <i>cis</i> -9-ottadecenoico	C18:1 $\omega$ 9	C18:1 $\Delta$ 9
Acido <i>cis</i> -vaccenico	Acido <i>cis</i> -11-ottadecenoico	C18:1 $\omega$ 7	C18:1 $\Delta$ 11
Acido gadoleico	Acido <i>cis</i> -11-eicosenoico	C20:1 $\omega$ 9	C20:1 $\Delta$ 11
Acido erucico	Acido <i>cis</i> -13-docosenoico	C22:1 $\omega$ 9	C22:1 $\Delta$ 13
Acido linoleico	Acido <i>cis</i> -9,12-ottadecadienoico	C18:2 $\omega$ 6	C18:2 $\Delta$ 9
Acido $\gamma$ -linolenico	Acido <i>cis</i> -6,9,12-ottadecatrienoico	C18:3 $\omega$ 6	C18:3 $\Delta$ 6
Acido arachidonico	Acido <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	C20:4 $\omega$ 6	C20:4 $\Delta$ 5
Acido $\alpha$ -linolenico	Acido <i>cis</i> -9,12,15-ottadecatrienoico	C18:3 $\omega$ 3	C18:3 $\Delta$ 9
Acido stearidonico	Acido <i>cis</i> -6,9,12,15-ottadecatetraenoico	C18:4 $\omega$ 3	C18:4 $\Delta$ 6
EPA	Acido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	C20:5 $\omega$ 3	C20:5 $\Delta$ 5
DHA	Acido <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosaesaenoico	C22:6 $\omega$ 3	C22:6 $\Delta$ 4

Tabella 1.2: Nomenclatura di alcuni fra i più frequenti acidi grassi

si conta a partire dal carbonio carbossilico, la posizione è identificata con la lettera  $\Delta$ , mentre, se si conta a partire dal metile che chiude la catena, la posizione è identificata con la lettera  $\omega$ . Questi due sistemi di nomenclatura, che verranno indicati come sintetici, non caratterizzano univocamente gli acidi carbossilici in quanto forniscono solo il numero delle insaturazioni e la posizione della prima insaturazione, senza specificare nè la configurazione nè la posizione di eventuali ulteriori insaturazioni e danno per sottinteso che la catena sia lineare. Tuttavia, nella grande maggioranza dei casi, gli acidi provenienti da grassi naturali sono a catena lineare e quelli insaturi hanno quasi sempre configurazione *cis*. Inoltre, quando sono presenti più legami multipli (tipicamente doppi legami), questi sono spesso equidistanziati e separati fra loro da un singolo gruppo metilenico: è quindi sufficiente identificare la posizione del primo doppio legame per individuarli tutti. Anche in questo caso, come per il numero pari di atomi di carbonio, le ragioni di queste peculiarità strutturali sono da ricercarsi nel meccanismo della sintesi naturale degli acidi grassi. In definitiva, il sistema sintetico è estremamente pratico e il suo utilizzo non comporta, generalmente, alcuna perdita di informazione [4].

La tabella 1.2 riporta, oltre la nomenclatura corrente e la IUPAC, anche la nomenclatura realizzata con questo sistema sintetico.

### 1.1.3 Gli acidi grassi in natura e le loro proprietà

Gli acidi grassi saturi a catena corta (4:0-10:0) si trovano prevalentemente in grassi animali e sono una frazione consistente dei grassi del latte; più raramente sono contenuti in alcune matrici vegetali. L'*acido laurico* e l'*acido miristico* sono i componenti principali della parte grassa dei semi di piante delle famiglie delle *laureaceae* e *myristicaceae*, dalle quali prendono il loro nome comune, e sono diffusi anche in altri grassi vegetali e, seppur in minore quantità, in grassi animali. L'*acido palmitico* è molto diffuso in grassi di origine sia vegetale che animale; in particolare, è il più importante acido grasso saturo negli oli di pesce. L'*acido stearico* è un componente minore di molti grassi vegetali e degli oli di pesce; in effetti, nella famiglia dei C18 sono di gran lunga più diffusi gli acidi insaturi. Gli acidi saturi a catena più lunga del C18 sono molto poco diffusi in natura; tuttavia, sono stati rinvenuti acidi saturi fino al C32, ciascuno di essi risultando importante in qualche particolare seme. Fra gli acidi grassi monoinsaturi il più diffuso è senza dubbio l'*acido oleico*, contenuto in un elevato numero di grassi ed oli di origine sia animale che vegetale. La tabella 1.2 riporta anche alcuni importanti acidi grassi polinsaturi (generalmente abbreviati con AGPI nella letteratura scientifica italiana e con PUFA, da "*Polyunsaturated fatty acids*", in quella internazionale): come si può vedere, si tratta di acidi appartenenti alle famiglie  $\omega 3$  e  $\omega 6$ , che sono riconosciute come particolarmente rilevanti nel metabolismo umano. Queste due famiglie non rappresentano solo un raggruppamento formale, ma sono estremamente significative in quanto gli acidi a catena lunga appartenenti a queste  $\omega$ -famiglie possono essere ottenuti, in molte specie animali, esclusivamente da acidi della stessa  $\omega$ -famiglia, mediante meccanismi enzimatici di allungamento di catena, accorciamento e insaturazione. Fra gli AGPI, sono particolarmente rilevanti per la loro azione biologica l'*acido linoleico* e l'*acido  $\alpha$ -linolenico*, molto diffusi soprattutto in matrici vegetali e, in misura molto minore, in grassi animali. Infine, studi effettuati negli ultimi decenni, hanno dato grande risalto al ruolo svolto nel metabolismo umano dall'*acido eicosapentaenoico* (EPA) e dall'*acido docosaesaenoico* (DHA), due AGPI contenuti soprattutto negli oli di pesce e nelle alghe marine [4].

Dal punto di vista chimico, la principale peculiarità degli acidi grassi è l'acidità conferita loro dal gruppo carbossilico. Sono degli acidi deboli che presentano dei valori di costante di acidità dell'ordine di  $10^{-5}$ ; in condizioni fisiologiche, quindi, esistono in forma ionizzata. Le principali proprietà fisiche di alcuni acidi grassi sono riportate nella tabella 1.3, realizzata da dati

Nome	$T_f$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	$T_{eb}$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Solubilità in acqua [g/100g]
Acido butirrico (C4:0)	-4.5	165.6	totale
Acido capronico (C6:0)	-2	205	3.7
Acido caprinico (C10:0)	31.5	270	0.7
Acido laurico (C12:0)	44	225 <sup>100</sup>	0.2
Acido miristico (C14:0)	53.9	250 <sup>100</sup>	insolubile
Acido palmitico (C16:0)	63	350	insolubile
Acido stearico (C18:0)	71-72	232 <sup>15</sup>	insolubile
Acido oleico (C18:1 $\omega$ 9)	16.3	286 <sup>100</sup>	insolubile
Acido linoleico (C18:2 $\omega$ 6)	-5	229 – 30 <sup>16</sup>	insolubile
Acido $\alpha$ -linolenico (C18:3 $\omega$ 3)	-11.3	230 – 32 <sup>17</sup>	insolubile
Acido arachidonico (C20:4 $\omega$ 6)	-49.5	163 <sup>1</sup>	insolubile

Tabella 1.3: Proprietà fisiche di alcuni acidi grassi

forniti in [2], [5]. Come si può vedere, gli acidi a catena corta sono solubili in acqua, divenendo sempre meno solubili con l'allungarsi della catena fino a completa insolubilità dal C14 in poi. La solubilità degli acidi a catena corta è dovuta alla possibilità del gruppo carbossilico di formare legame idrogeno con il solvente, mentre con l'allungarsi della catena la parte apolare della molecola prende il sopravvento. I grassi, invece, sono sempre insolubili in acqua in quanto non hanno la possibilità di formare alcun legame idrogeno. D'altra parte, gli acidi grassi dal C12 in poi, di rilevante importanza biologica, presentano, a temperature superiori al punto di fusione, completa miscibilità con la maggior parte dei solventi organici apolari e per questo motivo rientrano a tutti gli effetti nella categoria dei lipidi, proprio come i grassi. Gli acidi carbossilici presentano dei punti di ebollizione molto elevati e la ragione di ciò va ricercata nella possibilità di formare due legami idrogeno per molecola. Ad esempio, si può notare dalla tabella 1.3 che l'acido butirrico presenta una temperatura di ebollizione ben superiore a quella dell'alcool n-pentilico (138  $^{\circ}\text{C}$  [2]) che ha peso molecolare analogo ma può formare un solo legame idrogeno per molecola. Per quanto riguarda gli acidi a catena più lunga, questi tendono a decomporsi prima di bollire; quando non è disponibile alcun dato sperimentale di temperatura di ebollizione a pressione atmosferica, la tabella 1.3 riporta dei dati riferiti a valori di pressione inferiori, riportati ad apice, ed espressi in mmHg. Per quanto riguarda i punti di fusione, oltre al legame idrogeno, un ruolo fondamentale è giocato dalle insaturazioni e dalla loro configurazione: le insaturazioni di tipo *cis* rendono difficoltoso "l'impacchettamento" delle molecole per motivi di ingombro sterico e ciò comporta delle temperature di fusione più basse. A tale proposito è interessante notare, nella tabella 1.3, la notevole entità dell'effetto delle insaturazioni *cis* sul punto di fusione dei C18. Dal momento che negli

acidi grassi le insaturazioni sono quasi invariabilmente *cis*, il loro effetto ha delle implicazioni importanti nei sistemi biologici in quanto, più ancora che la lunghezza della catena, sono loro a determinare lo stato di aggregazione di un acido grasso o di un suo derivato; a tale proposito, si può vedere, sempre dalla tabella 1.3, che un C20 con 4 insaturazioni è liquido a temperatura ambiente mentre un C12 saturo è solido nelle stesse condizioni. L'attrazione fra le lunghe catene idrocarburiche è responsabile dell'elevata viscosità degli acidi grassi e dei grassi; per questo motivo la viscosità aumenta con la lunghezza delle catene idrocarburiche. Di contro, la presenza di insaturazioni di tipo *cis*, tendendo a far allontanare fra loro le diverse catene, causa una leggera diminuzione della viscosità. La dipendenza della viscosità di alcuni oli vegetali dalla lunghezza delle catene e dal grado di insaturazione è messa in luce, ad esempio, in [6], [7].

## 1.2 Il metabolismo degli acidi grassi

### 1.2.1 Introduzione

Gli acidi grassi svolgono un ruolo estremamente importante in numerosi processi che avvengono nell'organismo umano. La loro funzione ed il loro meccanismo d'azione sono ben conosciuti in molti aspetti, ma sussistono tuttora molti lati oscuri che li rendono oggetto di numerose ricerche nel settore biochimico e medico. Senza alcuna pretesa di completezza, data la vastità e complessità dell'argomento trattato, fra i ruoli fisiologici più rilevanti svolti dagli acidi grassi, si ricordano [8]:

- Riserva energetica. Gli acidi grassi vengono utilizzati dall'organismo per ottenere energia quando si è esaurita la disponibilità di questa da fonti a rapida utilizzazione (ad esempio, gli zuccheri).
- Ruolo strutturale. Gli acidi grassi sono fra i componenti dei *fosfolipidi* e dei *glicolipidi*, che a loro volta sono delle molecole di fondamentale importanza nella struttura delle membrane cellulari.
- Precursori ormonali. Derivati degli acidi grassi fungono da ormoni e messaggeri intracellulari (ormoni eicosanoidi). Esempi di tali molecole segnale sono le *prostaglandine*, le *prostacicline*, i *trombossani* ed i *leucotrieni*.

Gli acidi grassi vengono assunti con l'alimentazione, ma l'organismo è anche in grado di sintetizzarne diversi, sia a partire da altri acidi grassi, che da

materiale non lipidico. E' ben noto, infatti, che qualora con l'alimentazione vengano introdotti *glucidi* e *protidi* in quantità superiore al fabbisogno, questi vengono trasformati in grassi. La sintesi *ex novo* di acidi grassi, ovvero da materiale non lipidico, avviene essenzialmente nelle cellule del tessuto epatico e nelle cellule adipose [9]. Le cellule adipose sono anche il luogo dove i grassi permangono immagazzinati, generalmente sotto forma di un grosso globulo che può anche occupare la maggior parte del volume cellulare. Inoltre, quando vi è una richiesta energetica da parte dell'organismo che non può essere soddisfatta da altre fonti, le cellule adipose idrolizzano i grassi, rendendo gli acidi grassi disponibili per le cellule che ne operano la degradazione al fine di ottenere energia [8]. L'organismo regola il bilanciamento fra l'utilizzo, che avviene mediante un processo ossidativo, e la sintesi *ex novo* di acidi grassi in modo tale che questi due processi non avvengano mai simultaneamente. Tale regolazione si esplica in risposta alle abitudini alimentari ed alla richiesta di energia. La sintesi *ex novo* è inibita dai seguenti fattori: denutrizione, eccesso del rapporto grassi/carboidrati nella dieta, eccesso di consumo energetico. Nel primo caso, ovviamente, manca la materia prima per la sintesi; l'eccesso di grassi a scapito dei carboidrati, invece, comporta l'utilizzo di questi ultimi per ottenere energia e tende a favorire lo stoccaggio dei grassi alimentari in quanto tali; infine, l'eccesso di consumi energetici fa lavorare l'organismo in regime ossidativo e quindi la sintesi risulta inibita. A conferma di queste osservazioni, è stato rilevato che in eccesso di carboidrati la sintesi è molto attiva e nelle cellule adipose si depositano ingenti quantità di acidi grassi, principalmente palmitico, stearico e oleico che, come vedremo, sono i principali prodotti della sintesi a scopo di provvista energetica. Invece, quando la dieta è ricca di grassi, la sintesi è inibita e nelle cellule adipose vengono depositati i grassi alimentari in quanto tali, ovvero con una composizione che rispecchia abbastanza fedelmente la composizione dei grassi della dieta. Quest'ultima condizione è più frequentemente incontrata nei paesi occidentali, caratterizzati da elevate quantità di grassi nei regimi alimentari e da elevati rapporti grassi/carboidrati [9].

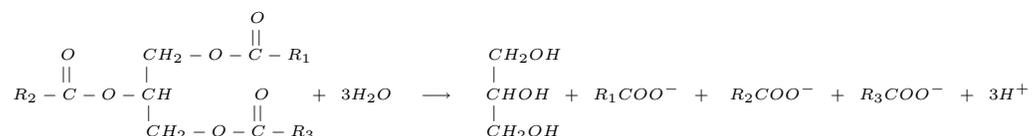
La sintesi di acidi grassi a partire da acidi grassi preformati, di origine alimentare, consiste in reazioni di insaturazione e allungamento di catena; tale processo non è indirizzato alla produzione di materiale lipidico da destinare a riserva energetica, ma avviene allo scopo di produrre particolari acidi grassi, generalmente polinsaturi a catena lunga, che hanno un ruolo vitale nel meccanismo di funzionamento dell'organismo. Ad esempio, alcuni acidi polinsaturi da 18 a 22 atomi di carbonio hanno un ruolo importante nelle membrane cellulari, mentre alcuni derivati di acidi polinsaturi a 20 atomi di carbonio costituiscono la famiglia degli ormoni eicosanoidi. La sintesi a partire da acidi grassi preformati è particolarmente attiva nel tessuto epati-

co, ma può anche avvenire localmente in altre cellule che necessitano di un particolare acido polinsaturo a catena lunga. Inoltre, questo tipo di sintesi differisce dalla sintesi *ex novo* in quanto necessita di un differente sistema enzimatico. In definitiva, la sintesi *ex novo* e la sintesi da altri acidi grassi seguono percorsi differenti e, praticamente, hanno pochissimi punti di contatto: i prodotti della sintesi *ex novo* sono generalmente destinati ad essere immagazzinati come riserva energetica e non rappresentano, se non in minima parte, il punto di partenza della sintesi da acido grasso [9].

### 1.2.2 La $\beta$ – ossidazione degli acidi grassi

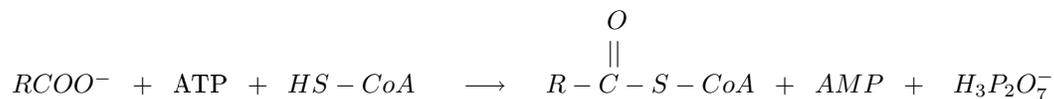
La produzione di energia da parte dell'organismo avviene trasformando varie classi di composti, che arrivano alle cellule dall'alimentazione, in *adenosin-trifosfato* (ATP). Infatti, tutte le attività biologiche che richiedono energia (contrazione muscolare, termoregolazione, biosintesi varie, funzione nervosa etc.) avvengono a spese dell'energia proveniente, direttamente o indirettamente, dalla scissione dei legami dell'ATP. La produzione di ATP avviene mediante il ciclo di Krebs che si attua a partire dai prodotti delle reazioni di degradazione degli acidi grassi, degli zuccheri e degli amminoacidi. Il processo di demolizione degli acidi grassi è la  $\beta$  – ossidazione, che dà luogo ad una produzione netta di *acetil CoA*, che entra nel ciclo di Krebs. Le reazioni del processo di  $\beta$  – ossidazione, sia per acidi saturi che insaturi, sono descritte di seguito [8].

Il primo passaggio nell'utilizzazione dei grassi come fonte energetica avviene nelle cellule adipose e consiste nell'idrolisi dei trigliceridi:



Questa reazione rende disponibili, a partire da ogni molecola di grasso, tre ioni carbossilato che rappresentano il punto di partenza del processo di  $\beta$ -ossidazione. Questo processo avviene nei *mitocondri*, organuli dell'ordine di grandezza di 1  $\mu\text{m}$  situati nel citoplasma cellulare e dotati di una doppia membrana (interna ed esterna). Prima di entrare nella matrice mitocondriale, gli acidi grassi vengono attivati sulla membrana esterna. La reazione di attivazione consiste nella formazione di un legame tioestere tra il gruppo carbossilico dell'acido ed il gruppo sulfidrilico del *coenzima A* (CoA) e produce

una molecola di *acil coenzima A*. Questa reazione richiede una molecola di ATP per ogni molecola di acido grasso da attivare:

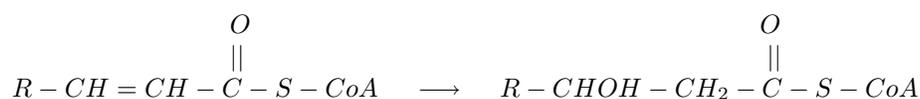


l'ATP viene defosforilato ad *adenosin 5'-monofosfato* (AMP) con liberazione di un pirofosfato inorganico. Questo legame fra l'acido ed il coenzima A è particolarmente importante perchè è solo in questa forma che l'acido è in grado di attraversare, mediante un complesso meccanismo, la membrana mitocondriale interna. La reazione di attivazione è la stessa sia per acidi saturi che insaturi, mentre delle piccole differenze vi sono per quanto riguarda l'ossidazione, che avviene all'interno della matrice mitocondriale. Per quanto riguarda gli acidi saturi, l'acil coenzima A viene degradato da una serie di quattro reazioni:

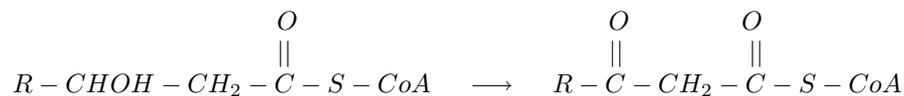
- deidrogenazione del legame fra carbonio  $\alpha$  e carbonio  $\beta$  dell'acil CoA:



- idratazione del doppio legame:



- ossidazione del carbonio  $\beta$

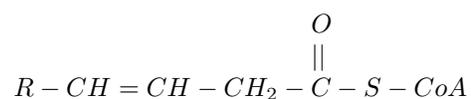


- tiolisi con intervento di una nuova molecola di coenzima A

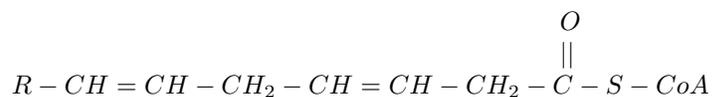


Il prodotto di questa catena di reazioni è una molecola di *acetil CoA*, che rappresenta il prodotto di degradazione che, entrando nel ciclo di Krebs, darà luogo alla formazione di ATP. Inoltre, si ha una nuova molecola di acil CoA, con due atomi di carbonio in meno, a partire dalla quale la catena delle reazioni ricomincia: in altri termini, gli acidi grassi, dopo l'attivazione e l'ingresso nei mitocondri, vengono degradati mediante successiva rimozione di unità bicarboniose.

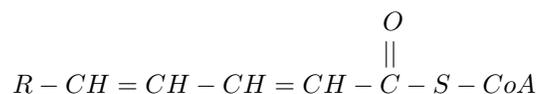
L'ossidazione di una vasta gamma di acidi grassi insaturi avviene con un meccanismo molto simile a quello appena visto; vi sono tuttavia alcune differenze e, in particolare, vi è la necessità di due ulteriori enzimi rispetto a quelli che catalizzano le reazioni viste in precedenza. La degradazione procede in modo perfettamente identico al caso precedente finchè il primo legame insaturo non si trova fra il carbonio  $\beta$  ed il carbonio  $\gamma$  (ovvero fra il C-3 ed il C-4):



questo composto, un *cis*-3-enoil CoA, non è un substrato per le deidrogenasi che catalizzano il primo passo dell'ossidazione, in quanto la presenza di un doppio legame *cis* fra il C-3 ed il C-4 impedisce la formazione di un altro doppio legame tra C-2 e C-3. Questo ostacolo è superato da una reazione di isomerizzazione catalizzata da un'*isomerasi*, che cambia la configurazione del doppio legame da *cis* a *trans*. Infatti, la deidrogenasi è in grado di operare sulla forma *trans* e quindi le successive reazioni di degradazione avvengono in modo praticamente identico, e ad opera degli stessi enzimi, a quelle viste per gli acidi saturi. Nel caso che l'acido grasso sia polinsaturo, compare un'ulteriore differenza. Si supponga che dopo alcuni cicli di degradazione si sia arrivati a questo composto:



L'isomerizzazione rende possibile l'inserimento di un doppio legame fra il C-2 ed il C-3 e quindi la degradazione procede. Tuttavia, dopo la formazione dell'acetil CoA, si ottiene questo composto:

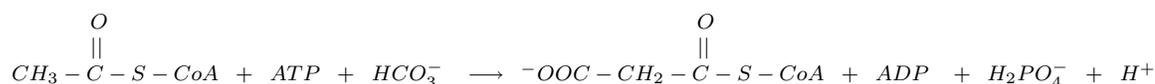


si tratta di un 2,4-diene che non è un substrato per l'enzima seguente nella via  $\beta$ -ossidativa. Questo problema è superato grazie ad una *reduttasi*, enzima che catalizza la trasformazione di questo diene nel *cis*-3-enoil CoA, la cui degradazione è resa possibile, come detto, dall'isomerasi. In sostanza, dal punto di vista dell'ottenimento di energia, non vi è una grossa differenza fra gli acidi saturi, monoinsaturi e polinsaturi: il processo principale è sempre la  $\beta$ -ossidazione, ma nel caso dei monoinsaturi serve un enzima aggiuntivo, mentre nel caso dei polinsaturi ne servono due.

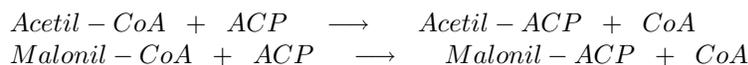
### 1.2.3 La sintesi degli acidi grassi

La sintesi *ex novo* di acidi grassi saturi a catena lineare, di lunghezza fino a C16, è resa possibile da un complesso di enzimi altamente organizzato, detto *acido grasso sintasi*. Questo sistema enzimatico si trova nel citoplasma cellulare: è questa una prima differenza fra la  $\beta$ -ossidazione, che avviene nei mitocondri, e la sintesi *ex novo*.

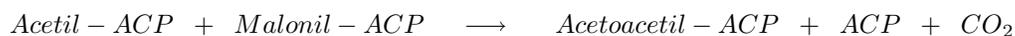
Il punto di partenza della sintesi è l'acetil CoA: dal momento che l'acetil CoA si ottiene, oltre che come prodotto di degradazione degli acidi grassi stessi, anche come prodotto di altre vie metaboliche, si spiega come l'organismo sia in grado di sintetizzare acidi grassi anche a partire da materiale non lipidico. I passi della sintesi *ex novo* possono essere schematizzati come segue [8]:



si tratta, essenzialmente, di una carbossilazione dell'acetil CoA che viene trasformato in malonil CoA. Dal punto di vista energetico, questa reazione è resa possibile dalla defosforilazione dell'ATP ad *adenosindifosfato*. Nei passi successivi, un ruolo chiave è svolto da una proteina trasportatrice di acili (ACP): tale proteina è in grado di legare il gruppo acetile dell'acetil CoA e del malonil CoA, liberando il CoA:

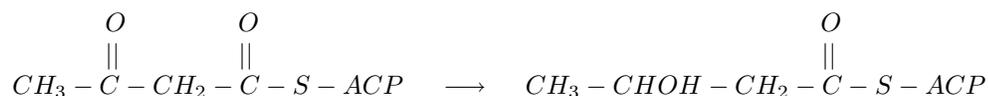


L'acetil-ACP ed il malonil-ACP reagiscono fra loro formando acetoacetil-ACP secondo la:

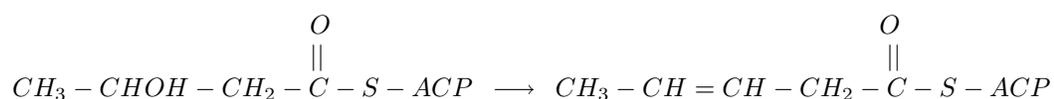


in definitiva, dalla condensazione si forma un'unità a 4 atomi di carbonio e viene rilasciata  $CO_2$  e una proteina trasportatrice. L'acetoacetil-ACP subisce le seguenti trasformazioni:

- riduzione:



- deidratazione:



- idrogenazione del doppio legame



Il prodotto di questa serie di reazioni è il butirril-ACP a partire dal quale può avviarsi un nuovo ciclo: condensazione con un malonil-ACP, riduzione, deidratazione ed idrogenazione del doppio legame. I cicli proseguono finché un C-2(n+1)-acil-ACP non viene idrolizzato, liberando la proteina trasportatrice e dando quindi luogo ad un acido grasso saturo a catena lineare, con lunghezza di catena pari a 2(n+1) dove n rappresenta il numero di cicli di allungamento. Ad ogni modo, questo meccanismo non può procedere oltre il C16 in quanto l'acido grasso sintasi non è in grado di catalizzare la condensazione fra il C16-acil-ACP ed il malonil-ACP. Il prodotto principale di questa sintesi è l'acido palmitico (C16:0), con piccole quantità di acido laurico (C12:0) e acido miristico (C14:0) [9].

Questi acidi grassi possono essere esterificati e depositati come trigliceridi in quanto tali oppure possono essere allungati e desaturati da altri sistemi enzimatici accessori che agiscono nel citosol: le *elongasi* e le *desaturasi*. Le

elongasi agiscono aggiungendo sequenzialmente unità bicarboniose all'estremità carbossilica degli acidi grassi, siano essi saturi o insaturi. Le desaturasi agiscono all'interno di un complesso enzimatico che, in sostanza, deidrogena un legame e, consumando ossigeno, produce un acido insaturo ed acqua. Le desaturasi sono in grado di operare su uno specifico legame: così, ad esempio, la desaturasi  $\Delta^4$  è in grado di desaturare il quarto legame C—C (contando a partire dall'estremità carbossilica) mentre la desaturasi  $\Delta^9$  agisce sul nono legame. Tuttavia, i mammiferi non posseggono desaturasi in grado di introdurre, nella catena degli acidi grassi, doppi legami oltre la posizione  $\Delta^9$ . Ciò ha delle importantissime implicazioni: gli acidi grassi della famiglia  $\omega^3$  e  $\omega^6$ , a catena C16 o più lunga di C16, non potranno essere sintetizzati dall'organismo umano se non a partire da altri acidi grassi appartenenti alla stessa  $\omega$ -famiglia. Tuttavia, alcuni acidi grassi polinsaturi  $\omega^3$  e  $\omega^6$  con catene da C18 a C22 sono indispensabili per le funzioni vitali dell'organismo. Dal momento che la sintesi *ex novo*, promossa dall'acido grasso sintasi, produce acidi saturi, l'organismo umano ha solo due possibilità: nutrirsi di alimenti che posseggano tali specifici acidi oppure che posseggano acido linoleico (C18:2 $\omega^6$ ) ed acido  $\alpha$ -linolenico (C18:3 $\omega^3$ ), a partire dai quali, mediante insaturazioni ed allungamenti di catena, possono essere prodotti tutti gli acidi polinsaturi delle famiglie  $\omega^3$  e  $\omega^6$  necessari per le cellule. Inoltre, come si avrà modo di approfondire in seguito, queste due possibilità non sono fra di loro equivalenti dal punto di vista degli effetti che determinano nell'organismo [8], [9].

L'acido palmitico prodotto dalla sintesi *ex novo* che non viene esterificato ed utilizzato come riserva energetica, rappresenta il punto di partenza per la sintesi di altri acidi. Mediante le elongasi e le desaturasi  $\Delta^9$  si possono ottenere acido stearico (C18:0), acido oleico (C18:1 $\omega^9$ ), ed acido eicosenoico (C20:1 $\omega^9$ ). Anche l'acido stearico e l'acido oleico possono essere stoccati dall'organismo come riserva energetica. Invece, l'utilizzo dell'acido oleico a scopi sintetici, mediante l'intervento di una desaturasi  $\Delta^6$  può produrre, un acido 18:2 $\omega^9$ . Se, invece, l'acido palmitico è prima insaturato in posizione  $\Delta^9$ , si ottiene l'acido palmitoleico (C16:1 $\omega^7$ ), che, a sua volta, può venire allungato ad acido vaccenico (C18:1 $\omega^7$ ) [8], [9].

Ben più rilevante è la sintesi di  $\omega^3$  ed  $\omega^6$  che, come detto, non può che avvenire a partire da acidi introdotti con l'alimentazione. Qui di seguito sono indicate le principali conversioni di acidi grassi polinsaturi della serie  $\omega^6$  ed  $\omega^3$ , che vengono rappresentate a partire dall'acido linoleico e dall'acido  $\alpha$ -linolenico in quanto questa coppia di acidi non può essere ottenuta a partire da alcun precursore presente nell'organismo:





Come si può vedere, gli acidi grassi in queste sequenze vengono prima desaturati e poi allungati con una unità bicarboniosa. I prodotti più rilevanti di queste sequenze metaboliche sono:

- l'acido arachidonico (C20:4 $\omega$ 6), precursore di una famiglia di ormoni eicosanoidi  $\omega$ 6-derivati ed importante costituente delle membrane fosfolipidiche delle cellule umane.
- l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega$ 3), precursore di un'altra famiglia di ormoni eicosanoidi, gli  $\omega$ 3-derivati. Inoltre, questo acido grasso è stato oggetto di numerosi studi in quanto si ritiene possa svolgere importanti azioni farmacologiche.
- l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6 $\omega$ 6), che ha un ruolo strutturale importante in molte membrane, soprattutto nel tessuto cerebrale e nella retina. Inoltre, anche questo acido grasso è stato oggetto di studi dal punto di vista farmacologico.

Siccome gli enzimi che rendono possibili entrambe queste sequenze metaboliche, sono le elongasi e le desaturasi  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$  e  $\Delta^6$ , le sintesi di AGPI  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 competono per lo stesso sistema enzimatico. Dal momento che nell'organismo umano la linea metabolica degli  $\omega$ 6 è più efficiente rispetto a quella degli  $\omega$ 3, si verifica una rapida trasformazione dell'acido linoleico in arachidonico, a scapito della produzione di EPA e DHA. Inoltre, la quasi totalità dell'EPA formato dalla sintesi viene trasformato in DHA. In definitiva, a meno di non introdurre EPA e DHA dall'alimentazione, i livelli di questi due acidi grassi nell'organismo, e soprattutto del primo, si mantengono a valori molto bassi [9].

## 1.3 Acidi grassi alimentari e salute umana

### 1.3.1 Gli acidi grassi negli alimenti

Il 99% circa degli acidi grassi introdotti nella dieta umana è consumato sotto forma di esteri, prevalentemente trigliceridi (grassi ed oli) e, in piccolissima quantità, digliceridi, monogliceridi e lipidi a struttura complessa contenenti acidi grassi esterificati. Un'altra forma edibile, sebbene raramente riscontrabile nei cibi, è rappresentata dagli esteri etilici degli acidi grassi. La restante quota, di scarsa entità, è consumata in forma di acidi liberi. In questa forma gli acidi grassi vengono ingeriti in piccola quantità e solo insieme ad altri

nutrienti, perchè altrimenti risulterebbero tossici per l'organismo ed irritanti per lo stomaco, data la loro acidità [9].

Le carni tipicamente consumate nella dieta dei paesi occidentali sono fonti di acidi grassi saturi a catena corta e media, e di acidi grassi monoinsaturi a catena lunga, prevalentemente acido oleico. L'acido oleico è altresì contenuto in molti vegetali ed oli di semi. Questi alimenti costituiscono anche la principale fonte di acidi insaturi  $\omega 6$  a catena non più lunga di C18: il principale è l'acido linoleico che, come è stato detto, è molto importante come precursore della sintesi della famiglia omologa di acidi polinsaturi. Alcuni acidi polinsaturi  $\omega 3$ , in special modo l'acido  $\alpha$ -linolenico, possono essere ottenuti da alcuni tipi di frutta, dai vegetali a foglia e da alcuni oli di semi. Il pesce e gli oli di pesce sono l'unica fonte quantitativamente significativa, nella dieta delle popolazioni occidentali, di acidi polinsaturi C20 e C22 della famiglia  $\omega 3$ , in special modo EPA e DHA. Altre popolazioni possono ottenere consistenti quantità di  $\omega 3$  dalle alghe e dal grasso di animali che si nutrono di plancton o di ingenti quantità di pesce ricco in  $\omega 3$  (ad esempio foche e balene). E' interessante notare che i pesci, proprio come i mammiferi, non sono in grado di sintetizzare acidi grassi  $\omega 3$  a catena lunga. Tali sostanze sono sintetizzate dalle piante, in special modo quelle acquatiche, che posseggono le desaturasi adatte a tale scopo. Vengono ritrovate anche nel plancton, che è un complesso di organismi costituito sia da elementi animali (*zooplancton*) che vegetali (*fitoplancton*). I pesci, dunque, nutrendosi di plancton, alghe o altri vegetali acquatici, immettono gli AGPI  $\omega 3$  nella catena alimentare [9].

Negli ultimi decenni è stata attribuita una rilevanza sempre maggiore all'assunzione degli AGPI nella dieta umana. Fra tutti gli AGPI, particolare importanza è rivestita dagli  $\omega 3$  e  $\omega 6$ , in quanto la loro presenza nell'organismo è stata riconosciuta come essenziale, quantomeno in piccole quantità. La carenza di AGPI  $\omega 3$  e  $\omega 6$  porta a gravi sintomatologie che consistono in ritardi di crescita, aumento della permeabilità delle membrane cellulari, sterilità, fragilità capillare, perdita di acqua dai tessuti, alterazione dell'aggregazione piastrinica e diminuzione della sintesi degli ormoni eicosanoidi [10], [11]. Bisogna però osservare che non è difficile ottenere dalla dieta sufficienti quantità di acido linoleico e di acido  $\alpha$ -linolenico e quindi la deficienza di AGPI  $\omega 3$  e  $\omega 6$  è praticamente sconosciuta nei paesi occidentali. Nonostante ciò, da alcuni anni è noto che i livelli ottimali di AGPI nella dieta dovrebbero essere ben superiori a quelli minimi previsti per non avere i sintomi da deficienza di AGPI  $\omega 3$  e  $\omega 6$ . Inoltre, non è solo il quantitativo totale di AGPI ad essere importante, ma, date le diverse funzioni svolte dagli  $\omega 3$  e dagli  $\omega 6$ , e data la competizione per lo stesso sistema enzimatico, un parametro fondamentale da considerare è il rapporto  $\omega 6/\omega 3$  nella dieta. Infine, anche all'interno della stessa  $\omega$ -famiglia, singoli AGPI svolgono funzioni peculiari,

non sostituibili da altri AGPI della stessa famiglia [11], [12]. Dal momento che il quantitativo di AGPI  $\omega 3$  e  $\omega 6$  nell'organismo è strettamente collegato alle abitudini alimentari, potendo esclusivamente provenire da grassi alimentari che li contengano o che contengano i precursori acido  $\alpha$ -linolenico e acido linoleico, lo studio della quota di AGPI  $\omega 3$  e  $\omega 6$  all'interno della parte grassa degli alimenti ha acquisito grande importanza. Inoltre, dato che è ormai largamente condiviso che il rapporto  $\omega 6/\omega 3$  nella dieta dei paesi occidentali industrializzati è molto elevato e che questo fattore è causa di molte patologie (questo aspetto verrà approfondito in seguito), lo studio della frazione di AGPI della parte grassa degli alimenti è rivolto con particolare attenzione a tale rapporto, al quantitativo dei precursori delle linee sintetiche  $\omega 6$  (acido linoleico) ed  $\omega 3$  (acido  $\alpha$ -linolenico), ed al quantitativo di EPA e DHA, data la loro importanza e la scarsa efficienza della linea sintetica  $\omega 3$ . La considerazione di questi aspetti ha cambiato il punto di vista dei nutrizionisti: in origine si dava importanza esclusivamente alla quota di grassi totali contenuti negli alimenti, in un secondo tempo si è cominciato a distinguere l'azione svolta dai grassi insaturi rispetto ai saturi, in seguito sono state individuate le peculiarità degli AGPI rispetto ai monoinsaturi e negli ultimi anni si sta comprendendo come le diverse famiglie di AGPI debbano essere bilanciate nella dieta e come EPA e DHA non possano mancare da questa per il loro peculiare ruolo fisiologico.

L'eccesso di consumi di acidi grassi  $\omega 6$  e la diminuzione di quelli  $\omega 3$  è un fenomeno che si è sviluppato nel corso del ventesimo secolo. Le cause principali vanno individuate nello sviluppo industriale della produzione di oli di semi, nello sviluppo degli allevamenti caratterizzati da mangimistica ricca in  $\omega 6$  e povera in  $\omega 3$ , nella diminuzione del consumo di frutta, di vegetali e di animali selvatici e, almeno per alcune popolazioni, nello scarso consumo di pesce. Lo sviluppo tecnologico ha reso possibile la produzione industriale su larga scala degli oli di semi, la maggior parte dei quali è caratterizzata da rapporti elevati  $\omega 6/\omega 3$ . Inoltre, la pratica industriale della idrogenazione selettiva di alcuni di questi oli, attuata per migliorarne le qualità organolettiche, causa una maggiore diminuzione del contenuto dei polinsaturi ad alti livelli di insaturazione rispetto a quelli meno insaturi. In questo modo, acidi come EPA e DHA, già scarsi nella matrice di partenza, vengono rapidamente idrogenati, se non addirittura degradati per effetto delle alte temperature, ed anche l'acido  $\alpha$ -linolenico (un triene) viene saturato in una quota maggiore rispetto all'acido linoleico (un diene). Il risultato di questa operazione è di aumentare ulteriormente il rapporto  $\omega 6/\omega 3$ . Inoltre, lo sviluppo industriale ha portato all'incremento dei grassi e degli oli a configurazione *trans*, deleteri per la salute, che scaturiscono dai trattamenti sugli alimenti; come conseguenza ulteriore, negli ultimi decenni, tali grassi ed oli vengono ritro-

Acido Grasso	Stato brado	Standard	Farina di pesce
Acidi saturi			
14:0	1.1	0.7	1.0
15:0	-	0.1	0.3
16:0	77.6	56.7	67.8
17:0	0.7	0.3	0.8
18:0	21.3	22.9	23.0
Totale	100.7	80.7	92.9
Monoinsaturi			
16:1 $\omega$ 7	21.7	4.7	5.1
18:1 $\omega$ 9	120.5	110.0	102.8
20:1 $\omega$ 9	0.6	0.7	0.9
24:1 $\omega$ 9	-	-	0.1
Totale	142.8	115.4	108.9
Polinsaturi $\omega$ 6			
18:2 $\omega$ 6	16.0	26.1	67.8
18:3 $\omega$ 6	-	0.3	0.3
20:2 $\omega$ 6	0.2	0.4	0.6
20:3 $\omega$ 6	0.5	0.5	0.5
20:4 $\omega$ 6	5.4	5.0	4.4
22:4 $\omega$ 6	0.7	0.4	0.3
22:5 $\omega$ 6	0.3	1.2	0.2
Totale	23.1	33.9	74.1
Polinsaturi $\omega$ 3			
18:3 $\omega$ 3	6.9	0.5	4.1
20:3 $\omega$ 3	0.2	-	0.1
20:5 $\omega$ 3 (EPA)	1.2	-	0.2
22:5 $\omega$ 3	2.8	0.1	0.4
22:6 $\omega$ 3 (DHA)	6.6	1.1	6.5
Totale	17.7	1.7	11.3
AGPI/saturi	0.4	0.4	0.9
Monoinsaturi/saturi	1.4	1.4	1.2
$\omega$ 6/ $\omega$ 3	1.3	19.9	6.6

Tabella 1.4: Composizione in acidi grassi del tuorlo di diversi tipi di uova

vati in numerosi cibi confezionati. Lo sviluppo degli allevamenti ha portato alla produzione di carni praticamente prive di acidi grassi  $\omega$ 3, a causa delle incorporazioni nei mangimi di alte quote di cereali, la cui parte grassa ha un elevato rapporto  $\omega$ 6/ $\omega$ 3, ed a causa della ridotta variabilità della dieta degli animali di allevamento. In effetti, l'impossibilità a sintetizzare *ex novo* gli AGPI  $\omega$ 6 ed  $\omega$ 3 non è solo una caratteristica umana, ma riguarda anche gli animali di cui l'uomo si nutre; quindi, diviene importante non solo la dieta umana, ma anche la dieta degli animali coinvolti nella catena alimentare. Nelle carni dei bovini, dei suini e del pollame di allevamento gli  $\omega$ 3 sono a

	Trota (pescata)	Trota (acq.)	Anguilla (pescata)	Anguilla (acq.)	Salmone (pescato)	Salmone (acq.)
Grassi totali (g/100g pesce)	5	6	21	30	10	16
Acidi grassi (g/100g acidi grassi)						
18:2 $\omega$ 6	4	9	2	5	1	3
18:3 $\omega$ 3	3	1	2	1	1	1
EPA	7	4	4	3	5	5
DHA	15	13	4	6	10	7
$\omega$ 3/ $\omega$ 6	7	2	5	2	11	6

Tabella 1.5: Composizione in acidi grassi di pescato e del pesce di acquacoltura

livelli bassissimi oppure nulli; nel pollame i livelli di  $\omega$ 3 crescono sensibilmente se l'animale è libero di razzolare e di avere quindi un'alimentazione più varia, comprendente anche vegetali selvatici, insetti, lumache e frutta. Quantità moderate di  $\omega$ 3 possono essere incorporate nel grasso di bovini e suini a seconda del tipo di dieta. Sensibili differenze nel contenuto di  $\omega$ 3 sono riscontrate, come diretta conseguenza, nel latte, nei formaggi e nelle uova a seconda del tipo di nutrizione degli animali. La tabella 1.4, adattata da [13], riporta il quantitativo di acidi grassi (espresso in mg per grammo di tuorlo) del tuorlo di uova di galline libere di razzolare, di uova standard dei supermercati degli USA e di uova di galline nella cui alimentazione è provvista una supplementazione con farina di pesce. Come si può vedere, la differenza più eclatante fra le uova di galline cresciute allo stato brado e quelle standard (provenienti da allevamenti intensivi) consiste proprio nel rapporto fra AGPI  $\omega$ 6/ $\omega$ 3. La supplementazione con farina di pesce, pur migliorando questo parametro, non porta a prodotti migliori di quelli ottenibili con le modalità di allevamento più tradizionali, cioè a bassa intensità. L'importanza del tipo di nutrizione diviene ancor più evidente se si pensa che animali selvatici erbivori che si nutrono di piante selvatiche come muschi e felci (praticamente esclusi dalla dieta moderna), hanno un contenuto di EPA che è circa il 4% del totale della parte grassa [13]. Di particolare interesse è anche il confronto fra il contenuto di AGPI  $\omega$ 6 e  $\omega$ 3 fra pesce di acquacoltura e pesce pescato in laghi, fiumi o mare. Nonostante sia comunque un'ottima fonte di AGPI  $\omega$ 3, in special modo EPA e DHA, il pesce di acquacoltura presenta generalmente un maggior contenuto di grassi totali ed un minor contenuto di polinsaturi  $\omega$ 3 (cfr. tabella 1.5, adattata da [13]). Altre fonti di AGPI  $\omega$ 3 terrestri, che sono oggi poco sfruttate rispetto al passato, sono i frutti di bosco, le noci, al-

cuni tipi di frutta (ad esempio i fichi) ed alcuni vegetali a foglia verde di tipo selvatico. In effetti, le coltivazioni moderne sono rivolte ad un numero relativamente limitato di vegetali a foglia, spesso molto poveri in  $\omega 3$ , che vengono prodotti su grande scala mentre nei secoli scorsi la dieta comprendeva una grande varietà di vegetali selvatici, alcuni dei quali costituivano una buona fonte di  $\omega 3$  [13], [14].

### 1.3.2 Studi epidemiologici relativi al consumo di $\omega 3$

Le prime osservazioni che cominciarono a mettere in luce il rapporto fra acidi grassi polinsaturi  $\omega 3$  e salute umana risalgono agli anni '60 e sono riferite alla popolazione degli Inuit della Groenlandia. Nonostante tale popolo avesse una dieta caratterizzata da elevatissime quantità di grassi, il livello di mortalità associato alle malattie cardiovascolari era straordinariamente basso. Negli anni '70 questo fatto fu associato all'elevata quota di EPA e DHA che veniva assunta da questo popolo che si nutriva essenzialmente di pesce grasso di acque fredde (la tipologia più ricca in EPA e DHA), balene e foche [15]. Fattori di tipo genetico furono esclusi, in quanto gli Inuit che si trasferivano in Canada ed acquisivano le abitudini alimentari tipiche dei paesi occidentali industrializzati, venivano a mancare di questa caratteristica epidemiologica.

Nel 1970 venne pubblicato un importante studio epidemiologico, denominato Seven Countries Study, che aveva lo scopo di analizzare il legame fra tipo di dieta ed incidenza di patologie cardiovascolari e cancro. Le popolazioni studiate appartenevano alle seguenti nazioni: Finlandia, Giappone, Italia, ex Jugoslavia, Olanda, USA e Grecia. Per quanto riguarda la Grecia, la popolazione considerata apparteneva all'isola di Creta. I risultati di questo studio mostrarono come la popolazione di Creta, seguita da quella del Giappone, avesse la più bassa incidenza sia delle malattie cardiovascolari che del cancro. All'epoca il risultato fu attribuito a due fattori: il basso consumo di grassi saturi, che caratterizza sia il Giappone che l'isola di Creta, connesso con l'elevato consumo di pesce (fonte di grassi insaturi e polinsaturi); la bontà della dieta mediterranea, ricca di frutta e verdura e caratterizzata dall'uso dell'olio di oliva, che fu interpretata come ulteriore elemento positivo per quanto riguarda l'isola di Creta. Nonostante questi fattori siano indubbiamente importanti, alcuni aspetti non erano stati considerati nell'interpretazione dei risultati. La dieta giapponese e quella dell'isola di Creta differiscono molto fra loro per quanto riguarda il contenuto totale di grassi: costituiscono l'11% dell'apporto energetico totale per quanto riguarda il Giappone, mentre ne costituiscono il 37% per quanto riguarda l'isola di Creta. Ancora una volta si aveva un indizio del fatto che alti quantitativi di grassi non sono necessariamente collegati ad alta incidenza di patologie cardiovascolari. Un riesame

dei risultati, alla luce delle conoscenze odierne, ha portato ad individuare un parametro che accomuna la dieta giapponese con quella dell'isola di Creta, nonostante i cibi consumati siano differenti: entrambe queste diete sono caratterizzate da elevate assunzioni di AGPI  $\omega 3$  e da bassi rapporti  $\omega 6/\omega 3$ . I giapponesi consumano elevate quantità di AGPI  $\omega 3$  da fonti marine (pesce, alghe), mentre la popolazione di Creta integra (o quantomeno integrava, all'epoca dello studio) le fonti marine di  $\omega 3$  con molti vegetali selvatici, fichi, noci, lumache ed animali che provengono da allevamenti a bassa intensità e che sono quindi liberi di muoversi e di nutrirsi da fonti più varie. Ulteriori conferme della bontà della dieta di Creta, e di conseguenza dell'importanza di aumentare i consumi di AGPI  $\omega 3$ , provengono da interpretazioni di tipo evolucionistico. E' noto che la probabilità di contrarre molte malattie dipende sia da fattori genetici predisponenti che da fattori ambientali; fra i fattori ambientali, quello alimentare è uno dei più importanti. Si ritiene che dal Paleolitico (circa 40000 anni fa) ad oggi, il profilo genetico umano non sia mutato di più dello 0.02%; di contro, negli ultimi 10000 anni (avvento dell'agricoltura) ed in particolar modo degli ultimi 150 anni (sviluppo industriale), l'alimentazione è mutata profondamente a causa dei motivi analizzati nel precedente paragrafo. In definitiva, il profilo genetico umano si è selezionato nel Paleolitico, quando gli uomini erano cacciatori-raccoglitori, e da allora non è mutato quasi per nulla; di contro, la dieta in uso nei paesi industrializzati non corrisponde a quella per la quale l'uomo si era geneticamente selezionato. La dieta di Creta all'epoca del Seven Countries Study, caratterizzata da elevati consumi di pesce, da assenza di carni di allevamento, di oli di produzione industriale e di cibi confezionati, nonché da una grande variabilità di verdure selvatiche e frutta, è quanto di più simile si possa trovare, nell'era moderna, alla dieta dei cacciatori-raccoglitori del Paleolitico [13].

L'importanza del rapporto  $\omega 6/\omega 3$  nella dieta è sottolineata anche dalle stime riportate nella tabella 1.6, adattata da [12]. Le popolazioni caratterizzate dai rapporti più elevati  $\omega 6/\omega 3$  nella dieta, sono anche quelle carat-

Popolazione	$\omega 6/\omega 3$
Paleolitico	0.79
Grecia (prima del 1960)	1-2
USA	16.74
UK e Nord Europa	15
Giappone	4

Tabella 1.6: Rapporto  $\omega 6/\omega 3$  nella dieta di diverse popolazioni

terizzate da maggior incidenza della malattia cardiovascolare. Che questa associazione non sia casuale è provato anche da studi biochimici e clinici (sui quali si tornerà in seguito) che hanno dimostrato che gli AGPI  $\omega 6$  e  $\omega 3$  di origine alimentare vengono incorporati nelle membrane cellulari ed entrano in gioco in modo rilevante nelle patologie dell'apparato cardiocircolatorio. Particolarmente suggestivi sono i risultati di uno studio che ha messo in relazione, per diverse popolazioni, la quota di EPA (come percentuale sul totale degli acidi grassi) ed il rapporto  $\omega 6/\omega 3$  delle membrane cellulari dei trombociti (cellule connesse con la formazione di trombi) e la frequenza di morti causate da malattia cardiovascolare (espressa come percentuale del totale delle patologie mortali). Tali risultati sono riportati nella tabella 1.7, adattata da [12]. Negli ultimi decenni sono stati effettuati numerosi altri studi epidemiologici per verificare l'esistenza di una correlazione fra stile alimentare e malattia cardiovascolare. Generalmente questi studi sono rivolti alla ricerca di una correlazione fra alti livelli di consumo di pesce e basso rischio di patologia cardiovascolare. La maggior parte di questi studi ha mostrato che alti consumi di pesce sono correlati a bassa incidenza di patologie cardiovascolari [16]; particolarmente chiara è risultata l'associazione fra alti consumi di pesce e bassa incidenza di morte cardiaca improvvisa [17]. Sebbene il consumo di pesce non sia un parametro analitico, in quanto stessi livelli di consumo di pesce possono corrispondere a diversi valori di EPA e DHA assunti e a diversi rapporti  $\omega 6/\omega 3$ , sia in relazione al tipo di pesce consumato che agli altri alimenti che compongono la dieta, questi risultati hanno rappresentato un ulteriore indizio dell'effetto benefico di EPA, DHA e di rapporti moderati  $\omega 6/\omega 3$  nella dieta.

Altri studi epidemiologici, basati sull'interpretazione di statistiche di differenti nazioni, hanno mostrato una relazione di proporzionalità inversa fra consumo di pesce ed incidenza di alcuni tipi di tumori e mortalità causata dagli stessi. In particolare, tali risultati sono stati ottenuti per i tumori del seno, della prostata e dell'intestino [18], [19]. A conferma di queste osservazioni è stato anche notato come le popolazioni dell'Alaska, del Giappone, dell'Islanda e della Groenlandia, in conseguenza ad un cambiamento di stile

	Europa e USA	Giappone	Inuit
EPA	0.5	1.6	8.0
$\omega 6/\omega 3$	50	12	1
Mortalità da malattia cardiovascolare	45	12	7

Tabella 1.7: Relazione fra la composizione delle membrane dei trombociti e mortalità da malattia cardiovascolare

di vita ed alimentare, caratterizzato in particolare da una minore quota di grassi provenienti dal pesce sui grassi totali assunti, hanno visto aumentare negli ultimi decenni l'incidenza di tali malattie [18]. In seguito a queste osservazioni, sono stati effettuati numerosi studi su gruppi di controllo, ovvero gruppi di persone la cui dieta e le cui patologie venivano registrate nel corso degli anni. Questi studi hanno fornito risultati controversi: circa la metà non ha evidenziato alcuna relazione fra consumo di pesce ed incidenza dei tumori, mentre l'altra metà ha dato risultati positivi di varia entità. Tuttavia, nella maggior parte di questi studi, soprattutto quelli meno recenti, non veniva specificato il tipo di pesce consumato, nè tantomeno si considerava la dieta nel suo insieme. E' noto che fra diversi tipi di pesce vi può essere notevole differenza nel contenuto di AGPI  $\omega 3$  e che un parametro importante è il rapporto fra AGPI  $\omega 6$  e  $\omega 3$  nell'intera dieta. Dal momento che l'ipotesi che EPA e DHA giochino un ruolo importante nella inibizione della carcinogenesi ha trovato conferme da esperimenti su cellule tumorali in vitro e su animali e molti possibili meccanismi d'azione degli  $\omega 3$  nei confronti della carcinogenesi sono stati proposti e sono attualmente investigati [20], ulteriori studi clinici sono necessari, basandosi su parametri maggiormente analitici, come il rapporto  $\omega 6/\omega 3$  nella dieta oppure l'assunzione giornaliera di EPA e DHA.

### 1.3.3 Assunzione ottimale di AGPI $\omega 3$ e $\omega 6$

Nel 1999 si è tenuta una conferenza presso il National Institute of Health (USA) che ha visto partecipare i più importanti ricercatori, su scala internazionale, del legame fra acidi grassi alimentari  $\omega 3$ ,  $\omega 6$  e salute umana. L'obiettivo di tale incontro era quello di arrivare a formulare, alla luce dei numerosi lavori di ricerca pubblicati negli ultimi anni, delle raccomandazioni relative all'assunzione ottimale giornaliera di tali nutrienti. Infatti, mentre valori di razione giornaliera raccomandata (indicata con RDI nella letteratura internazionale, dall'inglese *Recommended Daily Intakes*) sono disponibili già da molti anni per molti nutrienti, per gli AGPI  $\omega 3$  e  $\omega 6$  tali raccomandazioni non erano ancora state formulate. A valle dell'incontro è stato stabilito che le evidenze scientifiche non sono ancora sufficienti per stabilire con esattezza delle RDI e che ulteriori studi sono necessari per chiarire maggiormente i legami fra AGPI  $\omega 3$ ,  $\omega 6$  e salute umana. Tuttavia, le evidenze scientifiche sono state ritenute sufficienti per stabilire dei valori di razione giornaliera adeguata (indicata con AI nella letteratura internazionale, dall'inglese *Adequate Intake*), da intendersi come valori ragionevoli per il mantenimento di un buono stato di salute e come un punto di passaggio per arrivare, in futuro, alla formulazione delle RDI. I valori di AI sono riportati nella tabella

Acido Grasso	Grammi/giorno	% Energia
Acido linoleico	4.44	2.0
Acido linoleico (limite massimo)	6.67	3.0
Acido $\alpha$ -linolenico	2.22	1.0
EPA + DHA	0.65	0.3
EPA (limite minimo)	0.22	0.1
DHA (limite minimo)	0.22	0.1
Trans (limite massimo)	2.00	1.0
Saturi (limiti massimo)	-	8.0

Tabella 1.8: Razione giornaliera adeguata di alcuni acidi grassi

1.8, adattata da [21]. I valori riportati in tabella sono da intendersi riferiti ad una dieta tipo per un adulto, da 2000 kcal giornaliera. I dati espressi in unità percentuale indicano la quota di energia che deve essere ottenuta dai singoli acidi grassi rispetto alla totalità dell'energia ottenuta dall'alimentazione. Con riferimento ai contenuti medi di nutrienti nelle diete dei paesi occidentali industrializzati, emergono alcune raccomandazioni che possono essere riassunte come segue [21], [22], [23], [24].

**Acidi grassi saturi.** La quota di energia assunta dagli acidi grassi saturi deve essere ridotta a valori inferiori all'8% dell'energia totale per non avere effetti deleteri. Tale raccomandazione era rispettata nelle diete del Giappone e della Grecia all'epoca del Seven Countries Study, caratterizzate da un elevato consumo di pesce. In tali paesi la longevità è elevata e l'incidenza di patologie cardiovascolari è molto bassa.

**Acidi grassi *trans*.** La quota di energia assunta da acidi grassi a conformazione *trans* non deve eccedere il 2% del totale. Tale valore è stato fissato tenendo conto che nei cibi naturali (non processati in alcun modo) l'apporto energetico degli acidi *trans* è circa pari al 2% del totale. Inoltre, tali acidi non sono essenziali, non è noto che svolgano alcuna funzione benefica e, anzi, è stato dimostrato che esplicano un'azione negativa nel metabolismo lipidico.

**Acidi grassi monoinsaturi.** Non vengono fornite raccomandazioni specifiche riguardo gli acidi grassi monoinsaturi in quanto si sottintende che vadano calcolati per differenza. In una dieta bilanciata, con il 35% dell'apporto energetico proveniente dai grassi, dai dati riportati in tabella si ottiene un elevato apporto energetico dai monoinsaturi che è circa pari al 20% del totale. Nella pratica non è difficile rispettare questa raccomandazione in quanto nei cibi l'acido grasso più diffuso è l'acido oleico.

**EPA e DHA.** Questi due AGPI devono essere inseriti nella dieta. Sebbene possano anche essere sintetizzati dall'organismo a partire dall'acido  $\alpha$ -linolenico, l'efficacia di tale sintesi è limitata, soffrendo in particolar modo

della competizione con la linea sintetica  $\omega 6$ . E' stato dimostrato che gli effetti derivanti dall'assunzione diretta di EPA e DHA sono sostituibili solo in minima parte dall'assunzione di acido  $\alpha$ -linolenico che, quindi, non può essere considerata equivalente. Inoltre, lo sbilanciamento a favore della linea sintetica  $\omega 6$  è acuito nelle diete dei paesi industrializzati occidentali, molto ricche in  $\omega 6$  e povere in  $\omega 3$ . Infine, a questi due AGPI sono riconosciute funzioni peculiari, per cui non è solo la loro assunzione complessiva ad essere importante, ma anche singolarmente devono essere provvisti nella dieta in quantità sufficiente. Sebbene gli schemi alimentari seguiti varino molto da nazione a nazione, e anche fra singoli individui, mediamente la quantità di EPA e DHA assunta nei paesi occidentali è bassa rispetto agli AI. A titolo di esempio, si pensi che l'assunzione media di EPA + DHA negli USA ammonta a 0.1–0.2 g/giorno pro capite [17], contro gli 0.65 g/giorno raccomandati dagli AI.

**Acido linoleico ed acido  $\alpha$ -linolenico.** Questi due acidi devono stare tra loro in rapporto 2-3:1. Rapporti più sbilanciati verso il primo, molto frequenti nelle diete dei paesi occidentali, sono ritenuti deleteri per la salute essenzialmente a causa della eccessiva sintesi di acido arachidonico (C20:4 $\omega 6$ ) che causerebbe uno sbilanciamento nella composizione delle membrane cellulari ed un eccesso di ormoni eicosanoidi  $\omega 6$  derivati rispetto agli  $\omega 3$  derivati. Le principali linee guida formulate per bilanciare questo rapporto nelle diete occidentali consistono nella riduzione del consumo di taluni oli di semi.

Per quanto riguarda l'assunzione diretta (alimentare) di acido arachidonico, non è stata fissata alcuna AI in quanto i dati riportati in letteratura non sono stati considerati sufficienti. Bisogna inoltre rilevare, che sebbene il documento finale [21] abbia avuto un largo consenso, vi sono state alcune voci discordanti. In particolare, Horrobin [25] non concorda con la richiesta di ridurre il consumo di AGPI  $\omega 6$ , esprimendo contrarietà alle linee guida tendenti alla riduzione di alcuni oli di origine vegetale, ed avversa la visione negativa attribuita all'acido arachidonico. E' interessante notare, di contro, che riguardo le raccomandazioni di aumentare il consumo di  $\omega 3$ , ed in particolare di EPA e DHA, il consenso è assoluto.

Un altro tema importante trattato nel corso del seminario, ha riguardato la definizione delle AI per le formulazioni alimentari per lattanti. Tale tema è di particolare importanza dato il crescente numero di bambini nati prematuramente e di madri che non allattano al seno. In particolare, è stato stabilito che lo 0.35% degli acidi grassi contenuti nella formulazione alimentare deve essere costituita da DHA [21]. Si tratta di un risultato importante dal momento che in passato questo acido grasso era escluso dalle formulazioni sintetiche per lattanti, mentre è stato dimostrato che è indispensabile nelle prime fasi di crescita. E' stato visto che i bambini nutriti con formulazio-

ni sintetiche mostravano insufficienti velocità di incorporazione del DHA nel tessuto cerebrale se paragonate con le velocità di incorporazione dei bambini allattati naturalmente. Inoltre, ciò si verifica quale che sia la concentrazione di acido  $\alpha$ -linolenico (precursore del DHA) nella formulazione: è evidente che la sola sintesi endogena non è una fonte sufficiente di DHA. In effetti, i bambini allattati al seno ricevono dal latte materno, seppur con valori variabili a seconda dello stile alimentare della madre, oltre che l'acido  $\alpha$ -linolenico, anche del DHA già formato [22].

