

**“PRODUCCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS ESTRUCTURADOS MEDIANTE
SÍNTESIS ENZIMÁTICA CONTENIENDO ÁCIDOS GAMMA-
LINOLÉNICO Y ESTEARIDÓNICO, DOS ÁCIDOS GRASOS DE
INTERÉS NUTRICIONAL Y PROCEDENCIA VEGETAL
TERRESTRE”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS
MENCION NUTRICIÓN HUMANA

Tesista: Sussi López Puebla
Director de Tesis: Miguel Ángel Rincón Cervera

Octubre de 2019
Santiago-Chile

AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la Estudiante Sussi López Puebla ha sido revisado y aprobado por mí como Director de Tesis para la presentación formal ante la Comisión Evaluadora que designará el Comité Académico del Magíster en Nutrición y Alimentos.



**Prof. Miguel Ángel
Rincón Cervera**

Santiago de Chile, 19 de Octubre de 2019

ii. Comisión de tesis

Msc. Cynthia Barrera Ramírez. Departamento de Nutrición, Universidad de Chile.

Dra. Paula García Concha. Departamento de Nutrición, Universidad de Chile.

Dr. Luis Valladares Boasi. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos,
Universidad de Chile.

iii. Dedicatoria

Dedicado a mi familia, en especial a mi compañero de vida e hijo, que incondicionalmente han sido mi motor y mi sustento. En ellos me apoyo, descanso y continúo.

Dedicado también a mi madre y a mis abuelas, mi linaje femenino. Gracias a ellas y a la historia de vida que me han heredado es que soy terca, firme, fuerte y luchadora. Por ellas y por mí, es que trabajo y me dedico simplemente a lo que me apasiona y no a otra cosa.

Dedicado a todas las mujeres, en particular a aquellas que siguen el camino de la ciencia, que seamos siempre más y nunca menos, siempre visibles.

iv. Agradecimientos

Al laboratorio de Lípidos del INTA que me acogió, me ayudó a crecer en lo profesional y me entregó habilidades y conocimientos que van más allá de la nutrición.

A mi profesor guía Miguel Ángel Rincón Cervera, gracias por recibirme como alumna Tesista y guiarme en este proceso.

A las profesoras Yasna Orellana y Bárbara Leyton, gracias por sus infinitas asesorías estadísticas y enriquecimientos de este trabajo.

A la comisión evaluadora, gracias por aceptar ser parte de este proceso.

A la institución, gracias por abrirme las puertas al mundo investigativo y académico.

v. Índice de contenidos

V. ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	6
VI. ÍNDICE DE TABLAS.....	7
VII. ÍNDICE DE FIGURAS	8
VIII. ANEXOS.....	9
IX. LISTA DE ABREVIATURAS	10
3. RESUMEN	12
4. ABSTRACT	14
5. INTRODUCCIÓN.....	16
6. HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
7. OBJETIVOS	23
8. METODOLOGÍA.....	24
9. RESULTADOS	31
10. DISCUSIÓN	41
11. CONCLUSIONES.....	49
12. ANEXOS	50
13. REFERENCIAS.....	60

vi. Índice de tablas

- Tabla 1: Condiciones de reacción según el método Taguchi.
- Tabla 2: Condiciones de reacción según el método Taguchi (codificado).
- Tabla 3: Rendimiento y grado de concentración en el tratamiento A y B aplicado a la lecitina de soya.
- Tabla 4: Caracterización y cuantificación de una Lecitina de soya comercial, un Concentrado de FL y el Concentrado de FL experimental.
- Tabla 5: Perfil de ácidos grasos en el aceite de *Echium plantagineum* comercial y en los concentrados de GLA+SDA en la forma de AGL y EE.
- Tabla 6: Grado de incorporación de GLA y SDA en los FLE mediante acidólisis.
- Tabla 7: Análisis de varianza (ANOVA) para los factores incluidos en el método Taguchi.

vii. Índice de figuras

- Figura 1: Representación esquemática del procedimiento experimental.
- Figura 2: FL presentes en el concentrado en el tratamiento A y B aplicado a la lecitina de soya.
- Figura 3: Caracterización de clases lipídicas en el concentrado de FL obtenido tras el tratamiento de lecitina de soya comercial con acetona fría.
- Figura 4: Grado de incorporación de los ácidos grasos GLA+SDA a los FLE, según grupo funcional
- Figura 5: Optimización del diseño de síntesis enzimática.
- Figura 6: FLE purificados con acetona fría tras la reacción de síntesis enzimática.