## 1.4 Applicazioni terapeutiche degli $\omega$ 3

La ricerca riguardante le possibili applicazioni terapeutiche degli AGPI  $\omega$ 3 riguarda molteplici patologie: cardiovascolari, infiammatorie croniche, cancro e patologie neurologiche. In questo paragrafo verranno presi in considerazione con maggior dettaglio gli studi clinici relativi alla supplementazione di AGPI  $\omega$ 3 in soggetti ad elevato rischio di patologia cardiovascolare e nel trattamento di alcune malattie infiammatorie croniche. In effetti, verso queste due categorie di patologie i risultati sono molto promettenti: in alcuni casi si tratta di potenziali applicazioni terapeutiche in fase di studio, in altri, come ad esempio il trattamento della *ipertrigliceridemia*, si tratta di applicazioni terapeutiche già attualmente in uso. Per quanto riguarda il cancro e le patologie neurologiche, gli studi sono ancora in una fase preliminare. Tuttavia, giova ricordare che nello studio di alcuni tipi di cancro (seno, prostata, intestino) alcuni risultati relativi all'utilizzo di AGPI  $\omega$ 3, ottenuti in studi su cellule *in vitro*, su animali e in studi epidemiologici sull'uomo, fanno sperare in esiti interessanti (cfr. paragrafo 1.3.2). Infine, riguardo le malattie su base neurologica vi è, da alcuni anni, la comprensione di un ruolo importante svolto dal DHA nel sistema nervoso centrale, che sembra sia connesso con alcune patologie come la depressione, la schizofrenia ed il morbo di Alzheimer [26].

### 1.4.1 Malattie cardiovascolari

In seguito alle osservazioni epidemiologiche che suggerirono come elevate assunzioni di pesce nella dieta fossero inversamente associate al rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, sono stati effettuati molti studi clinici mirati a studiare l'azione degli  $\omega$ 3, sia nella prevenzione che nella terapia delle malattie cardiovascolari. Qui di seguito verranno ricordati alcuni fra gli studi più significativi.

**Lyon Heart Study.** Il Lyon Heart Study è uno studio di prevenzione secondaria rivolto a pazienti che avevano subito un infarto nel loro recente passato.

Un gruppo di 605 pazienti è stato suddiviso in due sottogruppi: al primo (302 pazienti) è stata somministrata una dieta mediterranea molto simile a quella precedentemente descritta come dieta di Creta nel Seven Countries Study, con ulteriori aggiunte di acido  $\alpha$ -linolenico. Al secondo gruppo (gruppo di riferimento) è stata somministrata una tipica dieta prudente post-infarto. Il primo gruppo ha riportato una notevolissima riduzione nella mortalità totale (70%) e, in particolare, nessun caso di morte cardiaca improvvisa contro gli 8 casi del gruppo di riferimento. Nonostante non sia facile asserire quale sia l'elemento positivo predominante in questa dieta (ricca in pesce, frutta, vegetali, e comprendente moderate quantità di vino rosso), il fatto che siano stati riscontrati degli aumenti degli  $\omega$ 3 nei fosfolipidi del plasma dei pazienti del primo gruppo nel corso dello studio, fa ritenere che questi acidi grassi possano aver svolto un ruolo importante in questo ruolo preventivo [13], [27].

**DART.** Il Diet and Reinfarction Trial (DART) è uno studio di prevenzione secondaria che ha riguardato un gruppo di più di 2000 pazienti del Galles che avevano da poco sofferto di un infarto del miocardio. Tre differenti interventi dietologici sono stati studiati su tre sottogruppi di pazienti, comunque sottoposti a diete prudenti post-infarto: una diminuzione del contenuto totale di grassi, un aumento del consumo di fibre, un aumento del consumo di pesce grasso (quindi ricco in EPA e DHA) da consumarsi almeno due volte a settimana. Nell'arco di due anni i pazienti che consumavano pesce grasso hanno mostrato una mortalità complessiva ridotta del 29% rispetto agli altri due sottogruppi; questo risultato è scaturito dalla ridotta mortalità dovuta a patologie cardiovascolari. Inoltre, il fatto che il gruppo che consumava pesce grasso ha avuto lo stesso numero di reinfarti rispetto agli altri gruppi ha dimostrato come l'effetto protettivo sia consistito in uno smorzamento della gravità degli eventi patologici cardiocircolatori. Questo fatto è stato connesso con una riduzione delle morti causate da aritmia cardiaca [27].

**Indian Study.** L'Indian Experiment on Infarct Survival è uno studio di prevenzione secondaria che ha riguardato 122 pazienti con un sospetto infarto del miocardio. I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: ad un gruppo è stato somministrato 1.08 g/giorno pro capite di olio di pesce (naturalmente ricco in EPA e DHA), ad un altro è stato somministrato un olio ricco di acido  $\alpha$ -linolenico mentre all'ultimo è stato somministrato un placebo. Nell'arco di un anno di tempo, il solo gruppo con alimentazione supplementata con olio di pesce ha registrato un calo statisticamente significativo della mortalità totale causata da patologia cardiovascolare e, in particolare, della mortalità causata da aritmia [27].

**GISSI-Prevenzione Study.** Il GISSI-Prevenzione Study è, ad oggi, lo studio più importante mai realizzato riguardo l'utilizzo di EPA e DHA nella prevenzione secondaria dell'infarto del miocardio. E' stato effettuato in Italia

ed ha riguardato ben 11324 pazienti che erano da poco sopravvissuti (meno di 3 mesi) ad infarto del miocardio. Un primo gruppo (2836 pazienti) ha ricevuto un'integrazione alimentare da 1 g/giorno pro capite di olio di pesce arricchito (in forma di esteri etilici, contenuto minimo di EPA + DHA 85%), un secondo gruppo (2830 pazienti) ha ricevuto un'integrazione alimentare con vitamina E, un terzo gruppo ha ricevuto sia l'olio di pesce arricchito che la vitamina E, mentre l'ultimo gruppo ha ricevuto un placebo. Tutti i gruppi assumevano, di base, una dieta prudente post-infarto e sono stati seguiti per tre anni e mezzo. In sintesi, la supplementazione con vitamina E non ha dato luogo ad alcun effetto, mentre la supplementazione con EPA e DHA ha dato luogo ad una riduzione del 20% della mortalità complessiva, del 30% della mortalità da patologia cardiovascolare e del 45% della morte cardiaca improvvisa. La particolare importanza di questo studio, oltre che per la grandezza del campione e la durata temporale, risiede nel fatto che è stato studiato l'effetto di due specifiche molecole (EPA e DHA) e non di una dieta, il che inevitabilmente comporta dubbi su quale sia l'elemento predominante che causa un certo effetto osservato. Inoltre, tutti i pazienti sono stati anche trattati con i farmaci attualmente somministrati ai post-infartuati (come, ad esempio, aspirina e  $\beta$ -bloccanti) e quindi il risultato riscontrato indica un effetto peculiare dell'EPA e del DHA. Bisogna anche considerare che circa il 70–80% dei pazienti già assumeva, nella propria dieta base, più di una porzione di pesce a settimana: non solo ciò non ha schermato l'effetto della supplementazione con olio di pesce arricchito, ma, anzi, ha dimostrato come l'assunzione ulteriore di  $\omega$ 3 porti ad ulteriori effetti benefici, lasciando presupporre un legame dose-effetto [27], [28].

Un altro risultato interessante ottenuto nel Lyon Hearth Study, nel DART e nel GISSI, consiste nell'aver ottenuto una diminuzione della mortalità complessiva e, nel caso del GISSI, anche della frequenza di morte cardiaca improvvisa, già dopo pochi mesi dall'inizio della sperimentazione. In passato, studi clinici su farmaci che miravano alla riduzione del colesterolo, un importante fattore di rischio di malattia cardiovascolare, avevano dato risultati positivi nel lungo periodo, dopo circa due anni dall'inizio della sperimentazione. L'incorporazione di EPA e DHA nelle membrane cellulari ed i conseguenti effetti benefici che ne scaturiscono sembrano essere processi relativamente rapidi [27].

Per quanto riguarda i possibili meccanismi di azione di EPA e DHA nella prevenzione e terapia della malattia cardiovascolare, i ricercatori hanno evidenziato molteplici meccanismi, che sono qui di seguito riportati.

**Antiaritmico.** Nonostante in passato si ritenesse che l'effetto protettivo di EPA e DHA nei confronti dell'apparato cardiocircolatorio fosse dovuto ad un'azione antiaterosclerotica ed antitrombotica, il fattore che oggi è ricono-

sciuto come predominante è quello antiaritmico. Ciò è stato suggerito da tutti gli studi appena descritti: in tutti i casi si ha una riduzione del numero di morti collegate ad aritmia cardiaca. L'idea che EPA e DHA siano degli agenti antiaritmici è stata confermata da un grande numero di esperimenti su cellule *in vitro*. Su cellule del muscolo cardiaco coltivate *in vitro* si può provocare un'aritmia per mezzo di aggiunte di alcune sostanze chimiche, note per provocare fibrillazione ventricolare nell'uomo. L'aggiunta al sistema di EPA o DHA in concentrazioni micromolari previene l'aritmia di queste cellule cardiache oppure la fa arrestare se precedentemente indotta. Anche gli AGPI  $\omega 6$  possono esplicare un tale effetto antiaritmico, ma solo in sinergia con una *ciclossigenasi*. EPA e DHA esplicano questo effetto in tutti i casi. Tale effetto sembra sia collegato con la modulazione di alcuni potenziali elettrici locali, ed è strettamente connesso con la presenza dei doppi legami di questi AGPI. Ulteriori studi sono necessari per chiarire come questo effetto si espliciti nell'uomo. A tale proposito sono già in essere alcuni studi su pazienti che convivono con defibrillatori di tipo impiantabile [27].

**Antiaterosclerotico.** L'aterosclerosi è una malattia degenerativa delle arterie caratterizzata da formazione di placche (accumuli di tipo lipidico) al di sotto delle cellule dell'endotelio, che costituisce il rivestimento interno della parete arteriosa. Le arterie colpite perdono in distensibilità e, laddove le placche protrudono nella corrente sanguigna si generano rugosità superficiali in grado di attivare l'aggregazione piastrinica, con conseguente rischio di coaguli. Un parametro importante è la stabilità delle placche: infatti, se una placca si rompe può provocare lesioni endoteliali con conseguente intervento delle piastrine che aggregandosi possono occludere il vaso (trombosi). Esperimenti su animali hanno mostrato che l'assunzione di olio di pesce provoca il rallentamento della progressione delle placche aterosclerotiche. La supplementazione di AGPI  $\omega 3$  nell'uomo ha portato a modesti miglioramenti della patologia aterosclerotica [16]. Infine, uno studio recente ha mostrato come l'assunzione di olio di pesce provochi una incorporazione degli AGPI  $\omega 3$  all'interno delle placche aterosclerotiche causando delle modifiche strutturali delle stesse che risultano più stabili e, quindi, meno soggette a rottura. Di contro, nei pazienti cui è stato somministrato olio di girasole, ricco in AGPI  $\omega 6$ , è stata rilevata una incorporazione di questi acidi grassi nelle placche che ha causato, contariamente agli  $\omega 3$ , una riduzione della stabilità delle placche, con aumentati rischi di rottura [29].

**Antitrombotico.** E' noto che gli AGPI  $\omega 3$  riducono l'aggregazione piastrinica mentre un effetto opposto è svolto dagli AGPI  $\omega 6$ . In effetti, uno dei fattori che regola l'intensità dell'aggregazione piastrinica è il rapporto fra AGPI  $\omega 6$  ed  $\omega 3$  all'interno delle membrane dei trombociti. Tale rapporto è chiaramente collegato alle abitudini alimentari e risulta basso nelle popo-

lazioni a bassa incidenza di malattia cardiovascolare (cfr. tabella 1.7) [12]. Questi aspetti portarono a ritenere che gli AGPI  $\omega$ 3, modulando l'intensità dell'aggregazione piastrinica, svolgessero un'azione antitrombotica e che questa azione fosse una delle responsabili della riduzione delle malattie cardiovascolari. Tuttavia, il meccanismo della trombosi è complesso ed alcuni studi recenti non hanno mostrato chiare evidenze nei confronti dell'ipotizzato effetto protettivo degli  $\omega$ 3. In sintesi, sebbene gli  $\omega$ 3 esplicino un effetto antitrombotico, non è chiaro quanto questo effetto sia rilevante nella ridotta mortalità cardiovascolare riscontrata negli studi clinici ed epidemiologici [16], [17].

**Ipotensivo.** Alcuni studi hanno dimostrato che alte dosi di EPA e DHA (più di 3 g/giorno) portano ad abbassamenti della pressione sanguigna mediamente da 2 a 5 mmHg. Il DHA sembra più efficace dell'EPA riguardo questo aspetto. Inoltre, è stata verificata l'esistenza di un legame dose-effetto. Sebbene questo effetto sia considerato acclarato ed è positivo per pazienti affetti da rischio di patologia cardiovascolare, EPA e DHA non possono essere presi in considerazione a questo specifico scopo in quanto la riduzione della pressione sanguigna che inducono è molto blanda [17].

**Riducente della trigliceridemia.** L'alto livello di trigliceridi nel sangue (*ipertrigliceridemia*) è uno dei fattori di rischio di malattia cardiovascolare. Può essere causato sia da fattori genetici che alimentari. E' ormai accertato che l'assunzione di AGPI  $\omega$ 3 a dosi elevate riduce i trigliceridi nel sangue; sembra che tale effetto sia svolto sia dall'EPA che dal DHA singolarmente. Attualmente, l'American Heart Association (AHA) raccomanda l'assunzione di EPA + DHA sotto controllo medico (da 2 a 4 g/giorno) per il trattamento della ipertrigliceridemia [17]. Inoltre, alcuni studi hanno mostrato che EPA e DHA possono essere utilizzati nel trattamento delle alte concentrazioni lipidiche nel sangue (*iperlipemia*). L'iperlipemia è un altro fattore di rischio di malattia cardiovascolare; gli alti valori di lipidi circolanti causano un' aumentata azione procoagulatoria, soprattutto dopo i pasti. E' stato dimostrato come l'associazione delle *statine* (farmaci attualmente utilizzati nel trattamento delle iperlipemie) con EPA e DHA (dosi di 2 g/giorno, in forma di esteri etilici, purezza 85%) è un trattamento efficace nel ridurre sia l'iperlipemia postprandiale che il rischio di attivazione della coagulazione sanguigna [30].

### 1.4.2 Malattie infiammatorie croniche

Con il termine *infiammazione* si indica un insieme di processi locali attuati dall'organismo (vasodilatazione, alterazioni della permeabilità vascolare, accumulazione di leucociti etc.) in risposta a stimoli lesivi di vario gene-

re (infezioni, traumi, trombosi, ipersensibilità verso alcune sostanze, etc.). Si tratta di una risposta positiva da parte dell'organismo, volta al ripristino dell'equilibrio preesistente (eliminazione dell'agente lesivo, riparazione dei tessuti). Tuttavia, quando i meccanismi reattivi dell'organismo non sono sufficienti ad eliminare o neutralizzare lo stimolo lesivo, l'infiammazione diviene cronica e può essa stessa divenire lesiva nei confronti dei tessuti dell'organismo. Esempi di stati infiammatori cronici che portano a gravi conseguenze nei tessuti dell'organismo si hanno in molte patologie fra cui l'aterosclerosi, le epatiti croniche, alcune affezioni gastrointestinali, l'artrite reumatoide, la psoriasi etc. Nei confronti di tali patologie, la ricerca farmacologica è rivolta da un lato alla eradicazione dell'agente lesivo, dall'altro a sviluppare farmaci che limitino gli effetti deleteri dell'infiammazione (farmaci antinfiammatori). Un esempio di farmaci antinfiammatori è costituito dai *corticosteroidi*, che però presentano delle problematiche relative agli effetti collaterali. Anche per questo motivo sono stati sviluppati molti farmaci antinfiammatori di tipo non steroideo, e molta ricerca è ad essi rivolta.

La risposta infiammatoria è regolata dall'organismo attraverso delle sostanze endogene (mediatori chimici). Fra queste sostanze un ruolo importante è svolto dagli ormoni eicosanoidi che, come detto, possono appartenere a due diverse famiglie:

- Eicosanoidi  $\omega 6$ , derivati dall'acido arachidonico (C20:4 $\omega 6$ , AA)
- Eicosanoidi  $\omega 3$ , derivati dall'acido eicosapentaenoico (C20:5 $\omega 3$ , EPA).

In estrema sintesi, si può dire che gli eicosanoidi  $\omega 6$  derivati inducono reazioni infiammatorie più forti mentre quelli  $\omega 3$  derivati inducono reazioni più blande. Inoltre, è stato dimostrato che il bilanciamento fra queste due famiglie di eicosanoidi dipende strettamente dal rapporto  $\omega 3/\omega 6$  alimentare [11]. Questi elementi hanno portato a ritenere che l'evoluzione verso una dieta sbilanciata a favore degli AGPI  $\omega 6$  sia uno dei fattori che favorisce lo sviluppo di patologie infiammatorie croniche [12] e che oli ricchi in  $\omega 3$ , in particolare in EPA, possano essere utilizzati a scopo terapeutico per modulare la risposta infiammatoria portando ad un miglioramento dei sintomi in tali patologie [31].

Per verificare l'efficacia terapeutica degli oli ricchi in EPA, sono stati effettuati numerosi studi clinici. In questo paragrafo non verranno presi in considerazione gli studi relativi alle patologie cardiovascolari, nelle quali anche l'infiammazione gioca un ruolo importante, in quanto gli studi più significativi sono già stati esaminati nel paragrafo precedente. Inoltre, sebbene gli studi sulle potenzialità terapeutiche degli  $\omega 3$  siano rivolti a molte malattie caratterizzate da infiammazione cronica, l'attenzione in questo paragrafo

sarà concentrata sulle patologie verso le quali gli  $\omega 3$  hanno dato i risultati più promettenti.

**Patologie infiammatorie gastrointestinali.** Si tratta di un ampio gruppo di patologie generalmente classificate in tre gruppi: colite ulcerosa, morbo di Crohn e colite aspecifica. Tutte queste patologie sono in grado di causare una diffusa ed intensa infiammazione del tratto gastrointestinale. L'obiettivo della ricerca è quello di sviluppare farmaci che favoriscano la remissione della malattia cercando di minimizzare gli effetti lesivi della stessa, che possono portare a gravi danni ed alla necessità di interventi chirurgici. Di tutti gli studi clinici effettuati, alcuni risultati interessanti sono stati ottenuti nel trattamento della colite ulcerosa e del morbo di Crohn. Nel caso della colite ulcerosa, supplementazioni di oli ricchi in EPA oppure in AGPI  $\omega 3$  a dosi elevate (fra 3 e 5.4 g/giorno) hanno portato in tutti i casi a miglioramento dei sintomi della malattia e, in alcuni studi, ad una ridotta necessità di farmaci corticosteroidi (fino al 72% di riduzione) per il controllo della malattia. Dal momento che gli effetti collaterali dei corticosteroidi sono particolarmente pesanti, la possibilità di utilizzare oli ricchi in  $\omega 3$  o in EPA come terapia di supporto che consente di utilizzare minori quantità di antinfiammatori convenzionali è molto interessante. Un altro studio ha mostrato che gli AGPI  $\omega 3$  sono anche efficaci nella fase di remissione della colite ulcerosa, riducendo, rispetto ad un gruppo di controllo supplementato con un placebo, il numero di ricadute. Inoltre, effetti positivi di supplementazioni con AGPI  $\omega 3$  nella colite ulcerosa sono stati verificati anche in esperimenti su animali, risultando generalmente in una risposta infiammatoria più blanda ed in una riduzione dei danni alla mucosa intestinale. Un altro studio di grosse dimensioni (204 pazienti) ha mostrato che supplementazioni di 5.1 g/giorno di esteri etilici  $\omega 3$  ha consentito di trattare con minori quantità di corticosteroidi pazienti in trattamento per il morbo di Crohn [31]. Infine, i risultati migliori nei confronti del trattamento del morbo di Crohn (in fase di remissione) sono stati ottenuti mediante somministrazione di una miscela di acidi grassi liberi (EPA 40%, DHA 20%) in capsule che garantivano la resistenza al passaggio nello stomaco. Questo tipo di preparazione ha garantito il miglior livello di incorporazione degli  $\omega 3$  ed assenza di effetti collaterali. Del gruppo supplementato con 2.7 g/giorno di  $\omega 3$ , a distanza di 1 anno dall'inizio della sperimentazione il 59% dei pazienti era ancora in una fase di remissione della malattia, mentre nel gruppo supplementato con un placebo tale percentuale era solo del 26% [32].

**Artrite reumatoide.** Si tratta di una malattia che causa uno stato infiammatorio cronico che porta ad una degenerazione delle articolazioni, con esiti che possono essere invalidanti. Tutti gli studi clinici effettuati hanno mostrato che la supplementazione con oli ricchi di AGPI  $\omega 3$ , utilizzata come

supporto alle terapie convenzionali basate su antinfiammatori non steroidei, porta ad un miglioramento dei sintomi connessi con questa malattia (rigidità e debolezza articolare). Inoltre, un certo numero di studi ha dimostrato che supplementazioni con oli ricchi di  $\omega 3$  (oli di pesce oppure oli arricchiti in forma di esteri etilici) consentono di trattare la malattia con assunzioni discontinue oppure a dosaggio ridotto degli antinfiammatori comunemente usati. La riduzione delle terapie convenzionali può avvenire, sotto controllo medico, dopo alcune settimane di supplementazione con  $\omega 3$ , a dosaggi dell'ordine di 3–6 g/giorno [33].

Altre patologie infiammatorie croniche che sono suscettibili di trattamento con gli AGPI  $\omega 3$ , sebbene le evidenze sperimentali siano, ad oggi, meno forti o meno numerose rispetto alle patologie di cui si è appena discusso, sono rappresentate da alcune malattie della pelle (come la psoriasi), alcune malattie respiratorie (asma, sindrome acuta respiratoria ostruttiva) [31], e la IgA nefropatia (malattia autoimmune che causa uno stato infiammatorio cronico dei reni) [34].

## 1.5 Oli arricchiti in $\omega 3$ : prospettive commerciali

Nelle farmacie è possibile trovare numerosi prodotti, generalmente classificati come integratori alimentari, sulle cui etichette vengono riportate le diciture “olio di pesce” oppure “omega-3”. Si tratta, in realtà, di un'ampia gamma di prodotti, che si presentano in forma di pasticche oppure fiale contenenti un olio. Alla base di questi prodotti c'è sempre un olio di talune specie di pesce, naturalmente ricche in  $\omega 3$  ed economiche. Nella formulazione del prodotto può essere utilizzato olio di pesce tal quale oppure olio di pesce arricchito (i.e. concentrato in EPA e DHA), ed in alcuni casi vi possono essere miscele con alcuni oli vegetali. Dal punto di vista chimico, l'olio utilizzato può essere una miscela di trigliceridi oppure di esteri etilici degli acidi grassi provenienti dall'olio grezzo. I prodotti a base di trigliceridi spesso non sono arricchiti e presentano una composizione in EPA e DHA all'incirca equivalente a quella dell'olio di partenza (generalmente compresa fra il 20 ed il 35%); in questi casi, gli unici processi attuati sull'olio di pesce grezzo consistono nei trattamenti convenzionali di deacidificazione e deodorazione. I prodotti a base di esteri etilici, invece, sono stati sottoposti, a valle dei trattamenti convenzionali sull'olio grezzo, a transesterificazione con alcool etilico ed a successivo frazionamento al fine di ottenere una frazione ricca di esteri etilici di acidi grassi a catena lunga (C20 e C22). Dal momento che

tali frazioni sono molto abbondanti in EPA e DHA, si ottengono degli oli ad alta percentuale di questi due acidi grassi, e, come conseguenza, ad alta percentuale di  $\omega 3$ . Sono disponibili sul mercato oli arricchiti negli esteri etilici dell'EPA e del DHA, a diversi rapporti EPA/DHA, a concentrazioni totali (EPA+DHA) che vanno dal 50 al 90%. Dipendentemente dalla legislazione dei vari Paesi, gli oli arricchiti vengono classificati come integratori alimentari oppure come farmaci.

Per avere un'idea più specifica riguardo l'offerta del mercato farmaceutico italiano, sono stati acquistati e sottoposti ad analisi alcuni prodotti commerciali in vendita nelle farmacie italiane: *Olio di pesce  $\omega 3$*  (*Body Spring*), *ColestOil* (*Aboca*), *Blue Fish* (*Roeder*). L'obiettivo di tale analisi consisteva nel verificare qualitativamente la tipologia dei prodotti e dare una stima di prima approssimazione della loro composizione. In un primo tempo, i campioni tal quali sono stati solubilizzati in etanolo ed analizzati per via gascromatografica (per quanto riguarda la procedura gascromatografica cfr. 3.5). Mentre il prodotto denominato *Blue Fish* ha fornito dei risultati qualitativamente analoghi a quelli delle prove sperimentali descritte nei successivi capitoli, realizzate su miscele di esteri etilici, gli altri due prodotti hanno fornito un tracciato gascromatografico pressochè piatto, per cui si è ipotizzato che fossero costituiti da una miscela di trigliceridi. Questi ultimi prodotti sono quindi stati sottoposti ad una reazione di transesterificazione con alcool etilico in eccesso (rapporto alcool/olio 6:1 in massa), in presenza di NaOH come catalizzatore, mantenendo la miscela in condizioni di ebollizione a pressione atmosferica e riflussando il vapore dopo averlo condensato; dopo la reazione, il sistema veniva raffreddato e la glicerina prodottasi veniva separata mediante centrifugazione mentre l'altra fase veniva sottoposta ad analisi gascromatografica, fornendo un tracciato qualitativamente simile a quello ottenuto per le miscele di esteri etilici. I risultati ottenuti dalle analisi gascromatografiche sono riportati, in termini di percentuale in massa degli esteri di acidi di specificata lunghezza di catena, nella tabella 1.9. Sebbene per i prodotti della *Body Spring* e della *Aboca* tali risultati abbiano valore solo indicativo, in quanto non è stato controllato il grado di avanzamento

Prodotto	C14	C16	C18	C20	C22
<i>Blue Fish</i>	0.0	0.7	11.5	53.8	34.0
<i>Olio di pesce <math>\omega 3</math></i>	8.0	32.0	23.4	24.6	12.0
<i>ColestOil</i>	0.5	4.7	44.2	34.1	16.4

Tabella 1.9: Composizione in acidi grassi di prodotti commerciali venduti nelle farmacie italiane

della reazione di transesterificazione, i risultati indicano chiaramente come il prodotto della *Body Spring* presenti una composizione, in termini di catene acide, simile a quella dell'olio di pesce tal quale mentre il prodotto dell'*Aboca*, pur presentando una frazione C20+C22 inferiore a quella del prodotto della *Roeder*, deve aver subito un processo di frazionamento. Nel complesso, senza che vi sia alcuna informazione al riguardo sulle etichette, i tre prodotti sono diversi fra loro ed il prodotto a base di esteri etilici è quello caratterizzato dal più elevato grado di purezza dei componenti pregiati a catena lunga.

Gli oli di pesce arricchiti trovano impiego come integratori alimentari per rispondere all'esigenza di diminuire il rapporto fra AGPI  $\omega 6$  e  $\omega 3$  nella dieta della popolazione generale e, contemporaneamente, aumentare l'assunzione di EPA e DHA. Alti rapporti  $\omega 6/\omega 3$  e bassi consumi di EPA e DHA sono problematiche alimentari molto gravi soprattutto negli USA, ed in secondo luogo nella maggior parte delle nazioni europee. Chiaramente, per riequilibrare l'apporto dei vari tipi di acidi grassi sarebbe auspicabile un cambiamento nello stile alimentare piuttosto che il ricorso ad integratori. Tuttavia, tale cambiamento non è semplice e richiederebbe, oltre che maggior attenzione e consapevolezza da parte del consumatore (che però non è aiutato dall'assenza di informazioni sulla tipologia di AGPI contenuti negli alimenti), anche dei cambiamenti in tutta la filiera produttiva. Infatti, la riduzione del rapporto  $\omega 6/\omega 3$  richiederebbe minor consumo di oli di semi, minor consumo di cibi confezionati nei quali tali oli sono impiegati, cambiamenti nella mangimistica degli allevamenti (sia terrestri che marini) con maggior attenzione alla quota dei vari grassi apportati nella dieta degli animali. Per quanto riguarda il corretto apporto di EPA e DHA, bisognerebbe introdurre nella dieta alcune tipologie di pesce, per più di 1 volta a settimana. La tabella 1.10, costruita

Prodotto marino	g/giorno
Tonno (in scatola)	210
Salmone (Atlantico)	30-50
Sgombro	35-160
Aringa (Atlantico)	30
Trota arcobaleno	60
Sardine	30-60
Merluzzo	270
Ostriche	150
Gamberetti	200

Tabella 1.10: Quantitativo equivalente alla AI per EPA e DHA per vari prodotti marini

in base a dati forniti in [16], riporta i grammi di pesce (o prodotti marini) che dovrebbero essere consumati in un giorno per ottenere 0.65 g di EPA+DHA (razione giornaliera adeguata). Per ogni singola specie il valore riportato copre il 100% del fabbisogno. In alcuni casi le stime fanno riferimento ad un intervallo piuttosto ampio in quanto il contenuto di  $\omega 3$  nell'alimento è molto variabile dipendentemente dalle stagioni, dalla dieta del pesce, dai metodi di pretrattamento e dalle modalità di cottura. Infine, le stime riportate in tabella potrebbero essere leggermente per eccesso in quanto fonti diverse dai prodotti marini potrebbero contribuire ad apportare  $\omega 3$  ma, comunque, nella dieta dei Paesi Occidentali tale apporto è molto basso. Dalla tabella 1.10 si evince che per rispettare le AI bisognerebbe introdurre il pesce nella dieta da 2 volte a settimana (se trattasi di pesce grasso) a tutti i giorni (se trattasi di pesce magro, come ad esempio il merluzzo). In effetti, tali stime trovano riscontro nel documento pubblicato dalla American Heart Association (AHA) che raccomanda (per la popolazione generale) di consumare vari tipi di pesce (preferibilmente grasso) per almeno due volte a settimana [17]. In sostanza, si evince come per ottenere un bilanciamento fra i diversi tipi di AGPI, sarebbero necessari cambiamenti nelle modalità produttive e l'adozione di una dieta molto ricca in pesce che non tutti i consumatori sono disposti ad accettare. Una possibile alternativa, per il mantenimento di adeguati livelli di EPA e DHA e di un giusto rapporto fra acidi grassi  $\omega 6$  e  $\omega 3$  nell'organismo, consiste nell'assunzione di integratori alimentari. A tale proposito, va inoltre considerato che sebbene vengano spesso proposti sul mercato prodotti a base di olio di pesce non arricchito, non vi è alcun dubbio che gli oli arricchiti siano decisamente da preferirsi. Infatti, considerando a titolo di esempio l'assunzione di una capsula da 1 g di un prodotto al 70% in EPA+DHA, il fabbisogno giornaliero di questi due acidi grassi risulta coperto, apportando solo 0.3 g di esteri etilici di altri acidi grassi: inoltre, è probabile che in questi 0.3 g una quota elevata sia costituita dall'estere dell'acido oleico (in quanto essendo un C18 molto frequente è probabile che rimanga in certa misura come impurezza del taglio C20–C22) che non ha nessuna controindicazione. Al contrario, l'utilizzo di olio di pesce tal quale, per esempio al 30% in EPA e DHA, comporta la necessità di assumere circa 2 g di olio, di cui circa 1.4 sono esteri di altri acidi grassi, con una quota consistente di acidi grassi saturi a catena più corta di C20, di cui l'alimentazione dei Paesi Occidentali è già sovrabbondante. Inoltre, uno dei problemi frequentemente riportati nell'utilizzo di tali supplementazioni è il cattivo gusto ed il cattivo odore persistente dopo l'assunzione: anche da questo punto di vista, assumere la stessa quantità di EPA + DHA con una quantità di olio due o tre volte inferiore è senza dubbio un ulteriore vantaggio. Infine, l'assunzione di esteri etilici, invece che di trigliceridi come avviene nei cibi naturali, non ha alcuna controindicazione

ed è caratterizzata da parametri di assorbimento da parte dell'organismo del tutto simili a quelli dei trigliceridi [35].

Ancora più importanti sono le applicazioni degli oli arricchiti a scopo terapeutico. Nel caso di pazienti che abbiano avuto un evento cardiovascolare, l'AHA raccomanda di aumentare l'assunzione di EPA + DHA fino ad 1 g/giorno come forma di prevenzione secondaria. Data la difficoltà di ottenere tali livelli di EPA e DHA dall'alimentazione ordinaria, e soprattutto data la necessità di mantenere tali livelli per lunghi periodi di tempo, l'AHA suggerisce come possibile alternativa l'utilizzo di supplementazioni alimentari. Nel caso specifico delle ipertrigliceridemie, l'utilizzo degli oli arricchiti in EPA e DHA è già molto diffuso: come anticipato, l'AHA raccomanda trattamenti da 2 a 4 g/giorno di EPA+DHA che, dato il dosaggio elevato, non possono che essere ottenuti mediante supplementazione alimentare [17]. E' evidente che i vantaggi degli oli arricchiti rispetto agli integratori a base di olio di pesce tal quale, se sono consistenti per bassi dosaggi, lo diventano ancor di più per dosaggi elevati. Gli altri utilizzi di tipo terapeutico degli oli arricchiti in EPA e DHA che vengono attualmente presi in considerazione riguardano il trattamento di alcune patologie infiammatorie croniche, in particolar modo dell'artrite reumatoide. In tutti i casi, gli utilizzi di oli ricchi in AGPI  $\omega$ 3 ad alti dosaggi sono da considerarsi alla stregua dei trattamenti farmacologici, e vanno effettuati sotto controllo medico perchè anch'essi potrebbero dar luogo ad effetti collaterali. Tuttavia, uno dei vantaggi che si riscontrano nell'uso di questi oli consiste nel fatto che tali effetti collaterali sono molto blandi. In particolare, è stato stimato che dosaggi inferiori ai 3 g/giorno, in pazienti non affetti da diabete o tendenza al sanguinamento, sono sicuri e presentano rischio di effetti collaterali molto basso. Infatti, gli effetti collaterali più frequentemente riportati nello studio GISSI (dosaggio 1 g/giorno) sono di tipo blando (disturbi gastrointestinali, nausea, fastidio per l'odore di pesce) ed hanno riguardato percentuali fra l'1 ed il 5% dei pazienti. Un ulteriore aspetto positivo degli oli arricchiti, sottoposti quindi a processi di frazionamento, consiste nella loro maggior sicurezza rispetto all'assenza di composti del mercurio, di policlorobifenili, diossine ed altri contaminanti ambientali, rispetto al pesce tal quale presente sulle nostre tavole [17].

In conclusione, gli oli derivati dal pesce, frazionati allo scopo di arricchimento in EPA e DHA, sono attualmente utilizzati nel trattamento di alcune frequenti patologie e molti studi sono in corso per valutare la possibilità di introdurre il loro consumo, a scopo terapeutico o preventivo, in altre patologie. E' prevedibile che in futuro la richiesta di tali prodotti aumenterà, a causa della crescente richiesta di integratori alimentari da parte della popolazione generale, degli aumentati ambiti terapeutici di utilizzo, della necessità di disporre di oli adatti alla realizzazione di studi clinici mirati ed anche perchè,

in tutti questi campi, verranno sempre più frequentemente preferiti agli oli di pesce non arricchiti. Particolare attenzione dovrà essere posta, nei processi di frazionamento, all'eliminazione di eventuali contaminanti ambientali, a non introdurre tracce di solventi nel prodotto finito e ad evitare fenomeni di degradazione, potenzialmente determinati dalle alte temperature e dal contatto con l'ossigeno, verso i quali gli acidi grassi polinsaturi sono particolarmente sensibili.

# Bibliografia

- [1] W.W. Nawar, Chemistry, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (vol.1), Y.H. Hui (ed.), John Wiley and Sons, inc., New York, 1996.
- [2] R.T. Morrison, R.N. Boyd, *Chimica organica*, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 1991.
- [3] J.M. deMan, Chemical and Physical Properties of Fatty Acids, in *Fatty acids in foods and their health implications*, C.K. Chow (ed.), M. Dekker, New York, 1992.
- [4] K. Lobb, Fatty Acid Classification and Nomenclature, in *Fatty acids in foods and their health implications*, C.K. Chow (ed.), M. Dekker, New York, 1992.
- [5] CRC Handbook of Data on Organic Compounds, R.C. Weast, M.J. Astle (eds.), CRC Press, inc., Boca Raton, Florida, 1985.
- [6] H. Nouredдини, B.C. Teoh, L.D. Clements, Viscosities of Vegetable Oils and Fatty Acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 (1992) 1189–1191.
- [7] H. Abramovic, C. Klofutar, The temperature dependence of dynamic viscosity for some vegetable oils, *Acta Chim. Slov.* 45(1) (1998) 69–77.
- [8] L. Stryer, *Biochimica*, Casa Editrice Zanichelli, Bologna, 1996.
- [9] G.J. Nelson, Dietary Fatty Acids and Lipid Metabolism, in *Fatty acids in foods and their health implications*, C.K. Chow (ed.), M. Dekker, New York, 1992.
- [10] G. Bruckner, Biological Effects of Polyunsaturated Fatty Acids, in *Fatty acids in foods and their health implications*, C.K. Chow (ed.), M. Dekker, New York, 1992.

- [11] D. Hwang, Dietary Fatty Acids and Eicosanoids, in *Fatty acids in foods and their health implications*, C.K. Chow (ed.), M. Dekker, New York, 1992.
- [12] A.P. Simopoulos, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, *Biomed Pharmacother* 56 (2002) 365–379.
- [13] A.P. Simopoulos, Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 60 (1999) 421–429.
- [14] A.P. Simopoulos, Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 11 (2002) S163–S173. 421–429.
- [15] W.E. Connor, Importance of n-3 fatty acids in health and disease, *American Journal of Clinical Nutrition* 71 (2000) S171–S175.
- [16] J.N. Din, D.E. Newby, A.D. Flapan, Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease—fishing for a natural treatment, *BMJ* 328 (2004) 30–35.
- [17] P.M. Kris–Etherton, W.S. Harris, L.J. Appel, Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 20–31.
- [18] P.D. Terry, T.E. Rohan, A. Wolk, Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiological evidence, *American Journal of Clinical Nutrition* 77 (2003) 532–543.
- [19] M.F. McEntee, J. Whelan, Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia, *Biomed Pharmacother* 56 (2002) 380–387.
- [20] S.C. Larsson, M. Kumlin, M. Ingelman–Sundberg, A. Wolk, Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms, *American Society for Clinical Nutrition* 79 (2004) 935–945.
- [21] A.P. Simopoulos, A. Leaf, N. Salem Jr, Workshop Statement on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 63(3) (2000) 119–121.

- [22] S.C. Cunnane, Commentary on the Workshop Statement, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 63(3) (2000) 139–144.
- [23] A.P. Simopoulos, Commentary on the Workshop Statement, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 63(3) (2000) 123–124.
- [24] C. Galli, Commentary on the Workshop Statement, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 63(3) (2000) 127–129.
- [25] D.F. Horrobin, Commentary on the Workshop Statement: Are we really sure that arachidonic acid and linoleic acid are bad things?, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 63(3) (2000) 145–147.
- [26] C.L. Broadhurst, Polyunsaturated Fats and Neurological Disorders, Nutrition Science News, September 2000.
- [27] R. De Caterina, R. Madonna, R. Zucchi, M.T. La Rovere, Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids: From epidemiology to bedside, American Heart Journal 146 (2003) 420–430.
- [28] The GISSI-Prevenzione Investigators, Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamins E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial, The Lancet 354 (1999) 447–455.
- [29] F. Thies, J.M. Garry, P. Yaqoob, K. Rerkasem, J. Williams, C.P. Sherman, et al., Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial, Lancet 36 (2003) 477–485.
- [30] A. Nordoy, B. Svensson, J.B. Hansen, Atorvastatin and omega-3 fatty acids protect against activation of the coagulation system in patients with combined hyperlipemia, Journal of Thrombosis and Haemostasis 1 (2003) 690–697.
- [31] A. Gil, Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases, Biomed Pharmacother 56 (2002) 388–396.
- [32] A. Belluzi, S. Boschi, C. Brignola, A. Munarini, G. Cariani, F. Miglio, Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease, American Journal of Clinical Nutrition 71 (2000) S339–S342.

- [33] J.M. Kremer, n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis, *American Journal of Clinical Nutrition* 71 (2000) S349-S351.
- [34] J.V. Donadio, J.P. Grande, The role of fish oil/omega-3 fatty acids in the treatment of IgA nephropathy, *Seminars in Nephrology* 24(3) (2004) 225-243.
- [35] A. Nordoy, L. Barstad, W.E. Connor, L. Hatcher, Absorption of the n-3 eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as ethyl esters and triglycerides by humans, *American Journal of Clinical Nutrition* 53 (1991) 1185-1190.

## Capitolo 2

# Estrazione, raffinazione ed arricchimento dell'olio di pesce

### 2.1 L'olio di pesce

#### 2.1.1 Composizione dell'olio di pesce

Gli *oli di pesce* sono la parte preponderante della frazione lipidica estraibile dal pesce. In realtà, con la dizione *oli di pesce* spesso si includono anche gli oli derivati da mammiferi marini (come ad esempio gli oli estratti dalle balene) o da alcune piante acquatiche. Ciò è dovuto al fatto che tutti questi oli presentano caratteristiche chimico-fisiche molto simili e, conseguentemente, trovano utilizzazioni negli stessi settori d'impiego. Tuttavia, visto che la stragrande maggioranza di questi oli derivano dai pesci, spesso si tende ad usare in modo intercambiabile la dizione *oli di pesce* oppure quella *oli marini*. Dal punto di vista chimico, gli oli di pesce sono delle miscele di trigliceridi con catene di acidi grassi molto lunghe e ad alto grado di insaturazione. L'elevato grado di insaturazione è la causa dei punti di fusione bassi di questi grassi, che quindi si presentano allo stato liquido in condizioni ambiente e, di conseguenza, sono classificati come *oli*. Per quanto riguarda la lunghezza delle catene acide, negli oli di pesce si ritrovano acidi grassi da 12 a 24 atomi di carbonio, con una prevalenza degli acidi da 14 a 22 atomi di carbonio. Gli acidi grassi insaturi sono più frequenti rispetto ai saturi, con un numero di insaturazioni generalmente elevato, soprattutto negli acidi a catena più lunga, arrivando fino a 6 insaturazioni. Inoltre, rispetto agli oli vegetali di origine terrestre, che sono ricchi in AGPI  $\omega 6$ , presentano una maggiore quota di AGPI  $\omega 3$ . In definitiva, rispetto ai grassi ottenibili dal mondo terrestre, dai cui animali si ottengono soprattutto grassi saturi, ed i cui vegetali sono ricchi in acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi  $\omega 6$ , gli oli di pesce presentano

Acido grasso	Olio di soia	Olio di arachide	Olio di semi di girasole	Olio di colza	Olio di oliva	Olio di palma	Olio di aringa	Olio di menhaden	Olio di sardina
<C12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	0.5	-	-	0.3	0.2	-	0.1
C14:0	0.1	0.1	0.2	0.1	-	1.1	7.2	8.0	6.5
C15:0	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.8
C16:0	11.0	11.6	6.8	2.8	13.7	45.1	11.7	15.1	16.6
C16:1 $\omega$ 7	0.1	0.2	0.1	0.2	1.2	0.1	9.6	10.5	7.5
C17:0	-	0.1	-	-	-	-	-	1.8	0.8
C18:0	4.0	3.1	4.7	1.3	2.5	4.7	0.8	3.8	3.9
C18:1( $\omega$ 9 + $\omega$ 7)	23.4	46.5	18.6	23.8	71.1	20.7	12.0	14.5	14.8
C18:2 $\omega$ 6	53.2	31.4	68.2	14.6	10.0	9.4	1.2	2.2	2.0
C18:3 $\omega$ 3	7.8	-	0.5	7.3	0.6	0.3	0.8	1.5	1.3
C18:4 $\omega$ 3	-	-	-	-	-	-	2.3	2.7	3.0
C20:0	0.3	1.5	0.4	0.7	0.9	0.2	-	0.2	0.4
C20:1 $\omega$ 9	-	1.4	-	12.1	-	-	13.6	1.3	6.0
C20:2 $\omega$ 6	-	0.1	-	0.6	-	-	-	-	-
C20:4 $\omega$ 6	-	-	-	-	-	-	0.3	1.2	1.8
EPA	-	-	-	-	-	-	6.3	13.2	10.1
C22:0	0.1	3.0	-	0.4	-	-	-	0.1	0.2
C22:1 $\omega$ 9	-	-	-	34.8	-	-	20.6	0.4	5.6
C22:5 $\omega$ 3	-	-	-	-	-	-	6.3	4.9	2.0
DHA	-	-	-	-	-	-	4.2	8.6	10.7
C24:0	-	1.0	-	1.0	-	-	-	0.2	0.1

Tabella 2.1: Composizione di alcuni fra i più diffusi oli naturali in termini degli acidi grassi costituenti (frazione in massa)

delle caratteristiche assolutamente peculiari per l'alto tenore in polinsaturi, soprattutto della specie  $\omega$ 3 [1]. La tabella 2.1 mostra la composizione, in termini di acidi grassi, di alcuni oli di pesce a confronto con la composizione di alcuni fra i più diffusi oli vegetali [2]. Per quanto riguarda gli oli di pesce, la tabella 2.1 riporta la frazione in massa limitatamente agli acidi grassi più rilevanti. In particolare, le composizioni riportate per gli oli di pesce hanno valore orientativo in quanto vi è una spiccata dipendenza della composizione dell'olio dal tipo di alimentazione seguita dal pesce e, di conseguenza, dalla stagione e dal luogo di pesca.

La complessità degli oli di pesce non risiede esclusivamente nell'elevato numero di acidi grassi che compongono i trigliceridi, ma anche nel contenuto, seppur in piccola quantità, di un elevato numero di altre specie chimiche: monogliceridi, digliceridi, acidi grassi liberi, fosfolipidi, steroidi, cere, alcuni idrocarburi, vitamine, pigmenti e contaminanti ambientali di varia specie [1]. Inoltre, l'esposizione degli oli di pesce all'ossigeno provoca la formazione di perossidi che decomponendosi generano aldeidi, chetoni ed acidi volatili a catena corta che, nel complesso, causano cambiamenti cromatici ed impartiscono all'olio un odore fortemente sgradevole. Questo insieme di trasformazioni, che viene chiamato *irrancimento*, è favorito dall'esposizione alla luce, dalla presenza di umidità nell'olio, di alcuni metalli che svolgono un'azione catalitica nei confronti dell'ossidazione (rame e ferro), procede più velocemente a temperature più elevate ed è strettamente connesso alla presenza dei doppi legami. E' stato infatti dimostrato che la velocità dell'ossidazione è tanto più elevata quanto più è alto il grado di insaturazione, ed i perossidi

che si formano da acidi polinsaturi a lunga catena, come ad esempio EPA e DHA, sono estremamente instabili e tendono a decomporsi rapidamente ed a formare quei composti responsabili del cambiamento delle qualità organolettiche. L'alto grado di insaturazione rende quindi gli oli di pesce, fra tutti gli oli, i più instabili ed i più sensibili in assoluto al processo di irrancidimento. Un altro fattore, diverso dal processo di irrancidimento, che gioca un ruolo nel pessimo odore degli oli di pesce, e che è responsabile della loro ridotta qualità, consiste nella formazione di ammoniaca, trimetilammina e composti solforati a causa di reazioni di degradazione che avvengono nel pescato se non è conservato a bassa temperatura ed utilizzato entro breve tempo dalla pesca [1], [3], [4].

### 2.1.2 Produzione ed utilizzi: cenni storici

La produzione di oli di pesce è un'attività molto antica che ha origine all'inizio del diciannovesimo secolo nel Nord America e nel Nord Europa. Negli Stati Uniti d'America, i primi impianti industriali su larga scala per l'estrazione dell'olio dal pesce, secondo un processo sostanzialmente analogo al processo ancora oggi più diffuso (*Wet Reduction Process*), risalgono alla metà del diciannovesimo secolo. Nel 1912 si contavano ben 48 impianti industriali sulla costa Atlantica, dal Rhode Island alla Florida, per la produzione di olio di pesce. Nei primi decenni dello sviluppo di questa industria, sia in Europa che in America l'olio veniva considerato il prodotto pregiato, mentre la parte solida che residuava dall'estrazione era senza alcun valore e, al fine di ovviare ai problemi legati al suo smaltimento, veniva data agli agricoltori per concimare i campi. Nei decenni successivi, la scarsità di cibo per gli animali da allevamento, in costante aumento, portò allo sviluppo di processi volti all'utilizzo dei residui per farne mangime. Il residuo veniva essiccato e polverizzato così da ottenere un prodotto ricco in proteine, stabile e comodo da maneggiare, adatto ad essere usato per l'alimentazione degli animali da allevamento [4], [5].

La principale materia prima utilizzata per produrre olio negli impianti della costa Orientale degli Stati Uniti d'America è sempre stato il *menhaden*. E' una specie da sempre considerata particolarmente adatta alla produzione di olio in quanto si tratta di un pesce di piccole dimensioni, con un elevato tenore di grasso (e quindi in grado di fornire buone rese in olio), non adatto all'alimentazione umana in quanto poco gustoso e spinoso, ed inoltre è largamente disponibile nell'Atlantico. La produzione nord europea, invece, era maggiormente rivolta all'utilizzo delle sovrapproduzioni di pesci, generalmente aringhe, o alle produzioni di oli particolari come l'olio di fegato di merluzzo. Fino al 1915 circa, l'olio di pesce non aveva applicazioni alimen-

tari e veniva utilizzato essenzialmente nella produzione di saponi, glicerina, vernici, rivestimenti protettivi, linoleum e nella concia delle pelli. Per quanto riguarda gli utilizzi di tipo alimentare, questi si svilupparono negli Stati Uniti d'America a partire dal 1915 circa, con lo sviluppo dei primi impianti di produzione di olio di pesce situati sulla costa Occidentale, i quali utilizzavano come materia prima gli scarti delle sardine, che su quella costa venivano pescate in modo intensivo ed utilizzate per essere inscatolate. L'olio di sardina veniva idrogenato ed utilizzato nella produzione di margarine, conferendo loro delle migliori proprietà plastiche, e negli impasti per la produzione di dolci e biscotti in quanto consentiva di usare, a parità di consistenza del prodotto finale, un rapporto zucchero/farina più elevato dando luogo a prodotti che venivano considerati più gustosi. Negli Stati Uniti d'America, il *U.S. Food, Drug, and Cosmetic act* del 1938 stabilì che l'olio di pesce non potesse essere usato per usi alimentari. Inoltre, dopo il 1945 ci fu un rapido declino delle quantità pescate della sardina del Pacifico che ha portato, nel giro di pochi anni, alla scomparsa dell'olio di sardina. In definitiva, dal 1950 fino al 1988, anno della riabilitazione da parte della *Food and Drug Administration* di alcuni tipi di oli di pesce a scopi alimentari, tale uso degli oli di pesce scomparve dagli Stati Uniti d'America. Gli utilizzi di tipo alimentare, soprattutto per quanto riguarda la produzione di margarine, sono invece proseguiti in Europa fino ai giorni nostri. A partire dagli anni immediatamente successivi alla scomparsa dell'olio di sardina del Pacifico, la quasi totalità della produzione di olio di pesce degli Stati Uniti d'America è stata basata sul menhaden, le cui quantità pescate sono aumentate dalle 454000 tonnellate del 1950 fino a 1188000 tonnellate del 1985. Negli ultimi decenni, infine, alcuni stati dell'America Latina, in particolare Cile e Perù, sono divenuti dei grandi produttori di olio di pesce sfruttando in particolar modo le grandi quantità di acciughe pescate (ad esempio, in Perù nel 1985 sono state pescate 1000000 di tonnellate di acciughe) [4], [5].

Un cenno storico meritano anche le applicazioni farmaceutiche più antiche riguardanti gli oli di pesce. Alla luce delle conoscenze odierne, di cui si è discusso nel Capitolo 1, è di particolare interesse scoprire che in Europa, sin dal diciottesimo secolo l'olio di pesce era utilizzato per lenire i sintomi di alcune malattie infiammatorie croniche. In particolare, vi sono notizie storiche secondo le quali nel 1783, nell'ospedale di Manchester, l'olio di fegato di merluzzo veniva comunemente utilizzato come terapia nell'artrite reumatoide. Infine, fino a pochi decenni orsono, in molte parti del mondo era invalso l'uso dell'olio di fegato di merluzzo come integratore alimentare. Il principale obiettivo di tale integrazione non riguardava affatto gli AGPI, gli effetti benefici dei quali non erano noti, ma consisteva soprattutto nell'apporto delle vitamine liposolubili A e D, naturalmente contenute nell'olio di pesce e

particolarmente abbondanti in quello di fegato di merluzzo. Inoltre, la diffusione dell'olio di fegato di merluzzo sin da tempi antichi, trova ragione anche nell'elevato contenuto di antiossidanti naturali, che consentiva a questo olio, anche senza le tecniche di conservazione moderne, di non irrancidire nell'arco di poco tempo [1].

### 2.1.3 Produzione ed utilizzi: prospettiva odierna

Se in passato il processo di estrazione dell'olio di pesce era volto esclusivamente all'ottenimento di questo prodotto, da alcuni decenni a questa parte il processo ha un duplice obiettivo: la produzione di farina e la produzione di olio. La *farina di pesce* è il residuo solido del processo di estrazione dell'olio, che viene essiccato, stabilizzato e triturato, in modo da ottenere un prodotto ricco in proteine, stabile e facile da trasportare e maneggiare. La farina di pesce è largamente impiegata come integratore di proteine nell'alimentazione di numerose specie di animali di allevamento: pollame, maiali, ruminanti, animali da pelliccia e pesce di acquacoltura. Le farine di pesce, a volte indicate con la sigla FPC (*Fish Protein Concentrates*), si distinguono dal punto di vista qualitativo, e quindi del prezzo di mercato, in base al contenuto di grassi ( $< 0.5\%$ ), in quanto il valore della farina è determinato dal contenuto specifico di proteine e dalla stabilità: una completa eliminazione dell'olio migliora entrambi questi parametri. Per questo motivo, ha avuto un certo sviluppo anche la produzione di farine bianche (circa il 10% del totale della farina prodotta), ovvero da pesci a carne bianca che sono a basso contenuto di grassi, come ad esempio il merluzzo; tale produzione è specificatamente rivolta alla produzione di farina di alta qualità e non è adatta alla produzione di olio. Le farine più economiche, prodotte da pesci grassi mediante processi di separazione meno spinti, hanno un contenuto di olio che può arrivare fino al 10%. Tuttavia, se fino ad alcuni decenni orsono l'alto contenuto proteico e la stabilità della farina erano gli unici parametri che venivano considerati rilevanti, negli ultimi decenni la comprensione dell'importanza dell'incorporazione degli AGPI  $\omega 3$  nella dieta umana, sta facendo cambiare, almeno in parte, il punto di vista su queste problematiche. Infatti, le carni di animali da allevamento, del pollame, come anche le uova ed il pesce di acquacoltura, hanno dei contenuti in AGPI  $\omega 3$  nettamente inferiori a quelli dei rispettivi alimenti prodotti in modo tradizionale (cfr. paragrafo 1.3.1) mentre, nel contempo, è in aumento la richiesta di cibi che siano più simili a quelli tradizionali e che abbiano un contenuto in AGPI  $\omega 3$  più elevato, sia per ragioni di gusto sia perchè è stato dimostrato che questi nutrienti hanno benefici effetti sulla salute. A questo proposito, ha avuto un qualche sviluppo la produzione

di farine ad alto contenuto di olio, stabilizzate per mezzo dell'aggiunta di antiossidanti, ed utilizzate soprattutto nelle acquaculture o nella nutrizione del pollame, al fine di ottenere pesci ed uova con composizione lipidica più simile a quella che questi alimenti avevano con le produzioni di tipo tradizionale. Tuttavia, la risposta a questo tipo di problematiche che ha preso maggiormente piede consiste nel separare in modo spinto farina ed olio, così da ottenere un residuo proteico stabile e di maggior valore ed un olio che, dopo adeguata raffinazione è utilizzabile come integratore lipidico nella nutrizione dei pesci di acquacoltura e nel pollame. A questo proposito, sono stati effettuati degli studi, e vi sono delle applicazioni in tal senso, riguardanti la supplementazione di olio di pesce nell'alimentazione del pollame: è stato verificato che aggiunte corrispondenti al 3% del totale della dieta aumentano il contenuto di EPA e diminuiscono gli AGPI  $\omega 6$ , mentre aggiunte fino al 6% non introducono nel sapore delle uova alcuna nota riconducibile al pesce [1], [4].

Per quanto riguarda le acquaculture, l'utilizzo dell'olio di pesce nella supplementazione alimentare ha avuto uno sviluppo talmente rilevante che si stima che circa il 50% dell'olio di pesce prodotto al mondo sia oggi rivolto a questa applicazione. In particolare, ben il 25% della produzione mondiale è assorbito dagli allevamenti di salmoni e trote. La supplementazione di olio di pesce nell'alimentazione delle acquaculture non deve essere vista, dal punto di vista degli AGPI  $\omega 3$ , come un ciclo produttivo inutile volto alla separazione di queste sostanze dal pescato per poi reintrodurlo nell'alimentazione del pesce allevato. Infatti, ciò che rende profittabile l'intero ciclo consiste nella separazione degli AGPI  $\omega 3$  da pesce di scarsa qualità alimentare, in impianti che hanno come obiettivo anche la produzione di farine di elevata qualità, e nella reintroduzione di queste sostanze nei pesci tramite le acquaculture, rivolte ad alcune specie molto appetibili e di maggiore pregio. Di particolare importanza, ai fini dello sfruttamento delle risorse, è anche il recupero di olio di pesce dal trattamento degli scarti di impianti di produzione di pesce in scatola. Tenendo presente che la crescita della richiesta mondiale di proteine, unitamente con la stazionarietà della quantità mondiale del pescato, sta comportando l'aumento della produzione da acquacoltura di circa il 10% annuo, è facile prevedere che nei prossimi anni vi sarà una richiesta sempre maggiore di olio di pesce fino a saturare l'intera possibilità produttiva. E' quindi da più parti auspicato che vadano a ridursi gli usi industriali classici dell'olio di pesce ancora oggi presenti (come quelli inerenti il settore delle margarine, i rivestimenti, le vernici, i grassi lubrificanti e la concia delle pelli) e che l'olio di pesce venga utilizzato per nutrire i pesci da allevamento e per produzioni a più alto valore aggiunto, come ad esempio gli integratori alimentari ed i farmaci a base di EPA e DHA [1], [6], [7].

Tipo di olio	1983	1986–1991	1998	1999
Soia	-	15.57	-	-
Palma	-	9.57	-	-
Colza	-	7.76	-	-
Girasole	-	7.45	-	-
Arachide	-	3.73	-	-
Semi di cotone	-	3.67	-	-
Noce di cocco	-	3.01	-	-
Oliva	-	1.83	-	-
Mais	-	1.29	-	-
Pesce	1.11	1.50	0.8	1.2

Tabella 2.2: Produzione mondiale dei più importanti oli vegetali e dell'olio di pesce (in milioni di tonnellate)

Per quanto concerne la produzione dell'olio di pesce negli ultimi decenni, la tabella 2.2 riporta alcuni dati reperibili in letteratura riguardanti la produzione di olio di pesce nel quinquennio 1986–1991 a confronto con quella dei più importanti oli vegetali. Per quanto riguarda l'olio di pesce, sono riportati anche dei dati di produzione riferiti ad altre annate [1], [8]. Come si può vedere, la produzione di olio di pesce è molto rilevante e, nonostante sia soggetta a una certa variabilità dipendentemente delle annate, di solito è, fra tutti gli oli, intorno al decimo–dodicesimo posto per quantità prodotte al mondo. La variabilità nella produzione influenza anche l'andamento dei prezzi. A metà 1998, anno di scarsa produzione, l'olio di pesce era sul mercato a circa 740 dollari USA per tonnellata, mentre nel 1999, anno in cui la produzione era risalita sensibilmente, il prezzo di mercato era intorno a 290 dollari USA per tonnellata. Attualmente, le principali nazioni produttrici di olio di pesce sono gli Stati Uniti d'America, il Giappone, i Paesi Scandinavi (la Norvegia in particolare), il Cile, il Perù e la Russia. Vi sono, tuttavia, molte altre nazioni, distribuite in tutti i continenti, caratterizzate da discrete produzioni di olio di pesce. Per quanto riguarda le specie di pesce destinate alla produzione di farina ed olio, non vi sono grandi cambiamenti rispetto al passato. Il menhaden, che costituisce il 50% del pescato degli Stati Uniti d'America, viene integralmente destinato a questo scopo. Altre specie di pesci grassi non pregiati, invece, vengono destinate prevalentemente a queste produzioni e solo in minima parte vengono consumate tal quali: i principali esempi sono costituiti dalle aringhe, le acciughe, le sardine e gli sgombri [4], [8]. Queste ultime tre specie, inoltre, costituiscono una buona materia prima di partenza specificatamente per la produzione di oli ricchi in EPA e DHA.

Un'altra materia prima utilizzabile è costituita dagli scarti degli impianti di produzione di filetti o di pesce in scatola. Tali scarti, che rappresentano un problema per quanto riguarda lo smaltimento, possono costituire una materia prima molto interessante per quanto riguarda la produzione di olio, in quanto alcune parti di essi sono estremamente ricche in AGPI  $\omega 3$ . Alcuni studi indirizzati in tal senso hanno dimostrato, mediante sperimentazione su scala pilota, la fattibilità di processi produttivi di olio di pesce di buona qualità a partire dagli scarti degli impianti di produzione delle aringhe salate. In particolare, si è visto che la produzione di olio ottenibile dallo scarto è paragonabile, sia in qualità che in quantità, a quella ottenibile dalla polpa dei pesci. Inoltre, è stato anche verificato che gli scarti indifferenziati sono adatti a questa operazione, senza che quindi vi sia la necessità di introdurre degli stadi di lavorazione aggiuntivi volti alla selezione delle diverse tipologie di scarto [9], [10].