viii. Anexos

- Anexo 1: Biosíntesis de AGPI.
- Anexo 2: Principales fuentes vegetales ALA.
- Anexo 3: Conversión del ALA a DHA en hígado y cerebro.
- Anexo 4: Composición de ácidos grasos típicos de aceites que contienen SDA.
- Anexo 5: Estructura química del ácido fosfatídico y su representación simplificada.
- Anexo 6: Perfil de ácidos grasos promedio en extractos de lecitina de plantas y animales.
- Anexo 7: Composición de la lecitina de soya líquida estándar (A) y de su forma granular o en polvo en donde la mayoría de los TAG y AGL son eliminados (B).
- Anexo 8: Descripción esquemática de la síntesis de un FLE, mediada por lipasa.
- Anexo 9: Composición del estándar comercial de FL.
- Anexo 10: Factores de retención en el concentrado y estándar comercial de FL.
- Anexo 11: CCF de FL del aceite de soya y estándar de FL individual.
- Anexo 12: Efecto de la presencia o ausencia de solventes o aditivos (cationes divalentes, urea) en la incorporación de EPA y DHA en fosfolípidos de soja por transesterificación.

ix. Lista de abreviaturas

- AA: Ácido araquidónico.
- AGL: Ácidos grasos libres.
- AGPI n-3: Ácidos grasos poliinsaturados omega 3.
- AGPI n-6: Ácidos grasos poliinsaturados omega 6.
- AL: Ácido linoleico.
- ALA: Ácido alfa-linolénico.
- ASE: Aceite de semilla de *Echium plantagineum*.
- CCF: Cromatografía en capa fina.
- CG: Cromatografía gaseosa.
- COX: Ciclooxygenasas.
- Δ -5-d: Delta 5 desaturasa.
- Δ -6-d: Delta 6 desaturasa.
- DGLA: Ácido dihomo gamma-linolénico.
- DHA: Ácido docosahexaenoico.
- EE: Ésteres etílicos.
- EMAG: Ésteres metílicos de ácidos grasos.
- EPA: Ácido eicosapentaenoico.
- FC: Factor de concentración.
- FL: Fosfolípidos.
- FLE: Fosfolípidos estructurados.
- GLA: Ácido gamma-linolénico.
- LOX: Lipooxygenasas.
- LT: Leucotrienos.
- Ma: Maresinas.
- NP: Neuroprotectinas.
- PG: Prostaglandinas.
- Rf: Factor de retención.
- Rv: Resolvinas.

- SDA: Ácido estearidónico.
- TAG: Triacilglicéridos.
- TX: Tromboxanos.

3. Resumen

Introducción. Los ácidos grasos poliinsaturados gamma-linolénico omega 6 y estearidónico omega 3, son precursores metabólicos de mediadores lipídicos con actividad antiinflamatoria en el organismo humano y su consumo podría mitigar el estado de inflamación crónica asociado a la obesidad. Estos ácidos grasos se encuentran en muy pocas fuentes naturales, siendo una de las más ricas el aceite de semilla de *Echium plantagineum*. Por otro lado, la bioaccesibilidad intestinal de los ácidos grasos podría mejorar al ser aportados como fosfolípidos en vez de triacilglicéridos, debido a su estructura anfifílica que facilitaría su absorción. Además, los fosfolípidos actúan como emulsionantes, estabilizantes y agentes humectantes en los alimentos. **Objetivo.** Sintetizar enzimáticamente fosfolípidos estructurados conteniendo ácido gamma-linolénico y ácido estearidónico, con el empleo de lecitina de soya y aceite de semilla de *E. plantagineum* como fuentes originales. **Métodos.** Se emplearon como sustratos para las síntesis: un concentrado de fosfolípidos obtenido a partir de lecitina de soya y un concentrado de ácido gamma-linolénico + ácido estearidónico en forma de ácidos grasos libres y de ésteres etílicos a partir del aceite de *E. plantagineum* utilizando un método de complejación con urea a temperatura ambiente. Como biocatalizador se utilizó lipasa comercial inmovilizada RM-IM (de *Rhizomucor miehei*), específica de posición sn-1,3, y se controlaron las siguientes variables: tiempo de reacción (h), cantidad de lipasa (% sobre los sustratos totales) y relación másica entre los sustratos. Las reacciones se realizaron a 50°C, en un medio con solvente orgánico (n-hexano) y MgCl₂ como cofactor. Los fosfolípidos estructurados resultantes se purificaron con acetona fría y se determinó su perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa. **Resultados.** Se incorporó un mayor porcentaje de ácido gamma linolénico + ácido estearidónico a los fosfolípidos estructurados usando como sustrato ácidos grasos libres (mediana 22,72%) que ésteres etílicos (mediana 19,31%), valor-p 0,04; test de Wilcoxon Mann-Whitney. La mayor incorporación de ácido gamma linolénico + ácido estearidónico (34% del valor máximo teórico) se obtuvo tras 48 h, con un 20% de lipasa y relación másica FLs:AGL 1:6, según lo

predicho por el método Taguchi para la optimización de variables, sin embargo este no es un resultado experimental. El tiempo no tuvo una influencia importante en las síntesis de los FLE, a pesar de que el modelo predice que a 48 h el resultado podría ser ligeramente superior que a 24 h. **Conclusión.** Es posible obtener fosfolípidos estructurados con ácido gamma linolénico y ácido estearidónico empleando lipasa RM-IM y sustratos de procedencia vegetal terrestre. Estos productos podrían emplearse como potenciales ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales.