## 2.2 Processi di estrazione dell'olio dal pesce

Nello studio del processo di produzione della farina e dell'olio di pesce, la materia prima da processare è considerata composta di tre frazioni principali: parte solida, olio ed acqua. La parte solida contiene essenzialmente le proteine e le ossa del pesce, mentre l'olio contiene i lipidi. L'obiettivo del processo consiste nel separare, nel modo più completo possibile, le tre frazioni le une dalle altre. In questo modo è possibile ottenere una farina stabile e ricca in proteine, un'elevata resa in olio (definita come rapporto fra la quantità di olio estratto e la quantità di lipidi complessivamente contenuti nel pesce) ed una fase acquosa che sia il meno possibile inquinata dalle altre frazioni.

In tutto il mondo questa operazione viene tuttora realizzata mediante il *Wet Reduction Process*, che è un processo messo a punto nel diciannovesimo secolo che essenzialmente consiste nella cottura del pesce e nella successiva pressatura per favorire la fuoriuscita dell'olio. Tuttavia, la necessità di ottenere un olio di qualità migliore ed una frazione proteica non denaturata, soprattutto per le applicazioni in campo alimentare e farmaceutico, ha portato a studiare e sviluppare altri processi per realizzare questa operazione, essenzialmente volti all'adozione di temperature moderate, al fine di limitare al massimo le reazioni di degradazione degli AGPI e delle proteine. Sebbene tali processi non siano tuttora applicati, sono oggetto di studio e di realizzazione su scala di laboratorio. In particolare, il processo di estrazione che utilizza l'anidride carbonica supercritica come solvente è particolarmente promettente per le basse temperature di esercizio, per l'assenza di solvente residuo nel prodotto finito e per la possibilità di ottenere un olio che ne-

cessita di minore raffinazione successiva. Al di là dei metodi alternativi al *Wet Reduction Process*, l'attenzione del mondo produttivo e della ricerca, sia per quanto riguarda le applicazioni nutrizionali e farmaceutiche, che richiedono ulteriori processi di frazionamento dell'olio a valle dell'estrazione, sia per quelle applicazioni rivolte all'olio di pesce tal quale, è rivolta al miglioramento dei processi di raffinazione dell'olio a valle dell'estrazione e prima dell'eventuale frazionamento. L'obiettivo che si cerca di ottenere consiste in un olio più stabile, deodorato, decolorato, privo di prodotti di degradazione di vario genere e di inquinanti ambientali. Inoltre, con l'obiettivo di ottenere un olio di qualità migliore o che richieda una raffinazione meno dispendiosa, non vanno sottovalutati i metodi di conservazione della materia prima appena pescata, che richiedono una certa cura al fine di limitarne il deterioramento che, nel caso del pesce, procede con estrema rapidità.

### 2.2.1 Conservazione del pesce

I principali processi di deterioramento che riguardano il pesce appena pescato consistono nel *deterioramento autolitico* e nella *degradazione batterica*. Il deterioramento autolitico è un fenomeno causato dagli enzimi digestivi del pesce stesso, che ne causano la degradazione e la rottura di alcune parti interne. Questo processo porta alla formazione all'interno del pesce di una fase acquosa mista a lipidi e proteine, che, in definitiva, rappresenta una perdita sia in termini di proteine che di olio per il successivo processo di estrazione. Inoltre, i grassi contenuti nel pesce subiscono una degradazione causata dalle *lipasi*, che produce acidi grassi liberi. La quantità di acidi grassi liberi contenuti nell'olio a valle dell'estrazione è uno dei parametri che viene valutato per stabilire la qualità dell'olio: si ritiene che più è alto il quantitativo di acidi grassi liberi, più l'olio sia andato incontro a fenomeni di degradazione. La degradazione batterica avviene ad opera di batteri anaerobici e porta alla formazione di composti azotati, come ad esempio l'ammoniaca o la trimetilammina, e dello zolfo, come l'acido sulfidrico ed alcuni mercaptani. I prodotti della degradazione batterica, che a valle dell'estrazione si ritrovano all'interno dell'olio, ne abbassano sensibilmente il valore e ne peggiorano l'odore. Inoltre, la formazione di composti solforati è deleteria per l'utilizzo dell'olio nell'industria delle margarine, in quanto tali composti sono dei veleni per il catalizzatore del processo di idrogenazione.

A causa di questi processi di degradazione, per avere un olio di buona qualità è necessario che il pesce da processare sia il più possibile fresco, che durante il trasporto sia stato conservato in stive refrigerate oppure, in assenza di queste, sia messo a contatto con del ghiaccio. E' inoltre necessario evitare

la formazione di acque stagnanti nella massa del pescato, dando la possibilità all'acqua di drenare [4].

### 2.2.2 Wet Reduction Process

Gli stadi principali del *Wet Reduction Process* sono:

- riscaldamento del pesce, in modo da provocare la rottura delle strutture cellulari che contengono l'olio, la fuoriuscita dell'acqua legata fisicamente e la coagulazione delle proteine.
- pressatura, per favorire mediante un'azione meccanica la rimozione delle fasi liquide liberatesi nello stadio precedente.
- separazione delle fasi liquide, in modo da ottenere l'olio grezzo ed una fase acquosa impura (*stickwater*).
- trattamento delle *stickwater* precedente al loro smaltimento.
- essiccamento e triturazione della frazione solida per ottenere la farina di pesce.

La figura 2.1 mostra uno schema a blocchi relativo al *Wet Reduction Process*. L'operazione di riscaldamento del pesce, tradizionalmente chiamata *cottura*, viene fatta avvenire mediante riscaldamento con vapore d'acqua a pressione atmosferica. In passato si riteneva che, per ottenere la fuoriuscita dell'olio dalle cellule nel modo più completo possibile, bisognasse portare la materia prima a temperature le più possibili prossime ai  $100^{\circ}C$ . In realtà, si è in seguito compreso che la rottura delle strutture cellulari, necessaria per causare la fuoriuscita dell'olio, avviene intorno ai  $50^{\circ}C$  e che la coagulazione delle proteine si completa intorno ai  $75^{\circ}C$ . Non vi è alcun vantaggio, quindi, a portare la massa solida a temperature più elevate, soprattutto dal momento che l'olio, se in contatto con l'ossigeno, si degrada tanto più rapidamente tanto più è alta la temperatura. Di maggiore importanza, invece, è la possibilità di raggiungere una temperatura uniforme in tutta la massa solida. Infatti, il non raggiungimento della temperatura desiderata in alcune zone della massa solida porta ad una minore resa del processo in olio e ad una farina con un contenuto di olio che, spesso, è indesiderato. Per il raggiungimento di questo obiettivo, i pesci di dimensioni non piccole vengono preventivamente tagliati, in modo da avere una pezzatura uniforme e non eccessiva all'interno dell'apparecchiatura di riscaldamento. Per migliorare l'efficacia delle singole operazioni, sebbene il *Wet Reduction Process* sia molto vecchio e le sue linee di principio non siano cambiate per più di un secolo, vi sono stati continui

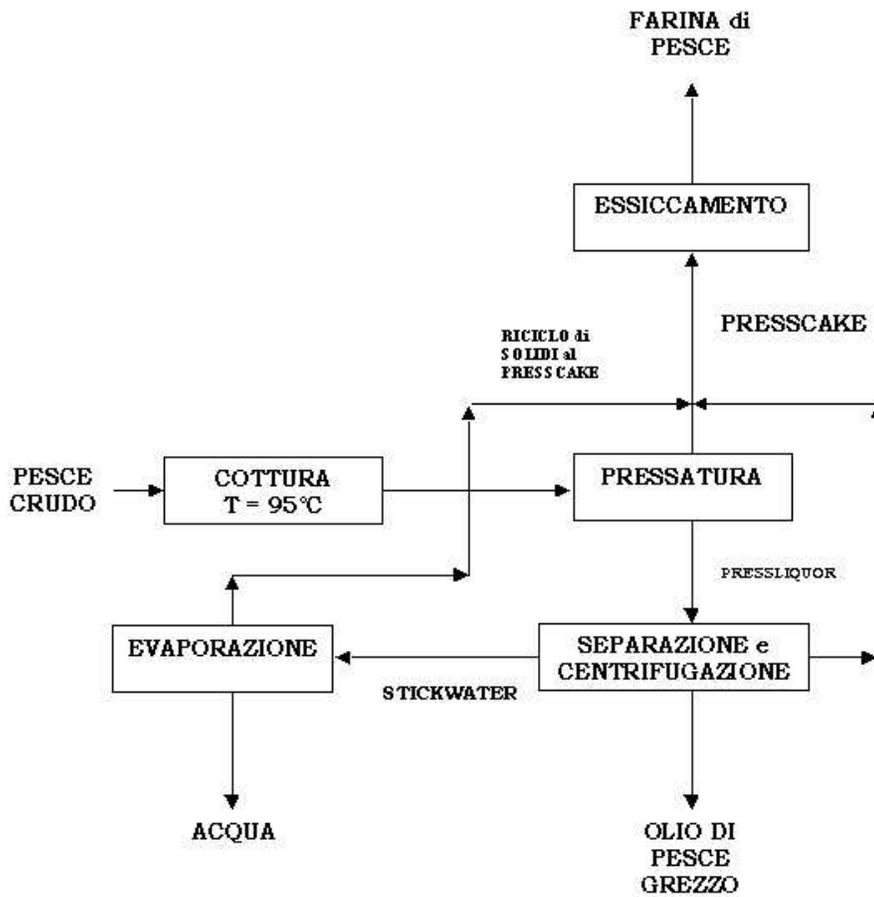


Figura 2.1: Schema a blocchi del Wet Reduction Process

miglioramenti nelle apparecchiature. Le apparecchiature per la cottura del pesce sono di due tipi: a *calore indiretto* ed a *vapore diretto*. Nelle caldaie a riscaldamento indiretto il vapore riscaldante fluisce all'interno di una camicia esterna, mentre all'interno della caldaia il pesce è movimentato da una coclea dalla sezione di ingresso a quella di uscita. Sono previste numerose aperture per effettuare delle periodiche operazioni di pulizia e manutenzione, dal momento che le proteine coagulate hanno la tendenza a dare luogo ad incrostazioni sulle pareti. In alcuni casi, possono essere previsti degli ugelli per iniettare del vapore diretto, al fine di ottenere una cottura più omogenea. Dal punto di vista dei parametri operativi, usualmente la cottura avviene intorno ai  $95^{\circ}\text{C}$  con dei tempi di permanenza di 15–20 minuti. Le caldaie a vapore diretto, invece, apportano l'intera quota di energia termica mediante

iniezioni di vapore. Tuttavia, questo metodo, sebbene possa portare ad una cottura più omogenea, apporta degli svantaggi in quanto il vapore iniettato condensa all'interno della massa solida e va ad incrementare la quota di acqua che in seguito dovrà essere separata. Nel complesso, le caldaie a vapore indiretto, eventualmente con l'utilizzo di alcuni ugelli per l'immissione di vapore diretto, garantiscono i migliori risultati. La capacità media di questi dispositivi, in termini di pesce trattato, varia da 700 a 70000 kg/h.

A valle della fase di cottura, il pesce viene inviato alla pressatura. L'obiettivo di questa operazione consiste nell'eliminare, mediante un'energica azione di spremitura, la maggior parte del liquido possibile. In questo modo si ottiene una migliore resa in olio, un minor residuo di liquido all'interno della fase solida, con conseguente minore spesa energetica per gli essiccatori e con produzione di una buona materia prima per fornire una farina di migliore qualità. Le presse utilizzate consistono, in linea di principio, in una coclea che convoglia il pesce, dalla sezione di ingresso a quella di uscita, costringendolo in canali di passaggio sempre più piccoli e causando quindi l'applicazione su di esso di pressioni sempre più elevate. Ad intervalli regolari, sono previste delle aperture sul fondo per far fuoriuscire il liquido liberato dall'azione di spremitura. La tipologia di pressa più efficace, consiste in due viti ruotanti in senso opposto. I prodotti di questa operazione consistono in una fase solida, che a questo stadio della lavorazione è denominata *presscake*, ed un sistema composto da due fasi liquide (fase acquosa e olio) contenenti anche molti solidi sospesi, globalmente denominato *pressliquor*.

Le successive fasi di lavorazione riguardano il *presscake* ed il *pressliquor* separatamente. La prima fase di lavorazione del *pressliquor* riguarda l'eliminazione dei solidi sospesi fuoriusciti insieme alla fase liquida nella pressatura (pezzi di polpa del pesce, spine). L'eliminazione dei solidi sospesi può essere condotta in due fasi: in una prima fase, vengono eliminati i solidi di dimensioni più rilevanti, mediante l'utilizzo di un vibrovaglio con fori dell'ordine di 5 cm. Il materiale trattenuto in questa fase viene ricircolato al *presscake*. La seconda fase del trattamento del *pressliquor* consiste nella separazione delle fasi liquide dai solidi sospesi di dimensioni più contenute. Questa operazione viene realizzata in centrifughe decantatrici. E' importante sottolineare che, per massimizzare la resa del processo di separazione mediante centrifugazione, il *pressliquor* deve essere nuovamente riscaldato fino a temperature di  $90 - 95^{\circ}C$  prima di essere alimentato alla centrifuga. La successiva fase della lavorazione prevede la separazione delle fasi liquide fra loro, in una centrifuga a coni dalla quale si ottengono tre frazioni: fango, una fase acquosa privata dell'olio (le *stickwater*) e l'olio. Il fango è ricircolato al *presscake*, le *stickwater* (che consistono in una fase acquosa con un contenuto dal 6 al 9 % di proteine solubili, proteine sospese, vitamine, minerali, olio residuo, ammine

ed ammoniac) va incontro ad ulteriori trattamenti, mentre l'olio, a questo stadio di lavorazione, è detto *olio di pesce grezzo*. Prima di essere stoccato ed inviato agli impianti dedicati alla raffinazione vera e propria, l'olio grezzo può subire un trattamento con acqua calda oppure uno stripping con vapore che elimina parte dei contaminanti che causerebbero l'accelerazione delle reazioni di degradazione. Le *stickwater*, che costituiscono una corrente di materia di ingente quantità (all'incirca il 65% in massa del pesce di partenza), sono sottoposte ad evaporazione in una serie di evaporatori a multiplo effetto, al fine di concentrare e recuperare le sostanze disciolte o sospese in esse. Tale processo, seppur dispendioso, viene effettuato per un duplice motivo: il recupero di ulteriori proteine ed altre specie chimiche di un qualche valore che vengono riciclate al *presscake* e le problematiche ambientali che porrebbero tali acque con un elevato carico organico se fossero smaltite tal quali. Il *presscake*, comprendente anche le frazioni riciclate dal trattamento del *pressliquor*, va incontro ad una serie di trattamenti volti all'ottenimento di una farina di pesce stabile: consistono nell'essiccamento, la triturazione e, se necessario, nell'aggiunta di antiossidanti per stabilizzare il prodotto finito [4].

### 2.2.3 Estrazione con solvente convenzionale

Per alcune applicazioni nel settore della mangimistica (in special modo nell'alimentazione dei maiali da allevamento), sarebbe auspicabile avere un contenuto di grassi molto basso nella farina di pesce, inferiore a quello che si ottiene dal *Wet Reduction Process*. Per questo motivo, sono stati proposti alcuni processi che prevedono l'utilizzo di solventi organici per migliorare l'estrazione della frazione lipidica. Alcuni di questi processi sono stati proposti per il trattamento della farina e quindi sono comunque rivolti alle operazioni a valle di quelle descritte in precedenza. Non si configurano, quindi, come processi alternativi al *Wet Reduction Process*, ma piuttosto come un trattamento aggiuntivo sulla farina. L'estrazione dei lipidi dalla farina di pesce può essere effettuata mediante l'utilizzo di etanolo, isopropanolo, esano o alcuni idrocarburi clorurati. A valle dell'estrazione sono necessarie le consuete operazioni di rimozione del solvente (mediante uno stripping con vapore seguito da un essiccamento con aria calda) e di recupero dello stesso che deve essere separato dall'olio (mediante distillazione). L'olio che si recupera da questa operazione è di qualità bassissima, spesso si presenta di colore molto scuro, contiene prodotti di polimerizzazione, e non è adatto per utilizzi alimentari umani. Ad ogni modo, questa operazione volta all'estrazione totale dei grassi dalla farina, a causa del costo aggiuntivo che comporta e dei bassi prezzi di

mercato richiesti ai mangimi, non è economicamente conveniente ed ha avuto scarsissimo sviluppo.

Altri processi di estrazione con solvente sono stati proposti per essere attuati sul *presscake* oppure direttamente sul pesce. Solventi particolarmente adatti ad estrarre la frazione lipidica dal pesce sono risultati alcuni solventi clorurati (come ad esempio il tetracloruro di etilene), il cui uso è però discutibile soprattutto se il prodotto è rivolto ad usi alimentari o farmaceutici umani, l'etanolo e l'isopropanolo. Tuttavia, anche se l'utilizzo di solventi organici consente un'eliminazione pressochè completa della frazione lipidica dalla matrice di partenza, essendo questi processi condotti a temperature paragonabili a quelle della cottura tradizionale (ad esempio, l'estrazione con tetracloruro di etilene viene condotta a circa  $88^{\circ}C$ ), in definitiva non apportano un chiaro vantaggio rispetto al processo tradizionale e, per questo motivo, non sono molto diffusi [4].

#### 2.2.4 Estrazione con anidride carbonica supercritica

Una delle alternative più interessanti ai processi convenzionali di estrazione della frazione lipidica dal pesce, è costituita dall'estrazione mediante anidride carbonica supercritica (SC-CO<sub>2</sub>). In generale, l'utilizzo dell'anidride carbonica supercritica (il solvente) per estrarre alcune sostanze da matrici solide consiste nei seguenti passi:

- compressione del solvente fino a valori di pressione generalmente compresi fra 8 a 35 MPa (dipendentemente dalla particolare applicazione)
- riscaldamento del solvente fino alla temperatura desiderata (di solito nell'intervallo  $35 - 60^{\circ}C$ )
- realizzazione di un adeguato contatto fra la matrice solida ed il solvente, che fluisce attraverso la matrice
- espansione della fase costituita dal solvente con i soluti disciolti, fino a valori di bassa pressione in modo tale che il solvente si separi dalle sostanze estratte

Rispetto ai metodi di estrazione da solido convenzionali, le temperature di esercizio sono più basse rendendo questo processo interessante per le applicazioni che riguardano matrici naturali contenenti prodotti termolabili. Nelle condizioni di temperatura e di pressione specificate, l'anidride carbonica presenta dei valori di densità paragonabili a quelli di un liquido, che le conferiscono un potere solvente paragonabile a quello dei solventi organici, unitamente con bassi valori di viscosità ed elevati valori di diffusività,

che le conferiscono una buona permeabilità all'interno della matrice naturale. A valle dello stadio relativo al contatto fra le fasi, l'espansione consente un recupero pressochè totale dell'anidride carbonica dalle sostanze estratte, che quindi risulteranno prive di inquinamento da parte del solvente. Inoltre, il fatto che l'anidride carbonica non sia nè tossica nè infiammabile apporta degli ulteriori elementi a suo vantaggio.

La possibilità di estrarre la frazione lipidica dal pesce mediante SC-CO<sub>2</sub> è stata studiata, su scala di laboratorio, in alcuni lavori scientifici. In particolare, l'attenzione è stata rivolta alla verifica della possibilità di estrarre la totalità della frazione lipidica (o alcune frazioni di essa) dal pesce, all'analisi delle caratteristiche qualitative sia dell'olio che delle proteine ottenute ed alla determinazione delle condizioni operative ottimali.

Ikushima et al. [11] hanno studiato l'estrazione, con anidride carbonica ad alta pressione, della frazione lipidica da una matrice costituita da polvere di sgombro liofilizzata. L'estrazione è stata condotta in modalità semicontinua, caricando un estrattore da 100 cm<sup>3</sup> con 25 g di polvere liofilizzata ed inviando in continuo una portata costante di anidride carbonica (1 l/min, misurata a 20°C e 1 atm). La polvere liofilizzata presentava, prima dell'estrazione, un contenuto di acqua pari al 7.3 % in massa. Le prove sperimentali sono state condotte alla temperatura di 40°C, a diversi valori di pressione nell'intervallo 4.9 – 24.5 MPa. Durante ogni singola prova sono stati eseguiti alcuni prelievi dell'estratto, i quali sono stati sottoposti ad analisi. In particolare, la frazione lipidica estratta è stata messa a paragone con quella ottenuta, da una matrice di identiche caratteristiche, mediante un'estrazione convenzionale con esano liquido a caldo, in apparecchiatura *Soxhlet*. Quest'ultimo metodo è uno dei metodi generalmente utilizzati per determinare la frazione lipidica contenuta in un campione di materiale organico. Gli Autori riportano che a 19.6 MPa è stato ottenuto un recupero della frazione lipidica circa pari all'85 % di quello ottenibile con il metodo di riferimento (estrazione con esano). All'aumentare della pressione, la quantità di olio estratto per unità di solvente (*loading*) aumenta, raggiungendo, alla temperatura oggetto della sperimentazione, i 5 g/kg a 24.5 MPa. Il confronto qualitativo fra l'olio estratto con i due diversi metodi, mostra una composizione in acidi grassi praticamente analoga. Dal punto di vista esteriore, l'olio estratto con SC-CO<sub>2</sub> si presenta più limpido, di colore giallo tenue, a differenza di quello estratto con esano che appare di colore rosso bruno. Inoltre, mentre l'olio estratto con esano ha un contenuto di fosforo non trascurabile, quello estratto con SC-CO<sub>2</sub> non contiene composti del fosforo, i quali evidentemente non vengono estratti e rimangono nella matrice solida. Quest'ultimo aspetto è rilevante in quanto, come si vedrà in seguito (cfr. Paragrafo 2.3), uno dei primi stadi della raffinazione degli oli di pesce consiste nel processo di eliminazione dei composti

del fosforo e di alcuni altri metalli presenti in tracce (*degumming*). In definitiva, questo lavoro scientifico dimostra che la SC-CO<sub>2</sub> consente di estrarre la frazione lipidica dal pesce liofilizzato e polverizzato, dando luogo ad un prodotto dalle caratteristiche migliori di quelle ottenibili con l'estrazione con esano a caldo. L'olio ottenuto presenta caratteristiche paragonabili a quelle di un *degummed oil*, e quindi richiederà minori stadi di raffinazione a valle dell'estrazione.

Hardardottir e Kinsella [12] hanno studiato l'estrazione dei lipidi dalla polpa di campioni di *trota arcobaleno* mediante SC-CO<sub>2</sub> e mediante una miscela supercritica anidride carbonica-etanolo (al 10 % in etanolo). Il processo di estrazione è stato condotto a temperatura di 40 – 50 °C ed a valori di pressione fra 13.8 e 34.5 MPa. Utilizzando anidride carbonica pura gli Autori rilevano un 20 % di frazione lipidica inestratta, mentre con la miscela anidride carbonica-etanolo si arriva quasi al 100 % di lipidi estratti. In entrambi i casi, il colesterolo è estratto quasi integralmente. Inoltre, viene fornita una caratterizzazione della frazione proteica residua, che risulta, a valle dell'estrazione dell'olio con SC-CO<sub>2</sub>, dalla funzionalità quasi inalterata e quindi utilizzabile anche per applicazioni nell'industria alimentare, a differenza di quanto ottenibile mediante i processi di estrazione a caldo e/o con solvente organico che causano la denaturazione delle proteine. Il processo è dunque potenzialmente in grado di separare un olio di buona qualità lasciando la fase proteica scarsamente alterata e priva di colesterolo ed è quindi interessante per applicazioni alimentari umane.

Temelli et al. [13] hanno studiato l'estrazione dei lipidi dallo sgombro Atlantico partendo direttamente dalla materia prima. Si tratta di una specie sottoutilizzata, dal contenuto lipidico che può anche arrivare al 20 % del totale, sebbene questo parametro presenti una forte variabilità stagionale. Per questo motivo questa specie si presenta come una fonte interessante di AGPI  $\omega$ 3, che possono arrivare a costituire il 5 % di tutta la massa del pesce. Campioni costituiti di filetti di pesce sono stati liofilizzati alla pressione di 1 torr fino ad un contenuto di umidità pari all'1.6 % in massa e successivamente spellati e sminuzzati. L'estrazione è stata condotta in modalità semicontinua, caricando 12 – 14 g di pesce in un estrattore (volume: 50 cm<sup>3</sup>) all'interno del quale veniva fatta fluire una corrente di SC-CO<sub>2</sub> (portata: 1.6 l/min, in condizioni ambiente). La pressione della corrente uscente dall'estrattore veniva ridotta per recuperare l'olio estratto che, a prefissati intervalli di tempo veniva pesato ed analizzato. L'intervallo di valori di temperatura e di pressione adottati nella sperimentazione è stato: 35 – 55 °C, 20.7 – 34.5 MPa. I migliori risultati in termini di *loading* (7.5 g/kg) sono stati ottenuti nelle condizioni di temperatura più bassa e pressione più elevata. In tutte le condizioni sperimentate, non ci sono state, nel corso delle singole prove, variazioni

sostanziali della composizione in termini dell'estratto, espressa in termini di acidi grassi. In altri termini, in queste condizioni di pressione, corrispondenti a valori elevati della densità, il solvente supercritico tende ad estrarre la frazione lipidica in modo indifferenziato. Inoltre, anche secondo questi Autori, la frazione proteica che residua dal processo di estrazione dell'olio con SC-CO<sub>2</sub> ha subito poche alterazioni ed è quindi di elevata qualità.

In successivi lavori sullo stesso tema, Dunford et al. [14], [15] hanno studiato l'effetto del contenuto di acqua nei campioni di sgombro da sottoporre ad estrazione e proposto una modellizzazione di questo processo. La procedura seguita per preparare i campioni e la procedura sperimentale sono analoghe a quelle descritte in [13]. Le estrazioni sono state condotte a 35 °C e 34.5 MPa, a partire da campioni a diverso contenuto di umidità (nell'intervallo dal 3.7 % al 64.0 %) ottenuti dal processo di liofilizzazione condotto in maniera più o meno spinta. I risultati ottenuti mostrano chiaramente che, a parità di solvente utilizzato, l'olio estratto dai campioni a più alto tenore di umidità è molto inferiore a quello estratto dai campioni a più basso valore di umidità. Se la matrice ha un contenuto elevato di umidità, il solvente supercritico solubilizza molta acqua e ciò causa una ridotta solubilità dell'olio. Per quanto riguarda i campioni ad un livello di umidità inferiore al 25 % circa, non si hanno sensibili variazioni della massa di olio estratto. Inoltre, le prove effettuate sui campioni a basso tenore di umidità hanno portato alla solubilizzazione di una quantità di olio circa pari a quella attesa in ipotesi di raggiungimento delle condizioni di equilibrio, in quanto la quantità disciolta è dello stesso ordine di grandezza dei valori di solubilità dei trigliceridi nelle stesse condizioni di pressione e temperatura. Ciò indica che l'acqua non solo riduce la solubilità dell'olio ma, creando una resistenza aggiuntiva al trasferimento di materia, diminuisce il coefficiente globale di trasferimento di materia rendendo più difficile il raggiungimento delle condizioni di equilibrio. I risultati ottenuti indicano che è necessario effettuare un'operazione di essiccazione del pesce prima dell'estrazione con SC-CO<sub>2</sub>, ma, al contempo, indicano che è sufficiente che questa operazione sia finalizzata a raggiungere livelli di umidità intorno al 25 %. Diminuzioni ulteriori del livello di umidità non apportano ulteriori vantaggi comportando, di contro, maggiori spese energetiche e di tempo operativo. Infine, anche in queste prove sperimentali condotte a pressione molto elevata, si ottiene un olio di buona qualità, quasi privo di composti del fosforo, ed una matrice proteica residua che mostra solo lievi modificazioni.

Esquivel et al. [16] hanno effettuato uno studio riguardante l'estrazione della frazione lipidica delle sardine mediante SC-CO<sub>2</sub>. Anche in questo caso si tratta di una specie molto interessante dal punto di vista dell'ottenimento di olio, in quanto è economica, spesso utilizzata nel settore della mangimisti-

ca animale ed ha un contenuto di lipidi che in alcuni periodi dell'anno può arrivare al 22 % dell'intera massa. Prima dell'estrazione, le sardine sono state tagliate e la parte edibile è stata liofilizzata (non viene specificato il livello di umidità del campione dopo liofilizzazione). L'estrazione è stata condotta in modalità semicontinua in un estrattore tubolare (volume:  $100\text{ cm}^3$ ) precedentemente caricato con la matrice naturale liofilizzata e triturrata ed alimentato con SC-CO<sub>2</sub>. Le prove sperimentali sono state condotte a temperatura di  $40^{\circ}\text{C}$  e  $48^{\circ}\text{C}$ , ed a valori di pressione compresi fra 12.6 e 18 MPa. I valori di *loading* più elevati sono stati ottenuti nelle condizioni corrispondenti alla densità più alta del solvente, e sono risultati compresi fra 0.5 e  $3\text{ g/kg}$  (comunque inferiori ai  $7\text{ g/kg}$  riportati in [13] perchè in quel caso le condizioni operative erano corrispondenti a valori di densità del solvente ancora più elevati). Le analisi dei campioni ottenuti dalle singole prove sperimentali, mostrano le variazioni della composizione della frazione lipidica estratta. Le analisi degli estratti sono state effettuate individuando più classi di lipidi e, all'interno della classe dei trigliceridi, determinando la composizione in termini di acidi grassi. I risultati mostrano che la SC-CO<sub>2</sub> estrae tutti i lipidi eccetto i fosfolipidi. I primi estratti sono più ricchi in colesterolo ed acidi grassi liberi rispetto agli ultimi. All'interno della classe dei trigliceridi, i primi estratti mostrano un tenore in composti più leggeri leggermente superiore. Ad esempio, per un grado di avanzamento del processo pari al 30 % (ovvero quando il 30 % di tutta la frazione lipidica presente nella materia prima è stata estratta), l'estratto complessivo presenta una percentuale di EPA + DHA pari al 25 %; il taglio che si ottiene a gradi di avanzamento fra 75 % e 92 % presenta una percentuale di EPA + DHA pari al 35 %. Si può affermare che la selettività della SC-CO<sub>2</sub> fra diversi lipidi presenti nella matrice naturale è scarsa, eccetto che per i fosfolipidi che non vengono solubilizzati se non in minima quantità.

In definitiva, la SC-CO<sub>2</sub> è un solvente in grado di estrarre l'olio tal quale dalla matrice naturale, con valori di *loading* tanto maggiori tanto più è alta la densità del solvente, eccezion fatta per i fosfolipidi che residuano nella fase proteica. L'olio che si ottiene si presenta di un lieve colorito giallo, è privato della maggior parte dei composti contenenti il fosforo, risultando di buona qualità e richiedendo minori processi di raffinazione rispetto all'olio estratto convenzionalmente. Da questo processo si ottiene anche una fase proteica solo minimamente alterata nella sua funzionalità, che quindi si presta per applicazioni nel settore alimentare umano, a differenza dei concentrati proteici ottenuti dai processi convenzionali che generalmente sono destinati all'alimentazione animale. La fattibilità del processo di estrazione dei lipidi dal pesce mediante SC-CO<sub>2</sub> richiede ulteriori approfondimenti, soprattutto riguardanti i costi che presumibilmente sono elevati. Bisogna tuttavia ri-

cordare che oltre alla migliore qualità del prodotto, che potrebbe rendere il processo giustificabile per applicazioni inerenti il settore nutrizionale e farmaceutico, il processo non presenta l'inconveniente di produrre grandi quantità di *stickwater* che devono comunque andare incontro a costosi trattamenti prima dello smaltimento. Inoltre, coerentemente con le previsioni di riduzione drastica della disponibilità dell'olio di pesce nei prossimi anni, è presumibile che il prezzo di questa materia prima si accrescerà e che i suoi utilizzi saranno sempre più rivolti ad applicazioni ad alto valore aggiunto, giustificando quindi l'adozione di processi oggi considerati costosi.

## 2.3 Raffinazione dell'olio di pesce

Prima di essere utilizzato, *l'olio di pesce grezzo* deve essere sottoposto ad una serie di operazioni di raffinazione, di natura sia chimica che fisica, volte a garantire una maggiore stabilità, l'assenza di composti tossici o comunque deleteri dipendentemente dalla destinazione d'uso, ed un miglioramento delle proprietà organolettiche.

La prima operazione del processo di raffinazione attuato sull'olio di pesce grezzo è il *degumming*, che consiste nella rimozione dei composti contenenti il fosforo oltre che di alcuni metalli generalmente presenti in piccole quantità. La necessità o meno di effettuare tale operazione dipende dalla quantità di questi composti presenti nell'olio grezzo. Come anticipato, l'utilizzo di un olio ottenuto mediante estrazione con anidride carbonica supercritica potrebbe rendere questa operazione superflua. Sebbene siano stati proposti molti processi diversi per realizzare questa operazione, uno dei metodi più diffusi per effettuare il *degumming* consiste nella miscelazione dell'olio grezzo con acido fosforico concentrato (85 %), in quantità che può variare dallo 0.002 all'1 % dell'olio da trattare, a seconda della quantità di composti da rimuovere. L'olio viene miscelato energicamente con l'acido, per un tempo di circa un minuto. La temperatura del sistema reagente è di solito selezionata nell'intervallo 70–90°C. Una variante di questo processo, più diffusa negli Stati Uniti d'America, prevede l'utilizzo di acido fosforico diluito (40 %), tempi di miscelazione di almeno 45 minuti e temperatura di 70°C. A valle di questa operazione, l'acido fosforico e gli acidi grassi liberi contenuti nell'olio vengono neutralizzati mediante la miscelazione con una soluzione di soda caustica. Dopo il trattamento acido/base, il sistema viene inviato in un separatore nel quale l'olio si separa dalla fase acquosa contenente saponi e composti del fosforo [1].

A questo punto l'olio può seguire diverse strade, a seconda della tipologia di applicazione. In linea di massima, per applicazioni che non richiedono

successive operazioni di frazionamento, l'olio è semplicemente sottoposto alle seguenti operazioni:

- *winterization*. Si tratta semplicemente di una sedimentazione a freddo, attuata per far solidificare e separare quei composti che col tempo darebbero comunque tendenza a smescolarsi ed a precipitare.
- *bleaching*. Consiste in un trattamento di decolorazione mediante adsorbimento con materiali economici (argille o carboni attivi) che, oltre a decolorare ulteriormente l'olio, adsorbono anche alcuni prodotti di ossidazione e migliorano le caratteristiche olfattive dell'olio.
- Ulteriore deodorazione e purificazione. Se l'olio è destinato ad usi alimentari, è probabile che ulteriori stadi di deodorazione e purificazione siano necessari.

Al riguardo di quest'ultimo punto, un possibile metodo da impiegare consiste nella distillazione sotto vuoto o in corrente di vapore ma, con questi metodi, vi è il serio rischio di degradare gli acidi grassi a più alto tenore di insaturazione.

Anche per quanto riguarda la deodorazione e la purificazione, è stato proposto l'utilizzo dell'anidride carbonica supercritica. Infatti, dipendentemente dai valori delle variabili operative pressione e temperatura, la SC-CO<sub>2</sub> dovrebbe essere in grado di solubilizzare selettivamente la maggior parte dei componenti a basso peso molecolare, che comprendono molti dei prodotti di auto-ossidazione responsabili del cattivo odore, senza solubilizzare i trigliceridi. A seconda dei valori di pressione impiegati, anche alcuni pigmenti potrebbero essere solubilizzati decolorando ulteriormente l'olio. Il metodo proposto è stato sperimentato caricando un estrattore di una specificata quantità di un olio di aringa da purificare ed alimentando in continuo il solvente supercritico. Il sistema è stato portato alla temperatura di 70°C ed a valori di pressione dell'ordine di 30 MPa. E' stato verificato che i primi estratti contenevano essenzialmente i composti a basso peso molecolare che venivano quindi estratti selettivamente. L'olio risultante si presentava decolorato e con caratteristiche olfattive nettamente migliorate [17]. Tuttavia, tale metodo non ha trovato applicazione soprattutto a causa dei costi elevati. Per le applicazioni che richiedono il successivo frazionamento dell'olio (integratori alimentari, farmaci), il percorso seguito dall'olio di pesce parzialmente raffinato è diverso (vedi figura 2.2). Dal momento che le operazioni di frazionamento sono condotte sugli esteri etilici degli acidi grassi e non sui trigliceridi, dopo il trattamento acido/base la miscela di trigliceridi viene *transesterificata* con etanolo in eccesso. Dopo la separazione della

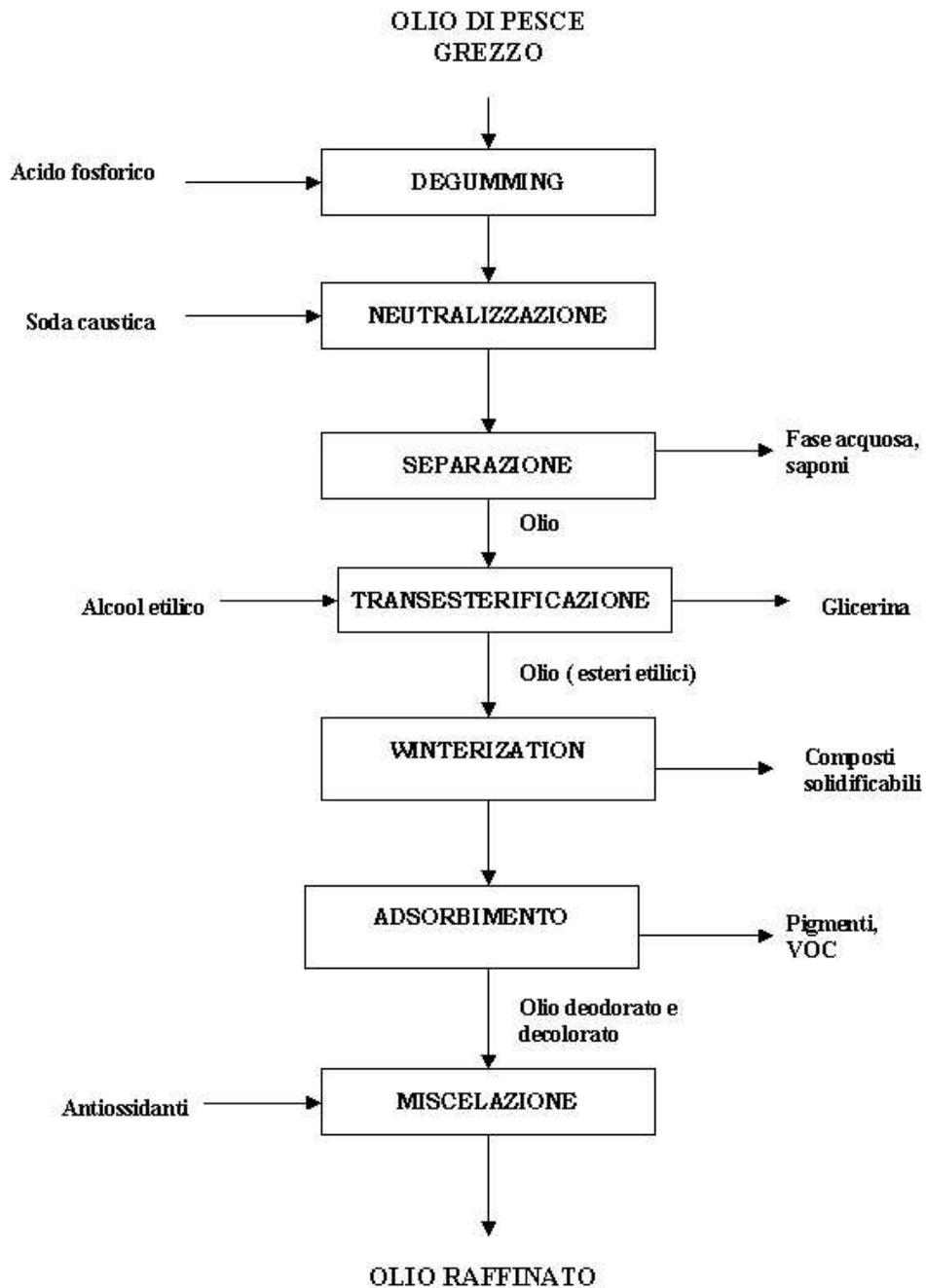


Figura 2.2: Schema a blocchi del processo di raffinazione per un olio di pesce destinato al frazionamento

glicerina prodottasi e dell'etanolo in eccesso, la miscela di esteri etilici viene sottoposta a frazionamento (cfr. Paragrafo 2.4). L'olio arricchito negli AGPI più pesanti (fase ricca in AGPI  $\omega 3$ , in special modo EPA e DHA) è sottoposto alle operazioni finali della raffinazione: *winterization* e *bleaching*. Se il prodotto è destinato ad usi alimentari o farmaceutici, l'operazione finale prima dello stoccaggio consiste nell'aggiunta di sostanze antiossidanti. Infine, lo stoccaggio viene realizzato in recipienti di acciaio sotto atmosfera inerte (azoto o argon) a temperature non superiori ai  $25^{\circ}C$ . Procedendo con tale cura, si possono produrre degli oli ricchi in AGPI  $\omega 3$  adatti al consumo alimentare oppure all'utilizzo nella formulazione di farmaci, con dei tempi di vita (*shelf-life*) dell'ordine di un anno.

## 2.4 Frazionamento dell'olio di pesce

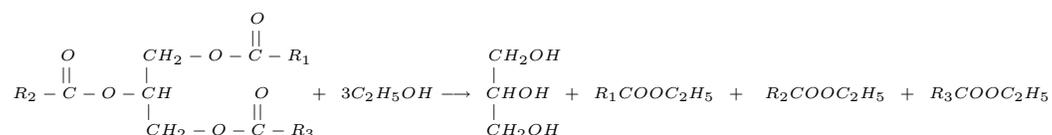
### 2.4.1 Considerazioni generali

Da quanto detto nei precedenti paragrafi, si evince che l'olio di pesce è una miscela naturale di estrema complessità e, come conseguenza, il suo frazionamento risulta difficoltoso. Pur tralasciando i numerosi composti minori (ovvero non appartenenti alla famiglia dei trigliceridi), l'olio di pesce contiene più di 60 acidi grassi diversi molti dei quali, a causa del loro elevato grado di insaturazione, presentano instabilità alla alte temperature e/o al contatto con l'ossigeno. Inoltre, dal momento che i processi di frazionamento sono attuati quando si desidera produrre degli oli di elevata qualità, adatti ad essere utilizzati in campo nutrizionale o farmaceutico, la necessità di evitare tali processi di degradazione è particolarmente stringente. Infatti, le reazioni di degradazione riducono proprio il contenuto degli AGPI  $\omega 3$  più pregiati generando dei composti spesso dannosi per la salute umana. Tutti questi fattori introducono molteplici note di complessità al processo di frazionamento di questa matrice naturale.

Il primo elemento da approfondire consiste nella natura chimica dei componenti dell'olio naturale e nel loro numero. Ipotizzando di avere 60 acidi grassi diversi, distribuiti in modo casuale fra i vari trigliceridi, si ottengono molte migliaia di trigliceridi diversi. In realtà, è stato osservato che la distribuzione degli acidi grassi non è casuale e che c'è una tendenza ad avere gli AGPI, come l'EPA ed il DHA, nella posizione centrale del trigliceride. Questo fatto, se da un lato riduce la complessità della miscela, complica le cose per quanto riguarda l'ottenimento di una frazione ricca in AGPI. Infatti, se gli AGPI si trovano prevalentemente in posizione centrale, è estremamente poco probabile avere trigliceridi con coppie di AGPI o, addirittura, una

terna. In definitiva, questa spiccata distribuzione degli AGPI su un elevato numero di trigliceridi diversi, rende praticamente improponibile ogni processo di arricchimento (quale esso sia) effettuato sulla miscela naturale tal quale, ovvero in forma di trigliceridi [2].

I processi di frazionamento devono quindi essere attuati su specie chimiche derivate dai trigliceridi di partenza, che presentino le singole catene acide libere (acidi carbossilici) o legate a gruppi identici (ad esempio, esteri metilici o esteri etilici). Quale che sia il metodo di separazione impiegato, i migliori risultati si ottengono frazionando gli esteri derivati dall'olio di pesce. La matrice naturale deve quindi subire un processo di *transesterificazione*, realizzato facendo reagire la miscela di trigliceridi con alcool in eccesso in ambiente acido o basico. Particolarmente adatto, per il tipo di applicazione in esame, risulta essere l'utilizzo dell'etanolo in quanto non tossico come il metanolo ed in quanto consente di ottenere, a valle del frazionamento, delle miscele di esteri etilici che sono direttamente utilizzabili a scopi nutrizionali e farmaceutici (cfr. Capitolo 1). La reazione di *transesterificazione* può essere schematizzata come segue:



Dai prodotti di reazione vengono separate due fasi, una polare contenente la glicerina, l'alcool etilico in eccesso e la soluzione acquosa contenente il catalizzatore (l'acido o la base) ed una praticamente apolare costituita dalla miscela di esteri etilici.

Dal punto di vista del numero delle specie chimiche costituenti la miscela, pur avendo ridotto sensibilmente il problema mediante la *transesterificazione*, che consente di "liberare" le singole catene acide, la miscela di esteri etilici da sottoporre a frazionamento è comunque composta da un numero molto elevato di componenti: una ventina di componenti principali ed altri (circa) quaranta presenti in piccola quantità. Inoltre, considerato che la richiesta di mercato è principalmente rivolta agli oli *pharmaceutical grade* piuttosto che ai componenti EPA e DHA puri, l'obiettivo del processo di separazione è generalmente quello di frazionare la miscela in due tagli, uno dei quali abbia una percentuale elevata in EPA e DHA.

Il problema dell'instabilità degli AGPI ed il campo di applicazione degli oli *pharmaceutical grade* limita sensibilmente il numero di processi di separazione applicabili alle miscele di esteri etilici derivate dall'olio di pesce. Fra i

processi di separazione attuabili su larga scala, la cristallizzazione frazionata, la distillazione sotto vuoto e, più recentemente, il frazionamento con anidride carbonica supercritica sono quelli che hanno ricevuto più attenzione.

La cristallizzazione frazionata ha dato discreti risultati soprattutto per la sua capacità di separare gli esteri degli acidi grassi in base al diverso grado di insaturazione (parametro da cui dipende fortemente il punto di fusione). Tuttavia, questa operazione, per ottenere buoni risultati, richiede di essere accoppiata con l'utilizzo di solventi (come ad esempio acetone, metanolo) [19]. Questo fatto rende questo processo difficilmente attuabile per le successive operazioni di recupero del solvente che si rendono necessarie per non lasciare tracce di inquinamento nel prodotto finito.

La distillazione sotto vuoto è un processo che viene comunemente applicato alle miscele di esteri etilici, soprattutto per separare esteri di peso molecolare non molto elevato ed a basso grado di insaturazione. Questo processo consente di separare i diversi esteri sulla base della lunghezza della catena dell'acido grasso, in quanto una differenza relativa a questo parametro comporta una differenza nei punti di ebollizione che viene sfruttata nella distillazione. Tale differenza è molto piccola, invece, nei riguardi di esteri di uguale lunghezza di catena ma con diverso grado di insaturazione, rendendo quindi complessa la separazione dei singoli componenti. Comunque, una separazione basata sulla diversità della lunghezza della catena è generalmente più che sufficiente per la produzione di oli *pharmaceutical grade*. Infatti, ipotizzando di separare integralmente la classe degli esteri di acidi grassi a 20 e 22 atomi di carbonio, si otterrebbe una miscela il cui contenuto in EPA e DHA potrebbe arrivare anche a circa il 75 % a seconda del tipo di olio di pesce. In altri termini, è possibile ottenere oli ad alta concentrazione di EPA e DHA anche realizzando un processo di separazione basato esclusivamente sulla diversa lunghezza della catena acida, purchè l'olio di partenza sia caratterizzato da una quota  $(EPA+DHA)/(C20+C22)$  elevata. Con riferimento alla tabella 2.1, si può vedere che l'olio di aringa non è adatto a tale scopo, mentre buoni risultati si possono ottenere con l'olio di sardina e, ancor meglio, con l'olio di menhaden. I fattori che limitano grandemente la possibilità di utilizzare la distillazione sotto vuoto sono, ancora una volta, legati alla degradazione degli AGPI ad alta temperatura. Infatti, anche a pressioni estremamente basse, le temperature richieste per effettuare questa operazione sono superiori ai  $200^{\circ}C$  causando, dipendentemente dai tempi di permanenza all'interno dell'apparecchiatura, delle degradazioni più o meno spinte. Al riguardo, di particolare interesse è l'esperienza riportata in [19], riguardante il confronto fra la distillazione degli esteri metilici di un olio di pesce completamente idrogenato ed uno tal quale, che presentava un tenore elevato in composti polinsaturi. La distillazione del primo olio è stata possi-

bile ed ha consentito di separare le differenti classi di esteri etilici sulla base della lunghezza della catena; la temperatura raggiunta nel ribollitore verso la fine del processo è stata di  $255^{\circ}\text{C}$  alla pressione di  $1\text{ mmHg}$ , mentre la temperatura in testa alla colonna ha raggiunto il valore di  $203^{\circ}\text{C}$ . La distillazione dell'olio non idrogenato è stata ben più complessa e si è risolta in un fallimento per quanto riguarda i componenti più pesanti. Con un quantitativo di residuo ancora pari al 30 % dell'alimentazione, il ribollitore era alla temperatura di  $225^{\circ}\text{C}$  e pressione di  $0.5\text{ mmHg}$ , mentre la testa della colonna era a  $135^{\circ}\text{C}$ . Sino a quel punto erano state separate le classi fino agli esteri del C18, quindi il residuo doveva essere composto essenzialmente da una miscela di C20 e C22. Le analisi effettuate sul residuo hanno evidenziato un 37 % di esteri di acidi insaturi a configurazione *trans*, chiaramente frutto di isomerizzazione indotta dalle alte temperature. Tale isomerizzazione non ha riguardato gli esteri di acidi C16 o più corti, ha riguardato il 5 % degli esteri del C18 ed è quindi evidente che una quota notevolissima degli esteri del C20 e del C22 ha subito degradazione. In effetti, tale frazione, con questo tipo di procedimento, è quella sottoposta alle temperature più alte, che permane più a lungo a tali temperature e che ha il maggior grado di insaturazione. Un'altra conferma di queste osservazioni si trova in [2], dove è riportata un'esperienza, eseguita da Ackman et al., consistente nella distillazione sotto vuoto di una miscela di esteri metilici di un olio di aringa: il 60 % degli AGPI a lunga catena non sono stati recuperati, mentre per quanto riguarda il DHA la percentuale recuperata è stata solo del 17 %. Queste osservazioni dimostrano chiaramente l'inapplicabilità della distillazione sotto vuoto per il frazionamento di queste miscele. L'unica possibilità in tal senso consiste nell'utilizzo della cosiddetta *distillazione molecolare* che negli ultimi anni sta cominciando a divenire un'alternativa tecnica commercialmente competitiva. In sintesi, questa operazione è una distillazione sotto vuoto realizzata in apparecchiature studiate per il raggiungimento di gradi di vuoto molto spinti e per avere dei tempi di permanenza molto bassi, così da limitare le reazioni di degradazione sulle molecole più instabili.

In definitiva, l'unico processo in grado di frazionare gli esteri etilici a bassa temperatura ( $< 100^{\circ}\text{C}$ ), senza causare alcuna reazione di degradazione e senza comportare alcun inquinamento da parte del solvente nel prodotto finito, è il frazionamento con anidride carbonica supercritica.

### 2.4.2 Frazionamento di miscele derivate da oli di pesce con anidride carbonica supercritica

I punti principali del processo di frazionamento di miscele liquide mediante anidride carbonica supercritica sono esattamente analoghi a quelli brevemente descritti all'inizio del Paragrafo 2.2.4, relativo all'estrazione da matrice solida con SC-CO<sub>2</sub>. L'unica differenza risiede nel fatto che in questo caso la fase supercritica è posta in contatto con una fase liquida e quindi all'interno dell'apparecchiatura di separazione (sia essa un estrattore per operazioni a singolo stadio di equilibrio o una colonna per operazioni multistadio) si hanno due fasi fluide.

Lo studio dei processi di frazionamento di miscele derivate da oli di pesce mediante SC-CO<sub>2</sub> è relativamente recente. Uno dei primi studi al riguardo è riportato in un brevetto di meno di 20 anni orsono [20]. Gli Autori effettuano un frazionamento di una miscela di esteri metilici derivati dall'olio di menhaden con l'obiettivo di separare le frazioni a diversa lunghezza di catena. Gli esperimenti consistevano nella seguente procedura: un estrattore veniva caricato con circa 7 g della miscela da frazionare, portato alla temperatura di 74 – 75 °C e pressurizzato fino a 170 atm. In queste condizioni operative, un flusso continuo di anidride carbonica supercritica veniva alimentato all'estrattore. Venivano raccolti alcuni estratti, di solito 6, dalle analisi dei quali gli Autori hanno verificato che la SC-CO<sub>2</sub> solubilizza preferenzialmente i composti più leggeri e, conseguentemente, gli ultimi estratti risultavano arricchiti negli esteri dei C20 e dei C22. Essendo partiti da un olio con un rapporto EPA/C20 e DHA/C22 molto elevato, questi risultati corrispondono ad un discreto arricchimento in EPA e DHA. In un esperimento gli Autori affermano di aver ottenuto, nell'ultimo campione (di 2.3 g), una frazione in massa di EPA pari al 19.7 % e di DHA del 48.3 %. Il recupero, inteso come grammi di EPA+DHA ritrovati nella frazione concentrata non è molto alto, ma il quantitativo di EPA e DHA complessivamente recuperato durante la prova è prossimo al 100 % e quindi, secondo gli Autori, non ci sono state perdite di EPA e DHA per eventuali reazioni di degradazione.

Altre prove sperimentali, riportate in letteratura [19], sono state dedicate allo studio delle condizioni di equilibrio di fase, a vari valori di pressione e temperatura, relativamente ad un sistema composto da anidride carbonica ed una miscela di esteri etilici derivati da olio di menhaden. E' stato verificato che esiste un ampio campo di valori di pressione e temperatura all'interno del quale il sistema studiato esiste smescolato su due fasi: una fase più densa, ricca in esteri e contenente dell'anidride carbonica disciolta, ed una più leggera, costituita essenzialmente da anidride carbonica ma contenente non trascurabili quantità di esteri. Definendo un coefficiente di partizione per il

P [bar]	T [ $^{\circ}$ C]	C14:0	C16:0	C18:1 $\omega$ 9	C20:1 $\omega$ 9	C20:4 $\omega$ 6	EPA	DHA
138	70	0.0170	0.0096	0.0060	0.0030	0.0037	0.0036	0.0019
151	70	0.0630	0.0320	0.0180	0.0081	0.0100	0.0099	0.0048
151	90	0.0210	0.0110	0.0055	0.0022	0.0029	0.0028	0.0011

Tabella 2.3: Coefficienti di partizione per i principali componenti dell'olio in diverse condizioni operative per il sistema anidride carbonica–esteri etilici derivati da olio di menhaden

generico componente  $i$  come:

$$PC_i = \frac{Y_i}{X_i} \quad (2.1)$$

dove  $Y_i$  rappresenta la frazione ponderale del componente  $i$  nella fase ricca in solvente (misurata sperimentalmente) mentre  $X_i$  rappresenta la frazione ponderale su base priva di  $CO_2$  nella fase ricca di esteri (calcolata dai bilanci di materia riferiti ai componenti dell'olio), sono stati calcolati i valori riportati nella tabella 2.3. I dati riportati in tabella fanno riferimento ai coefficienti di partizione dei principali esteri presenti nella miscela, che sono stati indicati tramite la sigla dell'acido grasso corrispondente. Dall'analisi dei dati è possibile trarre alcune considerazioni qualitative sul comportamento relativo dei vari esteri. A fissate condizioni di temperatura e pressione, i componenti più leggeri presentano dei coefficienti di partizione più elevati, ovvero sono solubilizzati preferenzialmente dall'anidride carbonica. A parità di lunghezza di catena, gli esteri degli acidi polinsaturi presentano dei coefficienti di partizione leggermente più elevati, ma la differenza è talmente piccola da far ritenere che la separazione dei saturi e monoinsaturi dai polinsaturi non sia agevole. Risulta quindi confermato che la SC-CO<sub>2</sub> è un solvente adatto a frazionare gli esteri etilici sulla base della lunghezza della catena, ma difficilmente può consentire il frazionamento dei componenti di una stessa classe. I dati riportati in tabella forniscono anche indicazioni al riguardo della dipendenza della solubilità dei vari composti dalla temperatura e dalla pressione. Dai dati riferiti a 70  $^{\circ}$ C si vede come aumentando la pressione aumenti il coefficiente di partizione, e quindi la solubilità nella SC-CO<sub>2</sub>, di tutti i componenti. Ciò si può spiegare con l'aumento di densità dell'anidride carbonica che si manifesta in un accresciuto potere solvente. Un comportamento opposto è individuato in corrispondenza ad aumenti di temperatura. Dai dati riferiti a 151 *bar* si vede come un aumento di temperatura da 70  $^{\circ}$ C a 90  $^{\circ}$ C porti ad una diminuzione dei coefficienti di partizione di tutti i componenti. Anche in questo caso la spiegazione può essere trovata nella diminuzione di densità del solvente che si ha innalzando la temperatura isobaricamente: a questo

Composto	$\Delta PC$
C14:0	-66.7
C16:0	-65.6
C18:1 $\omega$ 9	-69.4
C20:1 $\omega$ 9	-72.8
C20:4 $\omega$ 6	-71.0
EPA	-71.7
DHA	-77.1

Tabella 2.4: Variazione percentuale dei coefficienti di partizione per i principali componenti dell'olio al variare della temperatura (da 70 °C a 90 °C) a pressione costante (151 bar)

fenomeno è a volte dato il nome di *condensazione retrograda*. Tuttavia, la densità del solvente, sebbene sia il parametro più importante, può non essere l'unico fattore rilevante: vi sono infatti, dipendentemente dal campo di pressioni, dei sistemi che danno luogo ad un comportamento che può essere *retrogrado* oppure *non retrogrado* [2]. I dati riportati in tabella forniscono ulteriori spunti di riflessione quando si vadano ad analizzare le variazioni dei coefficienti di partizione per i singoli componenti al variare della temperatura. Prendendo come base i valori a 151 bar e 70 °C, sono state calcolate le variazioni percentuali di tali coefficienti con la temperatura: la tabella 2.4 riporta tali valori. Come si può osservare, la diminuzione del coefficiente di partizione è più accentuata per i composti a catena più lunga. Quindi, nel progetto di un processo di separazione fra componenti leggeri (esteri del C14+C16+C18) e pesanti (esteri del C20+C22) aumenti di temperatura dovrebbero causare una maggiore selettività del processo. Resta comunque inteso che in un processo con SC-CO<sub>2</sub> la temperatura debba comunque essere moderata, altrimenti si verrebbe a perdere proprio uno dei principali vantaggi del processo stesso.

Il primo processo di frazionamento di esteri etilici, realizzato in un impianto semicontinuo su scala pilota (adatto a trattare un'alimentazione dell'ordine dei kg), che consentiva di adottare un riflusso dell'estratto è stato sviluppato da Eisenbach nel 1984; la sua esperienza è descritta in [2]. L'apparato sperimentale consisteva in un estrattore sormontato da una colonna a riempimento di 4 metri di altezza, nella parte alta della quale era inserito un cilindretto riscaldato (*hot finger*). L'estrattore veniva caricato con 2.35 kg di una miscela di esteri etilici derivati da olio di fegato di merluzzo. L'estrattore, la colonna ed il cilindro caldo erano mantenuti rispettivamente a 25, 50, 90 °C. La pressione del sistema era mantenuta a 150 bar. L'anidride

carbonica liquida, alimentata a circa  $0.4 \text{ l/min}$ , scioglieva parte della carica nell'estrattore mentre, all'interno della colonna, a causa dell'innalzamento di temperatura che causava la diminuzione di solubilità degli esteri, una quota di essi ricondensava e ricadeva lungo la colonna, generando "internamente" al sistema stesso una corrente di riflusso. Nella parte alta della colonna avveniva praticamente qualcosa di analogo con un ulteriore riscaldamento, causato dall'*hot finger*, che faceva condensare una ulteriore quota di esteri che non avevano condensato in precedenza. Come si può intuire, l'operazione proposta da Eisenbach presenta molte note in comune con la distillazione discontinua, dove al calore fornito al ribollitore si sostituisca concettualmente il solvente supercritico e dove la condensazione, che nel caso della distillazione è provocata da un'asportazione di calore, in questo caso è causata da un innalzamento di temperatura che conduce ad una diminuzione della densità del solvente. Operando in questa maniera Eisenbach ottenne un ottimo frazionamento della miscela di esteri sulla base della lunghezza della catena. In particolare, ottenne una frazione estremamente ricca in esteri del C20 (95 %), in quantità pari al 13 % della carica. Considerato che gli esteri del C20 nella carica erano intorno al 26.5 %, Eisenbach ha ottenuto un recupero della frazione C20 del 46.6 %, che non è molto elevato. Inoltre, il risultato in termini di EPA non fu molto buono, essenzialmente a causa della tipologia di olio impiegato: l'olio di fegato di merluzzo ha infatti (mediamente) un rapporto EPA/C20 intorno al 50 % e quindi la percentuale di EPA nel prodotto finito non dovrebbe essere stata superiore al 50 %.

Prendendo come spunto il lavoro originario di Eisenbach, è stato sviluppato un processo di frazionamento in un impianto di laboratorio costituito da un estrattore sormontato da una colonna a riempimento (di altezza  $1.83 \text{ m}$ ) dotata di un certo numero di zone separatamente incamiciate, con la possibilità quindi di essere mantenute a diverse temperature. In questo modo si poteva stabilire un profilo di temperatura lungo la colonna, a partire dalla temperatura più bassa del fondo, fino alle temperature più alte in testa. Il solvente entrava dal fondo colonna, scioglieva parte della carica e, risalendo lungo la colonna, incontrava zone a temperatura crescente che causavano la condensazione di parte dell'estratto che ricadeva lungo la colonna generando il riflusso. In questo modo, in una colonna con il fondo a  $22^\circ\text{C}$ , e tre zone rispettivamente a  $70^\circ\text{C}$ ,  $80^\circ\text{C}$  e  $100^\circ\text{C}$ , è stato possibile ottenere delle frazioni di C20 e di C22 entrambe al 95 %. Inoltre, in questo caso è stato possibile ottenere una concentrazione di EPA intorno al 70 % in quanto si è partiti da un olio di menhaden come alimentazione [2]. Di particolare interesse, inoltre, il risultato riportato da Nilsson et al. [21]: in una serie di prove di frazionamento di esteri etilici derivati da olio di menhaden, realizzate in una colonna con profilo di temperatura nell'intervallo da  $40^\circ\text{C}$  a  $100^\circ\text{C}$ , il recu-

però globale di EPA e DHA (ovvero calcolato sommando la quota estratta e quella residua) è sempre stato intorno al 100 %, a meno di inevitabili errori sperimentali. Questo risultato, ottenuto anche in relazione a prove sperimentali di durata pari a molte ore, indica che a temperature inferiori a 100 °C, in un ambiente costituito da anidride carbonica, non avvengono reazioni di degradazione degli AGPI.

Un metodo messo a punto per aumentare il rapporto EPA/C20 e DHA/C22 preliminarmente al frazionamento, così da poter arrivare a prodotti con una concentrazione di EPA e/o DHA ancora più elevata, consiste nel pretrattare la miscela di esteri etilici da frazionare con una soluzione urea/etanolo a caldo. Il pretrattamento consiste nella miscelazione degli esteri con la miscela urea/etanolo a caldo e nel successivo raffreddamento fino ad ottenere una parziale solidificazione della miscela. I cristalli di urea che si formano tendono ad inglobare preferenzialmente gli esteri saturi e monoinsaturi, mentre i polinsaturi tendono a rimanere in fase liquida. Il grado di solidificazione ottimale è selezionato in base a valutazioni di compromesso fra purificazione (dei polinsaturi dagli altri esteri) e resa (al crescere del grado di solidificazione aumentano le perdite di AGPI). Operando in questo modo, Nilsson et al. [2], [21], sono riusciti ad ottenere delle frazioni di EPA o DHA a livelli di purezza superiori al 90 %.

Tuttavia, bisogna rilevare che l'utilizzo dell'urea è discutibile in quanto comporta l'introduzione di impurezze indesiderate nel prodotto finito e quindi va a ledere proprio uno dei motivi che rendono preferibile l'utilizzo del frazionamento con solvente supercritico.

Inoltre, bisogna anche sottolineare che per arrivare a livelli di purificazione così elevati, sia con il pretrattamento con urea che senza, è stato necessario operare con dei rapporti di riflusso elevatissimi (ovvero è stato necessario scaldare la maggior parte della colonna a temperature prossime ai 100 °C per generare un maggior riflusso interno), che hanno dato luogo a dei rapporti solvente/alimentazione superiori a 400 [2], [21]. Realizzando un profilo di temperatura variabile con un passo più piccolo (ovvero con una colonna suddivisa in un numero maggiore di zone a diversa temperatura) a partire dai 22 °C del fondo agli 80 °C della testa, è stata ottenuta, a fronte di una purezza solo modicamente diminuita, una riduzione notevole del rapporto solvente/alimentazione fino a circa 220 [2]. Ad ogni modo, è probabile che rapporti solvente/alimentazione così elevati possano rendere il processo non fattibile per ragioni economiche.

Per ottenere dei rapporti solvente/alimentazione più contenuti è necessario aumentare la pressione oppure diminuire la temperatura di esercizio, ovvero è necessario operare in condizioni di densità del solvente più elevata. In condizioni di densità più elevata, infatti, la solubilità è (generalmente) più

alta e la stessa quantità di olio solubilizzato si ottiene con un minor impiego di solvente. Le prove effettuate in tal senso, con lo stesso tipo di dispositivo sperimentale, hanno tuttavia dimostrato che l'arricchimento ottenibile nelle frazioni ricche in EPA e/o DHA diminuisce, a causa della minore selettività del solvente [2]. In altri termini, i risultati precedentemente esposti vanno visti, con riferimento alla tipologia del processo presentata, come dei limiti massimi di purezza ottenibile, a scapito di consumi di solvente eccessivamente elevati. Per ridurre l'impiego di solvente è necessario accettare dei livelli di purezza più contenuti.

Più recentemente Riha e Brunner hanno studiato un processo di separazione, di tipo multistadio continuo controcorrente, per frazionare miscele di esteri etilici derivate da olio di pesce [1]. Le miscele sottoposte a frazionamento derivano dalla transesterificazione di un olio di sardina e presentano una frazione in massa di componenti convenzionalmente definiti pesanti (esteri del C20+C22) pari al 35 %, ed una di leggeri (esteri del C14+C16+C18) pari al 65 %. La sperimentazione è stata condotta in un impianto su scala industriale costituito da una colonna (altezza: 12 m; diametro interno: 68 mm) dotata di un riempimento strutturato ad alta efficienza. La miscela di esteri etilici veniva alimentata dal centro della colonna, il solvente (la SC-CO<sub>2</sub>) veniva inviato dal fondo ed una quota dell'olio estratto veniva riflussato dalla testa. Il moto relativo delle due fasi all'interno della colonna era garantito dalla differenza di densità fra la fase ascendente (ricca in anidride carbonica, meno densa) e quella discendente (ricca in esteri, più densa). L'obiettivo del processo consisteva nel separare i componenti leggeri dai pesanti. Nessun tentativo di separare né le singole classi né tantomeno i composti saturi e monoinsaturi dai polinsaturi, internamente alle varie classi, è stato effettuato. D'altronde, questa scelta appare sensata alla luce delle più recenti richieste da parte del mercato, volte nella maggior parte dei casi alla produzione di miscele ricche in EPA e DHA (*oli pharmaceutical grade*) piuttosto che alla produzione dei singoli componenti ad alta purezza. L'interesse per i singoli componenti ad elevata purezza è limitato a particolari applicazioni, soprattutto di ricerca scientifica, relative al campo medico. Una serie di prove sperimentali sono state condotte a diversi valori di pressione a temperatura di 60 °C. Risultati inconsistenti sono stati ottenuti a valori di pressione di 15 MPa (corrispondenti ad una densità del solvente pari a 603 kg/m<sup>3</sup>) presumibilmente per la vicinanza del sistema alle condizioni di *flooding*. Le condizioni ottimali di funzionamento sono state individuate in corrispondenza di valori di pressione nell'intervallo (14 – 14.5 MPa), che garantiscono una solubilità elevata pur non essendo troppo prossimi alle condizioni di *flooding*. Per valori di pressione di 14 – 14.5 MPa la densità del solvente risulta compresa nell'intervallo 560 – 590 kg/m<sup>3</sup>. In particolare, alla pressione di 14.5 MPa, con un rapporto

di riflusso (definito come rapporto fra la portata di olio riflussata e quella estratta) pari a 8.15 è stato ottenuto un raffinato al 99 % in componenti pesanti con un recupero del 80 %. Una seconda serie di prove sperimentali è stata effettuata a valori di pressione e temperatura corrispondenti ad una densità del solvente pari a  $583 \text{ kg/m}^3$  (ovvero “muovendosi” lungo curve isodensità). Le coppie di valori pressione/temperatura, corrispondenti a tale densità, sperimentate sono state:  $40^\circ\text{C}$ , 9.6 MPa,  $60^\circ\text{C}$ , 14.5 MPa,  $70^\circ\text{C}$ , 17.0 MPa,  $80^\circ\text{C}$ , 19.5 MPa. Eccetto la prova effettuata a  $40^\circ\text{C}$ , tutte le altre condizioni operative hanno consentito il raggiungimento di una frazione in massa di componenti pesanti del 97 – 99 %, con un recupero di tali componenti nel raffinato del 75 – 80 %. I rapporti solvente/alimentazione sono risultati compresi nell'intervallo 63.3 – 127, con i valori più bassi ottenuti nelle prove a temperatura più elevata.

In definitiva, si può concludere che il frazionamento mediante anidride carbonica supercritica rappresenta una valida alternativa alla distillazione sotto vuoto consentendo di ottenere delle frazioni ricche negli esteri della classe C20+C22, senza ricorrere ad aggiunte di sostanze che possono procurare inquinamento al prodotto finito (ad esempio, urea) e senza causare alcuna degradazione termica. In questo modo, un'accurata scelta della tipologia dell'olio di partenza può consentire di produrre miscele ad alto tenore di EPA e DHA. Alla luce dei risultati ottenuti da Riha e Brunner, particolarmente promettente risulta essere l'utilizzo di un processo controcorrente multistadio dove il riflusso sia generato esternamente, mediante separazione dell'olio estratto, ricompressione ed invio in testa alla colonna. Infatti, questa metodologia consente una maggiore flessibilità nell'adozione del rapporto di riflusso desiderato. Ulteriori sviluppi sono necessari per quanto riguarda lo sviluppo di una modellizzazione del processo, che consenta di fornire delle stime di altezza equivalente allo stadio teorico (HETP) nonché stabilire i profili dei singoli componenti all'interno della colonna di separazione a partire da un modello che contenga un numero limitato di parametri empirici.

# Bibliografia

- [1] G.M. Pigott, Marine Oils, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (vol.1), Y.H. Hui (ed.), John Wiley and Sons, inc., New York, 1996.
- [2] E.S. Hands, Lipid Composition of Selected Foods, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (vol.1), Y.H. Hui (ed.), John Wiley and Sons, inc., New York, 1996.
- [3] C.T. Ho, Q. Chen, R. Zhou, Flavor Compounds in Fats and Oils, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (vol.1), Y.H. Hui (ed.), John Wiley and Sons, inc., New York, 1996.
- [4] FAO, Fisheries Industries Division, The production of fish meal and oil, 1986.
- [5] A.P. Bimbo, Production of Fish Oil, in *Fish Oils in Nutrition*, M.E. Stansby (ed.), Van Nostrand Reinhold, New York, 1990.
- [6] FAO, Inland Water Resources and Aquaculture Service, The State of World Fisheries Acquaculture, 2002.
- [7] J.R.S. Sargent, What will happen when the demand for fish oil will exceed supply within ten years?, *European Journal of Lipid Science and Technology* 103 (2001) 711.
- [8] FAO, Inland Water Resources and Aquaculture Service, The State of World Fisheries Acquaculture, 2000.
- [9] I. Aidos, A. van der Padt, R.M. Boom, J.B. Luten, Upgrading of Maa-tjes Herring Byproducts: Production of Crude Fish Oil, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3697–3704.
- [10] I. Aidos, S. Masbernat–Martinez, J.B. Luten, R.M. Boom, A. van der Padt, Composition and Stability of Herring Oil Recovered from Sorted Byproducts as Compared to Oil from Mixed Byproducts, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2818–2824.

- [11] Y. Ikushima, N. Saito, K. Hatakeda, S. Ito, T. Asano, T. Goto, A Supercritical Carbon Dioxide Extraction from Mackerel (*Scomber Japonicus*) Powder: Experiment and Modeling, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 59 (1986) 3709–3713.
- [12] I. Hardardottir, J.E. Kinsella, Extraction of Lipid and Cholesterol from Fish Muscle with Supercritical Fluids, *Journal of Food Science* 53 (1988) 1656–1658.
- [13] F. Temelli, E. LeBlanc, L. Fu, Supercritical  $CO_2$  Extraction of Oil from Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) and Protein Functionality, *Journal of Food Science* 60 (1995) 703–706.
- [14] N.T. Dunford, F. Temelli, E. Le Blanc, Supercritical  $CO_2$  Extraction of Oil and Residual Proteins from Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) as Affected by Moisture Content, *Journal of Food Science* 62 (1997) 289–294.
- [15] N.T. Dunford, M. Goto, F. Temelli, Modeling of oil extraction with supercritical  $CO_2$  from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) at different moisture contents, *Journal of Supercritical Fluids* 13 (1998) 303–309.
- [16] M.M. Esquivel, N.M. Bandarra, I. Fontan, M.G. Bernardo–Gil, I. Batista, M.L. Nunes, J.A. Empis, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Sardine *Sardina pilchardus* Oil, *Lebensm.–Wiss. u.–Technol.* 30 (1997) 715–720.
- [17] W.B. Nilsson, J. Spinelli, US Commerce, Purification of fish oils, Brevetto US4692280, 1987.
- [18] W.B. Nilsson, Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Fish Oils, in *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, J.W. King, G.R. List (ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996.
- [19] V.F. Stout, W.B. Nilsson, J. Krzynowek, H. Schlenk, Fractionation of Fish Oils and Their Fatty Acids, in *Fish Oils in Nutrition*, M.E. Stansby (ed.), Van Nostrand Reinhold, New York, 1990.
- [20] J. Spinelli, V.F. Stout, US Commerce, Polyunsaturated fatty acids from fish oils, Brevetto US4675132, 1987.
- [21] W.B. Nilsson, E.J. Gauglitz Jr., J.K. Hudson, V.F. Stout, J. Spinelli, Fractionation of Menhaden Oil Ethyl Esters Using Supercritical Fluid  $CO_2$ , *JAOCs* 65 (1988) 109–117.

- [22] V. Riha, G. Brunner, Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 17 (2000) 55–64.

## Capitolo 3

# Frazionamento di una miscela sintetica di esteri etilici

### 3.1 Introduzione

In questo capitolo viene descritta la prima parte del lavoro sperimentale, che consiste nello studio del frazionamento di una miscela sintetica di esteri etilici di acidi grassi, mediante anidride carbonica supercritica come solvente. Le prove sperimentali di frazionamento, realizzate in un impianto di laboratorio specificatamente assemblato per tale studio, sono state condotte in modalità semicontinua mettendo a contatto una specificata quantità di miscela da frazionare con il solvente, che veniva alimentato con continuità. La miscela sintetica è stata costituita mediante un numero contenuto di prodotti chimici ad elevata purezza, che si differenziano l'uno dall'altro per la diversa lunghezza della catena dell'acido grasso esterificato. Inoltre, tale miscela è stata costituita in modo tale da avere composizione, in termini di percentuale di composti di specificata lunghezza di catena, simile a quella derivante dalla transesterificazione di un olio naturale di pesce. In questo modo è stato possibile analizzare la capacità dell'anidride carbonica supercritica di frazionare gli esteri etilici in base alla lunghezza della catena, a partire da una miscela che rappresenta un modello semplificato della matrice naturale che si ottiene dall'olio di pesce. I risultati di questa parte della sperimentazione hanno consentito di individuare gli intervalli della pressione e della temperatura di esercizio più promettenti, in termini di solubilità e selettività, in vista dello sviluppo del processo di frazionamento sulla matrice naturale. Inoltre, i dati sperimentali ottenuti sono stati utilizzati per testare l'affidabilità di un modello, basato sull'equazione di stato di Peng-Robinson, sviluppato per la simulazione del processo di frazionamento relativo a questo sistema. L'affida-

bilità del modello proposto per la simulazione del processo di frazionamento a singolo stadio di equilibrio, realizzato su una miscela sintetica che rappresenta un modello semplificato della matrice naturale, è il necessario punto di partenza in vista dell'applicazione del modello per simulare il processo di frazionamento multistadio sulla matrice naturale.

## 3.2 Descrizione dell'impianto sperimentale

La figura 3.1 mostra una rappresentazione simbolica dell'impianto utilizzato per la realizzazione delle prove sperimentali di frazionamento in modalità semicontinua. L'impianto è costituito dai seguenti elementi:

1. Bombola di stoccaggio dell'anidride carbonica.
2. Compressore volumetrico a membrana. E' alimentato dall'anidride carbonica in fase vapore che viene compressa dalla pressione di stoccaggio (pari alla tensione di vapore della  $CO_2$  alla temperatura di stoccaggio) fino alla pressione di processo.
3. Scambiatore di calore. E' utilizzato per portare il solvente alla temperatura di processo prima di entrare nell'estrattore.
4. Estrattore. E' un recipiente cilindrico nel quale avviene il contatto fra la fase stazionaria (ricca in olio) e la fase continua (ricca in solvente). L'estrattore ha un volume pari a  $200\text{ cm}^3$  (diametro interno:  $40\text{ mm}$ ; altezza:  $160\text{ mm}$ ).
5. Camicia di termostatazione. E' un elemento di tipo rimovibile che circonda completamente l'estrattore e lo mantiene alla temperatura desiderata.
6. Valvola di espansione. E' una valvola micrometrica a spillo all'interno della quale si concentra la caduta di pressione, dal valore di processo fino a pressione atmosferica. La valvola è dotata di un sistema di riscaldamento.
7. Recipiente di separazione. All'interno di questo recipiente si raccoglie l'olio estratto nel corso del processo. E' di tipo intercambiabile, per consentire di prelevare in modo semplice l'estratto riferito ad ogni specificato intervallo di tempo.

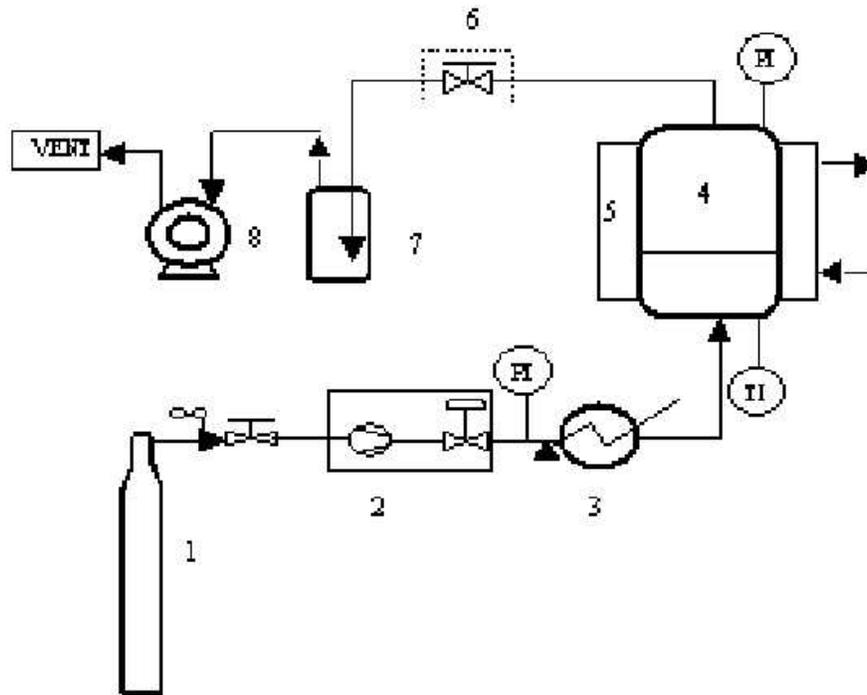


Figura 3.1: Impianto di laboratorio per la realizzazione delle prove sperimentali in modalità semicontinua a singolo stadio di equilibrio

8. Contatore volumetrico. Questo apparecchio fornisce la misura del volume di anidride carbonica che fluisce attraverso di esso. Dall'indicazione di due valori consecutivi riferiti ad un intervallo di tempo noto, permette il calcolo della portata di anidride carbonica fluita nell'intervallo specificato. E' adatto per misurare portate comprese fra 0.1 e 1.0 *l/min*.

Per quanto riguarda il sistema di termostatazione, l'impianto è dotato di due circuiti indipendenti, alimentati da due distinti termostati; il primo serve lo scambiatore a valle del compressore, mentre il secondo alimenta la camicia dell'estrattore. La temperatura di estrazione è misurata da una sonda termometrica (precisione di indicazione 1 *K*) a contatto con l'interno dell'estrattore. L'impianto sperimentale è inoltre dotato di due pressostati, che misurano la pressione a monte dello scambiatore di calore e immediatamente a valle dell'estrattore. La precisione di indicazione di quest'ultimo pressostato è pari a 1 *psi*.

### 3.3 Metodologia della sperimentazione

La sperimentazione è stata eseguita adottando una procedura perfezionata nel corso di alcune prove preliminari volte alla risoluzione di un certo numero di problemi tecnici. In primo luogo, dal momento che vi era la necessità di caricare l'estrattore con una contenuta quantità di olio di alimentazione (circa 10 g per ogni prova), il battente della fase liquida che si veniva a creare risultava insufficiente comportando un basso tempo di contatto fra le fasi. Per questo motivo si è provveduto ad inserire nel recipiente dei corpi di riempimento (palline in vetro), corrispondenti ad un volume pieno di  $60 \text{ cm}^3$ , che aumentavano sia il tempo che la superficie di contatto. Il volume vuoto effettivamente utilizzabile per il contatto fra le fasi risultava quindi pari a  $140 \text{ cm}^3$ . Dal punto di vista operativo, la prova sperimentale aveva inizio inserendo dall'alto dell'estrattore le palline di riempimento, quindi versando l'olio di alimentazione precedentemente pesato, chiudendo l'estrattore, montando la camicia di termostatazione e la sonda termometrica e connettendo l'estrattore nel circuito. A questo punto venivano azionati i termostati ed il compressore, si apriva la valvola di intercettazione posta in ingresso all'estrattore e, mantenendo chiusa la valvola di espansione, la  $\text{CO}_2$  veniva pressurizzata ed alimentata all'estrattore. Una volta raggiunti i valori di pressione e temperatura desiderati per il processo, si spegneva il compressore e l'estrattore veniva lasciato chiuso, per un tempo di circa 24 h, per consentire il raggiungimento delle condizioni di equilibrio termodinamico. Trascorso tale tempo, veniva nuovamente azionato il compressore, si aprivano le valvole di ingresso e di espansione e aveva quindi inizio l'estrazione vera e propria. Al fine di garantire un tempo di contatto fra le fasi sufficiente per l'instaurarsi di condizioni di equilibrio termodinamico, oltre al già citato utilizzo del riempimento, è stato necessario adottare, per tutte le prove sperimentali eseguite, un basso valore di portata di  $\text{CO}_2$ . Il valore di  $0.4 \text{ l/min}$ , misurato a  $20^\circ\text{C}$  e  $1 \text{ atm}$ , si è dimostrato adeguato a tale scopo. La regolazione della portata di  $\text{CO}_2$  e della pressione all'interno dell'estrattore veniva realizzata modulando l'apertura della valvola a spillo di espansione ed il rapporto di compressione. Di grande importanza si è rivelato l'adeguato riscaldamento della valvola di espansione, al fine di evitare la solidificazione degli esteri etilici, causata dal raffreddamento per effetto Joule-Thompson. Infatti, in alcune prove preliminari si è verificata, per insufficiente riscaldamento, una solidificazione all'interno dei tubi che riguardava, come dimostrato da analisi eseguite, essenzialmente l'estere etilico dell'acido stearico. Tale solidificazione, anche quando non causava il blocco dell'impianto, era in grado di portare ad errori nella determinazione della quantità e della composizione dell'estratto. Di contro, l'eccessivo riscaldamento della valvola di espansione ha portato, in

altre prove preliminari, alla formazione di uno spray chiaramente visibile con conseguenti perdite di esteri etilici per trascinarsi con la fase vapore. È stato possibile risolvere tali problemi selezionando un valore intermedio della potenza termica fornita alla valvola, che non ha dato luogo né a solidificazione né a formazione di spray. Il corretto funzionamento del sistema espansione - separazione è stato successivamente provato dalla chiusura dei bilanci di materia relativi all'intera operazione, i quali hanno dimostrato l'assenza di perdite rilevanti. L'olio estratto, che condensava grazie all'espansione in valvola, si separava dalla  $CO_2$  e si raccoglieva nel recipiente di separazione. Ad intervalli di tempo prefissati, il recipiente veniva sostituito e si procedeva alle analisi dell'estratto fra due successivi prelievi. La massa estratta veniva determinata per mezzo di una bilancia di precisione (precisione di indicazione 0.0001 g). È stato rilevato che era necessario attendere circa 2 ore, fra il prelievo dal recipiente di raccolta e la registrazione del valore relativo alla pesata, per dare modo alla  $CO_2$  di completare la sua separazione dalla fase liquida. Nell'arco di questo tempo, infatti, è stata misurata una diminuzione della massa del campione di circa lo 0.1 – 0.2% del valore di partenza, mentre, trascorso tale tempo, la pesata si manteneva stabile. Dopo aver determinato la massa estratta, il campione veniva diluito in etanolo e si procedeva all'analisi gascromatografica al fine di determinarne la composizione. La prova sperimentale veniva condotta fino ad esaurimento totale della carica. All'atto pratico, una modesta quantità di olio rimaneva inestratta nelle condizioni di processo. Tale quantità, denominata *residuo*, veniva recuperata nella fase di asciugamento dell'estrattore, realizzata inviando il solvente a pressioni più elevate della pressione di processo e protratta finché non si raccoglieva più nulla nel separatore. Il campione ottenuto nella fase di asciugamento veniva quindi pesato ed analizzato. Dopo aver depressurizzato il sistema, l'estrattore veniva smontato al fine di rimuovere le palline di riempimento. Prima di essere utilizzate per la prova successiva, le palline venivano pulite con etanolo ed asciugate in una stufa funzionante sotto vuoto.

### 3.4 Materiali della sperimentazione

Le specifiche dei composti utilizzati per realizzare la miscela di esteri etilici da sottoporre ad estrazione sono riportate nella tabella 3.1. In questa tabella e nel seguito, salvo diverso avviso, il generico estere etilico verrà individuato premettendo la sigla EE alla sigla che individua l'acido grasso esterificato secondo il sistema sintetico (ad esempio, l'estere etilico dell'acido palmitico sarà indicato con EE-C16:0). Per gli esteri etilici degli acidi eicosapentaenoico e docosaesaenoico si useranno le sigle EE-EPA e EE-DHA. Per quanto

Specie chimica	Purezza minima dichiarata	Ditta produttrice
EE-C14:0	99 %	Fluka Chemika
EE-C16:0	99 %	Sigma Aldrich
EE-C18:0	99 %	Sigma Aldrich
EE-EPA	90 %	K.D.-Pharma
EE-DHA	70 %	K.D.-Pharma

Tabella 3.1: Specifiche relative agli esteri etilici utilizzati per la realizzazione della miscela sintetica di alimentazione

riguarda questi ultimi prodotti, che sono i meno puri, la ditta produttrice ha fornito le analisi gascromatografiche dei lotti corrispondenti con il riconoscimento di tutte le principali impurezze. Da queste analisi è emerso che esse sono essenzialmente costituite da esteri etilici di acidi grassi C20 e C22. Le uniche impurezze non trascurabili e non appartenenti a questa categoria sono relative ad esteri di un C18 e di un C21. Assumendo che l'area percentuale dei picchi gascromatografici corrisponda alla frazione in massa dei rispettivi componenti, è stato possibile stabilire, quasi integralmente, la composizione dei prodotti ad alto contenuto di EE-EPA e EE-DHA. La tabella 3.2 riporta la composizione di questi prodotti, espressa come frazione percentuale in massa. Per effettuare l'estrazione è stata utilizzata anidride carbonica (Siad, Italia) di purezza del 99.9 %. La diluizione dei campioni da analizzare mediante gascromatografia è stata effettuata con alcool etilico anidro (Fluka Chemika) di purezza del 99.8 %.

	Prodotto ricco in EPA	Prodotto ricco in DHA
EE-C18:4 $\omega$ 3	1.22	0
EE-C20:4 $\omega$ 3	2.18	0
EE-C20:4 $\omega$ 6	3.96	0
EE-EPA	90.63	6.74
EE-C21:5 $\omega$ 3	1.30	2.54
EE-C22:5 $\omega$ 3	0	16.49
EE-C22:5 $\omega$ 6	0	1.00
EE-DHA	0.32	70.48
Altri (non identificati)	0.39	2.75

Tabella 3.2: Composizione dei prodotti ricchi in EPA e DHA forniti dalla K.D.-Pharma

### 3.5 Analisi gascromatografica

Le analisi dei campioni di interesse per la sperimentazione (alimentazione, estratti, residuo) sono state effettuate mediante un gas-cromatografo della Hewlett Packard (modello 580), dotato di una colonna capillare di tipo EC-5 (Alltech) dalle seguenti caratteristiche:

- lunghezza 30 *m*
- diametro 0.25 *mm*
- spessore del film interno 0.25  $\mu\text{m}$

La procedura analitica prevedeva la diluizione del campione in etanolo (rapporto di diluizione 1 : 10 in massa) e la successiva iniezione di un volume di 1  $\mu\text{l}$ . Il rapporto di splittaggio era 1 : 60; come gas di trasporto era utilizzato elio ad una portata pari a 2 *ml min*<sup>-1</sup>. La temperatura di iniezione era fissata a 250 °C, mentre quella del detector (di tipo F.I.D.) era fissata a 300 °C. La programmata è stata stabilita come segue:

- temperatura iniziale: 200 °C, mantenuta per 4 minuti.
- incremento di temperatura lineare, a 6 °C al minuto, fino a 250°C.
- permanenza a 250°C per 23 minuti.
- incremento di temperatura lineare, a 6 °C al minuto, fino a 280°C.
- permanenza a 280°C per 6 minuti.

Questa procedura ha permesso di ottenere dei picchi distinguibili per tutti i componenti rilevanti, unitamente ad un tempo ragionevole (circa 46 minuti) per l'esecuzione dell'analisi. La risposta del gascromatografo è stata interpretata assumendo che l'area percentuale dei picchi corrisponda alla percentuale in massa dei rispettivi componenti ed accorpando tutti i composti aventi uguale lunghezza di catena nello stesso gruppo. L'estere etilico dell'acido C21, comunque presente in piccole quantità, è stato accorpato per 2/3 alla classe dei C22 e per 1/3 alla classe dei C20. La validità della procedura analitica è stata testata sulla miscela di alimentazione. Questa miscela è stata preparata con i materiali elencati nella tabella 3.1, in modo da realizzare una composizione simile a quella derivante dall'esterificazione dell'olio di sardina. A questa miscela è stata attribuita una composizione derivante dalla conoscenza delle quantità utilizzate ed assumendo, per ogni prodotto,

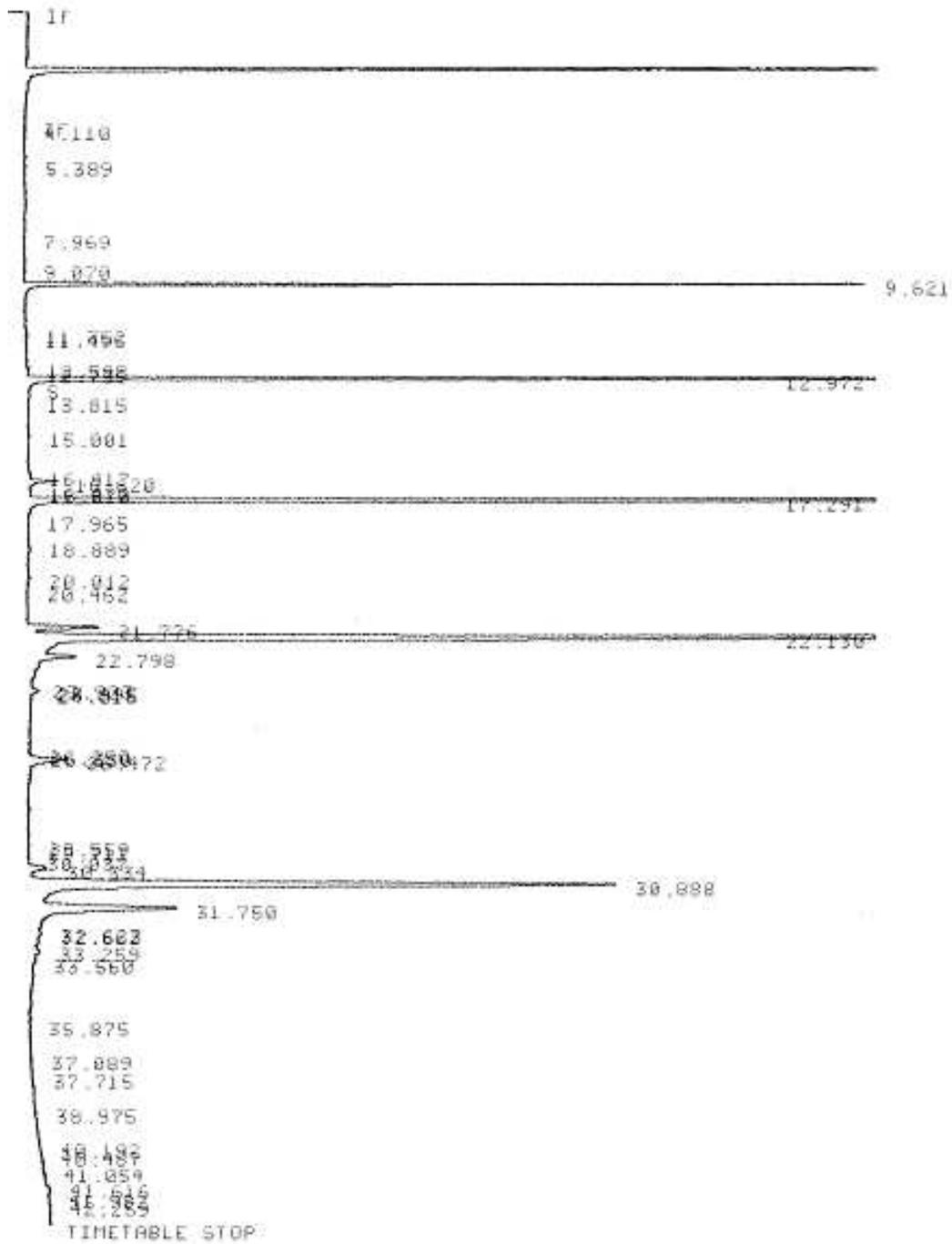


Figura 3.2: Tipico tracciato gascromatografico della miscela sintetica di esteri etilici utilizzata come alimentazione

Specie chimica	Tempo di ritenzione [minuti]
EE-C14:0	9.621
EE-C16:0	12.972
EE-C18:4	16.418
EE-C18:0	17.291
EE-C20:4 $\omega$ 6	21.776
EE-EPA	22.130
EE-C20:4 $\omega$ 3	22.798
EE-C21:5 $\omega$ 3	26.472
EE-C22:5 $\omega$ 6	30.334
EE-DHA	30.388
EE-22:5 $\omega$ 3	31.750

Tabella 3.3: Tempi di ritenzione dei 5 componenti principali e delle 6 impurezze

una composizione derivante dalla “normalizzazione a 100” sui componenti noti. La composizione determinata nel modo appena esposto è stata denominata *composizione effettiva*. Sebbene non sia possibile conoscere la reale composizione dell’alimentazione, l’analisi dei dati riportati nelle tabelle 3.1 e 3.2 chiarisce come la composizione effettiva debba essere molto prossima alla concentrazione reale del campione. La figura 3.2 mostra un tipico tracciato gascromatografico riferito alla miscela di alimentazione. Sono chiaramente individuati i 5 picchi principali, riferiti ai 5 prodotti chimici acquistati, e le 6 principali impurezze segnalate dalla K.D.–Pharma nei prodotti EE-EPA e EE-DHA. Con riferimento al tracciato gascromatografico riportato nella figura 3.2, ai componenti individuati corrispondono i tempi di ritenzione riportati nella tabella 3.3.

Per quanto riguarda i risultati quantitativi, la tabella 3.4 mostra la composizione effettiva e gascromatografica dell’alimentazione, espressa come percentuale in massa delle classi di esteri identificate in base alla lunghezza della catena acida. I dati riferiti alla composizione gascromatografica rappresentano il valore medio ottenuto dalla replica di tre analisi. Viene inoltre riportata

	C14	C16	C18	C20	C22
Effettiva	6.0	27.5	21.4	25.1	20.0
Gascromatografica	5.0 $\pm$ 0.6	27.2 $\pm$ 1.2	23.3 $\pm$ 0.2	25.9 $\pm$ 0.8	18.6 $\pm$ 1.0

Tabella 3.4: Composizione effettiva e gascromatografica dell’alimentazione

la deviazione standard, al fine di valutare la riproducibilità della misura. La lieve discordanza fra i valori di composizione effettiva e gascromatografica è presumibilmente dovuta all'approssimazione che si compie nel ritenere la percentuale di area dei picchi gascromatografici uguale alla frazione in massa dei rispettivi componenti. L'approssimazione ottenuta è stata ritenuta accettabile per il tipo di studio sviluppato in questa Tesi.

### 3.6 Risultati sperimentali

La tabella 3.5 riporta i valori di pressione e temperatura relativi alle nove prove sperimentali effettuate sulla matrice sintetica. In tutte le prove sperimentali la portata volumetrica di anidride carbonica, misurata a 20 °C e 1 atm, è stata mantenuta a 0.4 l/min.

T [°C]	P [atm]		
42	90	100	120
50	110	120	140
60	130	140	160

Tabella 3.5: Condizioni operative delle prove sperimentali sulla matrice sintetica

I dati sperimentali relativi ad ogni prova, derivanti da misure dirette, consistono nella massa di olio estratto fra due successivi prelievi e nella composizione di tali campioni; le stesse misure sono state effettuate per il residuo. È stato quindi possibile calcolare le perdite per ciascun componente, tramite il bilancio di materia:

$$P_i = (R_0)_i - \sum_{j=1}^N E_{ij} - (R_{t^*})_i \quad (3.1)$$

dove  $P_i$  rappresenta le perdite di componente  $i$ ,  $(R_0)_i$  indica la massa di componente  $i$  caricata nell'estrattore all'istante iniziale (tempo 0),  $E_{ij}$  rappresenta la massa di componente  $i$  raccolta in corrispondenza del prelievo  $j$ ,  $N$  rappresenta il numero di prelievi e  $(R_{t^*})_i$  indica la massa di componente  $i$  contenuta nel residuo ( $t^*$  è il tempo di fine prova). In tutte le prove sperimentali effettuate le perdite sono sempre risultate di piccola entità (mai superiori al 3% della quantità caricata). Dal momento che le perdite sono da attribuirsi ad esteri etilici che non condensano o che sono trascinati dalla corrente di  $CO_2$  a valle della valvola di espansione, esse sono state ridistribuite fra gli estratti secondo la relazione:

$$P_{ij} = P_i \frac{E_{ij}}{\sum_{j=1}^N E_{ij}} \quad (3.2)$$

dove  $P_{ij}$  indica le perdite di componente  $i$  riferite al prelievo  $j$ . Le perdite così calcolate per ogni componente ed ogni singolo estratto, sono quindi state riaccorpate all'estratto corrispondente. La massa dei singoli componenti caricata all'interno dell'apparecchiatura in ogni prova, nota dalla conoscenza del valore della massa di olio caricata (mediante pesata) e della composizione dell'alimentazione, è stata ricalcolata, a scopo di verifica, dalle pesate e dalle analisi gascromatografiche dei campioni di estratto e di residuo e dal riaccorpamento delle perdite: la discordanza fra i due valori è stata, in tutte le prove, sempre inferiore all'1%.

Le figure 3.3, 3.4, 3.5 mostrano la massa di olio estratta in funzione della massa di solvente fluita, in relazione alle prove sperimentali a  $42^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$  e  $60^{\circ}\text{C}$  rispettivamente. Per ogni fissata temperatura si vede chiaramente come ad aumenti di pressione corrispondano aumenti nella quantità estratta a parità di solvente utilizzato, ovvero aumenti della solubilità. Di contro, dal confronto fra i diversi grafici, si vede come aumenti di temperatura a parità di pressione conducano a diminuzioni di solubilità, e quindi ad aumentata quantità di solvente necessaria per estrarre una data quantità di olio. La brusca diminuzione della solubilità che si può vedere ad alti valori di olio estratto (generalmente a valori superiori ai 9 grammi) è chiaramente dovuta al fatto che si va esaurendo il liquido all'interno dell'estrattore. La tabella 3.6 riporta i valori della solubilità media, espressa come grammi di olio solubilizzato per kg di  $\text{CO}_2$ , riferita alle diverse prove sperimentali. Tali valori hanno una valenza solamente qualitativa dal momento che la composizione della fase liquida varia progressivamente ed in quanto al diminuire dell'olio all'interno dell'estrattore non è certo che si raggiungano condizioni di saturazione. Tuttavia, i valori ottenuti mostrano chiaramente l'effetto discorde degli aumenti di pressione e di temperatura, e forniscono delle indicazioni utili in sede di analisi della fattibilità del processo.

I punti sperimentali delle figure da 3.6 a 3.14 rappresentano l'andamento della composizione su base priva di solvente della fase gassosa al procedere della prova. I dati sono riportati in funzione del grado di avanzamento del processo, espresso in termini percentuali. Il grado di avanzamento ( $A$ ) è definito come:

$$A = 1 - R_t/R_0 \quad (3.3)$$

dove  $R_t$  rappresenta la massa dell'olio contenuto all'interno dell'apparecchiatura al generico tempo  $t$ . In questo modo il grado di avanzamento viene a

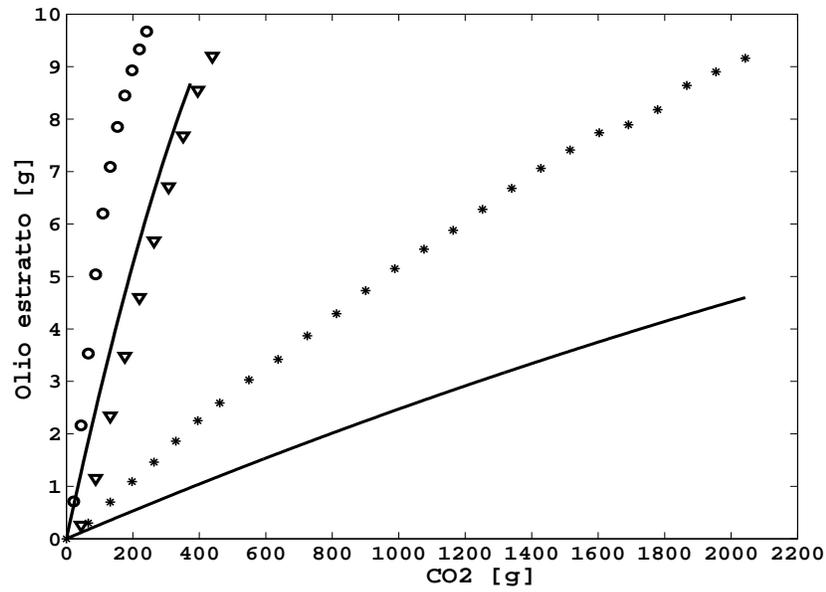


Figura 3.3: Olio estratto a temperatura di  $42^{\circ}\text{C}$ . Punti sperimentali e previsione del modello (\*  $90\text{ atm}$ ;  $\nabla$   $100\text{ atm}$ ;  $\circ$   $120\text{ atm}$ )

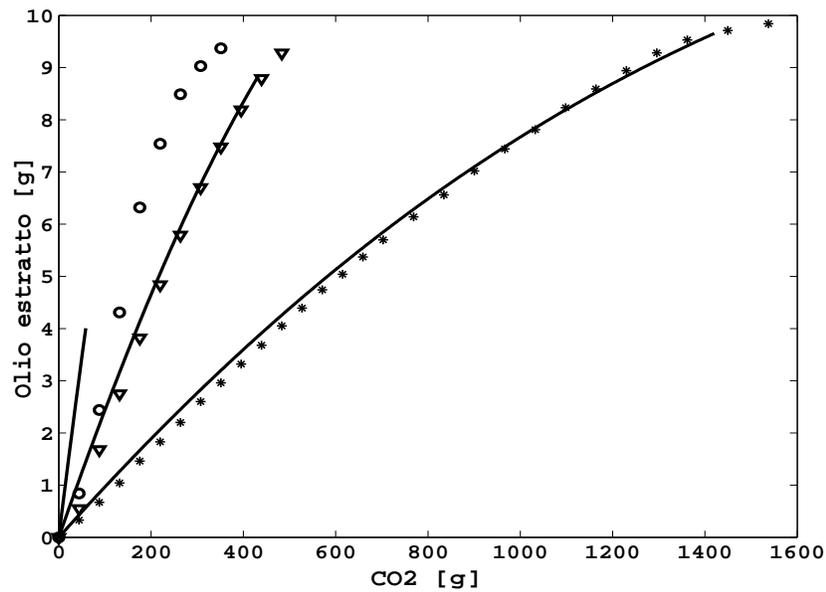


Figura 3.4: Olio estratto a temperatura di  $50^{\circ}\text{C}$ . Punti sperimentali e previsione del modello (\*  $110\text{ atm}$ ;  $\nabla$   $120\text{ atm}$ ;  $\circ$   $140\text{ atm}$ )

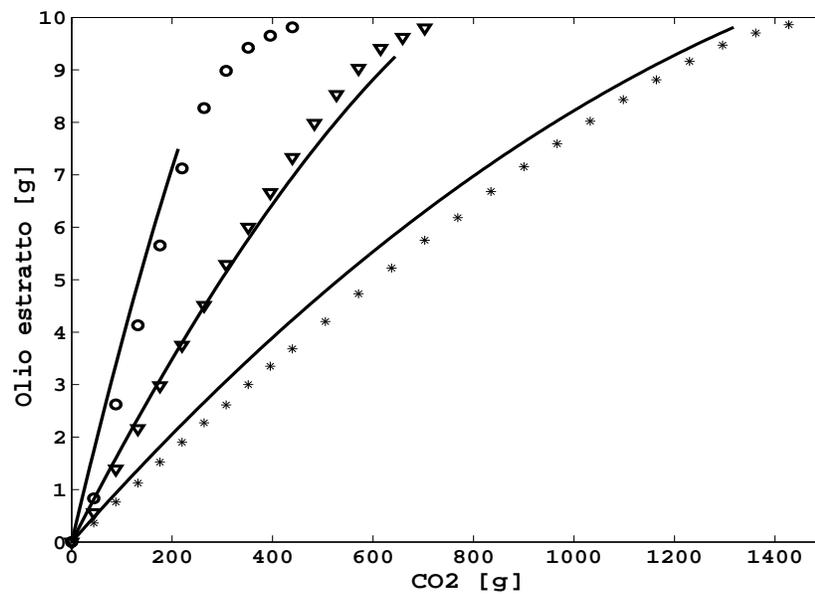


Figura 3.5: Olio estratto a temperatura di  $60^{\circ}\text{C}$ . Punti sperimentali e previsione del modello (\* 130 atm;  $\nabla$  140 atm;  $\circ$  160 atm)

T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	P [atm]						
	90	100	110	120	130	140	160
42	4.3	20.9	-	30.7	-	-	-
50	-	-	6.4	19.2	-	26.6	-
60	-	-	-	-	7.6	13.9	22.4

Tabella 3.6: Solubilità media [ $g_{olio}/kg_{CO_2}$ ] della miscela sintetica calcolata dai risultati sperimentali

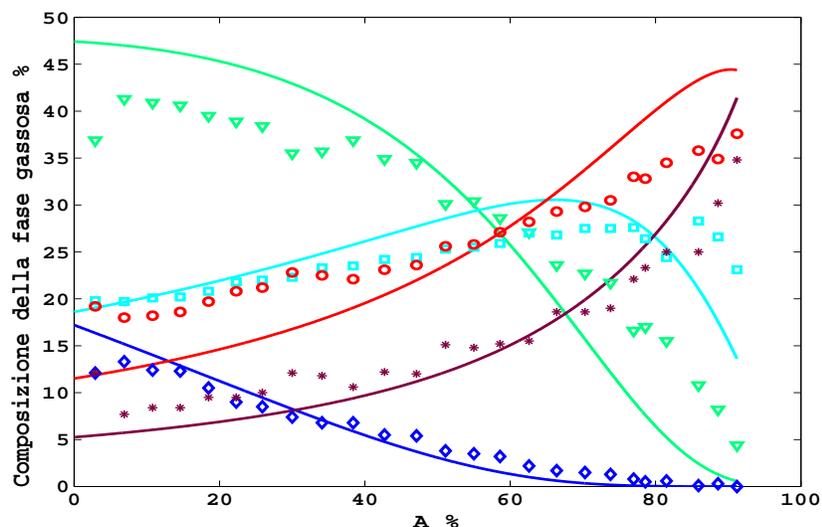


Figura 3.6: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $90\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE-C14$ ;  $\nabla$   $EE-C16$ ;  $\square$   $EE-C18$ ;  $\circ$   $EE-C20$ ;  $*$   $EE-C22$ )

rappresentare la quota di olio estratta rispetto alla quota inizialmente caricata nell'apparecchiatura. Tenendo presente la composizione dell'alimentazione (riportata nella tabella 3.4) si può vedere come in tutte le prove nei primi prelievi si ha un'estrazione preferenziale dei composti più leggeri, delle classi  $EE-C14$  e  $EE-C16$ . I composti più pesanti, appartenenti alle classi  $EE-C18$ ,  $EE-C20$  ed  $EE-C22$  sono estratti in quantità minore e tendono quindi a concentrarsi nella fase liquida presente nell'estrattore (*raffinato*). All'aumentare del grado di avanzamento, il progressivo impoverimento del raffinato nei composti più leggeri porta ad estratti sempre più ricchi nei composti più pesanti, prima nell' $EE-C18$ , poi nell' $EE-C20$  ed infine nell' $EE-C22$ . Ad ogni fissata temperatura, tale effetto è più evidente alla pressione di esercizio più bassa ed è sempre meno evidente alle pressioni più alte. In particolare, per ogni fissata temperatura la prova sperimentale a pressione più elevata evidenzia dei valori del grado di avanzamento oltre i quali la composizione della fase gassosa si mantiene praticamente costante. Questo fatto è, con ogni probabilità, dovuto alla formazione di una fase omogenea all'interno dell'estrattore e quindi all'assenza di arricchimento del raffinato. Tali valori di pressione sono dunque troppo elevati (per la data temperatura) per frazionare la miscela e quindi bisogna necessariamente orientarsi per valori di pressione operativa

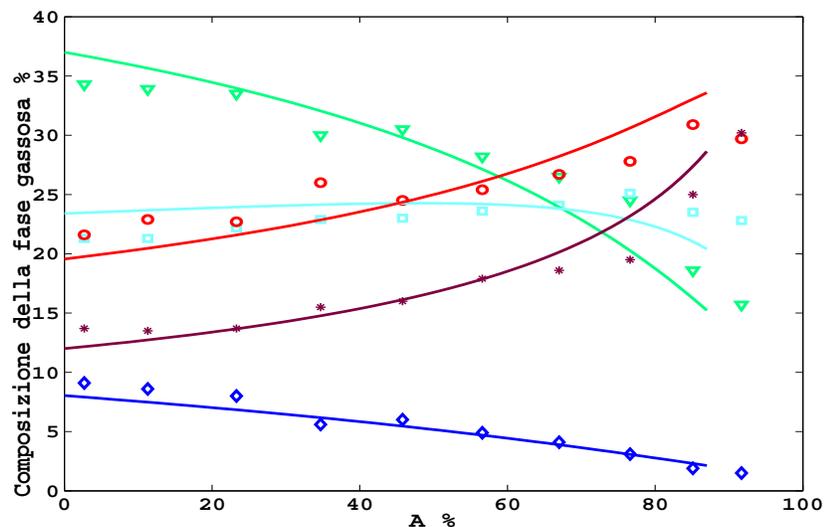


Figura 3.7: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $42^{\circ}C$  e  $100\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

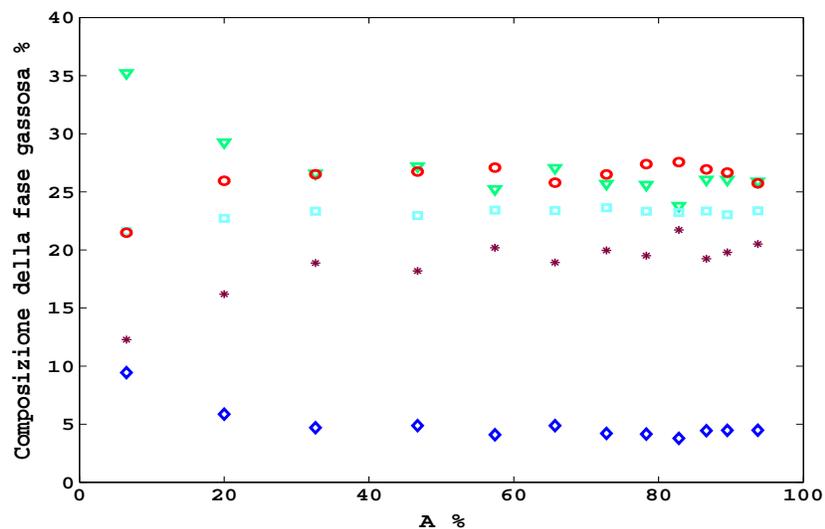


Figura 3.8: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $42^{\circ}C$  e  $120\ atm$ . Punti sperimentali. ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

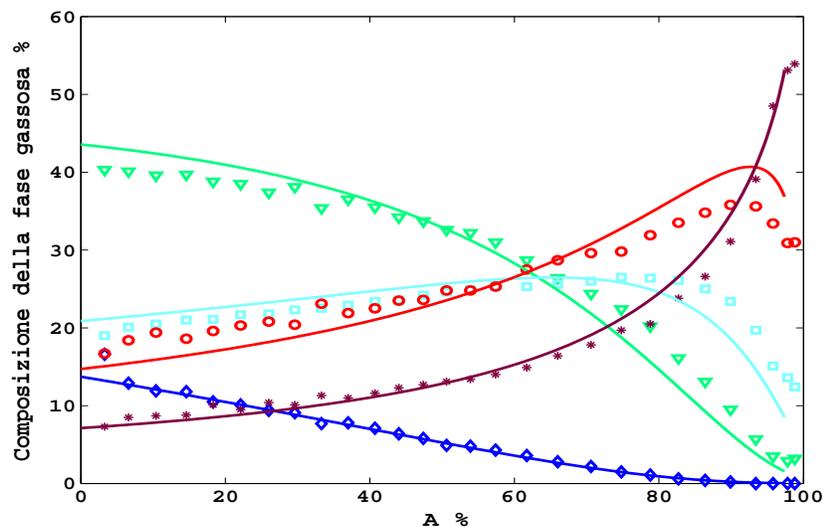


Figura 3.9: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $110\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

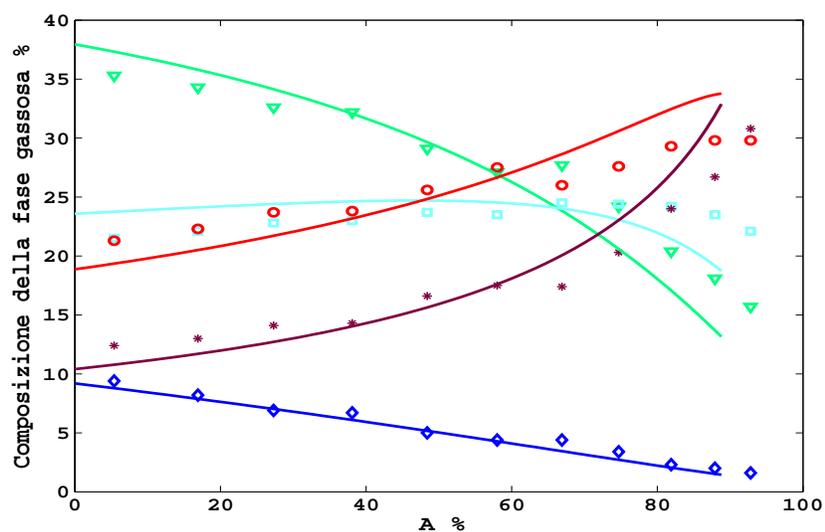


Figura 3.10: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

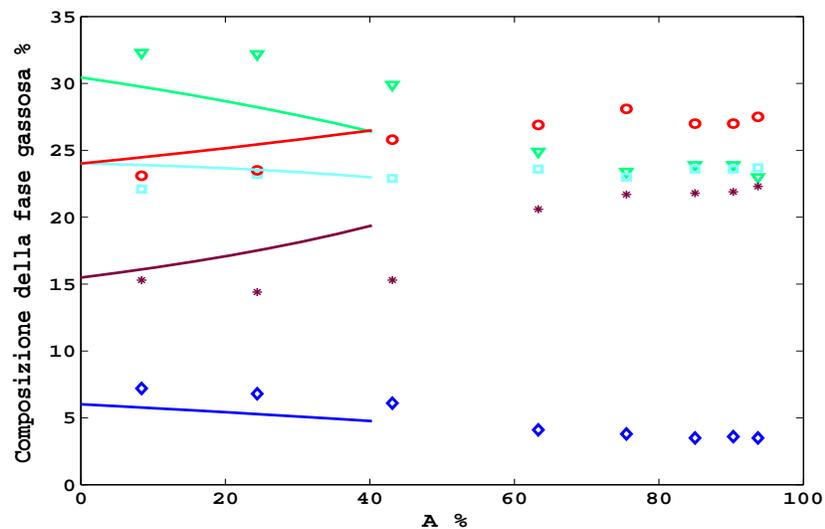


Figura 3.11: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

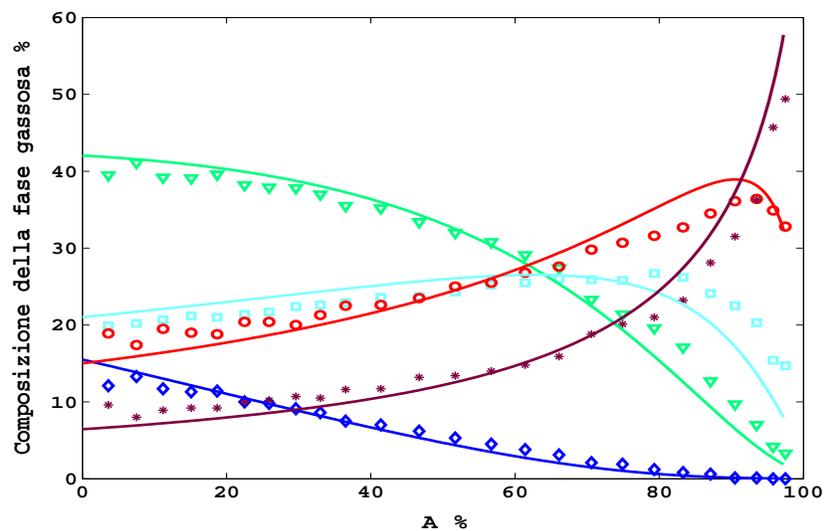


Figura 3.12: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$  e  $130\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

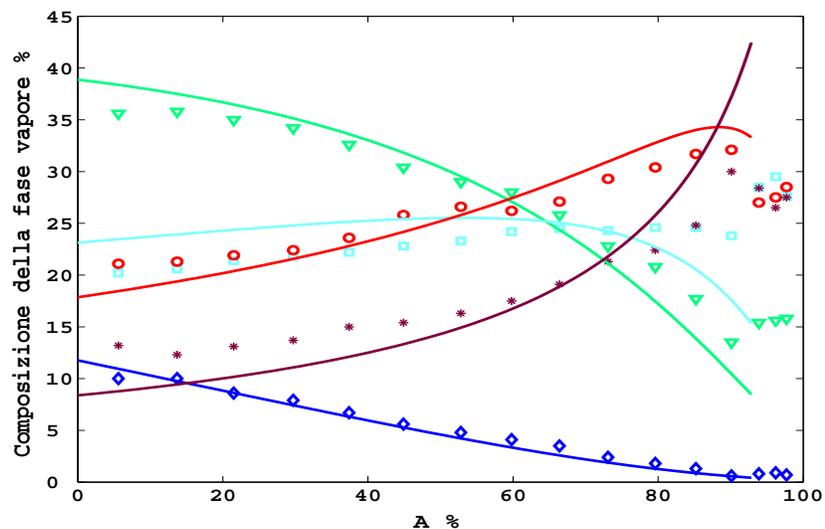


Figura 3.13: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

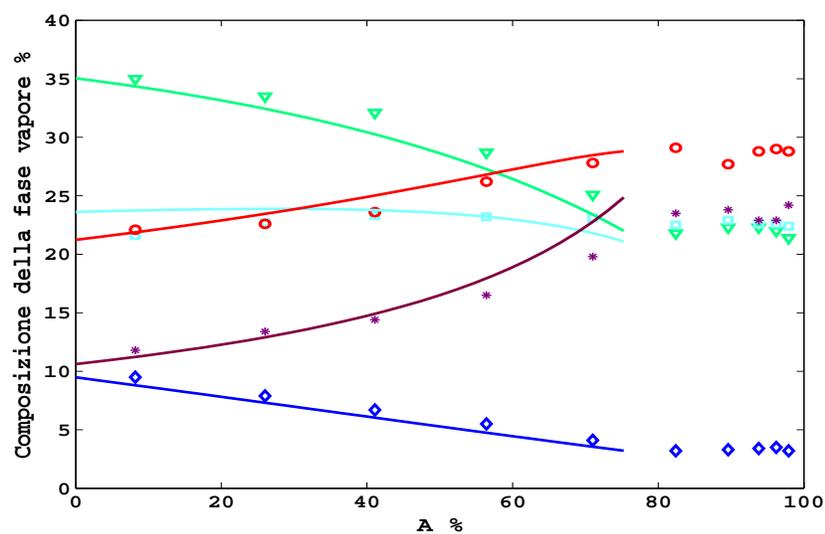


Figura 3.14: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$  e  $160\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

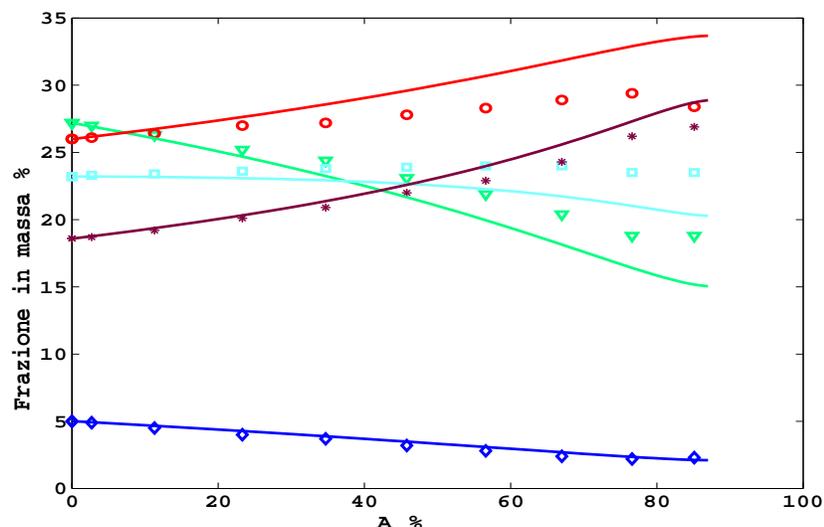


Figura 3.15: Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $100\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

inferiori.