4. Abstract

Introduction. The polyunsaturated fatty acid gamma-linolenic omega 6 and stearidonic omega 3, are metabolic precursors of lipid mediators with anti-inflammatory activity in the human body and their consumption could mitigate the state of chronic inflammation associated with obesity. These fatty acids are found in very few natural sources, being *Echium plantagineum* seed oil one of the richest. On the other hand, the intestinal bioaccessibility of fatty acids could be increased by being supplied as phospholipids instead of triacylglycerides, due to their amphiphilic structure that would facilitate their absorption. In addition, phospholipids act as emulsifiers, stabilizers and wetting agents in food. **Goal.** To synthesize through enzymatic catalysis structured phospholipids containing gamma-linolenic acid and stearidonic acid, with the use of soybean lecithin and *E. plantagineum* seed oil as original sources. **Methods.** The following materials were used as substrates for synthesis: a phospholipids concentrate obtained from soybean lecithin and a gamma-linolenic acid + stearidonic acid concentrate in the form of free fatty acids and ethyl esters from *E. plantagineum* oil using a method of urea complexation at room temperature. The sn-1,3 regiospecific immobilized lipase RM-IM (from *Rhizomucor miehei*) was used as biocatalyst, and the following variables were controlled: reaction time (h), amount of lipase (% of total substrates) and substrates mass ratio. Reactions were performed at 50°C in a medium with organic solvent (n-hexane) and MgCl₂ as cofactor. The resulting structured phospholipids were purified with cold acetone and the fatty acid profile was determined by gas chromatography. **Results.** A higher percentage of gamma-linolenic acid + stearidonic acid was incorporated into the structured phospholipids using the free fatty acid concentrate as substrate (median 22.72%) than ethyl esters (median 19.31%), p-value 0.04; Wilcoxon Mann-Whitney test. The highest incorporation of gamma-linolenic acid + stearidonic acid (34% of the theoretical maximum value) was obtained after 48 h, with 20% lipase and substrates mass ratio phospholipids:free fatty acid 1:6, as predicted by the Taguchi method for variable optimization. However, this is not an experimental result. Time did not have an important influence on the synthesis of

structured phospholipids, although the model predicts that at 48 h the result could be slightly higher than at 24 h. **Conclusion.** It is possible to obtain structured phospholipids with gamma-linolenic acid and stearidonic acid using RM-IM lipase and substrates of land plant origin. These products could be used as potential ingredients for the production of novel functional foods.

5. Introducción

En la actualidad, la prevalencia del sobrepeso y la obesidad ha aumentado considerablemente, representando en Chile al 39,8% y al 31,2%, respectivamente de la población mayor de 15 años, y situándonos en el tercer lugar en América Latina y el Caribe, luego de México y Bahamas (1, 2). Por otro lado, se ha visto en numerosas investigaciones que la obesidad está asociada con un estado de inflamación crónica de bajo grado (3-5). En base a esto, una buena vía para minimizar los síntomas asociados al estado de inflamación en pacientes obesos, podría ser aumentar el consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPI n-3), específicamente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), que son precursores de mediadores lipídicos con actividad antiinflamatoria en el organismo (6).

Una de las principales fuentes alimentarias de EPA y DHA son los productos del mar (7). Sin embargo, la sobreexplotación de los recursos pesqueros y la pesca ilegal representan una gran amenaza y han llevado a una disminución, a lo largo de los años, de la disponibilidad de varias especies de pescados y mariscos. En base a esto, ha sido necesario recurrir a la acuicultura como sistema de abastecimiento (8, 9). No obstante, este sistema ha acarreado algunas preocupaciones tanto ambientales como sanitarias, generando por ejemplo, brotes de enfermedades en varios países como la anemia infecciosa del salmón en Chile (9). Además, debido a la actividad industrial de cada región del país, como las termoeléctricas, y a la eliminación de residuos, se ha observado la presencia de mercurio orgánico en aguas costeras y su posterior acumulación en peces y mamíferos marinos, siendo luego ingerido por el humano mediante el consumo de productos del mar, lo que provoca un riesgo para la salud por su toxicidad a nivel neurológico y un problema de salud pública (10-12). Por otro lado, en varias encuestas se ha evidenciado que la población chilena no logra cumplir con las recomendaciones generales del consumo de pescados y mariscos (1-2 veces por semana, 28 g/día) (13), estando por debajo del promedio mundial (34 g/día). Esto a pesar de que la industria pesquera y la acuicultura constituyen la tercera actividad económica del país (14).

Lo anterior se ha visto también reflejado en otros países occidentales (9). Estos antecedentes ponen de manifiesto que el consumo de pescados y mariscos puede no ser una alternativa de excelencia para el aporte de AGPI n-3 en la alimentación, siendo necesario considerar nuevas fuentes alimentarias.