A partire dai dati determinati sperimentalmente è stato possibile calcolare, per mezzo dei bilanci di materia per ogni estere etilico, la massa e la composizione dell'olio contenuto all'interno dell'estrattore. Le figure da 3.15 a 3.18 mostrano, per alcune prove sperimentali, la composizione su base priva di solvente all'interno dell'estrattore. Tale composizione, riferita alla totalità dell'olio presente nell'estrattore (fase liquida + fase gassosa), può essere considerata, almeno in prima approssimazione, all'incirca pari alla composizione del raffinato (non accessibile sperimentalmente). Infatti, a bassi gradi di avanzamento, la quantità di olio in fase gassosa è molto minore di quella contenuta nella fase liquida, che viene quindi ad assumere una composizione simile a quella complessiva; invece, ad alti gradi di avanzamento, ovvero quando il sistema si avvicina alle condizioni di omogeneità, la composizione delle due fasi tende a divenire uguale e quindi, ancora una volta, la composizione globale è prossima a quella della fase liquida. Inoltre, per quanto riguarda i componenti più pesanti (EE-C20 e EE-C22), che sono quelli di maggior pregio, la loro frazione in massa all'interno dell'estrattore fornisce una stima per difetto della loro frazione in massa nel raffinato, in quanto la fase gassosa sarà più povera dei componenti più pesanti. In definitiva, le

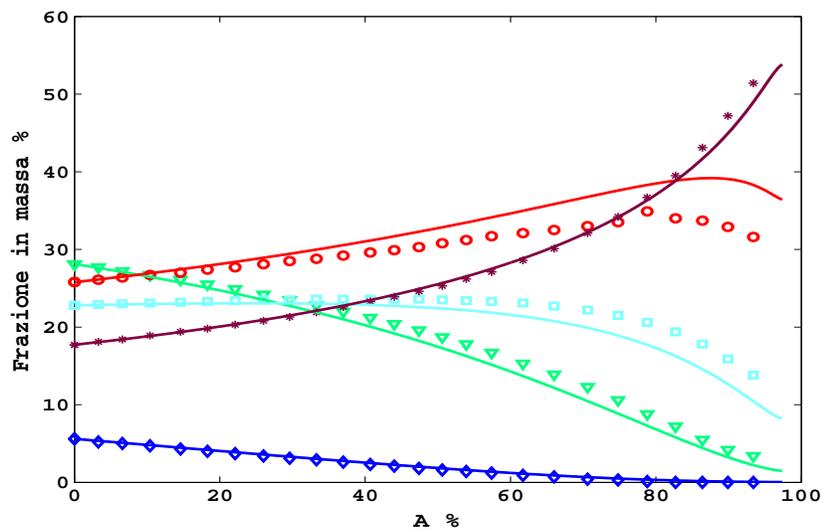


Figura 3.16: Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $110\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

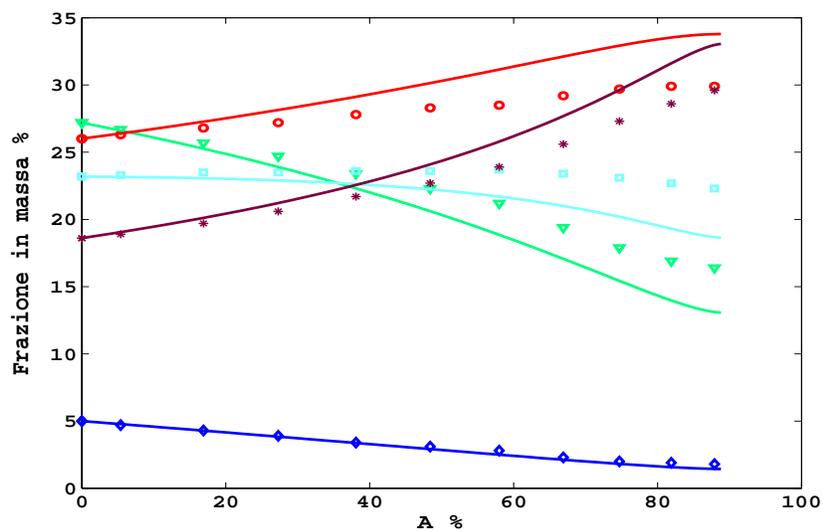


Figura 3.17: Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

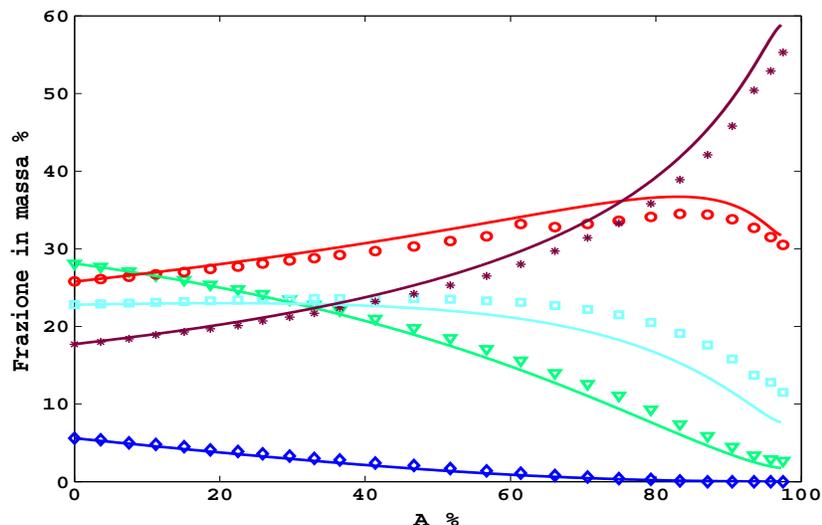


Figura 3.18: Composizione all'interno dell'estrattore espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $130\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  *EE* - *C14*;  $\nabla$  *EE* - *C16*;  $\square$  *EE* - *C18*;  $\circ$  *EE* - *C20*;  $*$  *EE* - *C22*)

figure da 3.15 a 3.18 indicano che, soprattutto nelle condizioni operative corrispondenti alle pressioni più basse ed alle temperature più alte, è possibile ottenere dei raffinati ad alta concentrazione nei componenti pesanti (*EE*-*C20* e *EE*-*C22*) che possono arrivare a superare l'80%. Tuttavia, queste condizioni operative corrispondono anche alle condizioni di solubilità più bassa (cfr. tabella 3.6) ovvero a quelle condizioni che, richiedendo un maggior impiego di solvente, risultano più costose. Per quantificare l'attitudine del processo a separare i composti leggeri (qui definiti come: *EE*-*C14*, *EE*-*C16*, *EE*-*C18*) da quelli più pesanti (*EE*-*C20*, *EE*-*C22*) nelle diverse condizioni operative, è stata introdotta una selettività leggeri-pesanti definita come:

$$S(A) = \frac{Y_l/X_l}{Y_p/X_p} \quad (3.4)$$

Nel primo membro dell'equazione 3.4 è stato messo in evidenza che la selettività, nel processo in esame che è di tipo non stazionario, varia al variare del grado di avanzamento dal momento che cambia continuamente la composizione delle fasi in equilibrio. Approssimando la composizione del raffinato con quella globale all'interno dell'apparecchiatura ed effettuando un'operazione di media sulla funzione  $S(A)$ , è stata calcolata la selettività media in ogni condizione operativa. I risultati di questi calcoli sono riportati nella

T [ $^{\circ}$ C]	P [atm]						
	90	100	110	120	130	140	160
42	2.1 (2.9)	1.4 (1.5)	-	1.0 (1.0)	-	-	-
50	-	-	2.1 (2.3)	1.5 (1.7)	-	1.1 (1.1)	-
60	-	-	-	-	2.1 (2.3)	1.5 (1.9)	1.2 (1.3)

Tabella 3.7: Selettività media nelle varie condizioni operative calcolata dai risultati sperimentali. I valori in parentesi tonda sono riferiti alla selettività media calcolata dalle simulazioni

tabella 3.7. L'analisi dei dati sperimentali globali, riferita alle tabelle 3.6, 3.7, evidenzia che:

- per ogni valore di temperatura oggetto della sperimentazione sull'olio sintetico, non si ha alcun arricchimento significativo nelle condizioni di pressione più elevate.
- la migliore selettività è ottenibile alla pressione più bassa. Tuttavia, in queste condizioni la solubilità è bassa rispetto a quella generalmente ritenuta minima affinché un processo con solvente supercritico sia ritenuto potenzialmente applicabile da un punto di vista economico.
- i valori delle coppie pressione-temperatura che appaiono più promettenti, in quanto forniscono un buon compromesso fra solubilità e selettività, sono ( $42^{\circ}$ C,  $100\text{ atm}$ ), ( $50^{\circ}$ C,  $120\text{ atm}$ ), ( $60^{\circ}$ C,  $140\text{ atm}$ ).

Infine, dalle figure relative alla composizione all'interno dell'estrattore si può vedere come raffinati ad alte percentuali di (EE-C20 + EE-C22) sono ottenibili esclusivamente ad alti valori del grado di avanzamento ovvero in condizioni corrispondenti a basse quantità del raffinato stesso. In altri termini, sebbene in alcune condizioni sperimentali sia possibile ottenere oli ad alte percentuali dei componenti pregiati, il recupero di questi (ovvero la quota raccolta nel raffinato rispetto a quella caricata con l'alimentazione) è molto basso. Ciò è chiaramente dovuto alla solubilità dei componenti pesanti nel solvente che, sebbene sia più bassa rispetto a quella dei componenti leggeri, non è affatto trascurabile e causa un progressivo decremento della massa di questi componenti nella fase liquida. Questo fatto rappresenta un limite del processo a singolo stadio di equilibrio, il cui studio deve essere visto come un necessario punto di passaggio in vista dello sviluppo di un processo di frazionamento multistadio.

### 3.7 Modellizzazione dell'equilibrio di fase

Per modellizzare il processo appena descritto è necessario disporre di un modello affidabile per la descrizione delle condizioni di equilibrio di fase, relativamente a sistemi composti da esteri etilici ed anidride carbonica in condizioni di alta pressione. In generale, in un sistema multicomponente la condizione di equilibrio di fase può essere espressa mediante le relazioni di isofugacità per tutti i componenti la miscela. Per il generico componente  $i$  si può scrivere:

$$\bar{f}_i^L(P, T, \vec{x}) = \bar{f}_i^V(P, T, \vec{y}) \quad (3.5)$$

dove  $P$  e  $T$  indicano rispettivamente la pressione e la temperatura del sistema,  $\vec{x}$  e  $\vec{y}$  rappresentano le frazioni molari delle due fasi in equilibrio. Con riferimento al sistema in esame, contenente alcuni componenti condensabili ed un componente incondensabile alle temperature in gioco (l'anidride carbonica), si indica con la lettera  $V$  la fase ricca nell'incondensabile (che nel seguito verrà anche chiamata *fase supercritica*) e con la lettera  $L$  la fase ricca in componenti condensabili (*fase liquida*). La fugacità del componente  $i$  in miscela è, come noto, esprimibile dalla:

$$\bar{f}_i = P \bar{\varphi}_i(P, T, \vec{y}) z_i \quad (3.6)$$

nella quale  $z_i$  rappresenta la frazione molare del componente  $i$  nella generica fase ed il coefficiente di fugacità  $\bar{\varphi}_i$  può essere espresso mediante un'equazione di stato. La condizione di equilibrio per il generico componente  $i$  diviene quindi:

$$P \bar{\varphi}_i^L(P, T, \vec{x}) x_i = P \bar{\varphi}_i^V(P, T, \vec{y}) y_i \quad (3.7)$$

da cui, semplificando la pressione ed esplicitando la composizione della fase ricca in incondensabili, si ottiene:

$$y_i = \frac{\bar{\varphi}_i^L(P, T, \vec{x})}{\bar{\varphi}_i^V(P, T, \vec{y})} x_i \quad (3.8)$$

I coefficienti di fugacità che compaiono nella condizione di equilibrio possono essere calcolati mediante la relazione [1]:

$$\ln \bar{\varphi}_i = \frac{1}{RT} \int_V^\infty \left[ \left( \frac{\partial P}{\partial N_i} \right)_{T, V, N_{j \neq i}} - \frac{RT}{V} \right] dV - \ln Z \quad (3.9)$$

dove  $V$  e  $Z$  indicano rispettivamente il volume ed il fattore di compressibilità della miscela mentre  $N_i$  indica le moli di componente  $i$  presenti nella miscela. Per esprimere i coefficienti di fugacità mediante l'equazione 3.9 è necessario

disporre di un'equazione di stato in grado di fornire una descrizione affidabile del comportamento volumetrico del sistema in esame.

Una delle equazioni di stato più utilizzate per il calcolo degli equilibri di fase ad alta pressione è l'equazione di stato cubica di Peng–Robinson, che fornisce un buon compromesso fra affidabilità e complessità non eccessiva. L'equazione di stato di Peng–Robinson per un componente puro lega la pressione  $P$ , la temperatura  $T$  ed il volume specifico molare  $\widehat{V}$  secondo la relazione:

$$P = \frac{RT}{\widehat{V} - b} - \frac{a(T)}{\widehat{V}(\widehat{V} + b) + b(\widehat{V} - b)} \quad (3.10)$$

dove  $R$  è la costante dei gas mentre  $a$  e  $b$  sono dei parametri dipendenti dallo specifico fluido. Con l'obiettivo di fornire una formulazione generalizzata dell'equazione di stato, Peng e Robinson espressero la funzione  $a(T)$  come prodotto di un termine dipendente solo dai parametri critici  $a(P_c, T_c)$  ed un altro contenente la dipendenza dalla temperatura:

$$a(T) = a(P_c, T_c) \alpha(T) \quad (3.11)$$

Il termine  $a(P_c, T_c)$  ed il termine  $b$ , anch'esso espresso esclusivamente in funzione dei parametri critici, furono calcolati imponendo la presenza di un flesso a tangente orizzontale nell'isoterma critica in corrispondenza della pressione critica, determinando le seguenti relazioni:

$$a(P_c, T_c) = 0.45724 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \quad (3.12)$$

$$b = 0.07780 \frac{RT_c}{P_c} \quad (3.13)$$

La funzione  $\alpha(T)$  fu scelta in modo tale da soddisfare il vincolo:

$$\alpha(T_c) = 1 \quad (3.14)$$

e da ottimizzare la predizione della tensione di vapore per un'ampia categoria di fluidi. Si trovò:

$$\alpha(T) = \left[ 1 + \kappa \left( 1 - \sqrt{\frac{T}{T_c}} \right) \right]^2 \quad (3.15)$$

dove  $\kappa$  è una funzione del fattore acentrico ( $\omega$ ) data dalla:

$$\kappa = 0.37464 + 1.54226 \omega - 0.26992 \omega^2 \quad (3.16)$$

Con questa formulazione l'equazione di stato di Peng–Robinson fornisce la predizione delle proprietà volumetriche di un qualsivoglia fluido a partire

dalla conoscenza di tre parametri: pressione critica, temperatura critica e fattore acentrico.

L'applicazione dell'equazione di Peng–Robinson alle miscele, come peraltro avviene per tutte le equazioni di stato cubiche, prevede che il comportamento volumetrico della miscela sia rappresentato dalla stessa forma funzionale utilizzata per un componente puro, ed i parametri che dipendono dal fluido vengano calcolati a partire dai rispettivi parametri per i fluidi puri che costituiscono la miscela. Ciò viene effettuato mediante l'utilizzo di relazioni, in genere di carattere empirico, che esprimono la dipendenza dei suddetti parametri dalla composizione della miscela. Tali relazioni sono dette *regole di mescolamento*. In questo lavoro sono state utilizzate regole di mescolamento di tipo quadratico (anche dette regole di mescolamento di van der Waals) definite dalle relazioni:

$$a_m = \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^c z_i z_j a_{ij} \quad (3.17)$$

$$b_m = \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^c z_i z_j b_{ij} \quad (3.18)$$

dove  $a_m$  e  $b_m$  sono i parametri riferiti alla miscela,  $z_i$  è la frazione molare del componente  $i$ ,  $z_j$  è la frazione molare del componente  $j$  e  $c$  rappresenta il numero dei componenti la miscela. Per quanto riguarda i termini  $a_{ij}$ , nelle relazioni 3.17 e 3.18 è adottata la convenzione secondo la quale, per  $i = j$  si ha:

$$a_{ii} = a_i; \quad a_{jj} = a_j; \quad b_{ii} = b_i; \quad b_{jj} = b_j \quad (3.19)$$

Invece, per  $i \neq j$  si assume:

$$a_{ij} = a_{ji} = \sqrt{a_i a_j} (1 - k_{ij}) \quad (3.20)$$

$$b_{ij} = b_{ji} = \frac{b_i + b_j}{2} (1 - \eta_{ij}) \quad (3.21)$$

dove  $k_{ij} = k_{ji}$  ed  $\eta_{ij} = \eta_{ji}$  sono dei parametri che vengono introdotti empiricamente per migliorare la rappresentazione delle proprietà volumetriche delle miscele. Tali parametri, detti *parametri di interazione binaria* sono riferiti, come si evince dalla relazione che li definisce, a tutti i sottosistemi a due componenti (*sottosistemi binari*) relativi alla miscela data, e vengono conseguentemente calcolati mediante la regressione di dati sperimentali relativi a tali sottosistemi binari. Tali parametri apportano, in sostanza, una correzione alla regola di mescolamento; possono assumere valori positivi o negativi e, in generale, non dovrebbero discostarsi troppo dal valore

nullo (ordine di grandezza: valore assoluto inferiore a 0.1, corrispondente ad una correzione del 10%) perchè altrimenti ciò sarebbe indice di una cattiva aderenza del modello al sistema che si vuole rappresentare. Inoltre, se l'equazione di stato considerata è in grado di fornire una buona rappresentazione delle proprietà volumetriche di tutti i componenti puri che costituiscono la miscela, tanto più i componenti  $i$  e  $j$  manifestano proprietà chimico-fisiche simili, tanto più tali parametri dovrebbero assumere valore prossimo a zero. In particolare, in questo lavoro si è assunto un valore nullo per tutti i parametri di interazione binaria relativi alle coppie di esteri etilici, data la similitudine delle loro proprietà chimico-fisiche. Questa approssimazione potrebbe essere poco accurata al crescere della differenza dimensionale fra le coppie di esteri: ad esempio, le differenti dimensioni dell'estere del C14 (A) e del C22 (B) potrebbe portare ad interazioni molecolari A-B modicamente differenti da quelle di tipo A-A e B-B. Tuttavia, la suddetta approssimazione è stata ritenuta sufficientemente accurata e sono stati dunque considerati esclusivamente i parametri di interazione binaria riferiti alle coppie anidride carbonica-estere.

L'utilizzo dell'equazione di stato di Peng-Robinson (con regole di mescolamento di van der Waals e due parametri di interazione binaria) nella relazione 3.9, conduce alla seguente espressione per i coefficienti di fugacità:

$$\ln \bar{\varphi}_i = \frac{C}{B} (Z - 1) - \ln(Z - B) - \frac{A}{2\sqrt{2}B} \left( \frac{D}{a_m} - \frac{C}{B} \right) \ln \frac{Z + (1 + \sqrt{2}) B}{Z + (1 - \sqrt{2}) B} \quad (3.22)$$

dove:

$$A = \frac{P a_m}{R^2 T^2} \quad (3.23)$$

$$B = \frac{P b_m}{RT} \quad (3.24)$$

$$C = \frac{2P}{RT} \sum_{j=1}^c z_j b_{ij} - B \quad (3.25)$$

$$D = 2 \sum_{j=1}^c z_j a_{ij} \quad (3.26)$$

e  $z_j$  è la frazione molare del componente  $j$  in miscela. Nell'Appendice A.2 sono riportati due programmi di calcolo per i coefficienti di fugacità di un sistema termodinamico omogeneo di composizione nota a pressione e temperatura fissate. Nello sviluppo dei programmi di calcolo, prima di applicare la relazione 3.22, è necessario calcolare il volume specifico del sistema, per poter valutare il fattore di compressibilità. Non essendo le equazioni di stato

cubiche esplicitabili rispetto al volume, il calcolo richiede la risoluzione di un polinomio di terzo grado. Nel caso si abbiano tre soluzioni reali maggiori di  $b_m$ , il programma denominato *CoeffFugacitaLiquidoPR* considera la soluzione di valore minimo mentre il programma *CoeffFugacitaVaporePR* considera la soluzione di valore massimo. Nel caso si abbia una singola soluzione reale i due programmi forniscono lo stesso risultato. Questi programmi sono stati utilizzati, nel corso di questo lavoro, come sottoprogrammi all'interno di codici di calcolo che verranno presentati in seguito.

### 3.8 Calcolo dei parametri critici e del fattore acentrico

L'applicazione dell'equazione di stato di Peng-Robinson richiede la conoscenza dei parametri critici e del fattore acentrico di tutti i componenti della miscela in esame. Per quanto riguarda la  $CO_2$ , questi parametri sono ricavabili da misure sperimentali e sono riportati, ad esempio, in [1]. Al contrario, non sono disponibili dati critici sperimentali per gli esteri etilici degli acidi grassi oggetto di interesse in questo lavoro, in quanto questi composti si decompongono a temperature inferiori al punto critico ed è quindi necessario ricorrere a metodi previsionali. Il calcolo dei parametri critici è stato effettuato mediante un metodo a contributi di gruppo esposto in [2]. Il fattore acentrico è stato successivamente determinato mediante un metodo proposto da Lee e Kesler, discusso in [3].

I parametri critici si determinano dalle relazioni [2]:

$$G_t = \frac{T_b}{T_c - T_b} \quad (3.27)$$

$$G_p = \left(\frac{M}{P_c}\right)^{1/2} \quad (3.28)$$

dove  $P_c$  è la pressione critica del fluido (espressa in bar),  $T_c$  e  $T_b$  sono, rispettivamente, la temperatura critica e la temperatura di ebollizione normale (K) e  $M$  è la massa molare ( $\text{g mol}^{-1}$ ) della specie in esame. I termini  $G_t$  e  $G_p$  vanno calcolati dalle relazioni:

$$G_t = 1.242 + 0.138N_t \quad (3.29)$$

$$G_p = 0.339 + 0.226N_p \quad [(\text{g mol}^{-1} \text{ bar}^{-1})^{1/2}] \quad (3.30)$$

dove  $N_t$  e  $N_p$  sono definiti come:

	$n_t$	$n_p$	$\Delta_b$	$C_i[K]$
$-CH_3$	1.000	1.000	23.58	188.555
$-CH_2-$	1.000	1.000	22.88	250.119
$-CH_2-$ (legato ad un $O$ )	-	-	-	278.135
$-COO-$ (estere)	2.400	2.080	81.10	697.228
$=CH-$	0.800	0.800	24.96	-
$-C=C-$	-	-	-	516.817

Tabella 3.8: Termini di contributo di gruppo per il calcolo dei parametri critici e della temperatura di ebollizione normale

$$N_t = \sum n_t \quad (3.31)$$

$$N_p = \sum n_p \quad (3.32)$$

ed i termini che compaiono nelle sommatorie sono i termini di contributo di gruppo. La tabella 3.8 mostra i contributi  $n_t$  e  $n_p$  per i gruppi presenti negli esteri etilici degli acidi grassi.

La tabella 3.9 mostra invece il numero di gruppi, suddivisi per tipo, che costituiscono gli esteri etilici degli acidi grassi oggetto di questo studio; riporta, inoltre, anche la massa molare degli esteri etilici di interesse.

L'applicazione delle relazioni esposte sopra consente di calcolare le pressioni critiche mentre, per calcolare la temperatura critica è necessario conoscere anche la temperatura di ebollizione normale delle specie in esame. Dal momento che in letteratura è reperibile esclusivamente un dato di temperatura di ebollizione normale (per l'EE-C14:0,  $T_b = 568.15$  K [4]), per tutti gli altri esteri etilici si rende necessario l'utilizzo di un metodo previsionale anche per la  $T_b$ . A tal fine e' stato utilizzato un metodo a contributo di gruppi

	EE-C14:0	EE-C16:0	EE-C18:0	EE-C18:1	EE-EPA	EE-DHA
$-CH_3$	2	2	2	2	2	
$-CH_2-$	13 (12)	15 (14)	17 (16)	15 (14)	9 (8)	9 (8)
$-CH_2-$ (legato ad un $O$ )	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
$-COO-$ (estere)	1	1	1	1	1	1
$=CH-$	0	0	0	2(0)	10 (0)	12 (0)
$-C=C-$	0	0	0	0 (1)	0 (5)	0 (6)
$M$ [g mol <sup>-1</sup> ]	256.43	284.48	312.54	310.52	330.51	356.55

Tabella 3.9: Gruppi costituenti gli esteri etilici da utilizzare per l'applicazione dei metodi a contributo di gruppo. I valori in parentesi tonda vanno utilizzati per l'applicazione del metodo di Cordes e Rarey

sviluppato da Cordes e Rarey e descritto in una recente pubblicazione [5]. Tale metodo si è rivelato più efficace dei metodi sviluppati in passato, ed è affidabile per una vasta gamma di composti organici, comprendente anche molecole con struttura e dimensioni sensibilmente diverse. La maggiore affidabilità è dimostrata dal confronto fra i valori predetti e quelli misurati sperimentalmente per numerosi composti per i quali la temperatura di ebollizione normale è nota. Le ragioni del miglioramento ottenuto da Cordes e Rarey vanno ricercate nell'utilizzo di un ampliato set di dati sperimentali su cui è stata effettuata la regressione per calcolare le costanti del modello, e nella frammentazione delle molecole in un numero maggiore di gruppi, al fine di valutare con più accuratezza l'effetto dei gruppi vicinali sul gruppo di cui si vuole calcolare il contributo. A fronte di questa aumentata accuratezza, questo metodo previsionale presenta una semplicità di applicazione comparabile con quella dei metodi presentati in passato. Il metodo di Cordes e Rarey pone:

$$T_b = \frac{\sum N_i C_i}{n^a + b} + c \quad (3.33)$$

dove  $a, b, c$  sono le costanti che derivano dall'ottimizzazione dei dati sperimentali,  $N_i$  è il numero di gruppi di tipo  $i$  (riportati nella tabella 3.9),  $C_i$  è il contributo del gruppo tipo  $i$  (valori riportati nella tabella 3.8), e  $n$  è il numero di atomi costituenti la molecola eccetto l'idrogeno. I valori da assegnare alle costanti sono:  $a = 0.6713$ ;  $b = 1.4442$ ;  $c = 59.344$  [K]. Il risultato ottenuto risulta espresso in K. Il calcolo di  $T_b$  per l'EE-C14:0 con questo metodo previsionale è particolarmente importante perchè consente di fare un confronto con l'unico valore sperimentale disponibile per la classe degli esteri etilici di acidi grassi di interesse in questo lavoro, consentendo quindi di avere un'indicazione sull'affidabilità del metodo per questa particolare classe di sostanze. Il valore previsto è  $T_b = 577.4$  K, che differisce di meno del 2% dal valore sperimentale riportato in precedenza. Al fine di utilizzare una omogenea rappresentazione termodinamica per tutti i componenti la miscela di esteri, il valore di  $T_b$  ottenuto con il metodo previsionale è stato adottato anche per l'EE-C14:0.

Sebbene in letteratura siano riportati alcuni valori di fattore acentrico per la  $CO_2$  che differiscono gli uni dagli altri, è stato osservato che il valore più corretto da utilizzare, quando si usi l'equazione di stato di Peng-Robinson, è 0.225 in quanto tale valore fu utilizzato da Peng e Robinson nel realizzare la correlazione di dati di tensione di vapore che ha portato alla determinazione dei parametri presenti nell'equazione stessa [3]. I valori da assegnare al fattore acentrico per gli esteri etilici sono stati calcolati applicando il metodo di Lee-Kesler [3]:

$$\omega = \frac{-\ln P_c - 5.92714 + 6.09648 \theta^{-1} + 1.28862 \ln \theta - 0.169347 \theta^6}{15.2518 - 15.6875 \theta^{-1} - 13.4721 \ln \theta + 0.43577 \theta^6} \quad (3.34)$$

dove  $\theta = T_b/T_c$  e  $P_c$  va espressa in atmosfere.

In definitiva, i valori utilizzati nella modellizzazione, sperimentali per la  $CO_2$  e calcolati per gli esteri etilici, sono riportati, unitamente con la massa molare, nella tabella 3.10.

	$P_c$ [MPa]	$T_c$ [K]	$\omega$	$T_b$ [K]	$M$ [g mol <sup>-1</sup> ]
EE-C14:0	1.454	735.8	0.855	577.4	256.43
EE-C16:0	1.315	757.9	0.928	603.8	284.48
EE-C18:0	1.200	778.2	0.998	628.4	312.54
EE-C18:1	1.236	782.4	0.994	630.2	310.52
EE-EPA	1.269	817.1	1.046	659.8	330.51
EE-DHA	1.194	837.3	1.108	682.7	356.55
$CO_2$	7.376	304.2	0.225	194.7	44.01

Tabella 3.10: Valori dei parametri utilizzati nella modellizzazione

### 3.9 Equilibrio di fase dei sottosistemi binari

L'affidabilità del modello termodinamico presentato nel paragrafo 3.7, unitamente ai metodi previsionali presentati nel paragrafo 3.8, è stata preliminarmente verificata su alcuni dati sperimentali di equilibrio di fase riportati in letteratura. Tali dati sperimentali sono relativi a sistemi binari di tipo anidride carbonica-estere etilico e riportano i valori di composizione delle fasi in equilibrio (o quantomeno di una delle due fasi) a diversi valori di pressione e temperatura. Una tale verifica è importante in quanto rappresenta la condizione necessaria affinché il modello possa dare una descrizione affidabile dell'equilibrio di fase relativo al sistema multicomponente. Inoltre, la regressione di questi dati sperimentali consente di valutare i valori ottimali dei parametri di interazione binaria. Questi vengono calcolati in modo tale da minimizzare la funzione dello scarto quadratico totale che, ad esempio, può essere definita come:

$$\Phi = \sum_{k=1}^{N_V} (y_k^{sp} - y_k^{calc})^2 + \sum_{m=1}^{N_L} (x_k^{sp} - x_k^{calc})^2 \quad (3.35)$$

dove  $N_V$  è il numero di punti sperimentali riferiti alla fase supercritica,  $N_L$  è il numero di punti sperimentali riferiti alla fase liquida,  $y^{sp}$  e  $y^{calc}$  sono le frazioni molari della fase supercritica sperimentali e calcolate rispettivamente,  $x^{sp}$  e  $x^{calc}$  sono le analoghe grandezze relative alla fase liquida. Il calcolo delle composizioni di equilibrio è stato effettuato sviluppando un programma denominato *FlashPR* e riportato, insieme con un commento esplicativo, nell'Appendice A.3. Il programma *FlashPR* è stato sviluppato seguendo un algoritmo di calcolo proposto in [1]. Le figure da 3.19 a 3.23 mostrano il confronto grafico fra dati sperimentali e valori calcolati con il modello. Il confronto è stato effettuato nell'intervallo di temperatura da 40 a 60°C. I dati sperimentali relativi ai componenti EE-C14:0 ed EE-C16:0 sono stati presi dal lavoro [6]; quelli relativi ai componenti EE-C18:0 (non mostrati nelle figure), EE-C18:1 e EE-DHA sono stati presi da [7]; infine, quelli relativi all'EE-EPA sono stati presi da [8]. La costruzione delle curve è stata effettuata utilizzando ripetutamente, per ogni temperatura, il programma *FlashPR* a vari valori di pressione e riportando la pressione di equilibrio in funzione delle composizioni della fase liquida e supercritica. Le curve mostrate nelle figure sono relative ai valori dei parametri di interazione binaria ottimali che sono riportati nella tabella 3.11. Come si può vedere, il modello fornisce una buona previsione dei dati di equilibrio sperimentali, in special modo per valori di pressione nè troppo bassi nè prossimi al *punto doppio*. Per *punto doppio* si intende il punto del diagramma isoterma che corrisponde a fasi coesistenti all'equilibrio di uguale composizione e compressibilità, ovvero con fasi all'equilibrio che degenerano in un'unica fase. Inoltre, bisogna rilevare che, tanto più ci si avvicina al *punto doppio*, tanto maggiore diviene il tempo computazionale necessario per arrivare a convergenza nella risoluzione del sistema di equazioni dell'isofugacità; per questo motivo, le curve calcolate non si chiudono in corrispondenza di tale punto. Bisogna altresì rilevare che tale zona è anche quella più difficile da studiare sperimentalmente e quindi non sempre si hanno informazioni sufficienti sulle quali validare il modello. Dal-

Estere	$\kappa$	$\eta$
EE-C14:0	0.057	0.000
EE-C16:0	0.056	0.030
EE-C18:0	0.051	0.067
EE-C18:1	0.054	0.030
EE-EPA	0.047	0.020
EE-DHA	0.050	0.012

Tabella 3.11: Parametri di interazione binaria  $CO_2$ -esteri

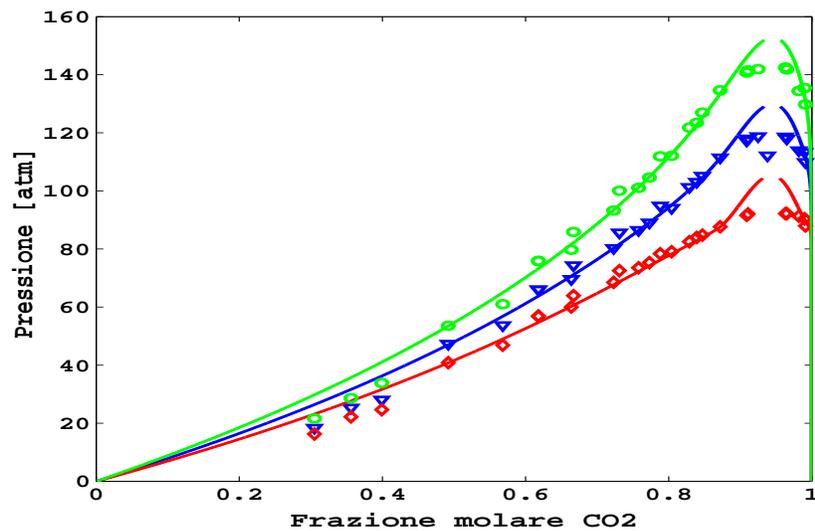


Figura 3.19: Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO<sub>2</sub>-EE-C14:0. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  40°C;  $\nabla$  50°C;  $\circ$  60°C)

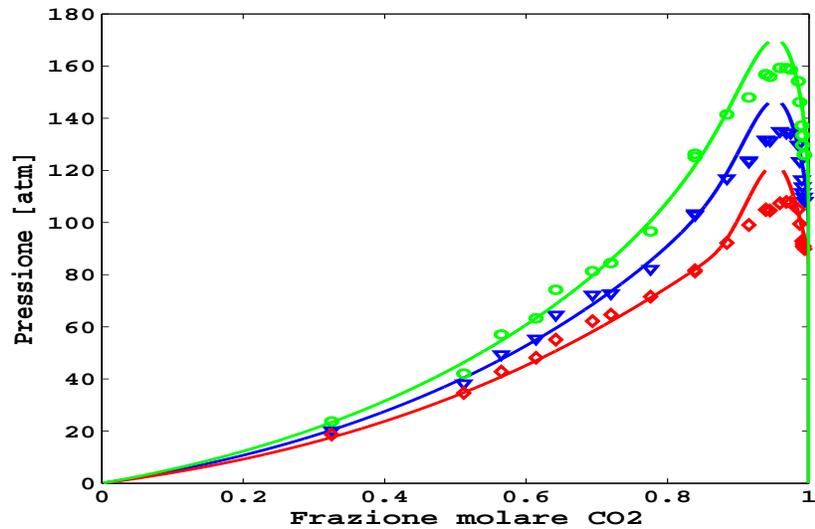


Figura 3.20: Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO<sub>2</sub>-EE-C16:0. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  40°C;  $\nabla$  50°C;  $\circ$  60°C)

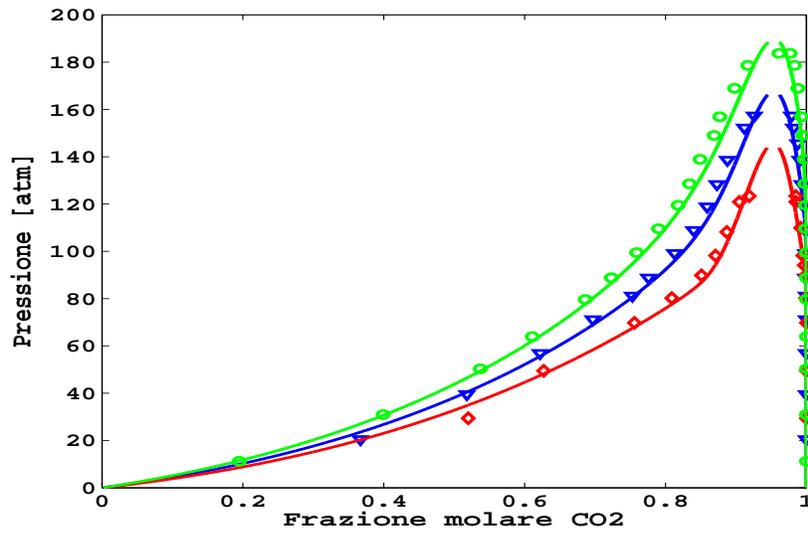


Figura 3.21: Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO<sub>2</sub>-EE-C18:1. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  40<sup>0</sup>C;  $\nabla$  50<sup>0</sup>C;  $\circ$  60<sup>0</sup>C)

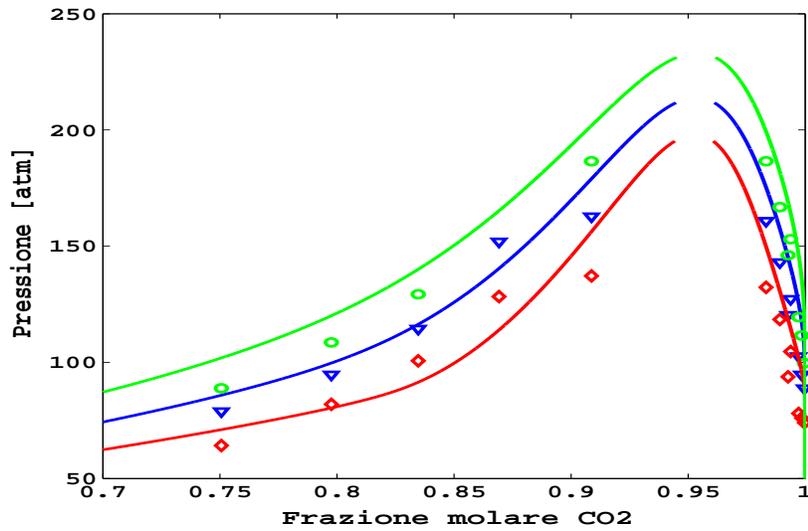


Figura 3.22: Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO<sub>2</sub>-EE-EPA. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  40<sup>0</sup>C;  $\nabla$  50<sup>0</sup>C;  $\circ$  60<sup>0</sup>C)

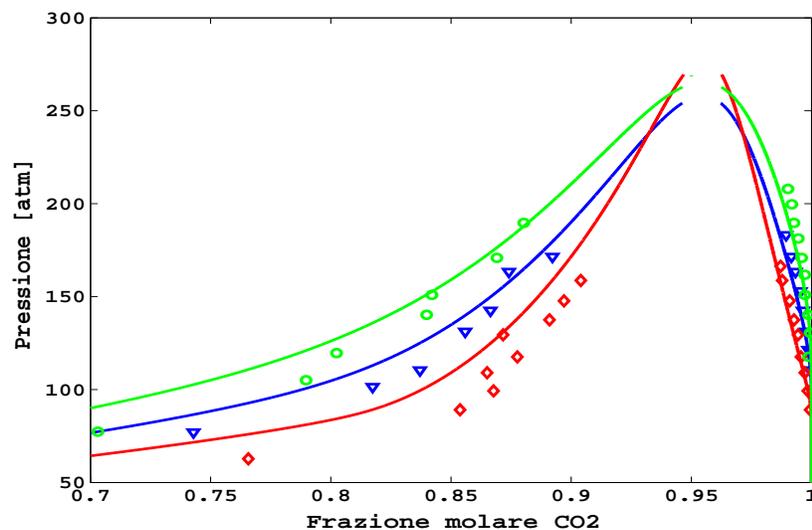


Figura 3.23: Diagramma di equilibrio per il sistema binario CO<sub>2</sub>-EE-DHA. Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  40<sup>0</sup>C;  $\nabla$  50<sup>0</sup>C;  $\circ$  60<sup>0</sup>C)

l'analisi dei grafici sembra che il modello mostri una tendenza a sovrastimare il valore massimo della pressione e che questa sovrastima sia più evidente alla temperatura più bassa. Ad ogni modo è necessario sottolineare che, dal punto di vista pratico, le regioni inferiori alle 80 atm e quelle prossime al *punto doppio* non sono di interesse nello studio dei processi di separazione in quanto, nel primo caso la solubilità degli esteri nella fase supercritica è bassissima mentre nel secondo caso si è eccessivamente prossimi alla zona di omogeneità e quindi si ha una selettività circa unitaria. Inoltre, come si può vedere dalle figure, per tutti i sistemi binari considerati si ha, negli intervalli di interesse per la pressione, un'ottima stima della composizione della fase supercritica, che rappresenta il parametro di maggior importanza per modellizzare correttamente la solubilità dell'olio nel solvente.

### 3.10 Modellizzazione del processo di estrazione semicontinuo a singolo stadio

La figura 3.24 mostra lo schema simbolico del processo di estrazione semicontinuo a singolo stadio di equilibrio la cui realizzazione sperimentale è stata dettagliatamente descritta nel paragrafo 4.4. Una portata  $F_{in}$  di anidride carbonica pura, in condizioni di temperatura e pressione note e pari a quelle

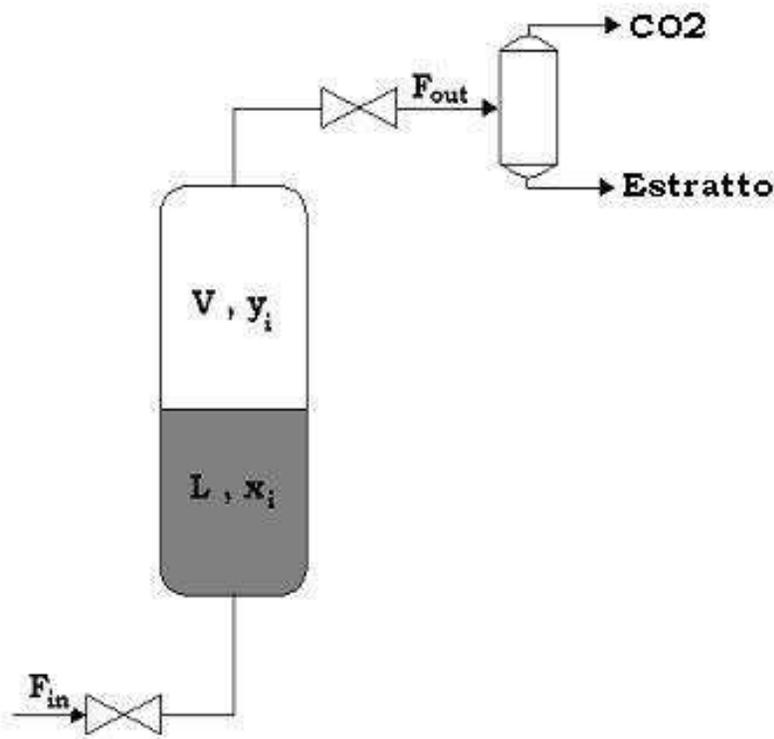


Figura 3.24: Schema simbolico del processo di estrazione semicontinuo a singolo stadio di equilibrio

cui si trova l'estrattore, entra dal fondo dell'apparecchiatura all'interno della quale viene a contatto con la miscela di esteri etilici (l'olio) precedentemente caricata. Se le condizioni di pressione e temperatura sono opportune, all'interno dell'estattore si formano due fasi distinte, una ricca in solvente (fase  $V$ , di composizione  $\bar{y}$ ) e l'altra ricca in olio (fase  $L$ , di composizione  $\bar{x}$ ). Dalla testa dell'apparecchiatura esce una portata di fase supercritica  $F_{out}$  che, a valle di un'espansione in valvola fino alla pressione di  $1 \text{ atm}$ , va in un separatore (supposto ideale) dal fondo del quale si raccoglie l'olio (*estratto*) privo di solvente mentre dalla testa esce una portata di  $CO_2$  pura. L'ipotesi di separazione ideale è realistica in quanto alla pressione di  $1 \text{ atm}$  la solubilità dell'anidride carbonica nella miscela liquida di esteri è praticamente nulla, ed in quanto gli esteri che si perdono con la fase gassosa sono molto pochi data la loro scarsa volatilità. Le altre ipotesi che sono state effettuate per modellizzare il processo sono:

- condizioni di mescolamento perfetto all'interno di entrambe le fasi. In

Classe	Componente rappresentativo
EE-C14	EE-C14:0
EE-C16	EE-C16:0
EE-C18	EE-C18:0
EE-C20	EE-EPA
EE-C22	EE-DHA

Tabella 3.12: Componenti rappresentativi delle singole classi

particolare, questa ipotesi comporta che la composizione della fase supercritica uscente dalla testa dell'estrattore sia uguale a quella della fase supercritica interna all'estrattore.

- le due fasi sono considerate in ogni istante in condizioni di equilibrio.

Queste ipotesi consentono di mettere in relazione la composizione delle due fasi mediante le condizioni di isofugacità, che sono state espresse nel paragrafo 3.7. Coerentemente con quanto stabilito nella messa a punto della procedura analitica, il sistema è stato considerato a 6 componenti (5 derivanti dall'accorpamento degli esteri etilici in base alla lunghezza della catena, più il solvente); ogni classe di esteri è stata rappresentata, dal punto di vista termodinamico, da un unico componente di proprietà uguali a quelle del componente maggiormente presente in quella classe. La tabella 3.12 riassume tale schematizzazione.

La modellizzazione del processo ha richiesto, prima di tutto, il calcolo dello stato del sistema a valle della fase di pressurizzazione dell'apparecchiatura. Il problema consiste nel calcolo della composizione e della quantità delle due fasi in equilibrio, in un sistema di volume noto ( $V_{app}$ , pari al volume disponibile per il fluido) a pressione e temperature fissate; le altre grandezze note sono le quantità dei singoli esteri globalmente presenti nelle due fasi, in quanto è nota la quantità e la composizione dell'olio caricato nell'estrattore. Questo problema si risolve mediante la risoluzione di un sistema di equazioni comprendenti:

- equazioni di bilancio di materia

$$N_i^0 = L x_i + V y_i \quad i = 1, \dots, 6 \quad (3.36)$$

dove  $N_i^0$  rappresenta le moli di componente  $i$  presenti globalmente nell'estrattore,  $L$  e  $V$  sono le moli totali della fase liquida e della fase vapore rispettivamente,  $x_i$  e  $y_i$  indicano la frazione molare del componente  $i$  nelle due fasi in equilibrio.

- condizioni di equilibrio di fase

$$y_i = \frac{\bar{\varphi}_i^L(P, T, \vec{x})}{\bar{\varphi}_i^V(P, T, \vec{y})} x_i \quad i = 1, \dots, 6 \quad (3.37)$$

- condizioni di congruenza

$$\sum_{i=1}^6 x_i = 1; \quad \sum_{i=1}^6 y_i = 1; \quad (3.38)$$

- equazione di stato

$$f(P, T, \widehat{V}_L, \vec{x}) = 0 \quad (3.39)$$

$$f(P, T, \widehat{V}_V, \vec{y}) = 0 \quad (3.40)$$

- condizione sul volume dell'apparecchiatura

$$V_{app} = L \widehat{V}_L + V \widehat{V}_V \quad (3.41)$$

Nel complesso si tratta di un sistema di 17 equazioni indipendenti nelle 17 incognite:  $x_i$  ( $i = 1..6$ ),  $y_i$  ( $i = 1..6$ ),  $L$ ,  $V$ ,  $N_1^0$  (designando con il numero 1 l'anidride carbonica),  $\widehat{V}_L$  e  $\widehat{V}_V$ . Questo sistema algebrico di equazioni è stato risolto implementando un procedimento iterativo mediante un programma di calcolo denominato *CondizioniIniziali* riportato nell'appendice A.4.

Una volta determinate le condizioni iniziali, ovvero lo stato del sistema dopo la fase di pressurizzazione e prima che il solvente cominci a fluire, è possibile procedere alla modellizzazione del processo di frazionamento vero e proprio. L'obiettivo di tale modello è quello di fornire, nota la portata di solvente misurata a valle del separatore, la pressione e la temperatura del sistema, l'andamento nel tempo delle composizioni delle due fasi e della portata di olio estratta dall'apparecchiatura. A tal fine vengono imposte le equazioni di bilancio di materia globali (ovvero riferite al sistema estrattore) per tutti i componenti del sistema. Per l'anidride carbonica (componente 1) si ha:

$$\frac{dN_1}{dt} = F_{in} - F_{out} y_1 \quad (3.42)$$

dove si è tenuto conto che la corrente di ingresso  $F_{in}$  è costituita da anidride carbonica pura. Per quanto riguarda i componenti dell'olio (gli esteri etilici) si può scrivere, tenendo conto che non c'è termine di ingresso nell'apparecchiatura:

$$\frac{dN_i}{dt} = -F_{out} y_i \quad i = 2, \dots, 6 \quad (3.43)$$

La portata uscente dall'estrattore è calcolabile a partire dalla conoscenza della portata di solvente uscente dal separatore ( $a$ , misurata sperimentalmente) mediante la relazione:

$$F_{out} y_1 = a \quad (3.44)$$

Questo sistema di equazioni differenziali ordinarie è stato risolto adottando il seguente algoritmo di calcolo:

1. calcolo delle condizioni iniziali mediante il programma *CondizioniIniziali* precedentemente descritto
2. calcolo delle derivate relative ai bilanci degli esteri etilici, effettuato sfruttando la conoscenza dei termini a secondo membro relativi al passo temporale precedente (al primo passo di integrazione, i dati relativi al passo precedente corrispondono alle condizioni iniziali). In questo passo dell'algoritmo si approssimano le derivate con le rispettive differenze finite (*metodo di Eulero esplicito*) e si calcolano le quantità dei singoli componenti dell'olio aggiornate al nodo temporale successivo ( $t = 1 \Delta t$ ).
3. riapplica il programma *CondizioniIniziali* che calcola le moli di anidride carbonica presenti nell'apparecchiatura e le composizioni aggiornate delle fasi in equilibrio al nodo temporale successivo
4. utilizza l'equazione di bilancio dell'anidride carbonica per calcolare la portata  $F_{in}$  relativa al passo di integrazione attuale passo temporale
5. ricomincia dal punto 2.

L'algoritmo di calcolo si arresta quando si arriva al tempo di fine prova sperimentale ( $t_{max}$ ) oppure quando non c'è più equilibrio di fase all'interno dell'apparecchiatura, ovvero si forma un'unica fase omogenea. Questo algoritmo è stato implementato ed il codice di calcolo, denominato programma *Dinamico* è riportato nell'appendice A.5.

Il programma *Dinamico* è stato preliminarmente testato nelle condizioni di pressione, temperatura e volume coincidenti con quelle sperimentali utilizzando diversi passi temporali di integrazione. E' stato rilevato che per passi temporali inferiori a 10 minuti, non si avevano apprezzabili variazioni fra soluzioni ottenute con diversi passi temporali. Inoltre, per migliorare l'accordo fra i dati calcolati e quelli sperimentali alle diverse temperature, è stato consentito ai parametri di interazione binaria  $\kappa_{1j}$  di variare linearmente con la temperatura. Le equazioni di primo grado che forniscono i parametri di interazione binaria  $\kappa_{1j}(T)$  sono state ricavate dall'ottimizzazione dei dati

Parametro	EE-C14:0	EE-C16:0	EE-C18:0	EE-EPA	EE-DHA
$\alpha_{1j}$	0.057	-0.542	-0.521	-0.359	-0.546
$\beta_{1j}$	0.000	0.00185	0.00177	0.00127	0.00186
$\eta_{1j}$	0.000	0.030	0.067	0.020	0.012

Tabella 3.13: Parametri di interazione binaria utilizzati nella modellizzazione del processo semicontinuo a singolo stadio di equilibrio. I parametri  $\kappa_{1j}$  si calcolano dalla relazione:  $\kappa_{1j} = \alpha_{1j} + \beta_{1j} T$ , dove  $T$  è la temperatura espressa in kelvin.

sperimentali di frazionamento semicontinuo ottenuti in questo lavoro. I valori di  $\kappa_{1j}$  ottenuti dalla regressione dei dati sperimentali binari sono stati comunque utilizzati, in quanto i valori ottimali di  $\kappa_{1j}$  alle diverse temperature sono stati cercati nell'intorno di tali valori. I valori di  $\eta_{1j}$ , invece, sono stati mantenuti pari a quelli calcolati dalla regressione dei dati dei sottosistemi binari. In definitiva, i valori dei parametri di interazione binaria utilizzati nella modellizzazione del processo semicontinuo a singolo stadio di equilibrio riferito alla miscela multicomponente sono riportati nella tabella 3.13.

Il confronto fra i dati sperimentali ed i valori calcolati con la modellizzazione è riportato nelle figure da 3.3 a 3.18. Le linee continue, riferite alle simulazioni, si arrestano quando il modello prevede la presenza di una fase omogenea all'interno dell'estrattore. Ciò è comprovato dal fatto che, negli istanti di tempo immediatamente precedenti, si hanno valori di composizione del vapore sempre più prossimi ai valori di composizione globale all'interno dell'estrattore (e quindi sempre più prossimi a quelli della fase liquida) e ciò indica che il sistema sta avvicinandosi alle condizioni di omogeneità. Nelle prove a pressione più elevata, per ogni fissata temperatura, il modello correttamente prevede che le condizioni di omogeneità vengano raggiunte a valori bassi del tempo; in effetti, come si può vedere dalla tabella 3.7, in tali condizioni operative la selettività media è prossima ad 1 e ciò consente di ritenere che anche nelle prove sperimentali si sia verificata la formazione di una fase omogenea a bassi valori del grado di avanzamento. In particolare, nella prova a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$  il modello prevede la presenza di una fase omogenea sin dall'istante iniziale. In effetti, anche i risultati sperimentali in quelle condizioni operative mostrano un'assenza di separazione, se non dall'inizio della prova, quantomeno da valori del grado di avanzamento molto bassi (cfr. figura 3.8). Come si può vedere dalle figure da 3.3 a 3.5, il modello prevede con esattezza la solubilità dell'olio al variare della pressione e della temperatura, con l'unica eccezione rappresentata dalla prova nelle condizioni più prossime al punto critico del solvente, ovvero a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $90\text{ atm}$ , riguardo alla quale il modello

sottostima la solubilità di circa il 50 %. Per quanto riguarda la composizione della fase supercritica, il modello fornisce un'ottima stima della composizione su base priva di solvente, ovvero, in altri termini, prevede correttamente la solubilità relativa dei diversi esteri etilici. In particolare, come si può vedere dalle figure da 3.7 a 3.14, la rappresentazione dell'andamento di tale composizione in funzione del grado di avanzamento è eccellente. L'unica eccezione si ha, anche in questo caso, a 42°C e 90 atm (cfr. figura 3.6), condizioni nelle quali il modello prevede una maggiore presenza di componenti leggeri nella fase supercritica. Nel complesso, l'ottima rappresentazione della solubilità relativa dei diversi esteri etilici è un'ulteriore prova dell'affidabilità dei metodi previsionali descritti nel paragrafo 3.8 e sembra indicare che l'assunzione di parametri di interazione binaria nulli per le coppie estere–estere sia valida. Come conseguenza della corretta rappresentazione della fase supercritica, si ha anche un'ottima previsione della composizione all'interno dell'estrattore (cfr. figure da 3.15 a 3.18). Queste considerazioni inerenti le composizioni delle fasi in equilibrio sono quantificate e riassunte dai dati di selettività riportati nella tabella 3.7.

### 3.11 Conclusioni

Le prove sperimentali descritte in questo capitolo hanno dimostrato che l'anidride carbonica in condizioni supercritiche è un solvente in grado di frazionare gli esteri etilici di acidi grassi a catena lunga, sulla base delle differenze nella lunghezza della catena. L'analisi dei dati ha messo in luce l'estrema variabilità nei risultati ottenibili dal processo al variare della pressione e della temperatura. Tale variabilità è connessa con la forte dipendenza della densità del solvente supercritico dalla pressione e dalla temperatura. Le condizioni corrispondenti a densità elevata (bassa temperatura, alta pressione) danno luogo ad elevata solubilità ma scarsa selettività; viceversa, le condizioni caratterizzate da bassa densità del solvente (alta temperatura, bassa pressione) conducono a buoni valori di selettività che però sono accompagnati da scarsa solubilità. Il miglior compromesso fra selettività e solubilità è stato individuato relativamente a valori di densità del solvente pari a 550 – 570 kg/m<sup>3</sup>, corrispondenti alle seguenti coppie pressione–temperatura: (42°C, 100 atm), (50°C, 120 atm), (60°C, 140 atm). Tuttavia, in queste condizioni operative l'arricchimento che si riesce ad ottenere con un processo a singolo stadio di equilibrio è modesto (in termini di componenti pesanti: dal 44 % al 60 % circa) e, inoltre, il recupero di questi componenti pregiati è basso in quanto una quota non trascurabile è solubilizzata dal solvente insieme ai componenti più leggeri. I successivi sviluppi devono quindi essere rivolti alla messa a punto

di un processo a più stadi di equilibrio, che preveda l'adozione di un riflusso dell'olio estratto.

Per quanto riguarda la modellizzazione, è stato dimostrato che il modello termodinamico proposto, basato sull'equazione di stato di Peng–Robinson, è in grado di descrivere il processo in un intervallo di valori di pressione e temperatura abbastanza ampio. L'affidabilità del modello, verificata su di un sistema sintetico, caratterizzato da un numero relativamente basso di componenti, dovrà essere messa alla prova sulla matrice naturale derivante dalla transesterificazione dell'olio di pesce.

# Bibliografia

- [1] S.I. Sandler, *Chemical and Engineering Thermodynamics*, Third Edition, John Wiley and Sons, Inc., 1999.
- [2] G. Raam Somayajulu, Estimation Procedures for Critical Constants, J. Chem. Eng. Data 34 (1989) 106–120.
- [3] R.C. Reid, J.M. Prausnitz, B.E. Poling, *The Properties of Gases and Liquids*, Fourth Edition, Mc Graw-Hill International Editions, 1988.
- [4] CRC Handbook of Data on Organic Compounds, R.C. Weast, M.J. Astle (eds.), CRC Press, inc., Boca Raton, Florida, 1985.
- [5] W. Cordes, J. Rarey, A new method for the estimation of the normal boiling point of non-electrolyte organic compounds, Fluid Phase Equilibria 201 (2002) 409–433.
- [6] C. Crampon, G. Charbit, E. Neau, High pressure apparatus for phase equilibria studies: solubility of fatty acids esters in supercritical  $CO_2$ , Journal of Supercritical Fluids 16 (1999) 11–20.
- [7] R. Bharath, H. Inomata, K. Arai, K. Shoji, Y. Noguchi, Vapor–liquid equilibria for binary mixtures of carbon dioxide and fatty acids ethyl esters, Fluid Phase Equilibria 50 (1989) 315–327.
- [8] J.N. Jaubert, P. Borg, L. Coniglio, D. Barth, Phase equilibria measurements and modelling of EPA and DHA ethyl esters in supercritical carbon dioxide, Journal of Supercritical Fluids 20 (2001) 145–155.

# Capitolo 4

## Frazionamento dell'olio naturale

### 4.1 Introduzione

In questo capitolo viene descritta la seconda parte del lavoro sperimentale, che consiste nello studio del frazionamento, mediante anidride carbonica supercritica come solvente, di una miscela di esteri etilici di acidi grassi derivata dalla transesterificazione di una miscela di oli di pesce. Questo lavoro ha richiesto un'accurato studio preliminare volto alla caratterizzazione analitica della matrice naturale, ovvero al riconoscimento dei numerosi composti presenti nella miscela ed alla corretta interpretazione dei risultati delle analisi gascromatografiche. Le prove sperimentali di frazionamento che sono state realizzate, sono di due tipi: prove a singolo stadio di equilibrio, concettualmente analoghe a quelle descritte nel Capitolo 3, e prove multistadio controcorrente realizzate caricando una specificata quantità di olio nel fondo di una colonna, inviando in continuo il solvente dal fondo della colonna stessa e riflussando parte dell'olio estratto dalla testa della colonna. Un riempimento strutturato ad alta efficienza garantisce un'elevata superficie di contatto fra le fasi. I risultati degli esperimenti a singolo stadio di equilibrio hanno consentito di individuare i valori di pressione e di temperatura più idonei in vista della realizzazione delle prove sperimentali con riflusso. Queste ultime prove hanno invece consentito di valutare il miglioramento ottenibile, in termini di frazionamento fra componenti leggeri (EE-C14+EE-C16+EE-C18) e pesanti (EE-C20+EE-C22), mediante l'adozione del riflusso. Inoltre, i dati sperimentali ottenuti nella prove a singolo stadio di equilibrio sono stati utilizzati per verificare se il modello proposto nel Capitolo 3, che ha fornito buoni risultati nella modellizzazione della miscela sintetica, confermi la sua affidabilità nei confronti della matrice naturale, composta da alcune decine di componenti. Tale modello è stato quindi applicato per simulare l'andamento delle prove

multistadio controcorrente: il confronto con i dati sperimentali ha permesso di valutare le potenzialità del modello proposto ed ha consentito di ricavare una stima dell'altezza equivalente allo stadio teorico (HETP) per il sistema in esame.

## 4.2 Materiali della sperimentazione

### 4.2.1 Caratterizzazione della matrice naturale

La miscela naturale utilizzata come alimentazione del processo di frazionamento è stata acquistata dalla K.D.-Pharma. Si tratta di una miscela di esteri etilici ottenuta dalla transesterificazione con etanolo di una miscela di oli di sardina, acciuga e sgombro. Queste specie di olio di pesce sono particolarmente adatte per la produzione di miscele ricche in EPA e DHA mediante processi di frazionamento che presentino selettività in base alla lunghezza della catena, in quanto presentano dei rapporti EPA/EE-C20, DHA/EE-C22 elevati. L'olio è stato stoccato a temperatura ambiente, in atmosfera inerte (argon) e al riparo dalla luce. Alcuni campioni di esso sono stati sottoposti ad analisi gascromatografica utilizzando la procedura descritta nel Paragrafo 3.5. La figura 4.1 mostra un tipico tracciato gascromatografico dell'olio di alimentazione. Nel tracciato sono individuabili più di trenta componenti che appaiono, a meno di poche eccezioni, suddivisi in gruppi ben spaziati fra loro. Escludendo un numero limitato di composti principali, il cui riconoscimento è stato fornito dalla ditta produttrice, per riconoscere il maggior numero possibile degli altri componenti costituenti l'olio è stato necessario ricorrere alla *spettrometria di massa* (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector – 6850 Series GC System). Gli spettri rilevati sono stati confrontati con la libreria degli spettri di massa del NIST (National Institute of Standards Technology). Le figure da 4.2 a 4.5 mostrano, a titolo di esempio, il riconoscimento di quattro fra i più rilevanti composti presenti nella classe EE-C20 fra quelli non riconosciuti dalla ditta produttrice. Complessivamente, tutti i composti identificati con certezza corrispondono a circa l'80 % del totale dei componenti dell'olio. Per tutti i composti identificati è stato possibile rilevare che tutti quelli aventi stessa lunghezza della catena cadono, nel tracciato gascromatografico, nello stesso raggruppamento di picchi. È stato inoltre possibile rilevare che, di ogni gruppo, i composti a tempo di ritenzione più basso sono gli esteri di acidi polinsaturi, seguiti dai monoinsaturi e dai saturi. Inoltre, i componenti relativi a quei picchi appartenenti al 20 % non identificato con certezza, nel processo di separazione si comportavano in modo assolutamente analogo agli altri componenti dello stesso gruppo.