Una opción sustentable para conseguir un adecuado aporte de AGPI n-3 son los alimentos de origen vegetal terrestre, como las semillas o aceites de semillas (15), algunos de ellos ricos en ácido alfa-linolénico (ALA, C18:3 n-3), un AGPI n-3 precursor de EPA y DHA (**Anexo 1**). En el **Anexo 2** se puede observar el aporte de ALA en algunas fuentes vegetales (16, 17). Sin embargo, la bioconversión de ALA en EPA y DHA en el organismo humano es limitada, ya que se ha visto que la enzima delta-6-desaturasa (Δ -6-d) que cumple la función de introducir un doble enlace en la cadena hidrocarbonada del ALA, tiene una escasa actividad en humanos, especialmente en condiciones fisiológicas como el envejecimiento, ante la deficiencia de nutrientes, tabaquismo o debido al alto consumo de alcohol, entre otros factores (18, 19). Además, algunos estudios han mostrado que el consumo de ALA en la dieta genera una bioconversión en EPA menos efectiva en comparación al ácido estearidónico (SDA), un AGPI n-3 producido a partir de ALA y también precursor de EPA y DHA. En otras palabras, 4,3 g de ALA equivalen aproximadamente a 300 mg de EPA a nivel tisular; mientras que tan solo con 1 g aproximadamente de SDA se puede alcanzar la misma concentración tisular de EPA (15, 18, 20). Por lo tanto, debido a las limitantes en los efectos del consumo de ALA, una alternativa más eficiente aún podría ser el aporte directo de SDA en la alimentación.

La síntesis de SDA (C18:4 n-3) en el Retículo Endoplasmático Liso a partir de ALA, se lleva a cabo gracias a la actividad de la enzima Δ -6-d que tiene la capacidad de introducir un doble enlace en su cadena hidrocarbonada. Luego de un proceso de elongación y desaturación por delta-5-desaturasa (Δ -5-d) se genera EPA (C20:5 n-3), seguidamente se llevan a cabo 2 elongaciones y 1 desaturación por Δ -6-d formando ácido tetracosahexaenoico (C24:6 n-3). Este AGPI de cadena larga es transferido a los peroxisomas en donde sufre una beta-oxidación para generar

finalmente DHA (C22:6 n-3) (21, 22). Una vez sintetizados, los AGPI de cadena larga pasan a cumplir diversas funciones en el organismo. Una de sus funciones claves es la formación de fosfolípidos (FL) para constituir la membrana plasmática de las distintas células. Sin embargo, cuando el organismo lo requiere, los AGPI n-3, específicamente EPA y DHA, pueden actuar como segundos mensajeros formando mediadores lipídicos como eicosanoides y docosanoides, los cuales tienen la capacidad de actuar como agentes antiinflamatorios. Así, gracias a la acción de enzimas ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX), el EPA es capaz de sintetizar prostaglandinas (PG) de la serie H3, E3, I3, tromboxanos (TX) A3, leucotrienos (LT) de la serie B5, C5, D5 y resolvinas (Rv) de la serie E1 a la E3; por otro lado, el DHA sintetiza docosanoides como Rv de la serie D1 a la D6, protectinas D1, neuroprotectinas (NP) D1 y maresinas (Ma) R1 (**Anexo 1**). Además, el DHA es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica cumpliendo funciones neurológicas y a nivel de la estructura de la retina (**Anexo 3**) (17, 21-23).

Se ha visto que el SDA se encuentra disponible principalmente en fuentes vegetales, como ciertos aceites de semillas (especialmente especies de la familia *Boraginaceae*), algas e incluso hongos, aunque en éstos últimos en muy poca cantidad (15). Son pocos los aceites de semillas, ricos en SDA, que han sido producidos comercialmente para el consumo humano; aceite de semilla de grosella negra y aceite de semilla de *Echium plantagineum* (ASE). Además, actualmente existe un nuevo aceite extraído de las semillas de *Buglossoides arvensis*, el cual se está desarrollando para su producción comercial bajo el nombre de aceite Ahiflower. Por otro lado, hay semillas que han sido modificadas genéticamente para enriquecer su aceite en SDA y con ello, producir aceites potencialmente comestibles como el aceite de soja o de canola, pero éstos pueden presentar algunas barreras en su comercialización como el tipo de mercado al cual se introduce o la desconfianza del consumidor. El **Anexo 4** muestra una comparación de los perfiles de ácidos grasos con respecto a los distintos aceites ricos en SDA. Es necesario mencionar que dentro de la familia *Boraginaceae*, *Echium*, *Lappula* y *Lithospermum*, al parecer son las mejores fuentes de SDA (15, 24).

Considerando su riqueza en SDA, el ASE parece ser una alternativa efectiva para contribuir al aumento en el aporte de este ácido graso a través de la dieta. Además, su comercialización ya fue aprobada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria en el 2008, como nuevo ingrediente alimentario (25). La planta de *Echium plantagineum* o flor morada, como se le conoce vulgarmente, es originaria del Mediterráneo, pero actualmente también se puede encontrar en forma silvestre en Brasil, Uruguay y en la zona central de Chile. Es una planta anual u ocasionalmente bienal, biológicamente clasificada como hierba creciendo de forma accidental e invadiendo preferencialmente zonas de agricultura, praderas, terrenos baldíos, bordes de caminos y malezas de cultivos. Su polinización es mediante insectos para dar lugar a nuevas semillas (26-30). Según un estudio realizado por M. Berti, et al. El rendimiento de aceite de semillas comerciales de *Echium* del Reino Unido oscila entre 229 a 298 g/Kg⁻¹, el cual puede variar según los diferentes entornos y fechas de siembra. En el caso de semillas experimentales chilenas, el rendimiento de aceite oscila entre 154 a 294 g/Kg⁻¹, dependiendo de su diversidad genética (26). Por estos motivos, el uso del ASE en la nutrición humana, resulta ser un recurso más sustentable en comparación a los productos marinos. El aceite presente dentro de la semilla se encuentra almacenado en cuerpos oleosos intracelulares, conformados principalmente por triacilglicéridos (TAG). La composición de estos cuerpos oleosos consiste en: 94-98% de lípidos neutros, 0,6-2% de FL y 0,6-3% de proteínas (31). Por otro lado, en el **Anexo 4** se puede observar que el ASE también es rico en ácido gamma-linolénico (GLA, C18:3 n-6), un AGPI n-6 (24). A pesar de la evidencia existente sobre la actividad pro-inflamatoria de la familia de AGPI n-6, el GLA presente en el ASE puede ser igualmente aprovechado debido a la actividad antiinflamatoria generada a partir de su consumo en conjunto con un aumento en el consumo de AGPI n-3 (32-34). Esto porque lleva rápidamente a la producción de ácido dihomo gamma-linolénico (DGLA; C20:3 n-6) que, a su vez, al aumentar su concentración en el organismo, produce PG de la serie E1 y 15-ácido hidroxieicosatrienoico (15-HETrE), responsables de la actividad antiinflamatoria (32-35).

La síntesis de GLA en el Retículo Endoplasmático Liso al igual que SDA, es a partir de su precursor ácido linoleico (AL, C18:2 n-6), llevándose a cabo gracias a la actividad de la enzima Δ -6-d. Luego, mediante una reacción de elongación se genera DGLA, seguido de una desaturación por Δ -5-d para formar ácido araquidónico (AA, C20:4 n-6), enseguida se llevan a cabo 2 elongaciones y 1 desaturación por Δ -6-d formando ácido tetracosapentaenoico (C24:5 n-6). Finalmente, este AGPI de cadena larga ingresa a los peroxisomas sufriendo una beta-oxidación para generar ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) (21). Normalmente, GLA y DGLA no se encuentran en estado libre; sino formando parte de FL, lípidos neutros y ésteres de colesterol en las membranas celulares, incluyendo a la membrana mitocondrial, donde mejoran la integridad y la fluidez de la membrana (35). Sin embargo, cuando resulta necesario, el DGLA así como también el AA pueden producir eicosanoides. En el caso del AA, este ácido graso es capaz de sintetizar PG, TX y LT, eicosanoides que participan en los procesos de inflamación aguda del organismo. Por otro lado, el DGLA puede ser metabolizado a PG E1 y a 15-HETrE, metabolitos que inhiben la inflamación, la agregación plaquetaria, promueven la vasodilatación, entre otras funciones. Por lo tanto, a diferencia del consumo de AL que, como es de conocimiento, lleva principalmente a la producción de AA y, con ello, a la producción de mediadores proinflamatorios; se ha estudiado que luego de la suplementación dietética con GLA, en conjunto con AGPI n-3, aumentan rápidamente los niveles de DGLA en el organismo, favoreciendo la producción de mediadores lipídicos antiinflamatorios (**Anexo 1**) (32-36).

Se ha sugerido que los AGPI pueden presentar una mejor bioaccesibilidad a nivel intestinal cuando forman parte estructural de moléculas de FL que de TAG, absorbiéndose más del 90% (37, 38). Debido a la estructura anfifílica de los FL, se favorece el acceso de las fosfolipasas pancreáticas a los sustratos lipídicos. Además, los FL forman parte de las micelas mixtas, lo que favorecería también su mayor absorción (37-40). En el **Anexo 5** se puede observar la estructura química de los FL. Su característica anfifílica se debe a que contienen 2 ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2 y un grupo fosfato en la posición sn-3 (41).