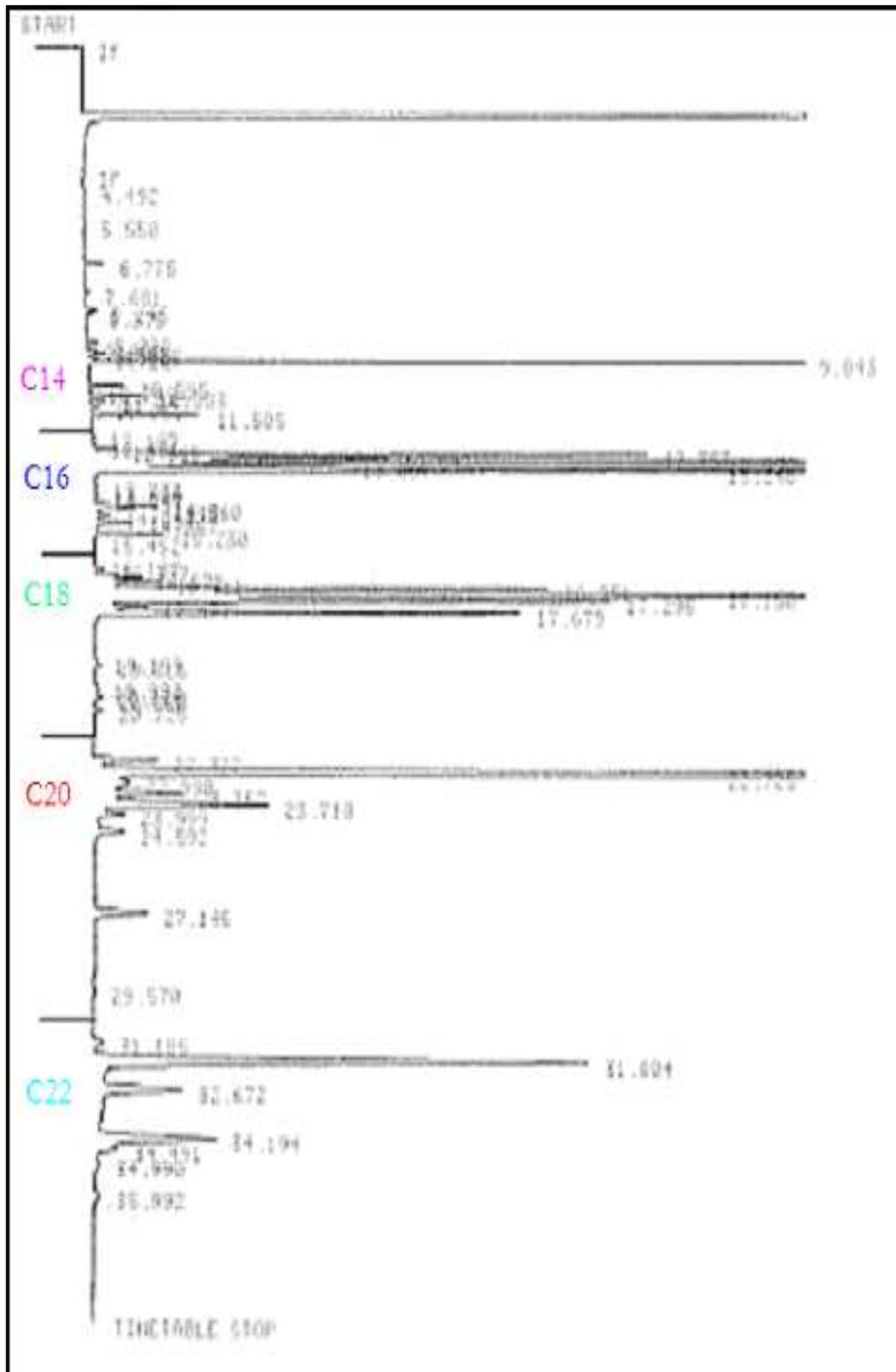
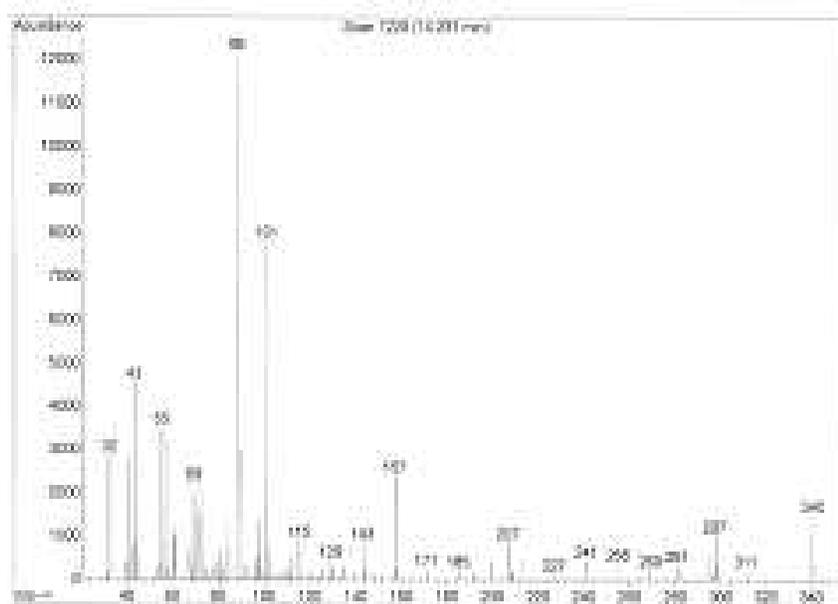
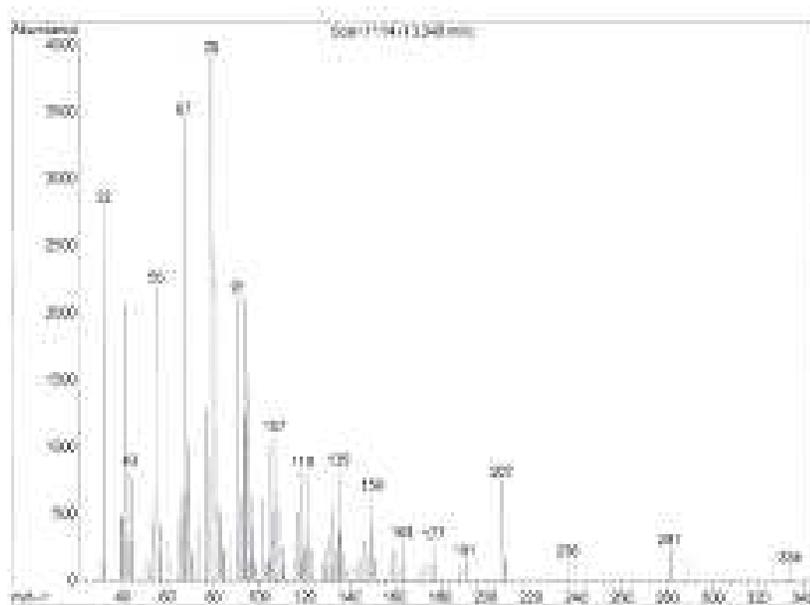
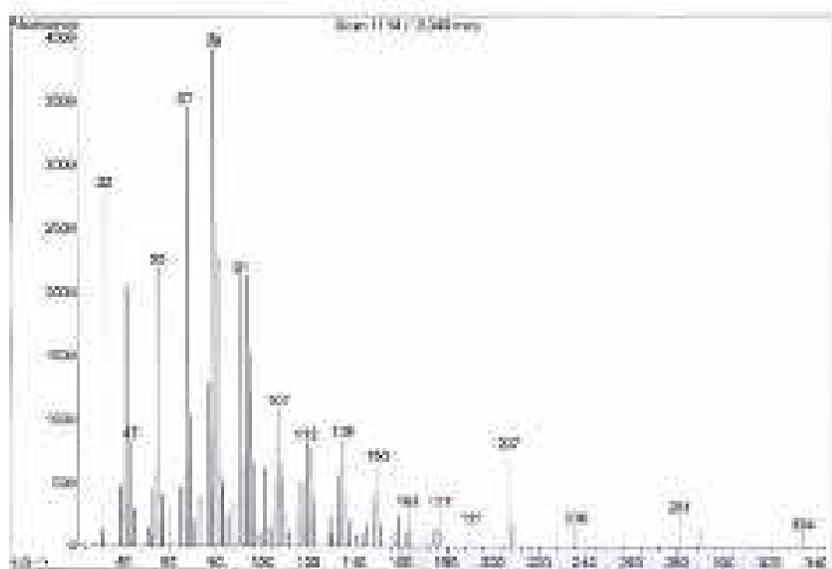
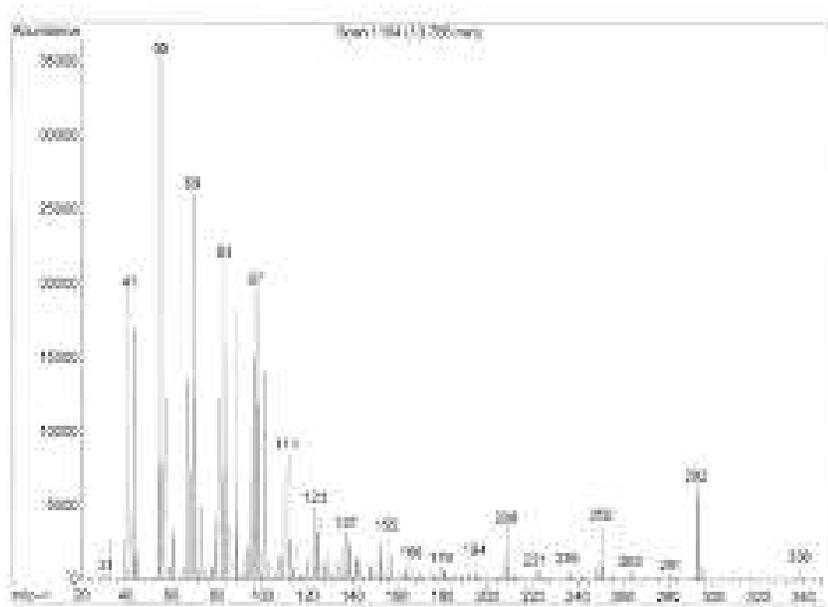


Figura 4.1: Tipico tracciato gascromatografico dell'olio naturale utilizzato come alimentazione

Figura 4.2: Spettro di massa del C<sub>20:0</sub>Figura 4.3: Spettro di massa del C<sub>20:1</sub> ω<sub>9</sub>

Figura 4.4: Spettro di massa del C<sub>20:3</sub> ω<sub>7</sub>Figura 4.5: Spettro di massa del C<sub>20:4</sub> ω<sub>6</sub>

C14	C16	C18	C20	C22
$9.4 \pm 0.2$	$34.0 \pm 0.5$	$18.7 \pm 0.1$	$25.1 \pm 0.4$	$12.8 \pm 0.2$

Tabella 4.1: Composizione gascromatografica dell'alimentazione naturale

Tutte queste osservazioni hanno fatto ritenere che, con ogni probabilità, ogni gruppo di picchi fosse caratteristico di una specifica lunghezza di catena. Di conseguenza, la risposta del gascromatografo è stata interpretata accorpando tutti i composti appartenenti ad uno stesso gruppo e riportando i risultati in termini di percentuali per le varie classi (EE-C14, EE-C16, EE-C18, EE-C20, EE-C22). La figura 4.1 mostra anche, oltre al tracciato gascromatografico, l'individuazione delle diverse classi di composti e l'intervallo caratteristico dei tempi di ritenzione corrispondenti. La spettrometria di massa ha consentito di riconoscere anche gli esteri di acidi grassi con una catena caratterizzata da un numero dispari di atomi di carbonio: EE-C15:0, EE-C17:0 e EE-C21:0. Questi composti, che nel complesso costituiscono all'incirca l'1.5 % dell'olio, sono stati accorpati con la classe corrispondente ad un numero pari di atomi di carbonio immediatamente inferiore. Infine, alcuni composti presenti in piccola quantità (meno dell'1 % complessivo), appartenenti alla classe degli esteri di acidi grassi C24, sono stati trascurati ed i risultati sono stati considerati "normalizzando a 100" sugli esteri da EE-C14 a EE-C22. La procedura proposta è stata applicata sulla miscela di alimentazione. La tabella 4.1 riporta i risultati (in termini di valori medi e deviazione standard) ottenuti dalla replica di quattro analisi. La stessa procedura è stata adottata in tutte le analisi relative ai campioni ottenuti dalla sperimentazione sull'olio naturale.

#### 4.2.2 Altri materiali

Per effettuare l'estrazione è stata utilizzata anidride carbonica tecnica (Siad, Italia) di purezza minima garantita del 99.5 %. La diluizione dei campioni da analizzare mediante gascromatografia è stata effettuata con alcool etilico anidro (Fluka Chemika) di purezza del 99.8 %.

### 4.3 Descrizione dell'impianto sperimentale

La figura 4.6 mostra una rappresentazione simbolica dell'impianto utilizzato sia per la realizzazione delle prove a singolo stadio di equilibrio che per

la realizzazione delle prove multistadio controcorrente con riflusso esterno. L'impianto è costituito dai seguenti elementi:

1. Bombola di stoccaggio dell'anidride carbonica.
2. Compressore volumetrico a membrana. E' alimentato dall'anidride carbonica in fase vapore che viene compressa dalla pressione di stoccaggio (pari alla tensione di vapore della  $CO_2$  alla temperatura di stoccaggio) fino alla pressione di processo.
3. Scambiatore di calore. E' utilizzato per riscaldare il solvente fino alla temperatura di processo prima di entrare nel fondo colonna. Il fluido riscaldante (acqua) è erogato da un termostato munito di resistenza interna (9).
4. Colonna a riempimento. E' una colonna di acciaio inossidabile (AISI 316), alta 189 cm e con diametro interno pari a 1.9 cm. Contiene un riempimento strutturato ad alta efficienza (Sulzer EX, Sulzer Chemtech Winterthur, Switzerland) costituito da 21 elementi sovrapposti, di altezza di 5.5 cm ciascuno (per 115.5 cm di altezza complessiva di riempimento). Ogni singolo elemento è costituito da fogli di garza metallica (acciaio inossidabile AISI 316L) opportunamente corrugati. Il riempimento presenta una superficie specifica pari a  $1710 \text{ m}^2/\text{m}^3$  ed un grado di vuoto pari a 0.86. Il volume vuoto contenuto all'interno del riempimento è quindi pari a  $281.5 \text{ cm}^3$ . Il fondo della colonna presenta un volume disponibile pari a  $110.5 \text{ cm}^3$ . Il volume disponibile dello spazio di testa è pari a  $73.4 \text{ cm}^3$ . Il volume vuoto complessivo contenuto all'interno della colonna è quindi pari a  $465.4 \text{ cm}^3$ . La colonna, in corrispondenza del riempimento, è circondata da una camicia di riscaldamento percorsa da acqua calda erogata dal termostato (10). Al fine di limitare le dispersioni termiche la camicia di riscaldamento è stata coibentata con della lana di roccia rivestita esternamente con dei fogli di plastica isolante. Anche il fondo della colonna è termostatato, per mezzo di un serpentino in rame avvolto intorno al fondo stesso ed alimentato con acqua calda erogata dal termostato (10).
5. Valvola di espansione. E' una valvola micrometrica a spillo all'interno della quale si concentra la caduta di pressione, dal valore di processo fino a pressione atmosferica. La valvola è dotata di un sistema di riscaldamento.
6. Separatore. E' un recipiente cilindrico a fondo conico di altezza pari a 16 cm e diametro interno pari a 4 cm (volume: circa  $200 \text{ cm}^3$ ).

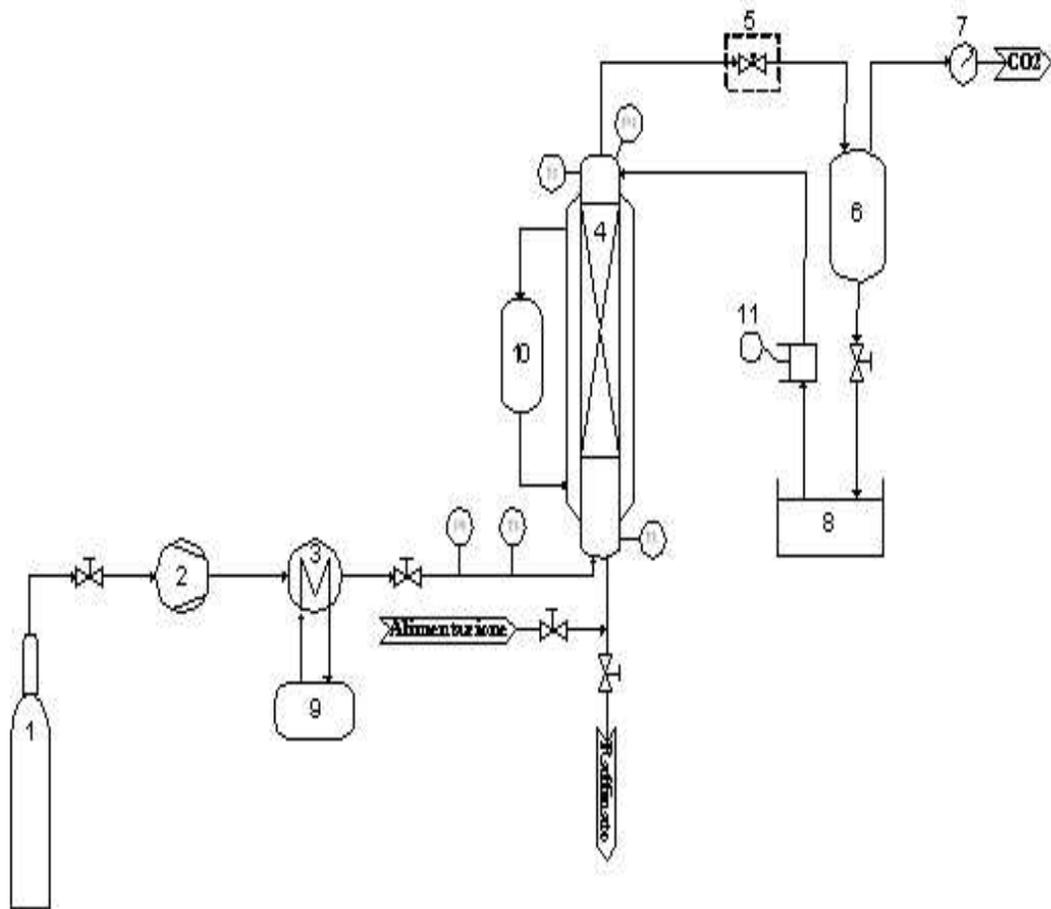


Figura 4.6: Impianto di laboratorio per la realizzazione delle prove sperimentali in modalità semicontinua a singolo stadio di equilibrio e multistadio con riflusso esterno

All'interno di questo recipiente le goccioline di olio hanno tempo per separarsi dall'anidride carbonica che, a valle dell'espansione si trova in fase vapore. L'olio estratto nel corso del processo si raccoglie nel fondo del separatore. Una valvola di intercettazione posta sul tubo uscente dal fondo del separatore consente di prelevare in modo semplice l'estratto in corrispondenza ad ogni specificato intervallo di tempo.

7. Contatore volumetrico. Questo apparecchio misura il volume di anidride carbonica che fluisce attraverso di esso. La misura volumetrica è effettuata in condizioni ambiente (approssimativamente:  $20^{\circ}C$ ,  $1\ atm$ ). Dall'indicazione di due valori consecutivi riferiti ad un intervallo di tempo noto, si può effettuare il calcolo della portata di anidride carbonica fluita nell'intervallo specificato. E' adatto per misurare portate comprese fra 1 e  $10\ l/min$ .
8. Accumulatore di riflusso. E' un semplice recipiente, utilizzato nell'esecuzione delle prove con riflusso, all'interno del quale si accumula il distillato. Costituisce il serbatoio per l'alimentazione del riflusso alla testa della colonna.
11. Pompa volumetrica ad alta precisione per alte pressioni (pompa di tipo HPLC, LabFlow 2000–LabService Analitica, Anzola Emilia, Bologna, Italia). Questa pompa eroga il riflusso per la testa della colonna.

La temperatura è rilevata da tre sonde termometriche: la prima misura la temperatura del solvente prima dell'ingresso in colonna (temperatura di preriscaldamento, precisione di indicazione  $0.1\ K$ ), la seconda misura la temperatura nel fondo della colonna (precisione di indicazione  $0.1\ K$ ) e la terza la temperatura di testa colonna (precisione di indicazione  $1\ K$ ). L'impianto sperimentale è inoltre dotato di due pressostati, che misurano la pressione in ingresso ed in uscita dalla colonna (precisione di indicazione  $1\ psi$ ).

## 4.4 Metodologia della sperimentazione

### 4.4.1 Prove a singolo stadio di equilibrio

Le prove sperimentali a singolo stadio di equilibrio avevano inizio azionando i termostati e caricando l'olio di alimentazione (circa  $40\ g$  per ogni prova) dal fondo della colonna per mezzo di una pompa peristaltica. A carica effettuata, veniva chiusa la valvola di intercettazione dell'alimentazione, veniva aperta quella corrispondente all'immissione del solvente e veniva azionato il compressore. Mantenendo la valvola di espansione (5) chiusa, la  $CO_2$  veniva

pressurizzata ed alimentata dal fondo della colonna con estrema lentezza per evitare ogni indesiderato eventuale trascinarsi di olio in fase liquida. Una volta raggiunti i valori di pressione e di temperatura desiderati per il processo, veniva aperta la valvola di espansione (5) ed aveva quindi inizio la prova sperimentale di frazionamento. Nell'arco dei primi minuti successivi all'apertura della valvola di espansione, la portata di solvente veniva variata fino al raggiungimento del valore prestabilito (compreso nell'intervallo 4–5 l/min a seconda della prova), mantenendo la pressione desiderata in colonna agendo contestualmente sull'apertura della valvola a spillo di espansione (5) e sul rapporto di compressione. Sempre agendo su questi parametri, la portata e la pressione di esercizio venivano mantenuti ai valori prestabiliti durante l'intera durata della prova. La temperatura di preriscaldamento veniva regolata agendo sulla temperatura dell'acqua erogata dal termostato (9), mentre la temperatura della colonna veniva regolata variando la temperatura dell'acqua erogata dal termostato (10). Analogamente alle prove sulla miscela sintetica, si è rivelato di grande importanza il riscaldamento della valvola di espansione con una portata termica regolabile. In questo modo è stato possibile evitare sia la solidificazione degli esteri etilici dal punto di solidificazione più elevato, causata dal raffreddamento indotto dall'effetto Joule–Thompson, che la formazione di uno spray provocato da eccessivo riscaldamento che avrebbe causato delle perdite di esteri. Il corretto funzionamento del sistema espansione – separazione è stato successivamente provato dalla chiusura dei bilanci di materia sui singoli esteri nonché dall'analisi delle curve relative alla frazione in massa degli estratti che non mostravano particolari singolarità. L'olio estratto, che condensava grazie all'espansione in valvola fino a pressione atmosferica, si separava dalla  $CO_2$  e si raccoglieva nel fondo del separatore (6). Ad intervalli di tempo prefissati (generalmente 30 minuti), veniva aperta la valvola di intercettazione sul tubo di uscita dal fondo del separatore e l'olio veniva raccolto, pesato per mezzo di una bilancia di precisione (precisione di indicazione 0.0001 g) e sottoposto ad analisi gascromatografica secondo la procedura esposta nel paragrafo 4.2.1. Se nella parte finale delle prove la quantità estratta diminuiva sensibilmente, il tempo fra due successivi prelievi veniva incrementato. Analogamente a quanto fatto per l'olio sintetico, il valore della pesata veniva registrato dopo 2 ore dal prelievo, per dare modo alla  $CO_2$  di completare la separazione dalla fase liquida. Nelle prove senza riflusso l'accumulatore (8) e la pompa HPLC (11) erano disinseriti dal circuito ed inutilizzati. Le prove sperimentali senza riflusso venivano condotte fino ad esaurimento totale della carica. All'atto pratico, una modesta quantità di olio rimaneva inestratta nelle condizioni di processo. Tale quantità, denominata *residuo*, veniva recuperata nella fase di asciugamento della colonna, realizzata inviando il solvente a pressioni più elevate della pressione

di processo e protratta finchè non si raccoglieva più nulla nel separatore. Il campione ottenuto nella fase di asciugamento veniva sottoposto alla stessa procedura analitica degli estratti.

#### 4.4.2 Prove multistadio con riflusso esterno

Le prove con riflusso esterno avevano inizio con una procedura identica a quella relativa alle prove senza riflusso con la differenza che l'accumulatore di riflusso (8) e la pompa HPLC (11) erano inseriti nel circuito e, oltre ai circa 40 g di olio di alimentazione caricati nel fondo della colonna, circa 10 g dello stesso olio venivano caricati nell'accumulatore (8) per garantire la possibilità di iniziare a riflussare sin dall'inizio del processo. Dopo che il sistema era stato portato alla pressione ed alla temperatura di esercizio, la valvola di espansione (5) veniva aperta e, allo stesso tempo, veniva azionata la pompa HPLC che cominciava ad alimentare la testa della colonna. In questo modo, all'interno della colonna a riempimento venivano in contatto una fase ascendente ricca in solvente supercritico ed una discendente ricca in esteri etilici. Il moto relativo della fase supercritica e della fase liquida è garantito dalla differenza di densità delle due fasi, se questa risulta essere sufficiente a tale scopo (dipendentemente dalle caratteristiche fluidodinamiche del sistema). La portata di solvente, in tutte le prove con riflusso, è stata mantenuta a 5 l/min ed è stata regolata, contestualmente alla pressione di esercizio, agendo sull'apertura della valvola di espansione e sul rapporto di compressione. Anche la temperatura, sia quella di preriscaldamento che quella all'interno della colonna, veniva regolata secondo quanto descritto nel precedente paragrafo. La fase supercritica ad alta pressione uscente dalla testa della colonna veniva fatta espandere nella valvola micrometrica a spillo (5) e l'olio che condensava si raccoglieva nel fondo del separatore (6). Ad intervalli di tempo prefissati (ogni 30 minuti) l'olio raccolto nel fondo del separatore (6) veniva prelevato e, in un tempo che fosse il più breve possibile, veniva pesato, un campione di esso veniva prelevato e conservato per la successiva analisi gascromatografica e la restante parte veniva rimboccata nell'accumulatore di riflusso (8). Si è fatto in modo che la quantità di estratto prelevato per l'analisi gascromatografica fosse molto bassa, generalmente compresa nell'intervallo 0.02 – 0.04 g, al fine di evitare che tali prelievi comportassero una diminuzione non trascurabile dell'olio circolante in colonna. Bisogna inoltre rilevare che, a differenza delle prove senza riflusso nelle quali la pesata dell'olio estratto veniva registrata dopo due ore dal prelievo, in questo caso non era evidentemente possibile applicare una simile procedura e quindi la pesata dell'olio estratto veniva registrata immediatamente. Comunque, da quanto detto relativamente alla metodologia della sperimen-

tazione nel Capitolo 3, si evince che la sovrastima che si commette in tale modo sulla massa estratta non eccede lo 0.1 – 0.2 %. Oltre alle variabili di cui si è detto in precedenza, nelle prove con riflusso era necessario mantenere sotto controllo e regolare la portata di riflusso. Il valore selezionato per la portata di riflusso dipende dalla strategia che si intende seguire nella realizzazione della prova sperimentale. Infatti, la diminuzione della massa di olio nel fondo colonna, fino all'ottenimento di una specificata quantità di olio arricchito (*raffinato*), può essere realizzata in diversi modi: date che siano la pressione e la temperatura del processo, e quindi la solubilità media dell'olio nel solvente, la diminuzione avverrà più rapidamente se si riflussa una portata di estratto inferiore e più lentamente se, viceversa, si riflussa una portata di estratto maggiore. Ovviamente, l'unico vincolo consiste nel dover riflussare una portata minore o, al più, uguale alla portata estratta altrimenti, se così non fosse, si avrebbe un depauperamento dell'olio nell'accumulatore di riflusso fino al disinnescamento della pompa. A seguito di alcune prove esplorative, è stato stabilito di realizzare delle prove sperimentali di durata di circa 8 ore ciascuna, operando in regime di riflusso totale nelle prime 2 ore (la portata riflussata era mantenuta il più possibile prossima alla portata estratta) ed operando con una portata riflussata pari all'80 – 85 % della portata estratta fino alla fine della prova. Il controllo della portata effettivamente erogata dalla pompa HPLC era possibile in quanto l'accumulatore era posizionato su di una bilancia e, quindi, dall'indicazione di due successivi valori di massa era possibile calcolare la portata effettivamente erogata nell'intervallo di tempo di controllo e, conseguentemente, si poteva regolare l'erogazione della pompa agendo sulla velocità dello stantuffo. In corrispondenza del tempo prestabilito per la fine della prova sperimentale, la pompa HPLC ed il compressore venivano spenti, la valvola di intercettazione corrispondente all'immissione del solvente veniva chiusa e la colonna veniva depressurizzata lentamente. A depressurizzazione avvenuta, il *raffinato* veniva raccolto dal fondo della colonna mediante l'apertura dell'apposita valvola di intercettazione e, insieme all'olio presente nell'accumulatore (*distillato*), veniva pesato e sottoposto ad analisi gascromatografica. Queste analisi venivano ripetute tre volte al fine di avere una maggiore accuratezza sulla determinazione della composizione dei prodotti finali dell'operazione. La prova sperimentale si concludeva con la fase di asciugamento della colonna. Questa operazione veniva condotta riportando la colonna in pressione (a valori più elevati di quelli della corrispondente prova sperimentale, mediamente 180 – 200 atm) e fluendo anidride carbonica finché non si estraeva più nulla dalla colonna stessa. L'olio recuperato nell'operazione di asciugamento, praticamente coincidente con il *bagnamento* del riempimento, veniva anch'esso pesato e sottoposto ad analisi gascromatografica.

## 4.5 Prove a singolo stadio di equilibrio

### 4.5.1 Risultati sperimentali

I valori di pressione e di temperatura operativi sono stati selezionati sulla base dei risultati ottenuti nella fase di sperimentazione riguardante l'olio sintetico. Non è stata effettuata alcuna prova di frazionamento a 42 °C e 90 atm in quanto le prove sull'olio sintetico hanno fornito dei valori di solubilità eccessivamente bassi in queste condizioni. Inoltre, per ogni valore di temperatura, la pressione più elevata sottoposta a sperimentazione è stata ridotta di 10 atm rispetto alle corrispondenti prove sulla matrice sintetica, in quanto queste ultime avevano evidenziato la formazione di una fase omogenea a bassi valori del grado di avanzamento, con conseguente selettività media circa unitaria. Per quanto riguarda la portata di solvente, alcune prove esplorative hanno consentito di selezionare dei valori adatti, come ordine di grandezza, per la tipologia dell'impianto sperimentale utilizzato, anche in vista delle successive prove con riflusso esterno. La tabella 4.2 riassume i valori dei parametri operativi selezionati (temperatura, pressione e portata di solvente) relativi alle otto prove sperimentali a singolo stadio di equilibrio (senza riflusso) effettuate sulla matrice naturale. Le rilevazioni sperimentali dirette relative ad ogni prova consistono nella massa di olio estratto fra due successivi prelievi e nella composizione di tali campioni. E' stata inoltre determinata la massa e la composizione dell'olio residuo. I dati sperimentali sono stati elaborati in modo perfettamente analogo alla procedura utilizzata riguardo alle prove effettuate sull'olio sintetico, descritta nel Capitolo 3. In tutte le prove sperimentali le perdite sono risultate, analogamente a quanto accaduto per le prove sull'olio sintetico, inferiori al 3 % dell'olio caricato.

Prova	T [°C]	P [atm]	S [l/min]
1	42	100	5
2	42	110	4
3	50	110	5
4	50	120	4
5	50	130	5
6	60	130	5
7	60	140	5
8	60	150	4

Tabella 4.2: Condizioni operative delle prove sperimentali di frazionamento di tipo semicontinuo a singolo stadio di equilibrio sulla matrice naturale

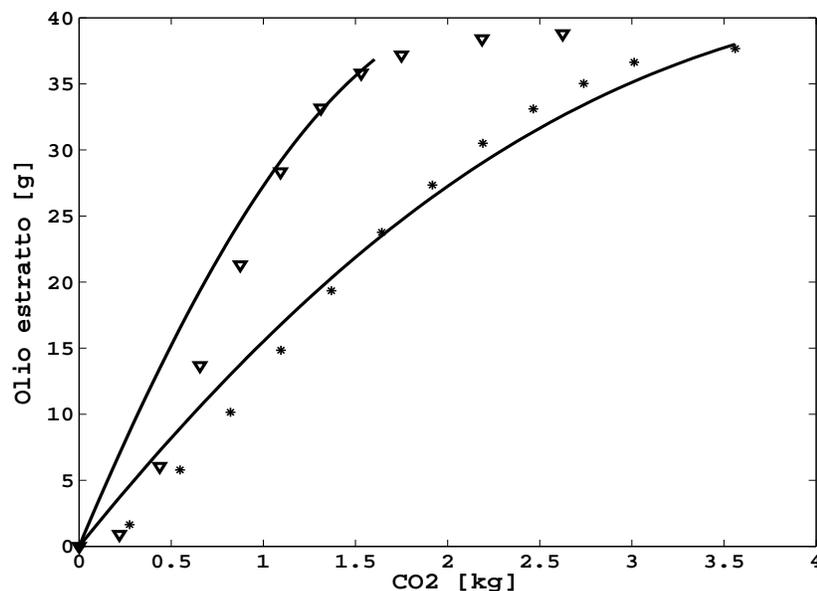


Figura 4.7: Olio naturale estratto a temperatura di  $42^{\circ}\text{C}$ . Punti sperimentali e previsione del modello (\*  $100\text{ atm}$ ;  $\nabla$   $110\text{ atm}$ )

Le figure 4.7, 4.8 e 4.9 mostrano la massa di olio naturale estratta in funzione della massa di solvente fluita in relazione alle prove sperimentali a  $42^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$  e  $60^{\circ}\text{C}$  rispettivamente. Come atteso, anche per l'olio naturale si può vedere come la quantità estratta, a parità di solvente utilizzato, aumenta con la pressione. Di contro, il confronto fra coppie di curve riferite ad uguale pressione e diversa temperatura mostra chiaramente come la quantità di solvente necessaria a solubilizzare una data quantità di olio aumenta con la temperatura. In altri termini, sebbene questa tipologia di prove sperimentali sia non stazionaria, caratterizzata da una fase liquida a composizione continuamente variabile, si evince chiaramente che la solubilità di questa matrice naturale in anidride carbonica supercritica aumenta con la pressione e diminuisce con la temperatura. La tabella 4.3 riporta i valori della solubilità media, espressa come grammi di olio solubilizzato per kg di  $\text{CO}_2$ , riferita alle diverse prove sperimentali. I valori di solubilità media sono stati calcolati escludendo il dato riferito al primo prelievo e considerando gli altri dati fino a grado di avanzamento pari a circa 0.8. La massa estratta con il primo prelievo non è stata considerata in quanto l'anidride carbonica uscente dalla testa della colonna nei primi minuti è sicuramente sottosatura. La causa di ciò è chiaramente individuabile nella mancanza di un tempo sufficiente, a valle della fase di pressurizzazione, per permettere il raggiungi-

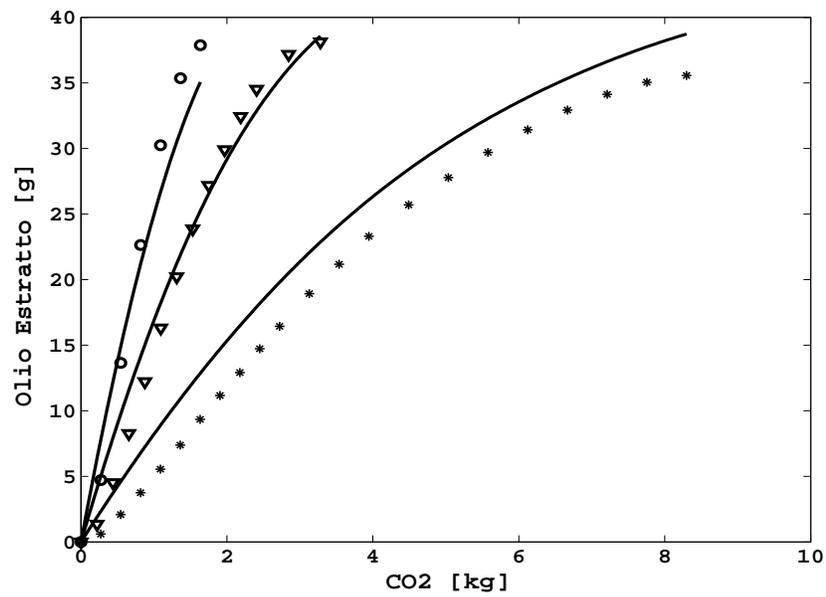


Figura 4.8: Olio naturale estratto a temperatura di  $50^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello (\* 110 atm;  $\nabla$  120 atm;  $\circ$  130 atm)

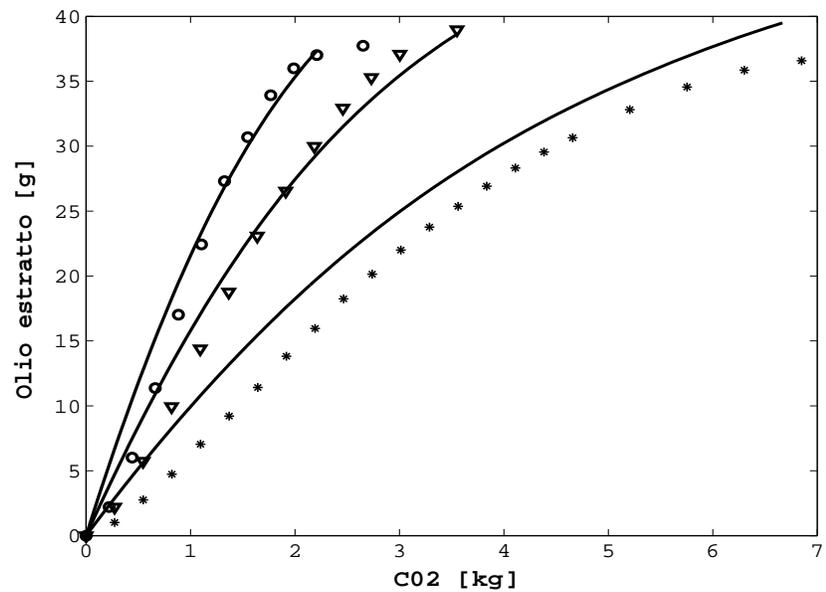


Figura 4.9: Olio naturale estratto a temperatura di  $60^{\circ}C$ . Punti sperimentali e previsione del modello (\* 130 atm;  $\nabla$  140 atm;  $\circ$  150 atm)

T [ $^{\circ}C$ ]	P [atm]					
	100	110	120	130	140	150
42	14.4	29.5	-	-	-	-
50	-	5.8	16.3	31.2	-	-
60	-	-	-	6.8	14.1	21.5

Tabella 4.3: Solubilità media [ $g_{olio}/kg_{CO_2}$ ] dell'olio naturale in anidride carbonica supercritica calcolata dai risultati sperimentali

mento delle condizioni di equilibrio. La maggior parte del solvente entrato in colonna nella fase di pressurizzazione ha attraversato il battente liquido senza solubilizzare olio, in quanto il sistema era a valori di pressione troppo bassi, corrispondenti a valori di solubilità dell'olio nell'anidride carbonica trascurabili. Nonostante i valori riportati in tabella 4.3 abbiano una valenza solamente qualitativa, essi forniscono delle valide indicazioni riguardo la dipendenza della solubilità dell'olio naturale in anidride carbonica supercritica e rappresentano uno strumento utile in vista della scelta delle condizioni operative ottimali per l'effettuazione delle prove con riflusso esterno. Con l'unica eccezione rappresentata dai dati riferiti alla prova a  $42^{\circ}C$  e  $100 atm$ , nella quale la solubilità dell'olio naturale è risultata modicamente inferiore (di circa il 30 %) a quella dell'olio sintetico nelle stesse condizioni, i valori di solubilità a  $50^{\circ}C$  e  $60^{\circ}C$  dell'olio naturale e dell'olio sintetico, nelle stesse condizioni di pressione e temperatura, sono molto prossimi fra loro.

I punti sperimentali delle figure da 4.10 a 4.17 rappresentano l'andamento della composizione (su base priva di solvente) della fase gassosa in funzione del grado di avanzamento del processo. In completa analogia con quanto rilevato nelle prove sull'olio sintetico, i primi prelievi risultano relativamente ricchi nei componenti più leggeri, delle classi EE-C14 e EE-C16, che vengono estratti preferenzialmente. Successivamente c'è un arricchimento sequenziale degli esteri dei C18, C20 e C22 rispettivamente. Ad ogni fissata temperatura, tale effetto è più evidente alla pressione di esercizio più bassa ed è sempre meno evidente alle pressioni più alte. Inoltre, la riduzione della pressione massima di esercizio, per ogni fissata temperatura, ha consentito di avere una effettiva separazione (sistema distribuito su due fasi all'interno della colonna fino ad alti gradi di avanzamento) in tutti i casi sottoposti a sperimentazione. La formazione di una fase omogenea all'interno della colonna si presenta, presumibilmente, solo in corrispondenza di valori del grado di avanzamento molto elevato, relativamente alle prove a  $42^{\circ}C$  e  $110 atm$  e  $60^{\circ}C$  e  $150 atm$ . I valori limite di pressione, evidenziati nel Capitolo 3 dall'analisi dei dati sperimentali riferiti all'olio sintetico, sono quindi da ritenersi validi anche

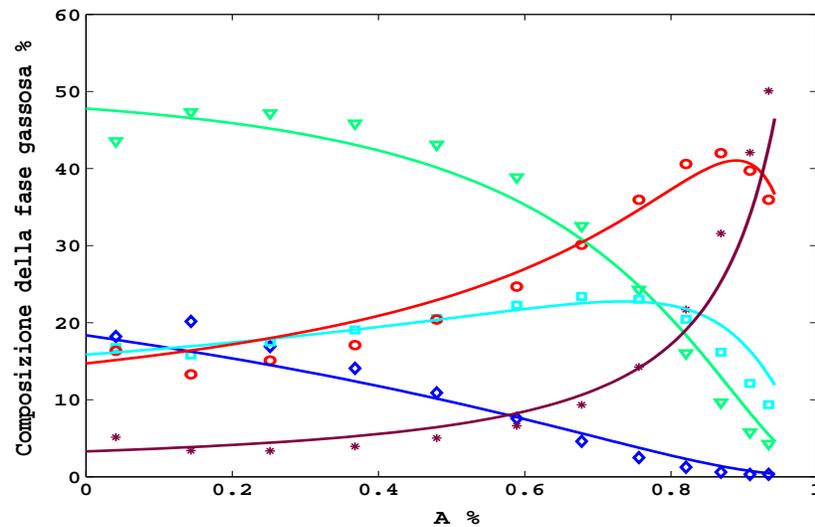


Figura 4.10: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $100\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

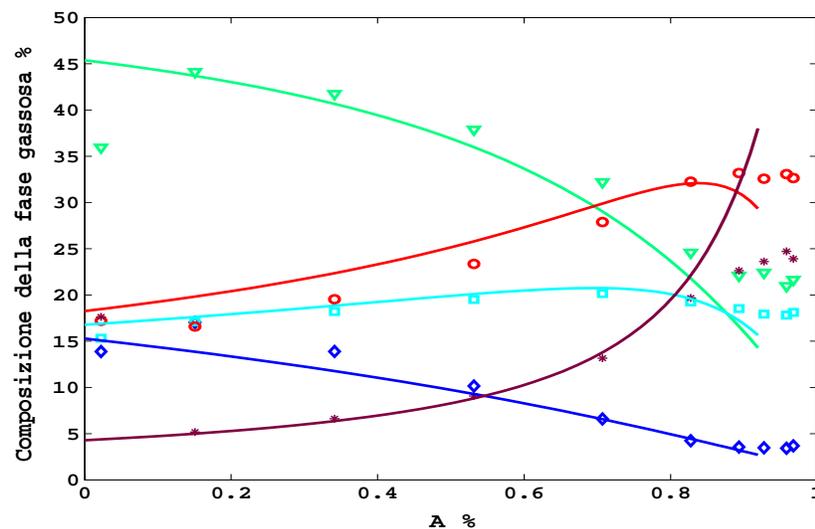


Figura 4.11: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $110\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello. ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

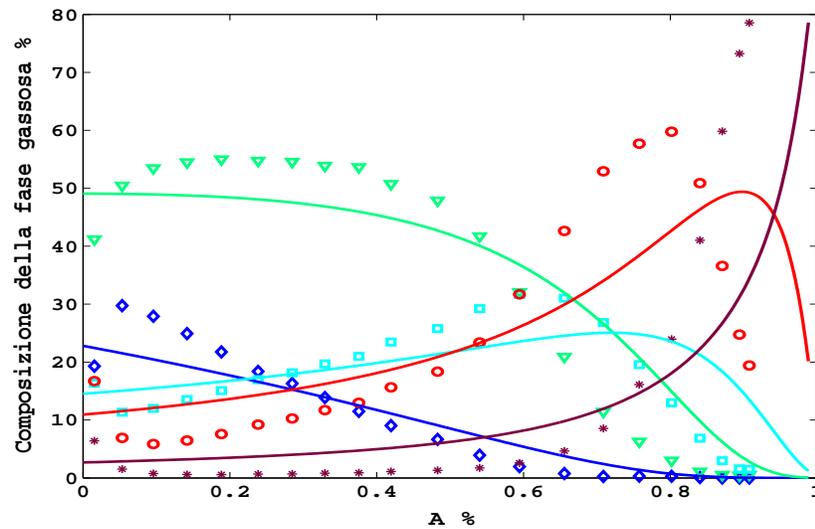


Figura 4.12: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $110\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

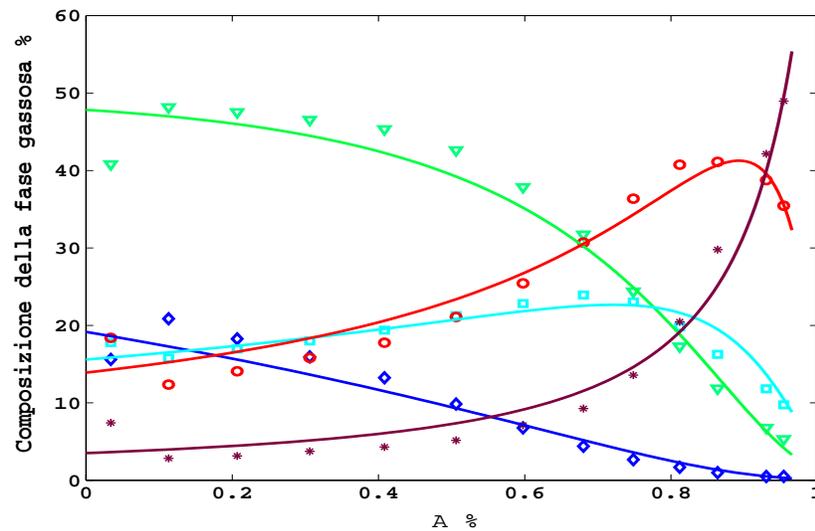


Figura 4.13: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

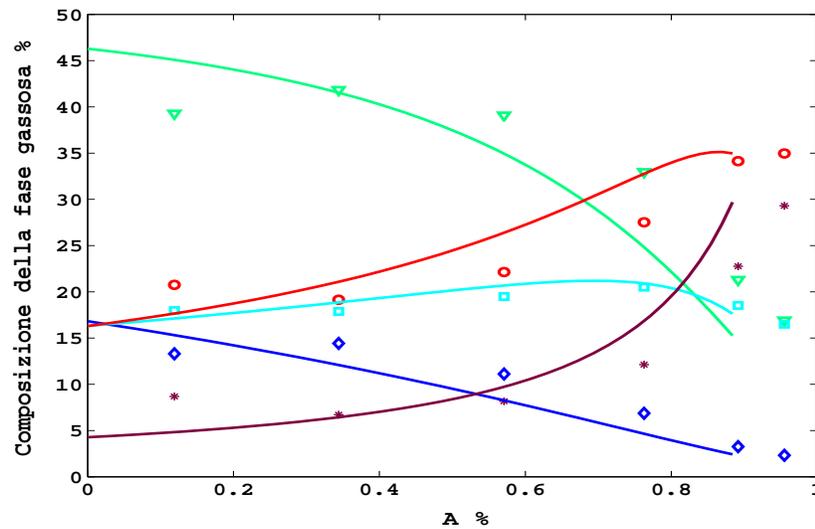


Figura 4.14: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $130\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

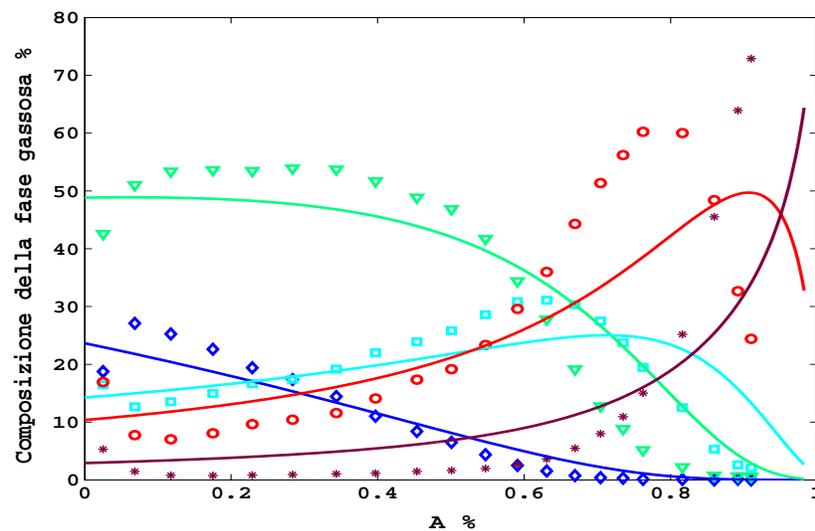


Figura 4.15: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $130\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

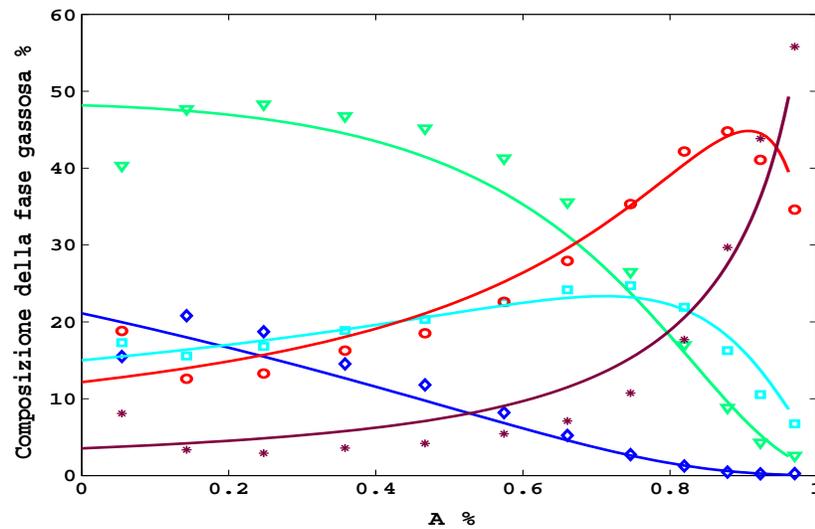


Figura 4.16: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $140\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

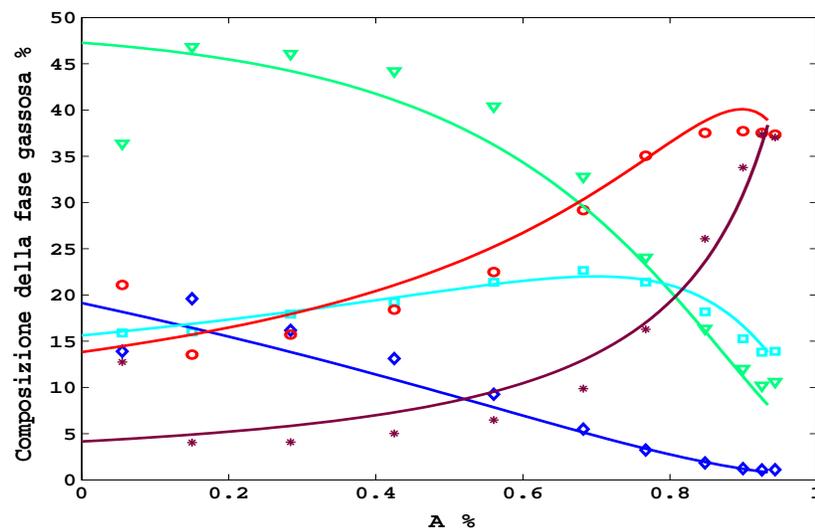


Figura 4.17: Composizione della fase gassosa espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale su olio naturale a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $150\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

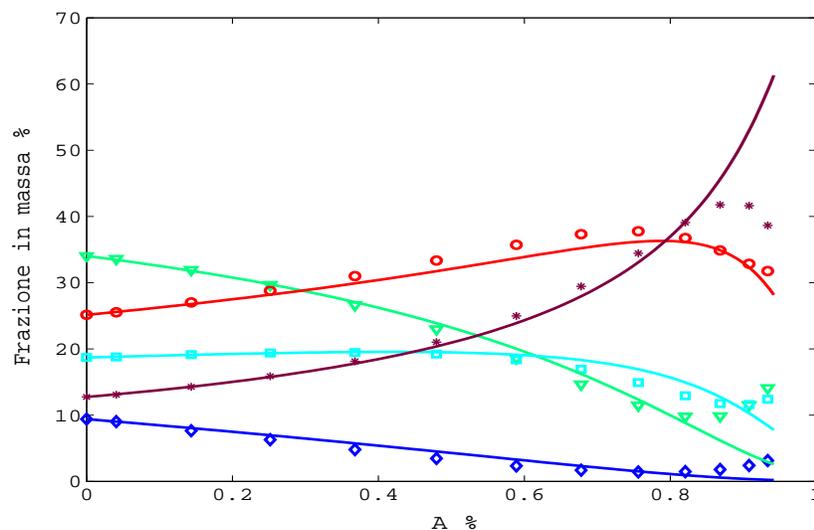


Figura 4.18: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $100\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

per l'olio naturale.

A partire dai dati determinati sperimentalmente è stato possibile calcolare, per mezzo dei bilanci di materia per ogni classe di esteri, la massa e la composizione dell'olio contenuto all'interno della colonna (fase liquida + fase supercritica). I valori di composizione ottenuti, mostrati per tutte le prove sperimentali nelle figure da 4.18 a 4.25, rappresentano una ottima approssimazione della composizione del liquido nel fondo colonna, per i motivi espressi nel Capitolo 3. I risultati ottenuti dai dati sperimentali, riferiti alla fase liquida, mostrano che i valori massimi ottenibili, per quanto riguarda la concentrazione di  $EE-C20 + EE-C22$ , sono analoghi a quelli che sono stati ottenuti nel processo a singolo stadio di equilibrio realizzato sull'olio sintetico (circa 80 %). In particolare, tali valori sono ottenuti nelle prove a densità del solvente più bassa, in corrispondenza di valori del grado di avanzamento di circa 0.7 – 0.8. A valori più elevati la fase liquida tende ad arricchirsi in  $EE-C22$  mentre la concentrazione di  $EE-C20$  comincia a decrescere. Tuttavia, come si evince dalla tabella 4.3, le condizioni di bassa densità del solvente, che corrispondono per ogni temperatura ai valori di pressione più bassi, sono quelle che forniscono la solubilità più bassa. L'attitudine del processo a separare i composti leggeri ( $EE-C14 + EE-C16 + EE-C18$ ) da quelli pesanti

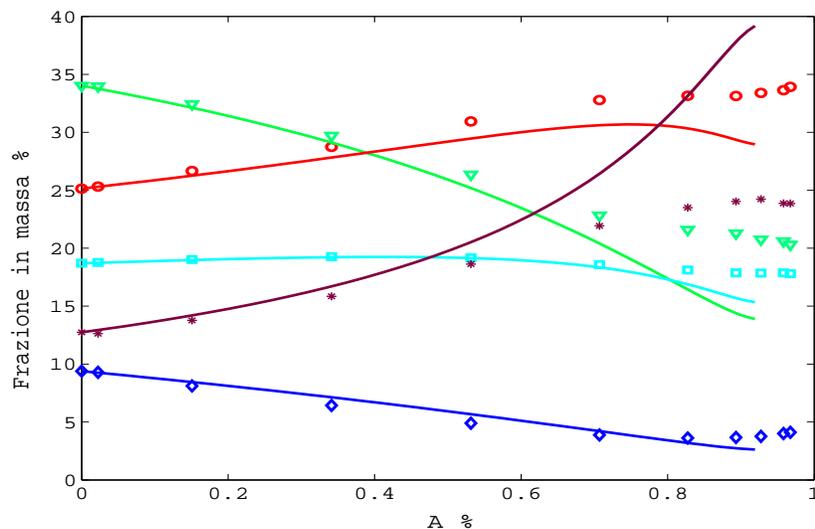


Figura 4.19: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $42^{\circ}C$  e  $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  EE - C14;  $\nabla$  EE - C16;  $\square$  EE - C18;  $\circ$  EE - C20;  $*$  EE - C22)

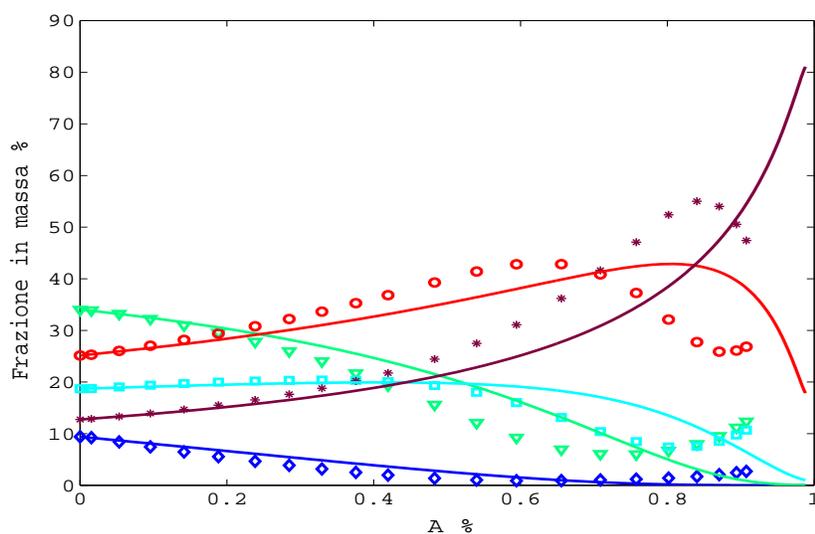


Figura 4.20: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}C$  e  $110\ atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$  EE - C14;  $\nabla$  EE - C16;  $\square$  EE - C18;  $\circ$  EE - C20;  $*$  EE - C22)

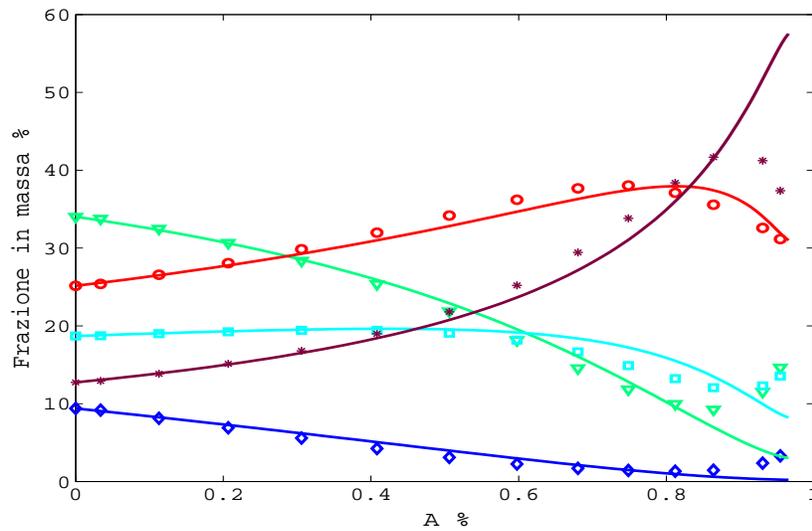


Figura 4.21: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}C$  e  $120 atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

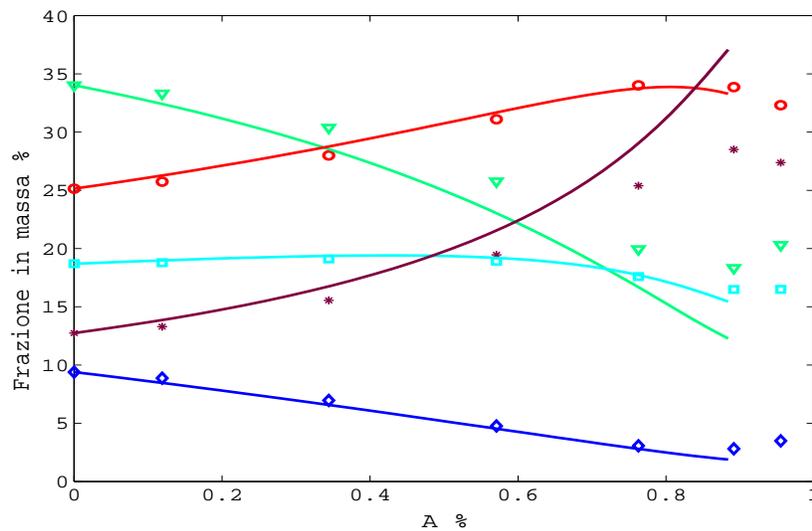


Figura 4.22: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $50^{\circ}C$  e  $120 atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

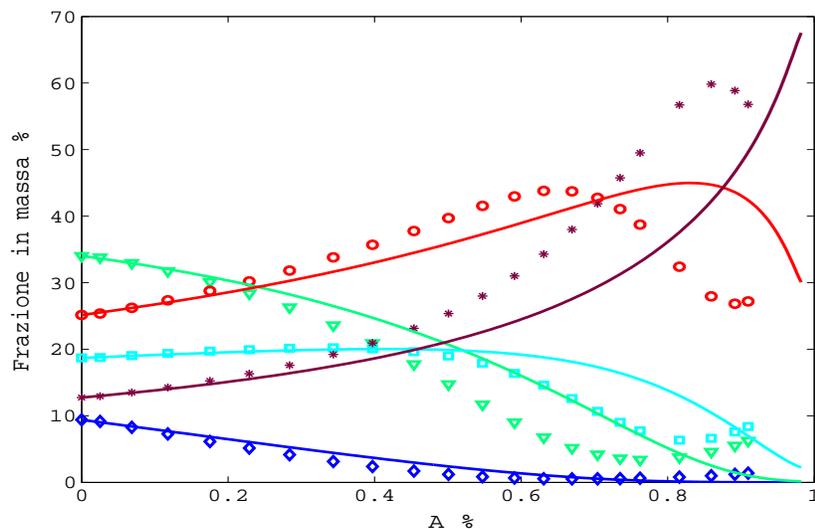


Figura 4.23: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$  e  $130 atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

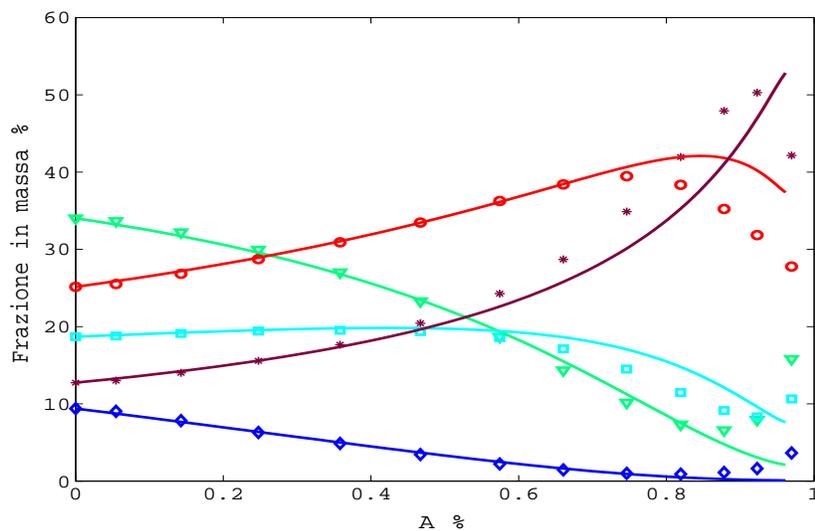


Figura 4.24: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $60^{\circ}C$  e  $130 atm$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

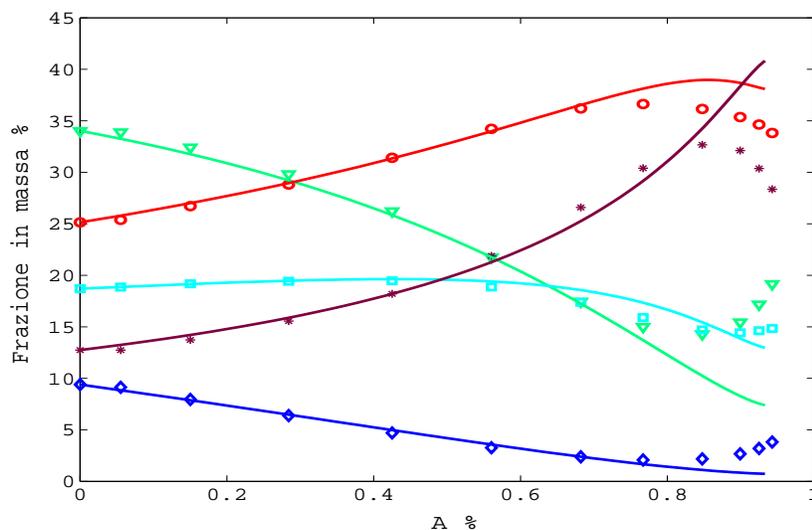


Figura 4.25: Composizione all'interno della colonna espressa come percentuale in massa su base priva di solvente. Prova sperimentale a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $130\text{ atm}$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

( $EE-C20 + EE-C22$ ) nelle diverse condizioni operative, è stata quantificata, analogamente a quanto fatto per l'olio sintetico, mediante il calcolo di una selettività media. I risultati di questi calcoli sono riportati nella tabella 4.4. L'analisi globale dei risultati ottenuti sull'olio naturale (solubilità, andamento qualitativo delle curve rappresentative della composizione delle fasi in equilibrio, selettività) porta a conclusioni analoghe a quelle ottenute dall'analisi dei risultati sperimentali relativi all'olio sintetico. In particolare, ciò conferma che la separazione di queste miscele per mezzo dell'anidride carbonica supercritica avviene sulla base della lunghezza della catena. Infatti, nonostante ogni classe di esteri dell'olio naturale sia formata da molti

T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	P [atm]					
	100	110	120	130	140	150
42	3.1	1.9	-	-	-	-
50	-	6.9	3.4	2.3	-	-
60	-	-	-	6.2	3.7	2.9

Tabella 4.4: Selettività media nelle varie condizioni operative calcolata dai risultati sperimentali delle prove a singolo stadio di equilibrio su olio naturale

componenti di uguale lunghezza di catena, il comportamento complessivo del sistema, nei confronti del processo di separazione, si è rivelato simile a quello della miscela sintetica, per la quale ogni classe corrispondeva, a meno di poche impurezze, ad un singolo componente. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura e riassunto nel Capitolo 2. In sintesi, i risultati principali ottenuti dalle prove sperimentali a singolo stadio di equilibrio possono essere riassunti come segue:

- il frazionamento della miscela naturale con anidride carbonica supercritica può essere ben simulato studiando il frazionamento di una miscela sintetica con un unico componente per ogni classe di specificata lunghezza di catena.
- per ogni valore di temperatura oggetto della sperimentazione, i seguenti valori di pressione rappresentano dei limiti superiori per l'ottenimento di valori di selettività accettabili: ( $42^{\circ}\text{C}$ ,  $110\text{ atm}$ ), ( $50^{\circ}\text{C}$ ,  $130\text{ atm}$ ), ( $60^{\circ}\text{C}$ ,  $150\text{ atm}$ ).
- le condizioni di selettività più elevata corrispondono a bassa densità del solvente e scarsa solubilità. Viceversa, in corrispondenza di valori elevati di densità del solvente si ottengono solubilità elevate e bassi valori di selettività. E' quindi necessario operare in condizioni corrispondenti a valori di densità del solvente che rappresentino un compromesso fra questi due aspetti.
- i valori delle coppie pressione-temperatura che appaiono più promettenti, in quanto forniscono un buon compromesso fra solubilità e selettività, risultano essere ( $42^{\circ}\text{C}$ ,  $100\text{ atm}$ ), ( $50^{\circ}\text{C}$ ,  $120\text{ atm}$ ), ( $60^{\circ}\text{C}$ ,  $140\text{ atm}$ ).
- il processo a singolo stadio di equilibrio è in grado di produrre raffinati ad alta concentrazione di EE-C20 + EE-C22 (fino all'80 %) ma questi risultati sono inevitabilmente ottenuti con dei bassi valori di recupero. E' quindi necessario passare allo studio di processi multistadio con riflusso per verificare il miglioramento ottenibile in termini di recupero.