Los FL se encuentran dispuestos como bicapas lipídicas, formando parte de todas las membranas celulares de plantas y animales. Debido a esto y a la composición de sus ácidos grasos, tienen la capacidad de incorporar canales iónicos, receptores, enzimas, proteínas estructurales, entre otros. En consecuencia, las funciones celulares como la señalización, el transporte y la actividad enzimática, pueden ser moduladas por los FL dietéticos (37, 41). Por otro lado, los FL aportan importantes aplicaciones a la industria alimentaria, actuando como antioxidantes, estabilizantes y emulsionantes, ya que se dispersan formando una interfaz entre el agua y el aceite. Esta característica, a diferencia de los TAG, les otorga la capacidad de incorporarse a una gama más amplia de matrices alimentarias (38, 42, 43). Dentro de las fuentes alimentarias de los FL se encuentran las lecitinas, que por su bajo costo son muy convenientes para la industria alimentaria. Sin embargo, como se observa en el **Anexo 6**, los aportes en AGPI con efectos antiinflamatorios para el organismo, son casi nulos en las distintas variedades que ofrece el mercado (38, 42, 44). La lecitina de soya, como fuente vegetal, es un subproducto obtenido del refinamiento del aceite de soya. En el **Anexo 7**, se compara su composición estándar y concentrada (principalmente en FL) (44).

Una forma de enriquecer los FL presentes en la naturaleza, es incorporándoles AGPI que otorguen efectos antiinflamatorios para el organismo, para esto se han llevado a cabo diversas síntesis de fosfolípidos estructurados (FLE), que son aquellos a los que se les ha modificado su estructura, ya sea química o enzimáticamente. La síntesis enzimática tiene ventajas con respecto a la catálisis química, la cual es más impura (42), como por ejemplo, ofrecer una alta selectividad gracias al uso de lipasas regioespecíficas que permiten un mejor diseño y un rendimiento de reacción en condiciones suaves, evitando que se vean afectados los AGPI que son muy sensibles a la degradación; siendo una alternativa más segura (38, 40). Las enzimas más utilizadas son: las fosfolipasas A1 y A2 que hidrolizan los enlaces éster de los FL en las posiciones sn-1 y sn-2, respectivamente; y las lipasas que hidrolizan específicamente la posición sn-1 de los FL. Sin embargo, las fosfolipasas tienen un alto costo en comparación a las lipasas, estas últimas se comercializan directamente inmovilizadas lo que facilita su recuperación y

reutilización en ciclos de síntesis adicionales, haciéndolas aún más rentables (38, 40). Algunos autores han reportado que las reacciones de transesterificación para la síntesis de FLE, en las cuales se utilizan ésteres etílicos (EE) como sustratos, pueden llegar a ser tan eficientes como las reacciones de acidólisis, en donde se utilizan ácidos grasos libres (AGL) como sustratos. El uso de la lipasa Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* inmovilizada en gel de sílice) ha mostrado un 18,9% de incorporación en la reacción de acidólisis de ácido linoleico conjugado, EPA y DHA a los FL de la soya y un 12,3% de incorporación en la transesterificación de EPA y DHA a la lecitina de soya. A diferencia de la acidólisis, la transesterificación puede proporcionar una mejor solubilidad de los sustratos de la reacción, beneficiando el proceso de reacción (45). Por otro lado, la obtención de EE mediante etanólisis, posee la ventaja de ser un proceso más sencillo que el requerido para la obtención de AGL mediante hidrólisis (46). Sin embargo, se han realizado pocos estudios que consideren la transesterificación como alternativa para la síntesis específica de FLE, por lo que estudios adicionales son necesarios para ampliar las opciones metodológicas (40).

En este trabajo, se sintetizarán enzimáticamente FLE enriquecidos con AGPI no convencionales con interés nutricional, específicamente GLA y SDA en la posición sn-1 de su estructura química. Como sustratos de la reacción, se utilizará un concentrado de FL extraído de la lecitina de soya y un concentrado de GLA y SDA (>60% de GLA+SDA sobre ácidos grasos totales) extraídos del ASE en forma de AGL y EE. El **Anexo 8** describe esquemáticamente la síntesis enzimática de los FLE. Esta aproximación es novedosa ya que hasta el momento no existen estudios que hayan llevado a cabo la producción de estos FLE, conteniendo GLA y SDA en su estructura (40).

6. Hipótesis de trabajo

El empleo de un concentrado de GLA y SDA en forma de AGL o EE junto con un concentrado de FL como sustratos para la síntesis mediada por lipasa de FLE, permitirá distintos grados de incorporación de GLA y SDA en la posición sn-1 de los FL originales en un medio con solvente.

7. Objetivos

General

- Sintetizar enzimáticamente FLE conteniendo GLA y/o SDA, con el empleo de lecitina de soya y aceite de semilla de *Echium plantagineum* como fuentes originales.

Específicos

- Obtener un concentrado de FL a partir de la lecitina de soya comercial y dos concentrados de GLA y SDA: uno en forma de AGL y otro en forma de EE a partir del aceite de semilla de la planta *Echium plantagineum*, que serán utilizados como sustratos para la síntesis enzimática de FLE.
- Desarrollar y optimizar la síntesis enzimática de los FLE con respecto al grado de incorporación de GLA y SDA, empleando lipasa inmovilizada RM-IM (de *Rhizomucor miehei*) como catalizador enzimático.
- Desarrollar un proceso de purificación de los FLE de interés del resto de los productos de la reacción.