### 4.5.2 Modellizzazione

Il processo di frazionamento a singolo stadio di equilibrio, applicato all'olio naturale e realizzato mediante l'impianto rappresentato in figura 4.6, è stato simulato utilizzando la modellizzazione proposta nel Paragrafo 3.10. Sono stati dunque applicati i programmi *Condizioni Iniziali* e *Dinamico*, riportati

nelle Appendici A.4 e A.5, ad un sistema di volume pari al volume vuoto disponibile all'interno della colonna ( $465.4 \text{ cm}^3$ ). L'olio naturale è stato assimilato, concordemente con la procedura analitica seguita, ad una miscela a 5 componenti, dove ogni componente rappresenta una classe di specificata lunghezza di catena. Ogni classe è stata quindi assimilata ad un componente avente proprietà termodinamiche (pressione critica, temperatura critica e fattore acentrico) corrispondenti a quelle del componente maggiormente presente nella classe considerata. La tabella 4.5 mostra i componenti rappresentativi di ogni classe. I dati termodinamici di questi componenti sono riportati nel Paragrafo 3.8. Il modello termodinamico utilizzato per il calcolo delle condizioni di isofugacità, richiesto all'interno dei programmi *Condizioni Iniziali* e *Dinamico*, è quello presentato nel Paragrafo 3.7. Anche nel caso dell'olio naturale, l'accordo fra i dati calcolati e quelli sperimentali, nelle diverse condizioni di esercizio, è stato migliorato introducendo i parametri di interazione binaria  $\kappa_{1j}$  come funzioni lineari della temperatura. Le espressioni dei  $\kappa_{1j}(T)$  per questa matrice naturale sono state ricavate, analogamente a quanto fatto sul sistema sintetico, dall'ottimizzazione dei dati sperimentali di frazionamento a singolo stadio di equilibrio presentati nel Paragrafo 4.5.1. I valori costanti di  $\kappa_{1j}(T)$ , ottenuti dalla regressione dei dati sperimentali relativi ai sottosistemi binari, sono stati utilizzati come valori di primo tentativo, nell'intorno dei quali sono state cercate le espressioni ottimali dei parametri per la caratterizzazione delle classi di componenti dell'olio naturale. I valori dei parametri  $\eta_{1j}$ , invece, sono stati mantenuti pari ai valori calcolati dalla regressione dei dati sperimentali binari relativi ai sottosistemi anidride carbonica/componenti rappresentativi. In definitiva, i valori dei parametri di interazione binaria utilizzati in tutte le simulazioni relative all'olio naturale, sono riportati nella tabella 4.6. Le figure 4.7, 4.8 e 4.9 mostrano il confronto fra la rilevazione sperimentale diretta della massa estratta ed i valori simulati con il modello descritto. Come si può vedere, in tutte le condizioni sottoposte a sperimentazione il modello fornisce un'ottima stima della

Classe	Componente rappresentativo
EE-C14	EE-C14:0
EE-C16	EE-C16:0
EE-C18	EE-C18:1
EE-C20	EE-EPA
EE-C22	EE-DHA

Tabella 4.5: Componenti rappresentativi delle singole classi di esteri dell'olio naturale

Parametro	EE-C14	EE-C16	EE-C18	EE-C20	EE-C22
$\alpha_{1j}$	0.070	-0.155	-0.208	-0.348	-0.036
$\beta_{1j}$	0.000	0.0007	0.0007	0.0009	0.0013
$\eta_{1j}$	0.000	0.030	0.030	0.020	0.012

Tabella 4.6: Parametri di interazione binaria relativi all'olio naturale. I parametri  $\kappa_{1j}$  si calcolano dalla relazione:  $\kappa_{1j} = \alpha_{1j} + \beta_{1j} T$ , dove  $T$  è la temperatura espressa in kelvin.

solubilità dell'olio naturale. Per quanto riguarda la composizione della fase supercritica, il confronto fra le misure sperimentali ed i dati ricavati dalla simulazione è mostrato nelle figure da 4.10 a 4.17. Si può vedere che il modello fornisce una buona stima della composizione su base priva di solvente della fase supercritica. Tuttavia, dalle simulazioni a  $50^{\circ}C$  e  $60^{\circ}C$  si vede come la solubilità dei singoli esteri non è perfettamente predetta in tutto il campo di valori di pressione. In particolare, i dati simulati tendono a discostarsi dai dati sperimentali nelle condizioni di pressione più bassa. Tuttavia, è stato verificato che con una diversa scelta dei parametri di interazione binaria è possibile migliorare la simulazione nelle condizioni di bassa pressione, anche se ciò avviene a scapito dell'affidabilità di quella ad alta pressione. In altri termini, il modello proposto, sebbene fornisca una discreta rappresentazione dell'andamento del processo, sembra mostrare dei limiti nella rappresentazione delle interazioni riguardanti gli esteri etilici a catena lunga nell'intero campo di valori di pressione. Le figure da 4.18 a 4.25 mostrano che il modello fornisce una buona stima della composizione all'interno della colonna (e quindi della fase liquida) al procedere del frazionamento. Nel complesso, il modello proposto rappresenta un buon compromesso fra affidabilità e complessità e si presenta come un utile strumento per lo studio del processo in esame.

## 4.6 Prove semicontinue con riflusso esterno

### 4.6.1 Risultati sperimentali

Le prove sperimentali semicontinue a riflusso esterno sono state condotte in corrispondenza delle condizioni di pressione e temperatura rivelatesi ottimali, sia sull'olio sintetico che sull'olio naturale, nelle prove a singolo stadio di equilibrio: ( $42^{\circ}C$ ,  $100\ atm$ ), ( $50^{\circ}C$ ,  $120\ atm$ ), ( $60^{\circ}C$ ,  $140\ atm$ ).

Sebbene valori di pressione leggermente più elevati (di circa  $5 - 10\ atm$ ),

dando luogo a selettività comunque modicamente maggiori di 1 e a solubilità più consistenti, potrebbero essere presi in considerazione, vi sono delle problematiche da considerare. Riha e Brunner [1] affermano di aver trovato risultati incoerenti a  $(60^{\circ}\text{C}, 150 \text{ atm})$ , attribuiti alla presenza di trascinamento della fase liquida all'interno della fase supercritica, dovuto alla vicinanza del sistema alle condizioni di *flooding*. E' probabile che in quelle condizioni di pressione e temperatura, corrispondenti ad una densità del solvente che supera i  $600 \text{ kg/m}^3$ , la differenza di densità fra le due fasi a contatto sia troppo bassa e possa dare luogo a problemi fluidodinamici. In effetti, nell'ambito degli studi relativi a questa Tesi, sono state effettuate alcune prove sperimentali a  $(50^{\circ}\text{C}, 130 \text{ atm})$ , condizioni corrispondenti anch'esse a densità del solvente superiore a  $600 \text{ kg/m}^3$ , trovando risultati incoerenti e non riproducibili. Tali problematiche non si sono verificate nelle prove sperimentali effettuate nella terna di condizioni selezionate che corrispondono a valori di densità compresi nell'intervallo  $550 - 590 \text{ kg/m}^3$ .

I risultati ottenuti nelle prove sperimentali con riflusso, in termini di massa e composizione dei prodotti, sono riassunti nelle tabelle 4.7, 4.8, 4.9 con riferimento alle diverse condizioni operative. Invece, la tabella 4.10 sintetizza i risultati ottenuti dalle tre prove sperimentali sulla base dei seguenti parametri di rilievo:

- frazione percentuale in massa dei componenti pregiati (EE-C20+EE-C22) nel raffinato.
- recupero ( $r$ ). E' definito come il rapporto fra la massa di componenti pesanti (EE-C20+EE-C22) contenuti all'interno della colonna a fine prova (ovvero nel raffinato e nel bagnamento) e quelli presenti nell'alimentazione. Il "complemento a 1" del recupero rappresenta la quota di componenti pesanti che sono, dal punto di vista pratico, "persi" in quanto si ritrovano diluiti all'interno del distillato. Trascurando le perdite di esteri dal sistema, che sono sempre risultate di piccola entità, il recupero può essere calcolato dalla:

$$r = 1 - \frac{D X_{Dp}}{F X_{Fp}} \quad (4.1)$$

dove  $D$  e  $F$  rappresentano la massa di distillato e alimentazione rispettivamente, mentre  $X_{Dp}$  e  $X_{Fp}$  rappresentano la frazione in massa di componenti pesanti nel distillato e nell'alimentazione rispettivamente.

- rapporto solvente/alimentazione ( $S/F$ ). Fornisce una misura della quantità di solvente che è necessario utilizzare, per unità di alimentazione, per realizzare il frazionamento. Sebbene nei processi industriali

il solvente venga riciclato, il rapporto  $S/F$  è un parametro di estremo rilievo in quanto è connesso con i costi di esercizio (il riciclo del solvente avviene dopo espansione e quindi tale rapporto è connesso con le spese energetiche di ricomprensione).

Nelle prove sperimentali effettuate sono stati ottenuti dei raffinati con un tenore di componenti pesanti abbastanza elevato, di valore paragonabile a quello ottenuto nelle prove sperimentali senza riflusso. Come era lecito attendersi, la maggiore impurezza presente nel raffinato è costituita dalla frazione EE-C18, che è la più difficile da separare. Tuttavia, in questo caso, il recupero in componenti pesanti viene nettamente incrementato, ovvero, a parità di rapporto di concentrazione viene prodotta una maggiore quantità di olio arricchito. La tabella 4.11 mostra il confronto fra i valori di recupero ottenuti nelle prove con riflusso e quelli ottenuti nelle prove senza riflusso, effettuate nelle stesse condizioni di pressione e temperatura, in corrispondenza di una composizione all'interno dell'estrattore prossima a quella ottenuta del raffinato ottenuto nelle prove con riflusso. Come si può vedere, il recupero viene incrementato in tutti i casi, ed il miglioramento nei risultati ottenibili è sempre più evidente all'aumentare della temperatura di esercizio. Inoltre, bisogna rilevare che aumentando la durata della prova, ovvero aumentando il rapporto di riflusso ed il rapporto solvente/alimentazione, si potrebbero ottenere dei raffinati che, a pari quantità prodotta, presentano una concentrazione più elevata di quella ottenuta in queste prove. D'altronde, i dati riportati da Nilsson [2], discussi nel Capitolo 2, riguardanti la produzione di oli arricchiti in un impianto semicontinuo con riflusso generato internamente al sistema per mezzo di un gradiente termico, fanno riferimento a prodotti al 90 % di EPA e DHA ma a scapito di rapporti solvente/alimentazione superiori a 200. Per quanto riguarda le condizioni operative sottoposte a sperimentazione, dalla tabella 4.10 si evince che i migliori risultati sono stati ottenuti in corrispondenza della temperatura più elevata. Infatti, rispetto alla prova sperimentale condotta a  $42^{\circ}C$ , è stato ottenuto un raffinato con una concentrazione in componenti pesanti circa uguale, ma con un recupero

	Massa [g]	EE-C14	EE-C16	EE-C18	EE-C20	EE-C22
Alimentazione	50.24	9.4	34.0	18.7	25.1	12.8
Distillato	24.97	11.7	44.8	22.8	17.1	3.6
Raffinato	15.77	0.8	7.8	15.3	39.8	36.3

Tabella 4.7: Massa e composizione di alimentazione e prodotti relativamente alla prova con riflusso a  $42^{\circ}C$  e  $100\ atm$

	Massa [g]	EE-C14	EE-C16	EE-C18	EE-C20	EE-C22
Alimentazione	50.20	9.4	34.0	18.7	25.1	12.8
Distillato	19.61	13.4	48.8	22.3	13.2	2.3
Raffinato	24.30	1.3	12.9	21.2	37.5	27.1

Tabella 4.8: Massa e composizione di alimentazione e prodotti relativamente alla prova con riflusso a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$

	Massa [g]	EE-C14	EE-C16	EE-C18	EE-C20	EE-C22
Alimentazione	50.26	9.4	34.0	18.7	25.1	12.8
Distillato	20.83	14.9	47.4	20.1	14.9	2.7
Raffinato	17.17	1.0	9.2	15.0	41.3	33.5

Tabella 4.9: Massa e composizione di alimentazione e prodotti relativamente alla prova con riflusso a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $140\text{ atm}$

T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	P [atm]	EE-C20+EE-C22 [%]	Recupero	S/F
42	100	76.0	72.9	86.0
50	120	64.6	84.0	86.5
60	140	74.7	80.8	80.6

Tabella 4.10: Qualità del prodotto, recupero e spesa di solvente nelle tre prove sperimentali con riflusso esterno

T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	P [atm]	Riflusso	Senza riflusso
42	100	72.9	51.2
50	120	84.0	58.9
60	140	80.8	33.8

Tabella 4.11: Confronto fra il recupero ottenuto nelle prove con riflusso e senza riflusso

superiore ed un consumo di solvente inferiore. Per quanto riguarda la prova sperimentale condotta a  $50^{\circ}C$ , si può osservare come per ottenere lo stesso rapporto di concentrazione che è stato ottenuto a  $60^{\circ}C$ , con un recupero presumibilmente analogo, sarebbe stato necessario prolungare la prova e quindi consumare molto più solvente di quello necessario a  $60^{\circ}C$  per ottenere un prodotto di qualità paragonabile.

### 4.6.2 Modellizzazione delle prove multistadio

Le prove sperimentali a singolo stadio di equilibrio, oltre a fornire le condizioni operative più promettenti in vista della realizzazione delle prove con riflusso, hanno consentito di determinare tutti i parametri del modello termodinamico proposto per la caratterizzazione delle condizioni di equilibrio di fase. Utilizzando tale modello termodinamico come base, è stata sviluppata una modellizzazione del sistema (fondo colonna + colonna multistadio) con l'obiettivo di simulare il processo per calcolare le portate circolanti in colonna, i profili di concentrazione etc. Bisogna sottolineare che tale modellizzazione presenta delle note di complessità dovute alla non stazionarietà del processo ed alla conseguente variabilità di tutte le grandezze oggetto di studio (portate, composizioni, densità) sia lungo la colonna che nel tempo.

L'ipotesi di fondo della modellizzazione consiste nello schematizzare la colonna a riempimento come una colonna costituita da  $n$  stadi di equilibrio teorici (piatti) ed il fondo della colonna (saturatore) come un unico stadio di equilibrio. Ad ogni piatto viene attribuito un volume pari a:

$$V_{pia} = \frac{V_{riemp}}{n} \quad (4.2)$$

dove  $V_{riemp}$  rappresenta il volume vuoto contenuto nel riempimento, mentre al saturatore viene attribuito un volume pari al volume del fondo colonna.

All'istante iniziale è previsto che la colonna possa essere considerata prebagnata oppure quasi asciutta (bagnamento iniziale  $B_0$ ). In quest'ultimo caso è previsto che la colonna si bagni progressivamente, con una legge di tipo lineare, in un tempo prestabilito ( $t_b$ ) fino al raggiungimento del valore di bagnamento ricavato sperimentalmente a fine prova ( $B_f$ ). Una volta raggiunto il valore  $B_f$ , il bagnamento della colonna si mantiene costante. Il valore di bagnamento della colonna è considerato, in ogni istante di tempo, equamente distribuito sugli  $n$  piatti. Occorre precisare che ciò che viene qui chiamato bagnamento e che viene imposto nel modello nel modo appena descritto, è la massa di olio presente in colonna al generico istante di tempo (hold-up di olio). La quantità di anidride carbonica e la composizione dell'hold-up

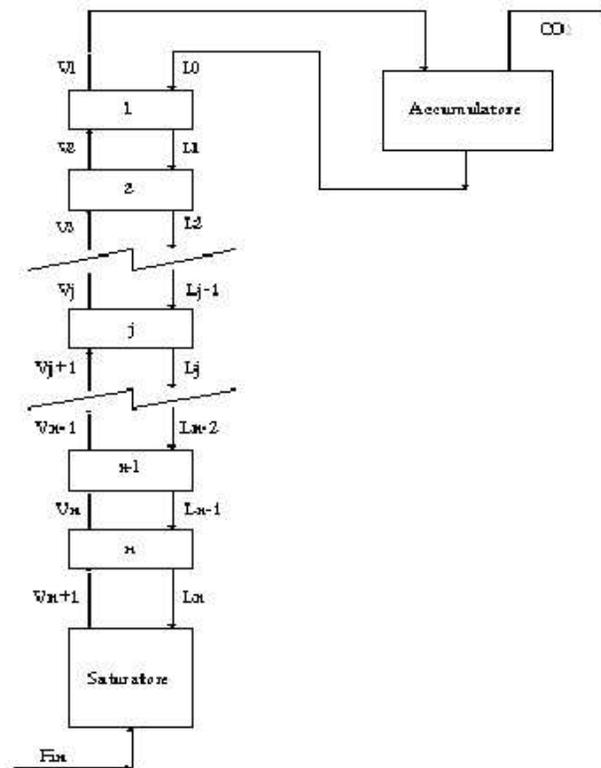


Figura 4.26: Schema simbolico del sistema: saturatore + colonna a  $n$  stadi di equilibrio

(totale e di olio) è invece calcolata dal modello che, correttamente, prevede l'evoluzione dei profili di concentrazione in colonna.

Il programma di calcolo che è stato sviluppato, per mezzo del software Matlab 6.5, per simulare il processo multistadio a riflusso esterno prende il nome di *Colonna* ed è riportato, con un commento esplicativo, nell'Appendice A.6. Il programma dapprima calcola le condizioni che ci sono nell'apparecchiatura all'istante iniziale (apparecchiatura alla pressione ed alla temperatura di processo, valvole chiuse) applicando il programma *CondizioniIniziali* (che calcola le condizioni di equilibrio di fase in un sistema a volume costante contenente una specificata quantità di olio) al saturatore ed ai singoli piatti (in ognuno dei quali si assume sia presente una quantità di olio pari a  $B_0/n$ ). Dopo aver determinato lo stato iniziale del sistema, l'algoritmo risolutivo prevede la discretizzazione dell'intervallo temporale della prova sperimentale da simulare e la risoluzione sequenziale, per ogni passo temporale, dei bilanci di materia e delle condizioni di equilibrio di fase per i piatti (a partire

dal piatto di testa e a scendere progressivamente) e per il saturatore e dei bilanci di materia all'accumulatore. Nella risoluzione di ognuno di questi elementi, l'unico sottoprogramma utilizzato dal programma *Colonna* è il sottoprogramma *Condizioni Iniziali*. Nel procedimento risolutivo, tutti i dati relativi alle portate circolanti in colonna ed alle densità vengono salvati all'interno di matrici bidimensionali (con un indice  $i$  riferito al passo temporale ed un indice  $j$  riferito al piatto), mentre i dati relativi alla composizione sono salvati in matrici tridimensionali (oltre ai precedenti indici, si considera anche un indice  $k$  che indica il componente). Maggiori dettagli sono forniti nell'Appendice A.6. Qui di seguito vengono invece descritti i principali passi dell'algoritmo risolutivo dei singoli elementi della colonna.

**Risoluzione dei piatti.** Il programma comincia dalla risoluzione del piatto di testa. A partire dalla portata molare di solvente uscente dalla testa della colonna ( $a$ ) viene calcolata la portata di fase supercritica (nel seguito la fase ricca in solvente verrà convenzionalmente indicata come vapore). La quantità  $a$  è calcolabile dalla misura del contatore volumetrico e dalla conoscenza della composizione della fase vapore uscente dal piatto di testa (ottenuta dal calcolo delle condizioni iniziali). Risulta:

$$V_1 = \frac{a}{y_1} \quad (4.3)$$

E' inoltre nota la portata di liquido entrante nel piatto, in quanto consiste nel riflusso che è noto in portata e composizione (pari a quella dell'accumulatore). A questo punto, la risoluzione del piatto avviene in tre fasi:

- Fase 1: si considera che si aprano delle valvole (fittizie) poste nella parte superiore del piatto consentendo il flusso delle correnti "superiori"  $L_0$  e  $V_1$  per un tempo pari al passo temporale di discretizzazione. Si applicano i bilanci di materia dei singoli componenti e si calcola la massa aggiornata dei componenti dell'olio contenuti nel piatto (cfr. Figura 4.27). Il bilancio di materia relativo al passo temporale  $i$ esimo, al piatto di testa (nella Fase 1) ed al componente  $k$ esimo si scrive come:

$$\frac{dN_{i,1,k}}{dt} = L_0 x_{i,0,k} - V_1 y_{i,1,k} \quad (4.4)$$

dove  $N_{i,1,k}$  indica le moli di componente  $k$  contenute nel piatto 1 al passo temporale  $i$ . Da queste 6 equazioni (una per ogni componente) e dalla conoscenza della quantità dei singoli componenti presenti nel piatto al passo temporale precedente, si calcola la quantità dei singoli componenti presenti nel piatto alla fine della Fase 1 del passo temporale attuale.

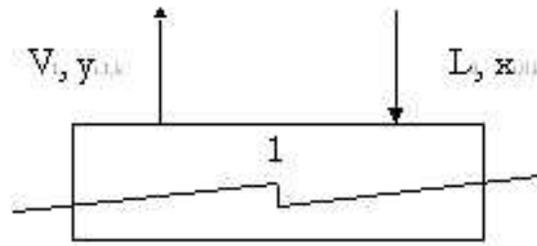


Figura 4.27: Schema simbolico della risoluzione della Fase 1 del piatto di testa

- Fase 2: si chiudono le valvole (fittizie) della parte alta del piatto. Il sistema piatto nella Fase 2 è un sistema chiuso e isocoro e si può applicare ad esso il programma *CondizioniIniziali* operante sulla massa dei singoli componenti dell'olio calcolati nella Fase 1. Il programma *CondizioniIniziali* fornisce la composizione delle fasi presenti nel piatto e le moli di anidride carbonica nel piatto stesso.
- Fase 3: si considera che si aprano delle valvole (fittizie) poste nella parte inferiore del piatto consentendo il flusso delle correnti "inferiori"  $L_1$  e  $V_2$  per un tempo pari al passo temporale di discretizzazione (cfr. Figura 4.27). In questo caso la massa totale dei componenti dell'olio a valle della Fase 3, che chiude il passo temporale, è fornita dalla legge di bagnamento imposta dall'esterno (in input al programma). Sfruttando questa informazione viene scritto il bilancio di materia globale per l'olio

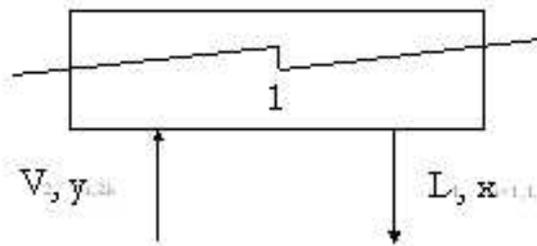


Figura 4.28: Schema simbolico della risoluzione della Fase 3 del piatto di testa

(sommando i bilanci parziali per  $k = 2..6$ ) ed il bilancio di anidride carbonica. L'equazione di bilancio di olio è scritta come:

$$\frac{1}{n} \frac{dB}{dt} = V_{i,2} \sum_{k=2}^6 PM_k y_{i,2,k} - L_{i,1} \sum_{k=2}^6 PM_k x_{i+1,1,k} \quad (4.5)$$

dove  $PM_k$  indica il peso molecolare del componente  $k$ . Il termine a primo membro rappresenta la variazione del bagnamento sul singolo piatto che è nota dai dati di input. Nel termine a secondo membro, la composizione della fase liquida è nota al passo temporale aggiornato in quanto è stata calcolata nella Fase 2, mentre la composizione della fase vapore è considerata pari al valore assunto al passo temporale precedente. Le due portate sono incognite. Il bilancio relativo all'anidride carbonica invece fornisce:

$$\frac{dN_{i,1,1}}{dt} = V_{i,2} y_{i,2,1} - L_{i,1} x_{i+1,1,1} \quad (4.6)$$

Il termine a primo membro è noto in quanto si impone che a valle di questo bilancio le moli di anidride carbonica nel piatto debbano essere pari a quelle previste dal programma *CondizioniIniziali* applicato nella Fase 2. In altri termini, nella Fase 3 si deve consentire uno scambio di anidride carbonica tale da far tornare, insieme con lo scambio di anidride carbonica avvenuto nella Fase 1, il valore previsto nella Fase 2. In definitiva, anche in questo bilancio le incognite sono  $V_{i,2}$  e  $L_{i,1}$ . Le equazioni 4.8 e 4.9 costituiscono quindi un sistema lineare di due equazioni in due incognite che consente di calcolare le portate relative alla parte inferiore del piatto.

Avendo calcolato la composizione delle fasi liquida e vapore contenute nel piatto e le portate relative ad esso, il piatto di testa è risolto. L'unico parametro ancora non calcolato consiste nella composizione del vapore in ingresso al piatto, in quanto questo parametro verrà calcolato dalla risoluzione del piatto inferiore. A questo punto il programma procede con la risoluzione degli  $n - 1$  piatti sottostanti, seguendo un ordine discendente. La risoluzione del piatto generico  $j$  è effettuata secondo la stessa procedura seguita per la risoluzione del piatto di testa in quanto il problema è perfettamente analogo. I dati sono le quantità di olio e di anidride carbonica presenti nel piatto al passo temporale precedente, le portate "superiori"  $L_{j-1}$  e  $V_j$  e la composizione della fase liquida entrante; invece, la composizione della fase vapore uscente è assunta pari al valore al passo temporale precedente. Le equazioni rappresentative delle varie fasi sono:

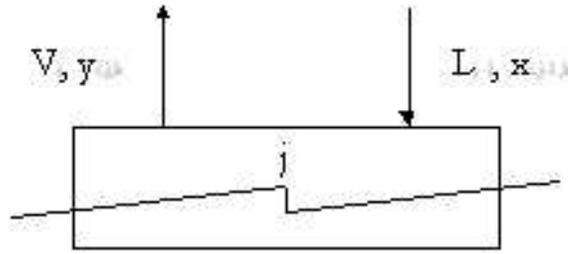


Figura 4.29: Schema simbolico della risoluzione della Fase 1 del piatto generico

- Fase 1: bilanci di materia dei singoli componenti (cfr. Figura 4.29).

$$\frac{dN_{i,j,k}}{dt} = L_{i,j-1} x_{i,j-1,k} - V_{i,j} y_{i,j,k} \quad (4.7)$$

- Fase 2: applicazione del programma *CondizioniIniziali*.
- Fase 3: bilancio di materia globale per l'olio (cfr. Figura 4.30):

$$\frac{1}{n} \frac{dB}{dt} = V_{i,j+1} \sum_{k=2}^6 PM_k y_{i,j+1,k} - L_{i,j} \sum_{k=2}^6 PM_k x_{i+1,j,k} \quad (4.8)$$

Bilancio relativo all'anidride carbonica:

$$\frac{dN_{i,j,1}}{dt} = V_{i,j+1} y_{i,j+1,1} - L_{i,j} x_{i+1,j,1} \quad (4.9)$$

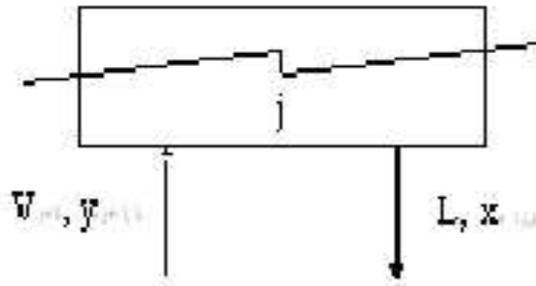


Figura 4.30: Schema simbolico della risoluzione della Fase 3 del piatto generico

Mediante questo procedimento, vengono risolti tutti i piatti fino al piatto  $n$ , immediatamente sovrastante il saturatore. A questo punto tutte le portate, densità e composizioni relative alla colonna sono state calcolate e aggiornate al nuovo passo temporale, eccezion fatta per la composizione del vapore entrante al piatto  $n$  che verrà calcolata dalla risoluzione del saturatore.

**Risoluzione del saturatore.** Il saturatore viene risolto applicando i bilanci di materia per tutti i componenti dell'olio, al fine di calcolare la quantità di olio aggiornata, ed applicando il sottoprogramma *CondizioniIniziali* per calcolare le nuove condizioni di equilibrio. Tenendo conto che lo scambio di olio fra il saturatore e l'esterno può avvenire esclusivamente in virtù delle portate "superiori" si scrive:

$$\frac{dN_{i,n+1,k}}{dt} = L_{i,n} x_{i+1,n,k} - V_{i,n+1} y_{i,n+1,k} \quad k = 2..6 \quad (4.10)$$

L'applicazione del programma *CondizioniIniziali* realizza il calcolo delle nuove composizioni delle due fasi (la composizione della fase liquida del saturatore coincide con la composizione del raffinato) e della quantità di anidride carbonica contenuta nel fondo colonna al nuovo passo temporale. Applicando il bilancio di anidride carbonica, si può dunque calcolare la portata di anidride carbonica entrante nel sistema ( $F_{in}$ ) secondo la:

$$F_{in} = \frac{dN_{i,n+1,1}}{dt} - L_{i,n} x_{i+1,n,1} - V_{i,n+1} y_{i,n+1,1} \quad k = 2..6 \quad (4.11)$$

A questo punto tutte le grandezze inerenti la colonna sono state aggiornate.

**Risoluzione dell'accumulatore di riflusso.** Prima di ricominciare i calcoli relativi al passo temporale successivo, bisogna calcolare i nuovi valori della massa e composizione del distillato contenuto nell'accumulatore di riflusso. Dal momento che si considera che l'anidride carbonica si separi integralmente dall'olio (in effetti, la solubilità dell'anidride carbonica nell'olio a condizioni ambiente è trascurabile), il calcolo delle nuove condizioni all'interno del separatore consiste semplicemente nell'effettuazione dei bilanci di materia per tutti i componenti dell'olio.

A questo punto il programma ricomincia i calcoli, con la nuova composizione del riflusso, relativi al nuovo passo temporale. Oltre al calcolo delle composizioni e delle portate, per entrambe le fasi presenti in colonna e per ogni istante di tempo, l'applicazione dell'equazione di stato di Peng-Robinson consente di calcolare le densità delle correnti circolanti. Infine, occorre notare che la procedura appena esposta, che essenzialmente consiste nello scomporre in tre fasi, in realtà simultanee, la risoluzione del singolo elemento di colonna, approssima tanto meglio la realtà quanto più viene scelto piccolo il passo temporale. Prima di giungere alle simulazioni definitive, sono

state effettuate una serie di simulazioni esplorative riducendo gradualmente il passo temporale di integrazione. E' stato visto che a valori inferiori a 0.1 minuti non si aveva più alcuna significativa variazione nei risultati e quindi il tempo computazionale aggiuntivo non era più giustificato. Nelle simulazioni mostrate nel prossimo paragrafo, tale passo temporale di integrazione è stato quindi adottato.

### 4.6.3 Risultati e discussione

Per calcolare il numero di stadi di equilibrio corrispondenti al processo sottoposto a sperimentazione, il modello precedentemente esposto è stato applicato per diversi valori di  $n$  in corrispondenza dei valori dei parametri operativi di ogni prova sperimentale. Dal confronto fra le misure sperimentali dirette (massa e composizione su base priva di solvente dell'estratto) e le corrispondenti previsioni del modello, è stato possibile valutare il valore di  $n$  che garantiva la migliore rispondenza fra dati sperimentali e simulati. A titolo di esempio, le figure da 4.31 a 4.34 mostrano il confronto fra curve simulate e dati sperimentali, per quanto riguarda la prova a  $60^{\circ}C$  e  $140 atm$ , nel caso di colonna ipotizzata a 2 ed a 3 stadi di equilibrio. In generale, all'aumentare degli stadi teorici di equilibrio, la simulazione prevede degli estratti più ricchi in componenti leggeri e, di conseguenza, delle portate estratte più elevate in quanto la solubilità dell'olio nelle zone alte della colonna aumenta a causa del più marcato "alleggerimento" dell'olio stesso. Nello specifico delle figure mostrate, per  $n = 3$  si ha un'ottima stima della portata di olio estratta dalla testa della colonna mentre tale grandezza è leggermente sottostimata per  $n = 2$ ; di contro, per  $n = 2$  si ha una stima migliore della composizione su base priva di solvente dell'olio uscente dalla testa della colonna. Analizzando da un punto di vista qualitativo tutti i confronti fra curve simulate e punti sperimentali per vari valori del parametro  $n$ , si è visto che, nel complesso, il valore  $n = 3$  ha fornito il miglior accordo fra dati sperimentali e simulati. Questo valore porta ad una stima orientativa dell'altezza equivalente allo stadio teorico (HETP), considerata come media nelle diverse condizioni operative per il sistema in esame, pari a  $38.5 cm$ .

Le figure da 4.35 a 4.38 mostrano il confronto, per  $n = 3$ , fra curve simulate e dati sperimentali per quanto riguarda la composizione e la portata di olio estratto dalla testa della colonna nelle altre due condizioni sottoposte a sperimentazione. Tutte le simulazioni sono state protratte per una durata di 720 minuti, a fronte dei 450 – 480 minuti della durata reale delle prove sperimentali, in modo da fornire anche un'estrapolazione del comportamento del processo a tempi più lunghi di quelli sperimentati.

Come si può vedere dalle figure, le curve simulate approssimano discre-

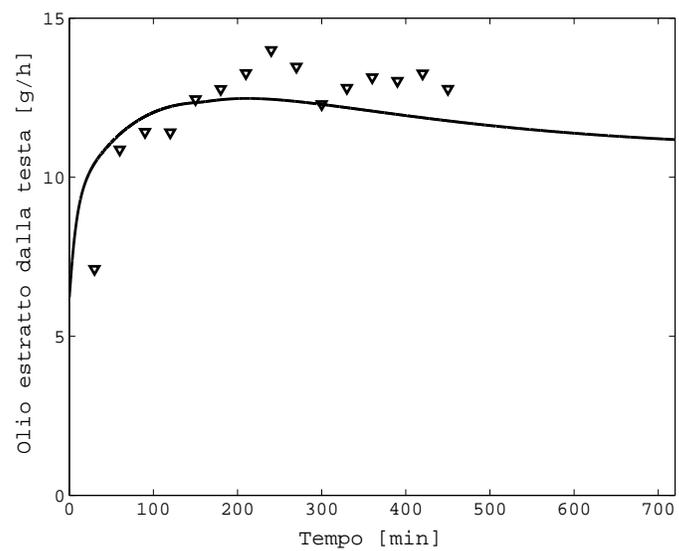


Figura 4.31: Portata di olio estratta dalla testa della colonna a  $60^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . Colonna  $n = 2$ .

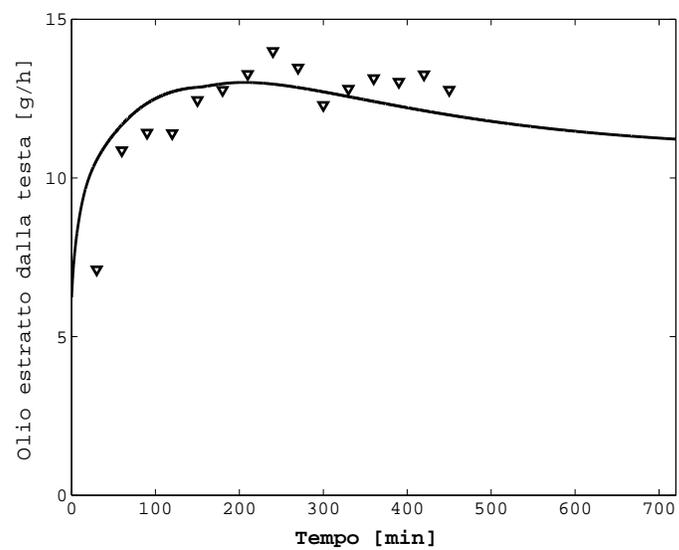


Figura 4.32: Portata di olio estratta dalla testa della colonna a  $60^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . Colonna  $n = 3$ .

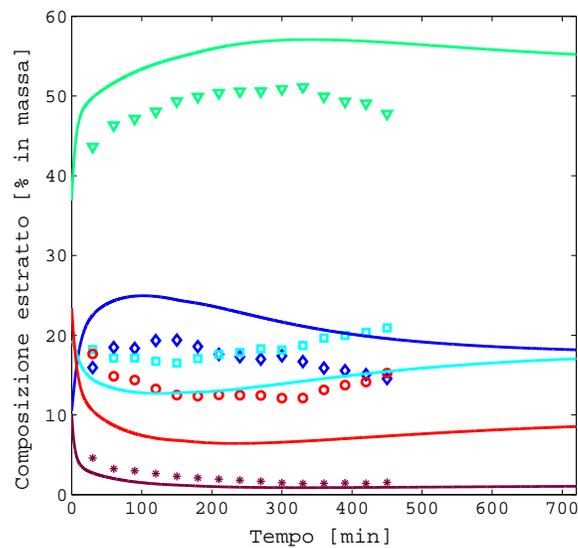


Figura 4.33: Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a  $60^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . Colonna  $n = 2$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ )

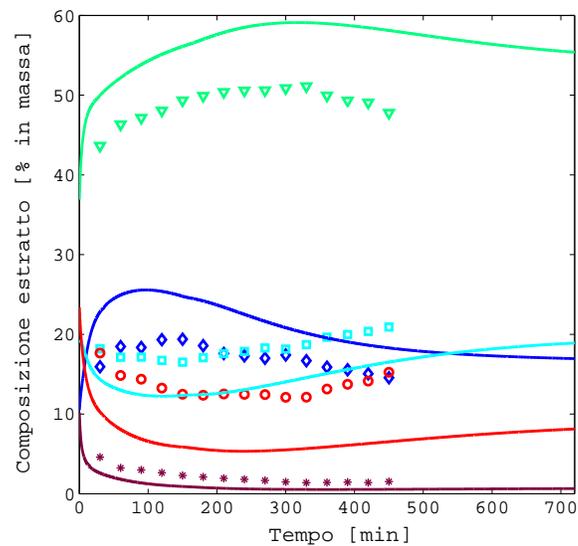


Figura 4.34: Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a  $60^{\circ}C$  e  $140\ atm$ . Colonna  $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ )

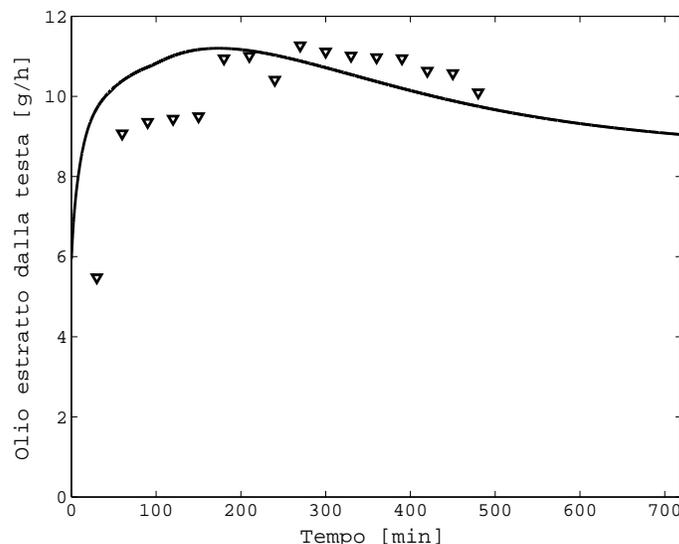


Figura 4.35: Portata di olio estratta dalla testa della colonna a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $100\text{ atm}$ . Colonna  $n = 3$ .

tamente i punti sperimentali. In particolare, dall'analisi qualitativa dei dati sperimentali emerge che, per valori elevati del tempo, si ha una lenta diminuzione della portata di olio estratto mentre, per quanto riguarda la frazione di EE-C20 nell'estratto, si evidenzia la presenza di un valore minimo dopo il quale la quota di questa classe ricomincia a crescere (invece la EE-C22 si mantiene a valori bassissimi). Questo comportamento qualitativo emerso nel corso delle sperimentazioni, è stato confermato dalle simulazioni ed è peculiare per questo tipo di processo che è non stazionario. Infatti, questo comportamento può essere spiegato dal progressivo arricchimento in componenti pesanti all'interno della colonna che contrasta il progressivo arricchimento in componenti leggeri del riflusso: due effetti contrastanti possono dar luogo ad un punto di stazionarietà che evidentemente si manifesta per l'EE-C20 mentre non si manifesta, almeno per questi valori del tempo, per la classe più pesante di tutte (EE-C22).

Se si vuole migliorare l'efficienza della separazione si deve aumentare la spesa di solvente (ovvero il rapporto  $S/F$ ) mediante l'adozione di rapporti di riflusso più elevati, mentre non è conveniente mantenere il rapporto di riflusso costante ed aumentare la durata della prova. Dalla scelta del rapporto di riflusso, costante o variabile secondo una legge prestabilita, dipende anche il rapporto EE-C20/EE-C22, e quindi il rapporto EPA/DHA nel prodotto finito che, in alcune formulazioni farmaceutiche ha la sua rilevanza. Questa

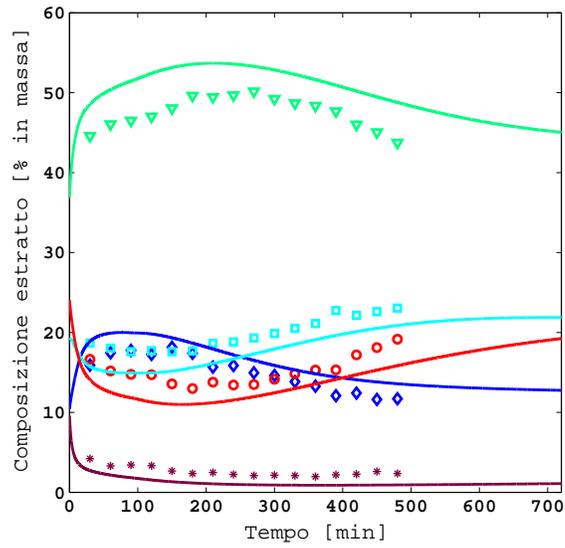


Figura 4.36: Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a  $42^{\circ}C$  e  $100\ atm$ . Colonna  $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond EE - C14$ ;  $\nabla EE - C16$ ;  $\square EE - C18$ ;  $\circ EE - C20$ ;  $* EE - C22$ )

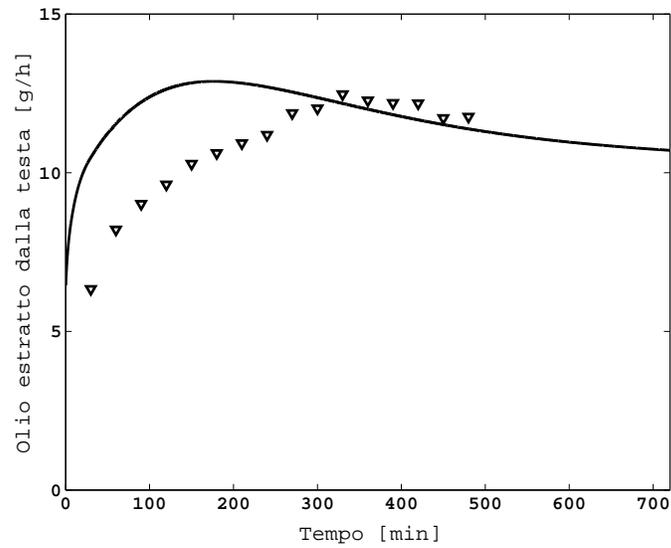


Figura 4.37: Portata di olio estratta dalla testa della colonna a  $50^{\circ}C$  e  $120\ atm$ . Colonna  $n = 3$ .

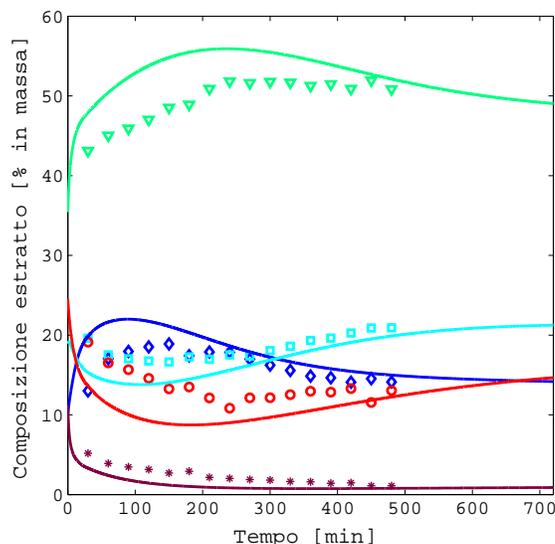


Figura 4.38: Composizione dell'olio estratto dalla testa della colonna a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$ . Colonna  $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

tipologia di processo, semicontinua a riflusso esterno, presenta una flessibilità maggiore rispetto ai processi in cui il riflusso è generato internamente al sistema mediante un gradiente termico in colonna, consentendo un'ampia gamma di possibilità produttive, soprattutto nei casi in cui non si sia interessati a prodotti a valori di purezza elevatissimi ma si vogliano ottenere *oli pharmaceutical grade*.

Nelle figure da 4.39 a 4.41 viene mostrato l'andamento della composizione della fase liquida nel saturatore (raffinato) in funzione del tempo. In questo caso, l'unico confronto con i dati sperimentali è possibile al tempo di fine prova, quando il raffinato viene scaricato dal fondo della colonna ed analizzato. La tabella 4.12 riassume, in termini di composizione di componenti leggeri e pesanti, i risultati ottenuti dalla sperimentazione ed i corrispettivi valori ottenuti dalla simulazione. Il confronto fra valori calcolati e dati sperimentali risulta molto buono, relativamente a due prove sperimentali, mentre non è soddisfacente per quanto riguarda la prova a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$ . Le figure da 4.39 a 4.41 mostrano anche come, se si fosse aumentato il tempo di prova sperimentale, e quindi il rapporto  $S/F$ , si sarebbero potuti ottenere dei raffinati anche oltre il 90 % di componenti pesanti. Tuttavia, come già parzialmente accennato in precedenza, questa soluzione non sembra conveniente in quanto comporta delle diminuzioni di quantità di raffinato prodotta, mentre è presu-

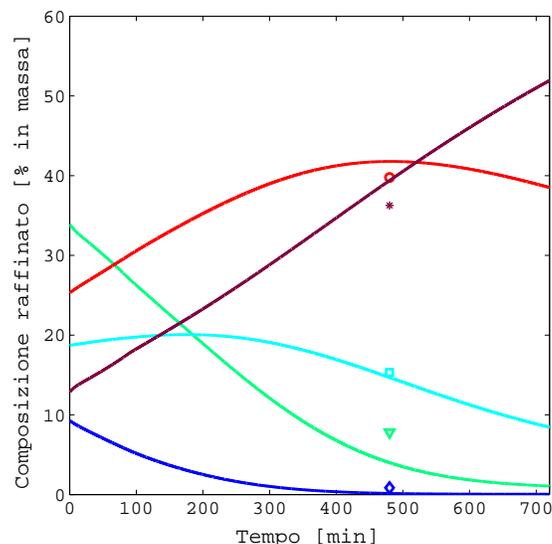


Figura 4.39: Composizione del raffinato a  $42^{\circ}\text{C}$  e  $100\text{ atm}$ . Colonna  $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

mibile che un aumento del rapporto  $S/F$  possa essere più convenientemente sfruttato su un tempo di processo costante mantenendo un rapporto di riflusso più elevato. Inoltre, mantenere lo stesso rapporto di riflusso ed aumentare la durata della prova porta a rapporti DHA/EPA maggiori di uno e progressivamente crescenti e questo può essere accettabile o meno dipendentemente dal tipo di prodotto che si vuole formulare. Un altro aspetto interessante, previsto dalla modellizzazione, che si evince dalla figure da 4.39 a 4.41 scaturisce dall'analisi delle curve riferite alla composizione delle due frazioni di pregio: mentre nelle prove a  $42$  e  $50^{\circ}\text{C}$  il punto di massimo della frazione EE-C20 corrisponde a valori di frazione in massa nell'intervallo  $40 - 45\%$ , a

T [ $^{\circ}\text{C}$ ]	P [atm]	$X_{l,sp}$	$X_{p,sp}$	$X_{p,calc}$	$\epsilon$
42	100	24.0	76.0	81.2	6.8
50	120	35.4	64.6	80.2	24.1
60	140	25.3	74.7	76.0	1.7

Tabella 4.12: Confronto fra la composizione del raffinato ottenuta sperimentalmente e calcolata. Le composizioni sono espresse come percentuale in massa.  $\epsilon$  rappresenta l'errore percentuale fra dato calcolato e sperimentale.

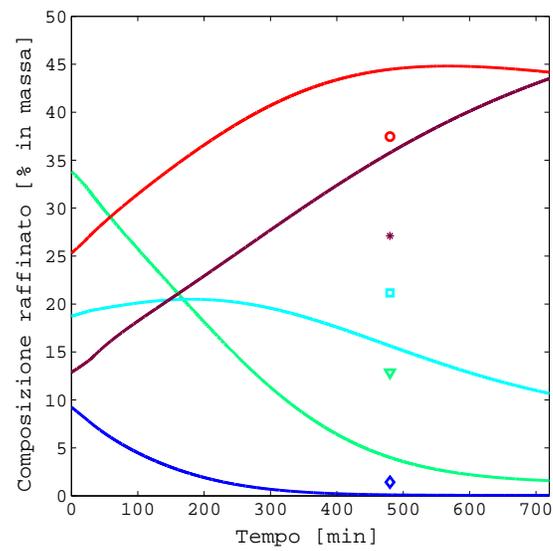


Figura 4.40: Composizione del raffinato a  $50^{\circ}\text{C}$  e  $120\text{ atm}$ . Colonna  $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

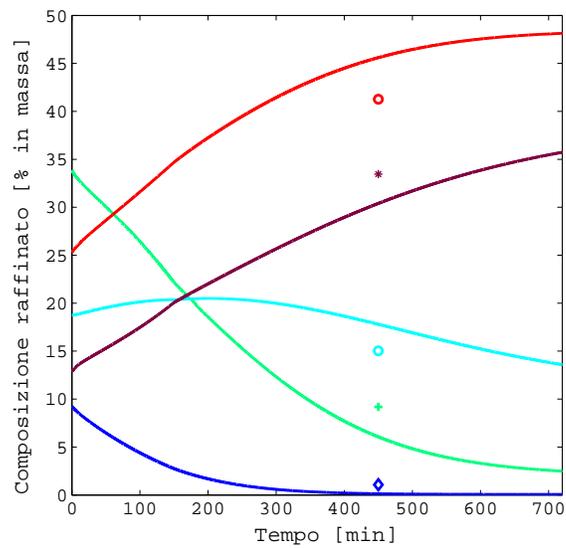


Figura 4.41: Composizione del raffinato a  $60^{\circ}\text{C}$  e  $140\text{ atm}$ . Colonna  $n = 3$ . Punti sperimentali e previsione del modello ( $\diamond$   $EE - C14$ ;  $\nabla$   $EE - C16$ ;  $\square$   $EE - C18$ ;  $\circ$   $EE - C20$ ;  $*$   $EE - C22$ )

60 °C tale valore si assesta intorno al 50%. Questo fatto, unitamente con le considerazioni effettuate nel Paragrafo 4.6.1 sul consumo di solvente, indica nuovamente le condizioni operative a temperatura più elevata come le più indicate per lo sviluppo di un processo produttivo.

Lo studio modellistico del processo in esame è stato completato dall'analisi dei profili di concentrazione in colonna, al variare del tempo. Le figure da 4.42 a 4.53 mostrano i profili di concentrazione, espressa come percentuale in massa, delle classi EE-C16, EE-C18, EE-C20 e EE-C22 all'interno della colonna, per quattro differenti valori del tempo: 180, 360, 540 e 720 minuti. Lo stadio 1 coincide con la zona più alta della colonna, mentre lo stadio 4 coincide con il saturatore. Di particolare interesse, anche per mostrare le potenzialità del modello sviluppato, risulta l'analisi del differente comportamento dei componenti leggeri rispetto ai pesanti. Per tutte le condizioni di pressione e temperatura sottoposte a sperimentazione, gli esteri degli acidi C16 hanno sempre, ad ogni istante si tempo, la massima concentrazione in testa alla colonna. Tuttavia, in ogni punto della colonna la loro concentrazione va diminuendo progressivamente in quanto, essendo solubilizzati preferenzialmente, tendono ad accumularsi nel distillato e quindi la loro quantità in colonna diminuisce al trascorrere del tempo. Da questo punto di vista, il loro comportamento non si differenzia da quello degli esteri degli acidi C14 (figure non mostrate). Il comportamento della classe più pesante, ovvero gli esteri degli acidi C22, è all'incirca opposto. Come si può vedere dalle figure da 4.51 a 4.53, in ogni istante di tempo la massima concentrazione di questi componenti è sempre nel saturatore. Inoltre, all'interno del saturatore, come anche nelle zone basse della colonna, la concentrazione degli esteri degli acidi C22 aumenta sempre. Nella parte più alta della colonna, invece, tale concentrazione si mantiene a valori molto bassi, all'incirca costanti. Per quanto riguarda gli EE-C20 si evidenzia, come si può vedere dalle figure da 4.48 a 4.50, un comportamento molto interessante. A temperatura di 60 °C, per valori del tempo fino a circa 540 minuti, gli EE-C20 si comportano in modo analogo agli EE-C22. Solo a valori del tempo più alti, quando in colonna è presente una quota elevata di componenti pesanti, il sistema comincia a "distinguere" più nettamente fra le due classi di componenti pesanti, causando la comparsa di una zona di massima concentrazione per gli EE-C20 in prossimità del terzo stadio. Di contro, più la temperatura si riduce, più la "distinzione" fra gli EE-C20 e gli EE-C22 è anticipata, con il massimo per gli EE-C20 localizzato, a 42 °C sin da valori del tempo compresi fra 180 e 360 minuti. Da questo punto di vista, soprattutto nei casi in cui si vuole arricchire l'intera classe EE-C20+EE-C22 piuttosto che le singole classi, le condizioni operative relative alla temperatura più alta sono, ancora una volta, da preferirsi. Infine, le figure da 4.45 a 4.47 manifestano chiaramente

il comportamento intermedio degli EE-C18: in tutti gli istanti di tempo il valore di massima concentrazione è situato nel secondo stadio della colonna. L'unica eccezione è rappresentata dal dato riferito a 720 minuti ed a temperatura di  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  che mostra uno spostamento del valore massimo in testa alla colonna.

Infine, è stato studiato il profilo delle densità delle fasi a contatto lungo la colonna, al variare del tempo, dal momento che la fattibilità del processo è legata anche alla presenza di una sufficiente differenza di densità fra le due fasi. In tutte le condizioni sottoposte a sperimentazione si è trovato lo stesso risultato: le variazioni di composizione causano delle variazioni trascurabili di densità delle singole fasi e quindi la differenza di densità fra le fasi si mantiene all'incirca costante, sia lungo la colonna che al trascorrere del tempo. La figura 4.54 mostra, a titolo di esempio, i risultati ottenuti relativamente alla prova sperimentale realizzata a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bisogna inoltre notare che la densità della fase supercritica è praticamente coincidente con la densità del solvente puro, in quanto la solubilità dei componenti dell'olio in anidride carbonica supercritica è comunque bassa. A  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $140\text{ atm}$  la densità dell'anidride carbonica è pari a  $560\text{ kg/m}^3$  [1]. Il motivo per cui la densità della fase supercritica mostrata nella figura 4.54 è leggermente diverso dal valore sperimentale riportato in letteratura, è dovuto all'errore commesso dall'equazione di stato di Peng-Robinson, comunque non elevato, e non dalla presenza di piccole quantità di olio solubilizzate.