8. Metodología

Materiales a emplear

- Lecitina de soya comercial: Donada por ESIN Ltda.
- Aceite “NEWmega™ Echium Oil” 0150200: Adquirido de la empresa De Wit specialty oils (Texel, Países Bajos).
- Urea: Obtenida de la empresa Sigma. Grado de pureza: $\geq 99,5\%$.
- Lipozyme RM-IM: Adquirida de Novozymes (Franklinton, Carolina del Norte, EE.UU.). Inmovilizada. En la forma recombinante del microorganismo *Rhizomucor miehei* (RM IM).
- Estándar comercial de FL: Obtenido de la empresa Supelco, Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Código del producto: P3817.
- Solventes y reactivos: Merck (Darmstadt, Alemania).

Definición del diseño de la investigación

El diseño del estudio será de tipo experimental-longitudinal, ya que se controlarán en el tiempo las variables de interés, interviniéndolas de manera que se favorezca el rendimiento de síntesis y la incorporación de GLA y/o SDA a los FLE.

Definición de las variables

Variable	Descripción	Unidad de media	Clasificación
Rendimiento de síntesis de FLE.	Dependiente. Cuantitativa-continua.	Porcentaje.	-
Grado de incorporación de GLA y/o SDA.	Dependiente. Cuantitativa-continua.	Porcentaje.	-
Tiempo.	Independiente. Cualitativa-ordinal.	Horas.	24 h – 48 h – 72 h
Carga enzimática.	Independiente. Cualitativa-ordinal.	% Respecto a la masa total de los sustratos.	10% – 15% - 20%

Relación másica entre los sustratos.	Independiente. Cualitativa-ordinal.	Masa.	1:2 – 1:4 – 1:6
--------------------------------------	--	-------	-----------------

Procedimientos y técnicas a realizar

Obtención y caracterización de un concentrado de FL a partir de lecitina de soya comercial

Para la obtención del concentrado de FL se empleó como material de partida lecitina de soya comercial, compuesta aproximadamente por un 46% de FL (**Anexo 7**). Al añadir acetona fría a la lecitina de soya, es posible purificar los FL debido a que éstos son insolubles en ella. Dicho esto, se aplicaron dos tratamientos con acetona fría en una relación lecitina:acetona 2:3 (m/v) para obtener el concentrado de fosfolípidos, uno sin agitación magnética (tratamiento A) y otro con agitación magnética y un baño de hielo (tratamiento B). Para el procedimiento, se pesaron 4 gramos de lecitina de soya en un matraz de vidrio, tapa rosca y 100 ml de capacidad y se añadieron 4 ml de n-hexano, se agitó, y luego se añadieron 6 ml de acetona fría y se refrigeró por 1 hora para luego centrifugar a 1.512 fuerza g durante 4 minutos (tratamiento A); o se dejó agitar durante 1 hora en un agitador magnético en un baño de hielo (tratamiento B). Este procedimiento se repitió 3 veces y el precipitado se recolectó en un matraz y el solvente se retiró por evaporación en un evaporador rotatorio (RE 100 Pro, Quimis). Las muestras fueron recolectadas en tubos de ensayo, pesadas y almacenadas a -20°C en atmósfera inerte con nitrógeno.

Luego, se tomaron alícuotas del concentrado de FL obtenido tras el tratamiento B (9 mg), las cuales fueron diluidas en cloroformo y metanol en una relación cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se caracterizaron las clases lipídicas por Cromatografía en Capa Fina (CCF), mediante comparación de los factores de retención (Rf) con un estándar comercial de FL (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, Estados Unidos). Fase estacionaria: placa de sílice activada; Fase móvil: cloroformo:metanol:agua 65:25:4 (v/v/v) (**Anexos 9 y 10**). Las clases lipídicas en el

concentrado de FL que no estaban presentes en el estándar comercial de FL, se identificaron en base a bibliografía en donde se utilizó los mismos solventes en similar proporción (cloroformo:metanol:agua 75:25:3 v/v/v) (47).

Seguidamente, se tomaron alícuotas y se obtuvieron los perfiles de ácidos grasos por su derivación a ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG), para luego ser analizados por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (CG-FID) (Agilent 6890N con un inyector automático 7683B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). La temperatura inicial se ajustó a 140°C durante 5 minutos, siendo la temperatura mantenida a 240°C por 5 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas portador y la temperatura del inyector y el detector se ajustaron a 270 y 260°C, respectivamente. Se utilizó una columna capilar Supelco SP-2560 (película de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm) para llevar a cabo el análisis (Sigma-Aldrich). Los EMAG se identificaron de acuerdo con sus respectivos tiempos de retención en comparación con una mezcla de estándares analíticos (37 componentes de EMAG Mix de Supelco, Sigma– Aldrich). Finalmente, se cuantificó la masa de cada una de las clases lipídicas (mg) y su proporción (%) con respecto al concentrado total de FL, gracias a la adición del estándar interno C17:0 (Ácido heptadecanoico).