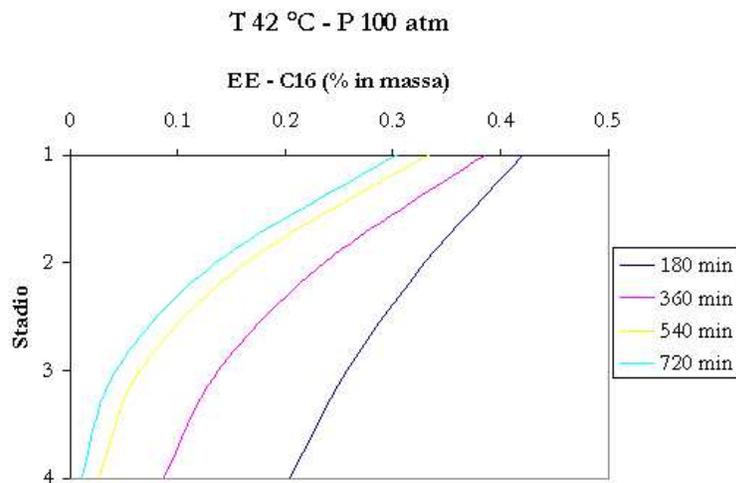


Figura 4.42: Profilo di concentrazione della classe EE-C16 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 42 °C, 100 atm

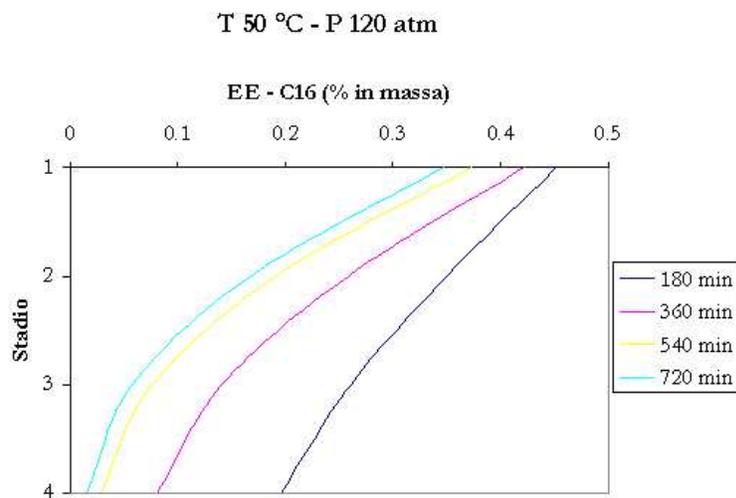


Figura 4.43: Profilo di concentrazione della classe EE-C16 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 50 °C, 120 atm

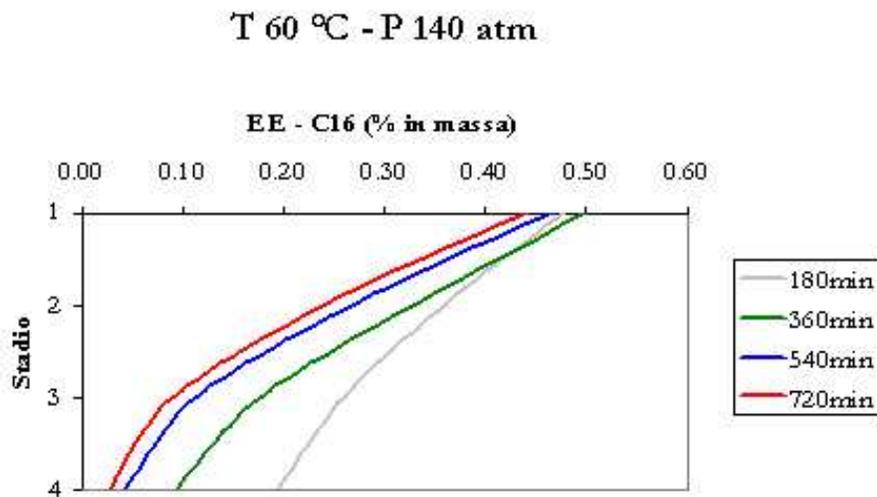


Figura 4.44: Profilo di concentrazione della classe EE-C16 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 60 °C, 140 atm

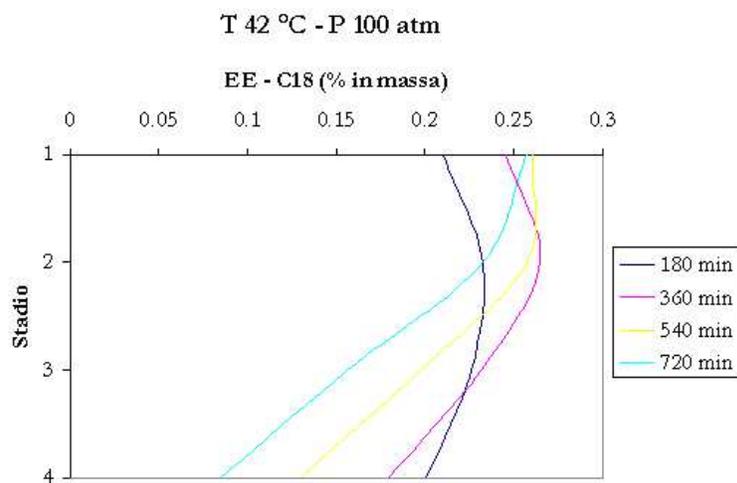


Figura 4.45: Profilo di concentrazione della classe EE-C18 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 42 °C, 100 atm

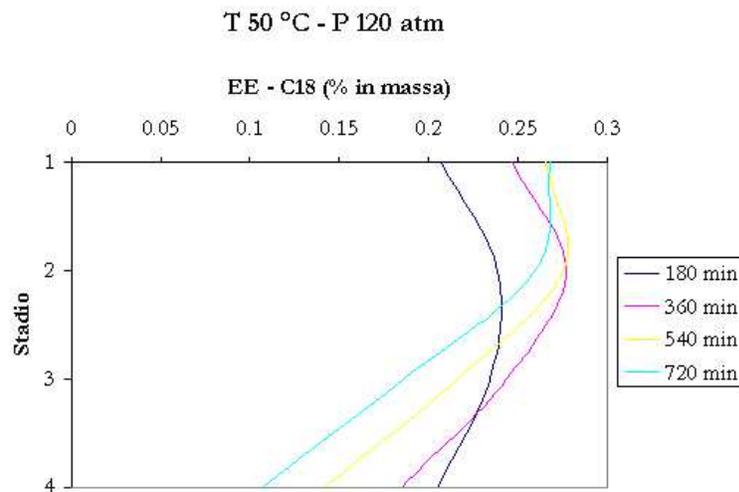


Figura 4.46: Profilo di concentrazione della classe EE-C18 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 50 °C, 120 atm

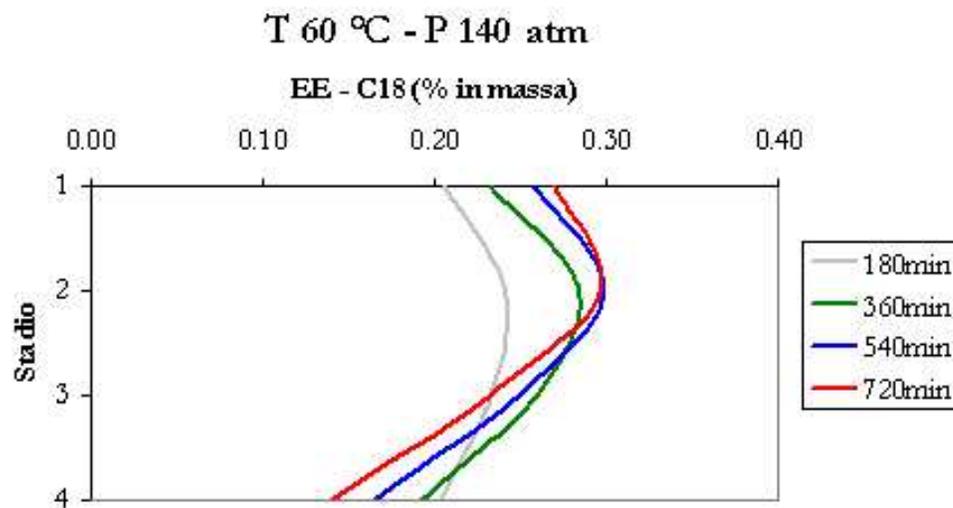


Figura 4.47: Profilo di concentrazione della classe EE-C18 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 60 °C, 140 atm

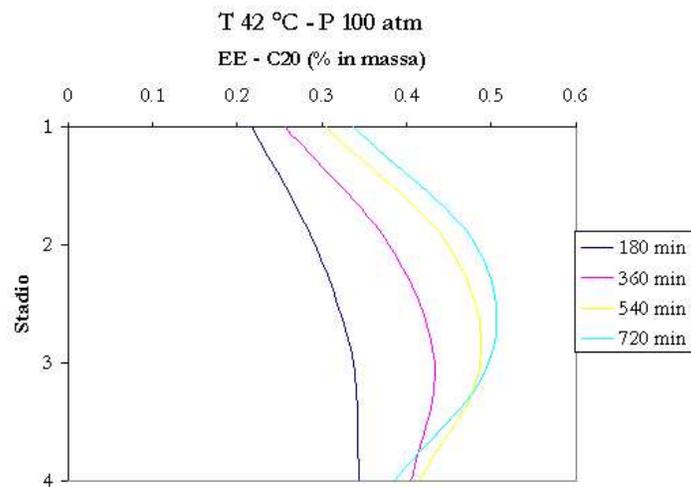


Figura 4.48: Profilo di concentrazione della classe EE-C20 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 42 °C, 100 atm

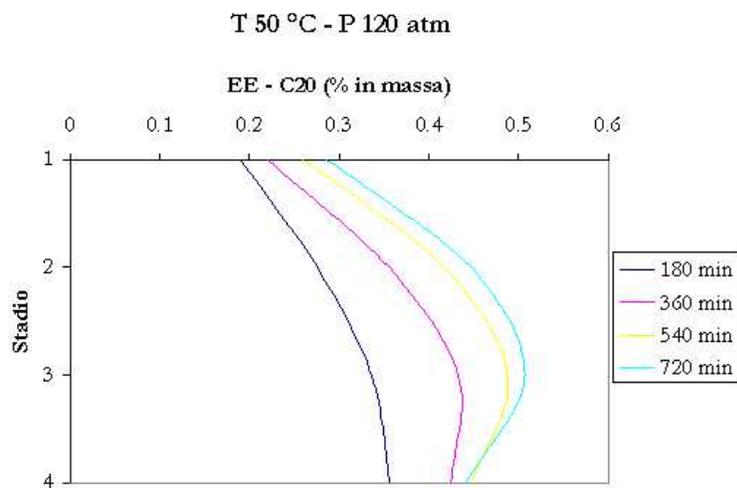


Figura 4.49: Profilo di concentrazione della classe EE-C20 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 50 °C, 120 atm

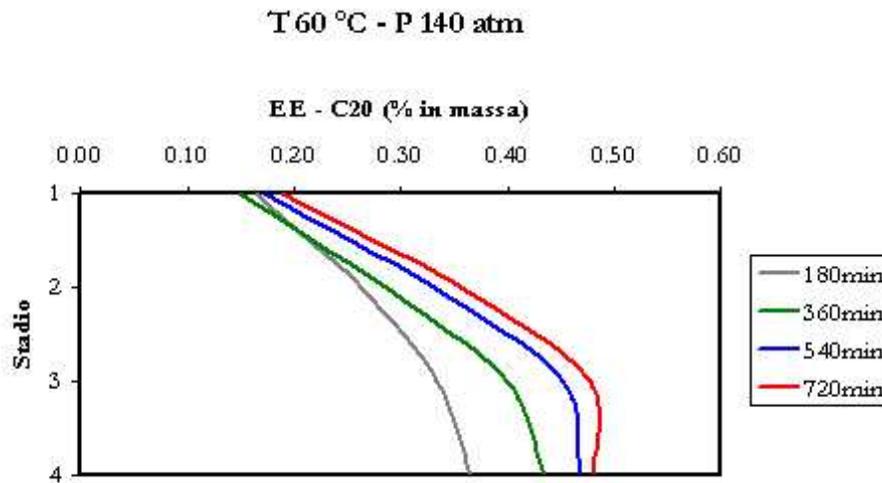


Figura 4.50: Profilo di concentrazione della classe EE-C20 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 60 °C, 140 atm

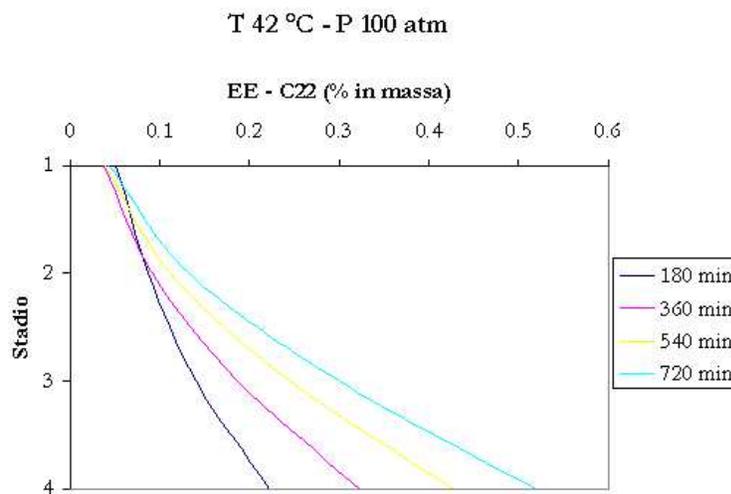


Figura 4.51: Profilo di concentrazione della classe EE-C22 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 42 °C, 100 atm

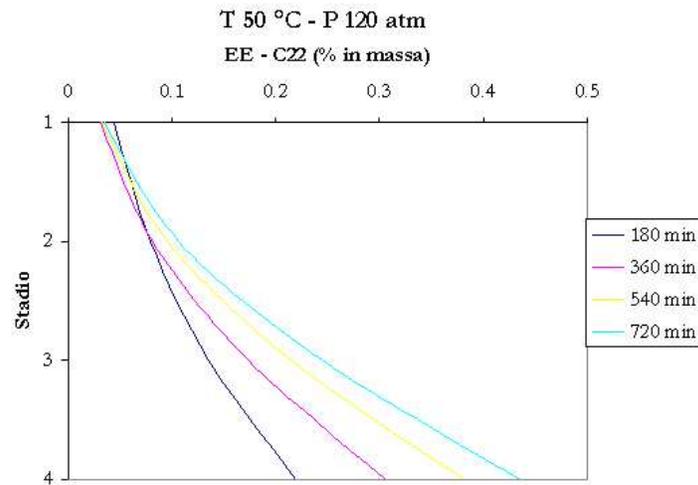


Figura 4.52: Profilo di concentrazione della classe EE-C22 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 50 °C, 120 atm

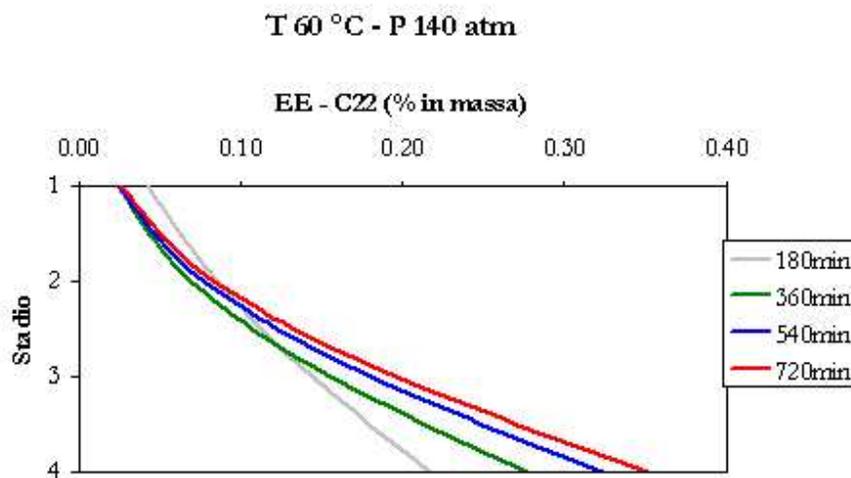


Figura 4.53: Profilo di concentrazione della classe EE-C22 in colonna per differenti valori del tempo. Prova sperimentale a 60 °C, 140 atm

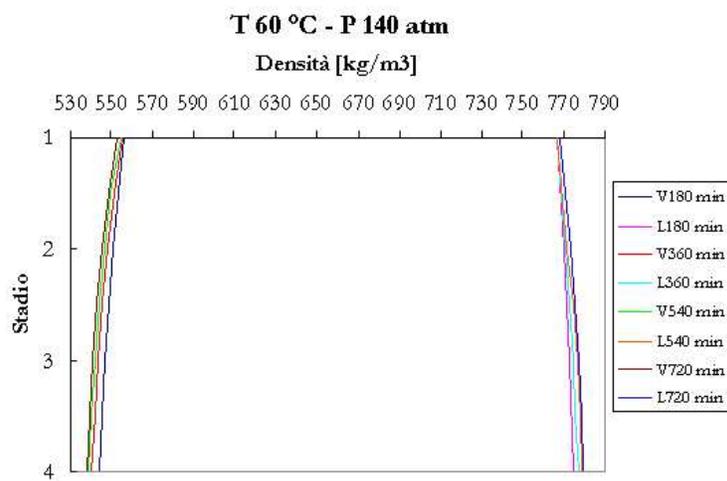


Figura 4.54: Profilo di densità delle due fasi circolanti in colonna a 60 °C e 140 atm.

# Bibliografia

- [1] V. Riha, G. Brunner, Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 17 (2000) 55–64.
- [2] W.B. Nilsson, Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Fish Oils, in *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*, J.W. King, G.R. List (ed.), AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996.

# Capitolo 5

## Conclusioni

Lo studio dei processi di raffinazione e frazionamento degli oli di pesce è un tema che sta acquisendo sempre maggiore importanza per la possibilità di ottenere, da questa matrice naturale, miscele ricche in EPA e DHA, le cui proprietà benefiche nella prevenzione e nella terapia di alcune patologie molto diffuse sono state ampiamente dimostrate. Una delle richieste emergenti da parte del settore farmaceutico e degli integratori alimentari riguarda la produzione di *oli pharmaceutical grade*, ovvero di miscele arricchite in EPA e DHA (o nei loro esteri etilici) a valori di frazione in massa generalmente compresi fra il 50 ed il 90 %.

Il frazionamento degli oli di pesce presenta degli elementi di complessità in quanto l'EPA ed il DHA, come gli altri acidi grassi polinsaturi contenuti in questi oli, sono composti che si degradano con estrema facilità a causa del contatto con l'ossigeno e/o dell'esposizione a temperature elevate. Inoltre, gli elevati standard qualitativi richiesti ai prodotti da commercializzare non consentono l'utilizzo di solventi che non possano essere integralmente separati dal prodotto finito. Tutti questi fattori hanno reso i processi basati sull'utilizzo dell'anidride carbonica supercritica una delle possibilità più attraenti per questo settore.

La sperimentazione effettuata nell'ambito di questa Tesi ha riguardato due tipologie di processi di separazione mediante anidride carbonica supercritica. La prima tipologia consiste nel frazionamento semicontinuo a singolo stadio di equilibrio, effettuato sia su una miscela sintetica che su un olio naturale, derivato dalla transesterificazione di un olio di pesce. E' stato verificato che il frazionamento è reso possibile dalla selettività che l'anidride carbonica manifesta nei confronti degli esteri etilici di acidi grassi a diversa lunghezza di catena. Quindi, selezionando oli di pesce con rapporti EPA/C20 e DHA/C22 elevati, il prodotto pesante (raffinato) ottenuto dal processo di frazionamento risulta ad alta concentrazione di EPA e DHA. Gli oli più indicati a tale scopo

sono gli oli di sardina, acciuga, sgombro, menhaden oppure gli oli ottenibili dagli scarti della lavorazione di alcune specie di pesce, come ad esempio il tonno. Inoltre, questa fase della sperimentazione ha consentito di sviluppare un modello termodinamico basato sull'equazione di stato di Peng–Robinson, per la rappresentazione dell'equilibrio di fase ad alta pressione di queste miscele complesse.

La seconda fase della sperimentazione ha riguardato lo studio di un processo di separazione di tipo semicontinuo che prevede il riflusso di parte dell'olio estratto in una colonna, dotata di un riempimento strutturato ad alta efficienza. Nell'ambito dei valori dei parametri operativi utilizzati nella sperimentazione (temperature variabili da 42 a 60 °C, pressioni variabili da 90 a 160 atm) le condizioni ottimali sono state individuate per valori di densità del solvente compresi nell'intervallo 550 – 590 kg/m<sup>3</sup>. In particolare, i risultati migliori sono stati ottenuti a 60 °C e 140 atm. In queste condizioni, con un rapporto solvente/alimentazione pari circa a 80, che è un valore relativamente basso rispetto ai valori caratteristici dei processi supercritici, è stato ottenuto un raffinato al 75 % in componenti pesanti, con un recupero superiore all'80 %.

Il modello termodinamico sviluppato e messo a punto con i dati relativi alle prove a singolo stadio di equilibrio è stato utilizzato come base per lo sviluppo di una modellizzazione del processo multistadio con riflusso. I risultati ottenuti consentono di dare una buona rappresentazione del processo, in termini di profili di concentrazione, densità e portate circolanti in colonna, al variare del tempo. L'applicazione del modello ai risultati delle prove sperimentali ha consentito di stimare che, aumentando il rapporto solvente/alimentazione, si possa arrivare a frazioni in massa di componenti pesanti nel raffinato superiori al 90 %. Il modello proposto rappresenta un utile strumento per la selezione dei parametri operativi ottimali e la progettazione di un processo semicontinuo, di tipo non stazionario con riflusso esterno, per una data specifica di separazione.

# Appendice A

## Programmi di calcolo

In questa appendice vengono riportati i programmi utilizzati per la realizzazione delle simulazioni. Il software utilizzato è il Matlab 6.5.

### A.1 Calcolo del volume specifico

Questo programma esegue il calcolo del volume specifico molare di una miscela di  $c$  componenti mediante l'equazione di stato di Peng-Robinson con regole di mescolamento di tipo van der Waals.  $P_c$  (pascal),  $T_c$  (kelvin),  $\omega$  sono dei vettori di  $c$  componenti che riportano i dati critici ed il fattore acentrico;  $\kappa$  ed  $\eta$  sono delle matrici ( $c \times c$ ) che riportano i parametri di interazione binaria.  $P$  (pascal) e  $T$  (kelvin) rappresentano la pressione e la temperatura del sistema;  $z$  è un vettore di  $c$  componenti che riporta le frazioni molari dei componenti il sistema. Il programma produce in output tutte e sole le soluzioni reali dell'equazione di stato cubica.

```
function [V]=CalcolaVolumeMixPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,z)
R=8.314;
c=length(z);
k=0.37464+1.54226*omega-0.26992*omega.^2;
alpha=(1+k.*(1-sqrt(T./Tc))).^2;
a=0.45724*R^2*((Tc.^2).*alpha)./Pc);
b=0.07780*R*(Tc./Pc);
A=zeros(c,c);
B=zeros(c,c);
amix=0;
bmix=0;
for i=1:c
    for j=1:c
```

```

    if i==j
        A(i,j)=a(i);
        B(i,j)=b(i);
    else
        A(i,j)=sqrt(a(i)*a(j))*(1-kappa(i,j));
        B(i,j)=((b(i)+b(j))/2)*(1-eta(i,j));
    end
    amix=amix+z(i)*z(j)*A(i,j);
    bmix=bmix+z(i)*z(j)*B(i,j);
end
end
a2=(bmix*P-R*T)/P;
a3=(amix-2*bmix*R*T-3*P*bmix^2)/P;
a4=(R*T*bmix^2+P*bmix^3-amix*bmix)/P;
[V]=SolvePoly3(a2,a3,a4);

```

## A.2 Calcolo dei coefficienti di fugacità

Questo programma calcola il coefficiente di fugacità di tutti i componenti di una miscela utilizzando l'equazione di stato di Peng-Robinson.  $P_c$ ,  $T_c$ ,  $\omega$  sono vettori di  $c$  componenti che riportano le pressioni critiche (pascal), temperature critiche (kelvin) ed il fattore acentrico di tutti i componenti.  $x$  è un vettore di  $c$  componenti che riporta le frazioni molari dei componenti della miscela.  $\kappa$  ed  $\eta$  sono le matrici ( $c \times c$ ) dei parametri di interazione binaria. In caso di soluzioni multiple per il volume specifico molare, fra tutte quelle con significato fisico viene scelta la soluzione di valore minimo.

```

function [fi]=CoeffFugacitaLiquidoPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,x)
R=8.314;
c=length(x);
k=0.37464+1.54226*omega-0.26992*omega.^2;
alpha=(1+k.*(1-sqrt(T./Tc))).^2;
a=0.45724*R^2*(((Tc.^2).*alpha)./Pc);
b=0.07780*R*(Tc./Pc);
A=zeros(c,c);
B=zeros(c,c);
amix=0;
bmix=0;
for i=1:c
    for j=1:c
        if i==j

```

```

        A(i,j)=a(i);
        B(i,j)=b(i);
    else
        A(i,j)=sqrt(a(i)*a(j))*(1-kappa(i,j));
        B(i,j)=((b(i)+b(j))/2)*(1-eta(i,j));
    end
    amix=amix+x(i)*x(j)*A(i,j);
    bmix=bmix+x(i)*x(j)*B(i,j);
end
end
a2=(bmix*P-R*T)/P;
a3=(amix-2*bmix*R*T-3*P*bmix^2)/P;
a4=(R*T*bmix^2+P*bmix^3-amix*bmix)/P;
[V]=SolvePoly3(a2,a3,a4);
if min(V)>bmix
    VL=min(V);
else
    VL=max(V);
end
ZL=(P*VL)/(R*T);
A1=(amix*P)/((R*T)^2);
B1=(bmix*P)/(R*T);
C=zeros(1,c);
D=zeros(1,c);
for i=1:c
    T1=B(i,:);
    T2=A(i,:);
    C(i)=(2*P/(R*T))*(T1*x')-B1;
    D(i)=2*(T2*x');
end
fiL=zeros(1,c);
for i=1:c
    lnfiL(i)=C(i)*(ZL-1)/B1-log(ZL-B1)-(A1/(2*sqrt(2)*B1))*
        (D(i)/amix-C(i)/B1)*log((ZL+(1+sqrt(2))*B1)/
        (ZL+(1-sqrt(2))*B1));
    fiL(i)=exp(lnfiL(i));
end
fi=fiL;

```

La seguente funzione è analoga alla precedente con la sola differenza che, in caso di soluzioni multiple per il volume, fra tutte quelle con significato fisico

viene scelta quella maggiore.

```
function [fi]=CoeffFugacitaVaporePR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,y)
R=8.314;
c=length(y);
k=0.37464+1.54226*omega-0.26992*omega.^2;
alpha=(1+k.*(1-sqrt(T./Tc))).^2;
a=0.45724*R^2*((Tc.^2).*alpha)./Pc);
b=0.07780*R*(Tc./Pc);
A=zeros(c,c);
B=zeros(c,c);
amix=0;
bmix=0;
for i=1:c
    for j=1:c
        if i==j
            A(i,j)=a(i);
            B(i,j)=b(i);
        else
            A(i,j)=sqrt(a(i)*a(j))*(1-kappa(i,j));
            B(i,j)=(b(i)+b(j))/2*(1-eta(i,j));
        end
        amix=amix+y(i)*y(j)*A(i,j);
        bmix=bmix+y(i)*y(j)*B(i,j);
    end
end
a2=(bmix*P-R*T)/P;
a3=(amix-2*bmix*R*T-3*P*bmix^2)/P;
a4=(R*T*bmix^2+P*bmix^3-amix*bmix)/P;
[V]=SolvePoly3(a2,a3,a4);
VV=max(V);
ZV=P*VV/(R*T);
A1=(amix*P)/((R*T)^2);
B1=(bmix*P)/(R*T);
C=zeros(1,c);
D=zeros(1,c);
for i=1:c
    T1=B(i,:);
    T2=A(i,:);
    C(i)=(2*P/(R*T))*(T1*y')-B1;
    D(i)=2*(T2*y');
```

```

end
fiV=zeros(1,c);
for i=1:c
    lnfiV(i)=C(i)*(ZV-1)/B1-log(ZV-B1)-(A1/(2*sqrt(2)*B1))*
        (D(i)/amix-C(i)/B1)*log((ZV+(1+sqrt(2))*B1)/
        (ZV+(1-sqrt(2))*B1));
    fiV(i)=exp(lnfiV(i));
end
fi=fiV;

```

### A.3 Calcolo del Flash

Questo programma esegue il calcolo del flash di una miscela a  $c$  componenti di composizione globale  $\bar{z}$  (frazioni molari) che si trova alla temperatura  $T$  (kelvin) ed alla pressione  $P$  (pascal). Il programma richiede in input le pressioni critiche (pascal), le temperature critiche (kelvin) ed il fattore acentrico (vettori di  $c$  componenti), due matrici di dimensioni ( $c*c$ ) che riportano i parametri di interazione binaria  $\kappa$  ed  $\eta$  ed un vettore di  $c$  componenti che riporta una stima di primo tentativo dei rapporti di equilibrio. Se nelle condizioni date il sistema non lineare che rappresenta la condizione di isofugacità ammette soluzione con significato fisico e se tale soluzione è trovata con un numero di iterate inferiore al valore assegnato al parametro *itermax*, il programma restituisce in output le frazioni molari delle due fasi in equilibrio.

```

function [xeq,yeq]=FlashPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,z,K0);
itermax=10000;
eps1=0.0001;
eps2=0.0001;
L1=0.0001;
L2=0.9999;
c=length(z);
K=K0;
L=(L1+L2)/2;
x=z./(L+K.*(1-L));
y=K.*x;
fiL=CoeffFugacitaLiquidoPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,x);
fiV=CoeffFugacitaVaporePR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,y);
fL=P*x.*fiL;
fV=P*y.*fiV;
iter=0;
while (abs(sum(x)-sum(y))>eps1 | max(abs(fL-fV))>eps2) & iter<itermax

```

```

while L2-L1>eps1*L2
    aux1=sum(z.*(1-K)./(L1+K.*(1-L1)))
    aux2=sum(z.*(1-K)./(L2+K.*(1-L2)))
    L=(L1+L2)/2;
    aux3=sum(z.*(1-K)./(L+K.*(1-L)))
    if aux3*aux2<0
        L1=L;
        aux1=aux3;
    else
        L2=L;
        aux2=aux3;
    end
end
end
x=z./(L+K.*(1-L));
y=K.*x;
fiL=CoeffFugacitaLiquidoPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,x);
fiV=CoeffFugacitaVaporePR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,y);
fL=P*x.*fiL;
fV=P*y.*fiV;
for i=1:c
    if fV(i)==0
        fV(i)=0.000001;
    end
end
end
K=(K.*fL)./fV;
x=z./(L+K.*(1-L));
y=K.*x;
iter=iter+1;
end
if iter<itermax
    xeq=x;
    yeq=y;
    Ls=L;
    if max(abs(y-x))<0.000000001
        for i=1:c
            xeq(i)=NaN;
            yeq(i)=NaN;
            Ls=L;
        end
    end
end
else

```

```

    for i=1:c
        xeq(i)=NaN;
        yeq(i)=NaN;
        Ls=L;
    end
end
end

```

## A.4 Calcolo delle condizioni iniziali

Questo programma calcola lo stato di un sistema distribuito su due fasi a volume, pressione e temperatura noti, quando sia nota la quantità dei componenti dell'olio presenti nel sistema. Il programma riceve in input la temperatura (kelvin), la pressione (pascal), un vettore contenente il numero totale delle moli di olio ( $NO_i$  per  $i = 2 : 6$ ), la stima di primo tentativo delle moli di  $CO_2$  presenti nell'apparecchiatura nelle condizioni iniziali ( $NO_1$ ), il volume dell'apparecchiatura ( $V_{app}$ ) ed un vettore che riporta i pesi molecolari di tutti i componenti. Inoltre, riceve in input gli altri parametri necessari al funzionamento dei sottoprogrammi chiamati al suo interno. Restituisce in output i vettori di  $c$  componenti che riportano la composizione delle due fasi in equilibrio ( $\vec{x}$  e  $\vec{y}$ ), le moli totali in fase liquida ( $L_{tot}$ ) ed in fase vapore ( $V_{tot}$ ) e le densità delle due fasi ( $roL$  e  $roV$ ) che vengono espresse in  $kg/m^3$ .

```

function [x,y,Ltot,Vtot,roL,roV]=CondizioniIniziali(Pc,Tc,omega,
kappa,eta,P,T,NO,Vapp,KO,PM)
itermax=1000;
eps1=0.0001;
c=length(NO);
z=NO/sum(NO);
[xeq,yeq,alfaL]=FlashPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,z,KO);
[Vol,bmix]=CalcolaVolumeMixPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,xeq);
    if min(Vol)>bmix
        VL=min(Vol);
    else
        VL=max(Vol);
    end
[Vol,bmix]=CalcolaVolumeMixPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,yeq);
VV=max(Vol);
aux1=Vapp/(alfaL*(VL-VV)+VV)-sum(NO(2:c));
Ltot=alfaL*sum(NO);
Vtot=sum(NO)-Ltot;
iter=0;

```

```

while abs((aux1-N0(1))/N0(1))>eps1 & iter<itermax
    N0(1)=aux1;
    N0=[aux1,N0(2:c)];
    z=N0/sum(N0);
    [xeq,yeq,alfaL]=FlashPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,z,K0);
    Ltot=alfaL*sum(N0);
    Vtot=sum(N0)-Ltot;
    [Vol,bmix]=CalcolaVolumeMixPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,xeq);
    if min(Vol)>bmix
        VL=min(Vol);
    else
        VL=max(Vol);
    end
    [Vol,bmix]=CalcolaVolumeMixPR(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,yeq);
    VV=max(Vol);
    aux1=Vapp/(alfaL*(VL-VV)+VV)-sum(N0(2:c));
    iter=iter+1;
end
iter=iter;
x=xeq;
y=yeq;
Ltot=Ltot;
Vtot=Vtot;
VfL=VL*Ltot;
VfV=VV*Vtot;
VL=VL;
VV=VV;
N=[aux1,N0(2:c)];
PMmL=sum(x.*PM);
PMmV=sum(y.*PM);
roL=PMmL/(VL*1000);
roV=PMmV/(VV*1000);

```

## A.5 Simulazione del processo semicontinuo a singolo stadio

Questo programma simula il comportamento di un processo semicontinuo a singolo stadio di equilibrio. Il programma riceve in input gli stessi dati elencati in precedenza relativamente al programma *CondizioniIniziali*, oltre alla

portata di solvente uscente dall'apparecchiatura (da esprimersi in  $mol/min$ ), alla durata temporale del processo che si vuole simulare ( $t_{max}$ , in minuti) ed al passo temporale di integrazione ( $deltat$ , in minuti). Il programma fornisce in output: le matrici  $c \times p$  ( $c$ : numero di componenti;  $p$ : numero di passi temporali dell'integrazione) che riportano le composizioni in fase liquida ( $x$ ) ed in fase vapore ( $y$ ) ai vari nodi temporali di integrazione; le analoghe grandezze riferite alle composizioni su base priva di solvente ( $X$  e  $Y$ ); i vettori di  $p$  componenti che riportano le moli di liquido ( $L_{tot}$ ) e le moli di vapore ( $V_{tot}$ ) ai vari nodi temporali di integrazione; le matrici  $c \times p$  che riportano le moli dei singoli componenti nel liquido e nel vapore ai vari nodi temporali ( $L$  e  $V$ ); un vettore di  $p$  componenti che riporta la portata in ingresso di solvente ( $Fin$ ). La simulazione si arresta o al raggiungimento del tempo  $t_{max}$  oppure se il sottoprogramma *FlashPR*, chiamato all'interno del sottoprogramma *CondizioniIniziali*, non raggiunge la convergenza.

```
function [x,y,Fin,V,L,X,Y,Vtot,Ltot]=Dinamico(Pc,Tc,omega,kappa,eta,
P,T,N0,Vapp,K0,PM,a, tmax, deltat)
c=length(Pc);
t=0;
Fin=0;
Xeq=zeros((tmax/deltat)+1,c-1);
Yeq=zeros((tmax/deltat)+1,c-1);
xeq=zeros((tmax/deltat)+1,c);
yeq=zeros((tmax/deltat)+1,c);
Lp=zeros((tmax/deltat)+1,c);
Vp=zeros((tmax/deltat)+1,c);
Fin=zeros((tmax/deltat)+1,1);
Ltotp=zeros((tmax/deltat)+1,1);
Vtotp=zeros((tmax/deltat)+1,1);
[x,y,Ltot,Vtot,N]=CondizioniIniziali(Pc,Tc,omega,kappa,eta,
P,T,N0,Vapp,K0,PM);
xeq(1,:)=x;
yeq(1,:)=y;
Vtotp(1,1)=Vtot;
Ltotp(1,1)=Ltot;
Vp(1,:)=Vtotp(1,1)*y;
Lp(1,:)=Ltotp(1,1)*x;
for i=1:c-1
    X(i)=Lp(1,i+1)/(Ltotp(1,1)-Lp(1,1));
    Y(i)=Vp(1,i+1)/(Vtotp(1,1)-Vp(1,1));
end
```

```

Xeq(1,:)=X;
Yeq(1,:)=Y;
for i=1:c
    if x(i)~=0
        K0=y./x;
    end
end
aux1=zeros(1,c);
while t<tmax & sum(x)>0 & sum(y)>0
    for j=2:(tmax/deltat)+1
        aux1(1)=N(1);
        aux1(2:c)=N(2:c)-(a*y(2:c)/y(1))*deltat;
        for i=1:c
            if aux1(i)<0
                aux1(i)=0;
            end
        end
        end
        [x,y,Ltot,Vtot,N]=CondizioniIniziali(Pc,Tc,omega,kappa,eta,
        P,T,aux1,Vapp,K0,PM);
        Vtotp(j,1)=Vtot;
        Ltotp(j,1)=Ltot;
        Vp(j,:)=Vtotp(j,1)*y;
        Lp(j,:)=Ltotp(j,1)*x;
        for i=1:c-1
            X(i)=Lp(j,i+1)/(Ltotp(j,1)-Lp(j,1));
            Y(i)=Vp(j,i+1)/(Vtotp(j,1)-Vp(j,1));
        end
        Xeq(j,:)=X;
        Yeq(j,:)=Y;
        aux2=N(1);
        deltaN1=aux2-aux1(1);
        Fin(j,1)=a+deltaN1/deltat; %Fin risulta espressa in [mol/min]
        for i=1:c
            if x(i)~=0
                K0=y./x;
            end
        end
        end
        K0=K0;
        xeq(j,:)=x;
        yeq(j,:)=y;
        t=t+deltat;

```

```

    end
end
x=xeq;
y=yeq;
Fin=Fin;
Fout=a./y(:,1);
V=Vp;
L=Lp;
N=L+V;
X=Xeq;
Y=Yeq;
Vtot=Vtotp;
Ltot=Ltotp;

```

## A.6 Calcolo del sistema multistadio a riflusso esterno

Questo programma simula il comportamento di un saturatore sormontato da una colonna a piatti. Il saturatore è inizialmente caricato con una specificata quantità di olio, il sistema è alimentato dal fondo da una portata nota di solvente ed una quota dell'olio estratto viene riflussata dalla testa della colonna. Il programma riceve in input i dati termodinamici del sistema, la pressione di esercizio (pascal), la temperatura (kelvin), il volume dell'apparecchiatura (saturatore + zona vuota del riempimento + disimpegno di testa, indicato con  $V_{app}$ ), il volume del saturatore ( $V_{sat}$ ), il volume vuoto del riempimento ( $V_{riemp}$ ). Tutti i volumi sono espressi in  $m^3$ . Richiede inoltre in input il numero di piatti ( $n$ ), le moli totali caricate nell'accumulatore all'istante iniziale ( $D0$ , grandezza scalare), le moli totali caricate nel saturatore all'istante iniziale ( $R0$ , grandezza scalare), la frazione molare dell'alimentazione ( $XF$ , vettore a  $c-1$  componenti), un vettore che riporta la portata di riflusso nei vari istanti di tempo ( $L0$ , vettore di  $p=t_{max}/\Delta t$  componenti espresse in g/min, dove  $p$  rappresenta il numero di passi dell'integrazione rispetto al tempo), la portata di  $CO_2$  uscente dalla colonna ( $a$ , grandezza scalare) espressa in mol/min, una matrice  $(p+1) \times n$  che riporta gli hold-up di olio espressi in grammi, un vettore di  $c$  componenti che riporta la stima di primo tentativo dei rapporti di equilibrio ( $K0$ ), il tempo massimo ( $t_{max}$ , grandezza scalare) di simulazione in minuti, il passo temporale di integrazione ( $\Delta t$ , grandezza scalare) in minuti.

Restituisce in output una matrice  $p \times (n+1)$  che riporta le portate liqui-

de in colonna espresse in mol/min (L), una matrice  $p \times (n+1)$  che riporta le portate vapore in colonna espresse in mol/min (V), una matrice  $p \times (n+1)$  che riporta le portate liquide di olio in colonna espresse in g/h (GLolio), una matrice  $p \times (n+1)$  che riporta le portate vapore di olio in colonna espresse in g/h (GVolio), una matrice  $(p+1) \times (n+2) \times c$  che riporta le frazioni molari in fase liquida (x), una matrice  $(p+1) \times (n+1) \times c$  che riporta le frazioni molari in fase vapore (y), una matrice  $(p+1) \times (n+2) \times (c-1)$  che riporta le frazioni molari su base priva di solvente in fase liquida (X), una matrice  $(p+1) \times (n+1) \times (c-1)$  che riporta le frazioni molari su base priva di solvente in fase vapore (Y), una matrice  $(p+1) \times (n+2) \times 2$  che riporta le frazioni molari su base priva di solvente dei componenti leggeri e pesanti in fase liquida (Xlp), una matrice  $(p+1) \times (n+1) \times 2$  che riporta le frazioni molari su base priva di solvente dei componenti leggeri e pesanti in fase vapore (Ylp), una matrice  $(p+1) \times (n+2) \times (c-1)$  che riporta le frazioni ponderali su base priva di solvente in fase liquida (Xpond), una matrice  $(p+1) \times (n+1) \times (c-1)$  che riporta le frazioni ponderali su base priva di solvente in fase vapore (Ypond), una matrice  $(p+1) \times (n+2) \times 2$  che riporta le frazioni ponderali su base priva di solvente dei componenti leggeri e pesanti in fase liquida (Xpondlp), una matrice  $(p+1) \times (n+1) \times 2$  che riporta le frazioni ponderali su base priva di solvente dei componenti leggeri e pesanti in fase vapore (Ypondlp), il vettore di  $(p+1)$  componenti che riporta i grammi di distillato (D), il vettore di  $(p+1)$  componenti che riporta i grammi di raffinato (R), una matrice  $(p+1) \times (n+1) \times c$  che riporta le moli (fase liquida + fase vapore) dei singoli componenti contenute nei piatti e nel saturatore (N), una matrice  $(p+1) \times (n+1)$  che riporta nel tempo la densità in kg/m<sup>3</sup> della fase vapore nei piatti e nel saturatore (roV) ed una matrice  $(p+1) \times (n+1)$  che riporta nel tempo la densità in kg/m<sup>3</sup> della fase liquida nei piatti e nel saturatore (roL). Nota: la suddivisione leggeri/pesanti è effettuata considerando leggeri i componenti da 2 a 4 (il componente 1 è il solvente) e pesanti tutti quelli da 5 in poi. Se si volesse cambiare la suddivisione bisognerebbe correggere le definizioni di Xlp e Ylp. Il sottoprogramma *CondizioniInizialiBis* che viene chiamato all'interno di questo programma è identico al programma *CondizioniIniziali*, presentato in Appendice A.4, eccetto che per le variabili che vengono esplicitate in output.

```
function [L,V,GLolio,GVolio,x,y,X,Y,Xlp,Ylp,Xpond,Ypond,Xpondlp,
Ypondlp,D,R,Moliosat,N,roV,roL]=Colonna(Pc,Tc,omega,kappa,eta,
PM,P,T,Vapp,Vsat,Vriemp,n,D0,R0,XF,L0,a,Holio,K0,tmax,deltat)
p=tmax/deltat; %Calcolo dei passi temporali
c=length(PM); %Calcolo numero componenti
Vpia=Vriemp/n; %Calcolo del volume del singolo piatto
%Definizione e azzeramento vettori e matrici da calcolare in
```

```

output:
L=zeros(p,n+1);
V=zeros(p,n+1);
GLolio=zeros(p,n+1);
GVolio=zeros(p,n+1);
x=zeros(p+1,n+2,c);
y=zeros(p+1,n+1,c);
X=zeros(p+1,n+2,c-1);
Y=zeros(p+1,n+1,c-1);
Xlp=zeros(p+1,n+2,2);
Ylp=zeros(p+1,n+1,2);
Xpond=zeros(p+1,n+2,c-1);
Ypond=zeros(p+1,n+1,c-1);
Xpondlp=zeros(p+1,n+2,2);
Ypondlp=zeros(p+1,n+1,2);
D(1:p+1)=0;
R(1:p+1)=0;
Moliosat(1:p+1)=0;
N=zeros(p+1,n+1,c);
roV=zeros(p+1,n+1);
roL=zeros(p+1,n+1);
%Assegnazione diretta dei valori noti da input
%Calcolo del peso molecolare medio
dell'alimentazione
PMmedf=sum(PM(2:c).*XF);
%Calcolo della portata di riflusso in
mol/min al primo passo temporale
L(1,1)=L0(1)/PMmedf;
%Calcolo della portata di riflusso in
g/h al primo passo temporale
GLolio(1,1)=L0(1)*60;
%Assegnazione frazioni molari note da input
x(1,1,2:c)=XF;
X(1,1,:)=XF;
Xlp(1,1,1)=sum(XF(1:3));
Xlp(1,1,2)=sum(XF(4:c-1));
Xpond(1,1,:)=(XF.*PM(2:c))/sum(XF.*PM(2:c));
Xpondlp(1,1,1)=sum(Xpond(1,1,1:3));
Xpondlp(1,1,2)=sum(Xpond(1,1,4:c-1));
%Calcolo dei grammi caricati nell'accumulatore
D(1)=D0*PMmedf;

```

```

K0inizio=K0;

%CALCOLO DELLE CONDIZIONI INIZIALI SU TUTTI I PIATTI ED AL
SATURATORE.
%Il calcolo viene effettuato tenendo presente il volume del
%saturatore e dei piatti e le quantità di olio inizialmente
%caricate in ciascun piatto. Calcolo del volume specifico
%molare della CO2 che verrà usato per calcolare la CO2 di
%primo tentativo per il calcolo degli equilibri riferiti al
%primo nodo temporale.
[VCO2]=CalcolaVolumePR(Pc(1),Tc(1),omega(1),P,T);

%CONDIZIONI INIZIALI SUI PIATTI
for j=1:n %Ripeti su tutti i piatti

    %Creazione variabili ausiliarie di input al sottoprogramma
    auxN0(1)=Vpia/VCO2;
    for k=2:c
        auxN0(k)=(Holio(1,j)/PMmedf)*XF(k-1);
    end
    [auxx,auxy,auxN,Ltot,auxroV,auxroL]=CondizioniInizialiBis
    (Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,auxN0,Vpia,K0,PM);
    %Scaricamento delle variabili ausiliarie calcolate dal
    %sottoprogramma nelle matrici di output del programma
    %principale
    x(1,j+1,:)=auxx;
    y(1,j,:)=auxy;

    %Frazioni molari su base priva di CO2 su 5 componenti e
    %divise in leggeri-pesanti
    X(1,j+1,:)=auxx(2:c)/(1-auxx(1));
    Y(1,j,:)=auxy(2:c)/(1-auxy(1));
    Xlp(1,j+1,1)=sum(X(1,j+1,1:3));
    Xlp(1,j+1,2)=sum(X(1,j+1,4:c-1));
    Ylp(1,j,1)=sum(Y(1,j,1:3));
    Ylp(1,j,2)=sum(Y(1,j,4:c-1));

    %Calcolo delle frazioni ponderali
    Xor(1:c-1)=X(1,j+1,:);
    Yor(1:c-1)=Y(1,j,:);

```

```

Xpond(1,j+1,:)=(Xor.*PM(2:c))/sum(Xor.*PM(2:c));
Ypond(1,j,:)=(Yor.*PM(2:c))/sum(Yor.*PM(2:c));
Xpondlp(1,j+1,1)=sum(Xpond(1,j+1,1:3));
Xpondlp(1,j+1,2)=sum(Xpond(1,j+1,4:c-1));
Ypondlp(1,j,1)=sum(Ypond(1,j,1:3));
Ypondlp(1,j,2)=sum(Ypond(1,j,4:c-1));

%Scaricamento dal sottoprogramma delle moli totali e delle
%densità
N(1,j,:)=auxN;
roV(1,j)=auxroV;
roL(1,j)=auxroL;
end

%CONDIZIONI INIZIALI AL SATURATORE

%Creazione variabili ausiliarie di input al sottoprogramma
auxN0(1)=Vsat/VC02;
for k=2:c
    auxN0(k)=R0*XF(k-1);
end
[auxx,auxy,auxN,Ltot,auxroV,auxroL]=CondizioniInizialiBis(Pc,
Tc,omega,kappa,eta,P,T,auxN0,Vsat,K0,PM);
x(1,n+2,:)=auxx;
y(1,n+1,:)=auxy;

%Frazioni molari su base priva di CO2 su 5 componenti e divise
%in leggeri-pesanti
X(1,n+2,:)=auxx(2:c)/(1-auxx(1));
Y(1,n+1,:)=auxy(2:c)/(1-auxy(1));
Xlp(1,n+2,1)=sum(X(1,n+2,1:3));
Xlp(1,n+2,2)=sum(X(1,n+2,4:c-1));
Ylp(1,n+1,1)=sum(Y(1,n+1,1:3));
Ylp(1,n+1,2)=sum(Y(1,n+1,4:c-1));

%Calcolo delle frazioni ponderali
Xor(1:c-1)=X(1,n+2,:); %Creazione variabili ausiliarie
Yor(1:c-1)=Y(1,n+1,:);

Xpond(1,n+2,:)=(Xor.*PM(2:c))/sum(Xor.*PM(2:c));
Ypond(1,n+1,:)=(Yor.*PM(2:c))/sum(Yor.*PM(2:c));

```

```

Xpondlp(1,n+2,1)=sum(Xpond(1,n+2,1:3));
Xpondlp(1,n+2,2)=sum(Xpond(1,n+2,4:c-1));
Ypondlp(1,n+1,1)=sum(Ypond(1,n+1,1:3));
Ypondlp(1,n+1,2)=sum(Ypond(1,n+1,4:c-1));

%Scaricamento dal sottoprogramma delle moli totali e delle
%densità
N(1,n+1,:)=auxN;
roV(1,n+1)=auxroV;
roL(1,n+1)=auxroL;

%Calcolo dei grammi di raffinato al tempo zero usando Ltot
%che nell'output del sottoprogramma rappresenta le moli totali
%di fase liquida
R(1)=sum((Ltot*auxx(2:6)).*PM(2:6));
%Calcolo dei grammi di olio in tutto il saturatore
Moliosat(1)=sum(auxN(2:c).*PM(2:c));

%CICLO DI ITERAZIONI sui TEMPI (indice i) e sui PIATTI (indice j)

for i=1:p

    %Calcolo della portata molare di vapore uscente dal piatto
    %di testa al generico passo temporale (i), calcolata a
    %partire dal dato sperimentale misurato (a) e dalla frazione
    %molare di CO2 riferita al primo piatto ed all'inizio del
    %passo temporale.
    V(i,1)=a/y(i,1,1);
    yor(1:c-1)=y(i,1,2:c);
    %Calcolo della portata di olio in g/h
    GVolio(i,1)=sum(V(i,1)*(yor.*PM(2:c)))*60;
    %Calcolo della portata molare di riflusso al generico passo
    %temporale (i)
    %Assegnazione della frazione molare preesistente
    %all'accumulatore ad una variabile ausiliaria riorientata
    Xaccp(1:c-1)=x(i,1,2:c);
    %Calcolo della portata molare di riflusso al generico passo
    %temporale (mol/min)
    %N.B. Al primo passo temporale riassegna il valore che era
    %già stato assegnato in precedenza.

```

```

L(i,1)=L0(i)/sum(PM(2:c).*Xaccp);
GLolio(i,1)=L0(i)*60; %Calcolo della portata di olio in g/h

for j=1:n

    %FASE SUPERIORE
    %Assegnazione delle moli di CO2 preesistenti nel generico
    %piatto al nodo temporale i ad una variabile ausiliaria
    auxNO(1)=N(i,j,1);

    %Bilancio dei singoli componenti dell'olio sul generico
    %piatto al generico passo temporale
    %ed assegnazione al vettore ausiliario
    if j==1
        auxNO(2:c)=N(i,j,2:c)+(L(i,j)*x(i,j,2:c)-V(i,j)*y(i,j,2:c))
        *deltat;
    else
        auxNO(2:c)=N(i,j,2:c)+(L(i,j)*x(i+1,j,2:c)-V(i,j)*y(i,j,2:c))
        *deltat;
    end
    for k=2:c
        if auxNO(k)<0
            auxNO(k)=0;
        end
    end
end

%Bilancio di CO2 sul generico piatto al generico passo
%temporale ed assegnazione ad una variabile
%ausiliaria scalare che servirà nella fase inferiore
auxNCO2=N(i,j,1)+(L(i,j)*x(i+1,j,1)-V(i,j)*y(i,j,1))*deltat;

%EQUILIBRIO SUI PIATTI
%Aggiornamento dei rapporti di equilibrio in ingresso al
%CondizioniInizialiBis
for k=1:c
    if x(i,j+1,k)~=0
        KO(k)=y(i,j,k)/x(i,j+1,k);
    else
        if i>1
            KO(k)=y(i-1,j,k)/x(i-1,j+1,k);
        end
    end
end

```

```

        else
            KO(k)=KOinizio(k);
        end
    end
end
end

[auxx,auxy,auxN,Ltot,auxroV,auxroL]=CondizioniInizialiBis
(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,auxN0,Vpia,K0,PM);
x(i+1,j+1,:)=auxx;
y(i+1,j,:)=auxy;

%Calcolo frazioni molari su base priva di CO2 su 5
%componenti ed in leggeri-pesanti
X(i+1,j+1,:)=auxx(2:c)/(1-auxx(1));
Y(i+1,j,:)=auxy(2:c)/(1-auxy(1));
Xlp(i+1,j+1,1)=sum(X(i+1,j+1,1:3));
Xlp(i+1,j+1,2)=sum(X(i+1,j+1,4:c-1));
Ylp(i+1,j,1)=sum(Y(i+1,j,1:3));
Ylp(i+1,j,2)=sum(Y(i+1,j,4:c-1));

%Calcolo frazioni ponderali
Xor(1:c-1)=X(i+1,j+1,:);
Yor(1:c-1)=Y(i+1,j,:);

Xpond(i+1,j+1,:)=(Xor.*PM(2:c))/sum(Xor.*PM(2:c));
Ypond(i+1,j,:)=(Yor.*PM(2:c))/sum(Yor.*PM(2:c));
Xpondlp(i+1,j+1,1)=sum(Xpond(i+1,j+1,1:3));
Xpondlp(i+1,j+1,2)=sum(Xpond(i+1,j+1,4:c-1));
Ypondlp(i+1,j,1)=sum(Ypond(i+1,j,1:3));
Ypondlp(i+1,j,2)=sum(Ypond(i+1,j,4:c-1));

%Calcolo delle densità
roV(i+1,j)=auxroV;
roL(i+1,j)=auxroL;

%FASE INFERIORE
%Calcolo delle moli totali di CO2 nel generico piatto al
%nuovo passo temporale
N(i+1,j,1)=auxN(1);

```

```

%Vengono risolti a sistema (2X2) i bilanci di CO2
%(molare) e di Olio (somme dei singoli bilanci
%ponderali per k da 2 a c) per ricavare la portata
%di liquido uscente dal generico piatto al generico
%passo temporale e la portata di vapore entrante al
%generico piatto ed al generico passo temporale.

%Costruzione Matrice dei coefficienti del sistema
%lineare
d(1:c-1)=y(i,j+1,2:c);
dd(1:c-1)=x(i+1,j+1,2:c);
%Coefficienti del sistema lineare
A(1,1)=y(i,j+1,1);
A(1,2)=-x(i+1,j+1,1);
A(2,1)=sum(d.*PM(2:c));
A(2,2)=-sum(dd.*PM(2:c));
b(1,1)=(auxN(1)-auxNCO2)/deltat;
b(2,1)=(Holio(i+1,j)-sum(auxN(2:c).*PM(2:c)))/deltat;

%Vettore ausiliario che riporta la soluzione del
%sistema lineare
auxsoluzione=A\b;
%Assegnazione della soluzione del sistema alle portate
%molari inferiori
V(i,j+1)=auxsoluzione(1,1);
L(i,j+1)=auxsoluzione(2,1);

%Calcolo delle portate di olio in g/h
GVolio(i,j+1)=sum(V(i,j+1)*(d.*PM(2:c)))*60;
GLolio(i,j+1)=sum(L(i,j+1)*(dd.*PM(2:c)))*60;

%Calcolo delle moli dei componenti dell'olio nel generico
%piatto al nuovo passo temporale
N(i+1,j,2:c)=auxN(2:c)+(V(i,j+1)*d-L(i,j+1)*dd)*deltat;

end

%SATURATORE
%Creazione variabili ausiliarie per entrare nel SaturatoreBis

```

```

auxN0(1:c)=N(i,n+1,:);
for k=1:c
    if x(i,n+2,k)~=0
        KO(k)=y(i,n+1,k)/x(i,n+2,k);
    else
        if i>1
            KO(k)=y(i-1,n+1,k)/x(i-1,n+2,k);
        else
            KO(k)=KOinizio(k);
        end
    end
end
end
auxL(1:c)=L(i,n+1)*x(i+1,n+1,:);
auxV(1:c)=V(i,n+1)*y(i,n+1,:);
[auxx,auxy,auxN,Ltot,auxroV,auxroL,Fin]=SaturatoreBis
(Pc,Tc,omega,kappa,eta,P,T,auxN0,Vsat,KO,PM,auxL,auxV,
deltat);
x(i+1,n+2,:)=auxx;
y(i+1,n+1,:)=auxy;

%Calcolo frazioni su base priva
X(i+1,n+2,:)=auxx(2:c)/(1-auxx(1));
Y(i+1,n+1,:)=auxy(2:c)/(1-auxy(1));
Xlp(i+1,n+2,1)=sum(X(i+1,n+2,1:3));
Xlp(i+1,n+2,2)=sum(X(i+1,n+2,4:c-1));
Ylp(i+1,n+1,1)=sum(Y(i+1,n+1,1:3));
Ylp(i+1,n+1,2)=sum(Y(i+1,n+1,4:c-1));

%Calcolo frazioni ponderali
Xor(1:c-1)=X(i+1,n+2,:);
Yor(1:c-1)=Y(i+1,n+1,:);

Xpond(i+1,n+2,:)=(Xor.*PM(2:c))/sum(Xor.*PM(2:c));
Ypond(i+1,n+1,:)=(Yor.*PM(2:c))/sum(Yor.*PM(2:c));
Xpondlp(i+1,n+2,1)=sum(Xpond(i+1,n+2,1:3));
Xpondlp(i+1,n+2,2)=sum(Xpond(i+1,n+2,4:c-1));
Ypondlp(i+1,n+1,1)=sum(Ypond(i+1,n+1,1:3));
Ypondlp(i+1,n+1,2)=sum(Ypond(i+1,n+1,4:c-1));

%Calcolo moli totali,grammi di raffinato, grammi di
%olio nel saturatore e densità

```

```

N(i+1,n+1,:)=auxN;
%Calcolo dei grammi di raffinato al generico passo
%temporale
R(i+1)=Ltot*sum(auxx(2:c).*PM(2:c));
%Calcolo dei grammi di olio in tutto il saturatore
Moliosat(i+1)=sum(auxN(2:c).*PM(2:c));
roV(i+1,n+1)=auxroV;
roL(i+1,n+1)=auxroL;

%ACCUMULATORE
%Assegnazione della frazione molare preesistente
%all'accumulatore ad una variabile ausiliaria
%riorientata
Xaccp(1:c-1)=x(i,1,2:c);
%Assegnazione della frazione di testa colonna ad
%una variabile ausiliaria per riorientare il vettore
ytesta(1:c-1)=y(i,1,2:c);
%Creazione di un vettore di c-1 componenti che riporta
%la portata dei singoli componenti dell'olio uscenti
%dall'accumulatore
Olioout=L(i,1)*Xaccp;
%Creazione di un vettore di c-1 componenti che riporta
%la portata dei singoli componenti dell'olio entranti
%nell'accumulatore
Olioin=V(i,1)*ytesta;
%Calcolo delle moli totali di olio al passo precedente
%(scalare)
Ntotolio=D(i)/sum(PM(2:c).*Xaccp);
%Creazione di un vettore di c-1 componenti che riporta
%le moli dei singoli componenti preesistenti
%nell'accumulatore
Noliop=Ntotolio*Xaccp;
%Applicazione del bilancio sui singoli componenti e
%calcolo delle nuove moli dei singoli componenti
Nolio=Noliop+Olioin*deltat-Olioout*deltat;
%Calcolo della nuova frazione molare nel distillato
x(i+1,1,2:c)=Nolio/sum(Nolio);

%Calcolo frazioni su base priva nel distillato (elimina
%l'elemento nullo della CO2)
X(i+1,1,:)=Nolio/sum(Nolio);

```

```
Xlp(i+1,1,1)=sum(X(i+1,1,1:3));
Xlp(i+1,1,2)=sum(X(i+1,1,4:c-1));

%Calcolo frazioni ponderali
Xor(1:c-1)=X(i+1,1,:);

Xpond(i+1,1,:)=(Xor.*PM(2:c))/sum(Xor.*PM(2:c));
Xpondlp(i+1,1,1)=sum(Xpond(i+1,1,1:3));
Xpondlp(i+1,1,2)=sum(Xpond(i+1,1,4:c-1));

%Calcolo del nuovo valore del distillato in grammi
D(i+1)=sum(Nolio.*PM(2:c));

end %fine programma
```