Obtención de concentrados de GLA y SDA en forma de ácidos grasos libres y ésteres etílicos

El ASE se sometió a hidrólisis y etanolisis para obtener AGL y EE respectivamente, según los procedimientos descritos por L. Vázquez, et al. (48). Luego, se realizó el método de complejación de la urea a temperatura ambiente en donde se agregó a un matraz de vidrio, de base plana y 250 ml de capacidad, 15 g de urea, 40 ml de n-hexano, 2 ml de etanol absoluto y 1 g del concentrado de AGL o EE paralelamente, según lo descrito en un trabajo reciente por M.A. Rincón, et al. (49) y se obtuvo un concentrado de GLA y SDA en forma de AGL y de EE.

Finalmente, se tomaron alícuotas y se obtuvieron los perfiles de ácidos grasos por su derivación a EMAG, para luego ser analizados por CG-FID según el método descrito anteriormente en este trabajo, y las muestras fueron almacenadas a -20°C

en atmósfera inerte con nitrógeno para su posterior uso como sustratos en las síntesis enzimáticas de FLE.

Síntesis enzimática de FLE con GLA y/o SDA

Las síntesis se llevaron a cabo en viales de vidrio, de base cónica y para cada una de ellas se agregaron 50 mg del concentrado de FL, concentrado de GLA y SDA como AGL o EE paralelamente (1:2 – 100 mg, 1:4 – 200 mg o 1:6 - 300 mg), n-hexano como solvente orgánico (1 ml), se agitó con vortex hasta lograr la dilución del concentrado de FL, luego se agregó la lipasa comercial inmovilizada RM-IM como biocatalizador (% sobre la masa total de los sustratos), MgCl₂ como cofactor (5% sobre la masa total de los sustratos) y agua (4% sobre la masa total de los sustratos + la lipasa). Las reacciones se llevaron a cabo a 50°C en un equipo de calentamiento y agitación magnética (Reacti-Therm III #TS-18823, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) a 11 fuerza g en atmósfera inerte con nitrógeno.

Se realizaron ensayos de síntesis enzimática de FLE para comparar la incorporación entre AGL y EE, y para esto, se seleccionaron los niveles medios de cada variable control (48 h, 15% de carga enzimática y relación másica FL:AGL o FL:EE 1:4).

Los parámetros de las síntesis enzimáticas se optimizaron con el método Taguchi (9 corridas) con un n=6. Las combinaciones se observan en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1: Condiciones de reacción según el método Taguchi.

Corridas	Tiempo	Carga enzimática	Ratio
1	24	10	1:2
2	24	15	1:4
3	24	20	1:6
4	48	10	1:4
5	48	15	1:6
6	48	20	1:2
7	72	10	1:6
8	72	15	1:2
9	72	20	1:4

Tabla 2: Condiciones de reacción según el método Taguchi (codificado).

Corrida	Tiempo	Carga enzimática	Ratio
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

Purificación de los FLE

En primer lugar, se solubilizaron los productos de la reacción (FLE, lisofosfolípidos, AGL) con cloroformo (6 ml) y se retiró la lipasa junto con el agua y el $MgCl_2$, a través de una columna de vidrio con sulfato de sodio granular como fase estacionaria y el solvente se retiró por evaporación en un evaporador rotatorio. Luego, se precipitaron los FLE con acetona fría debido a que los FL son insolubles en acetona, mientras que los AGL se solubilizan en ella. Para esto, los FLE se solubilizaron con cloroformo (1 ml) y se traspasaron a un tubo de ensayo previamente pesado, se agregó acetona fría en una relación acetona:cloroformo 4:1 (v/v) y se centrifugó a 2.058 fuerza g durante 5 minutos, se extrajo el sobrenadante y se repitió el lavado con acetona fría 3 veces. El remanente de acetona que pudiera haber quedado en el tubo de ensayo fue retirado con nitrógeno y se pesó nuevamente el tubo de ensayo para obtener la masa final de FLE y con ello, evaluar el rendimiento de la reacción (% de los miligramos de producto con respecto a la masa inicial del concentrado de FL).

Se tomaron alícuotas y se obtuvieron los perfiles de ácidos grasos de los FLE por su derivación a EMAG, para luego ser analizados por CG-FID según el método descrito anteriormente en este trabajo. También se tomaron alícuotas (10 mg) y se diluyeron en n-hexano (120 μ l) para analizarlas por CCF. Fase estacionaria: placa de sílice activada; Fase móvil: n-hexano:éter dietílico:ácido acético 70:30:1 (v/v/v). Finalmente, las muestras fueron almacenadas a $-20^{\circ}C$ en atmósfera inerte con nitrógeno.

A continuación se esquematiza el desarrollo experimental del trabajo.

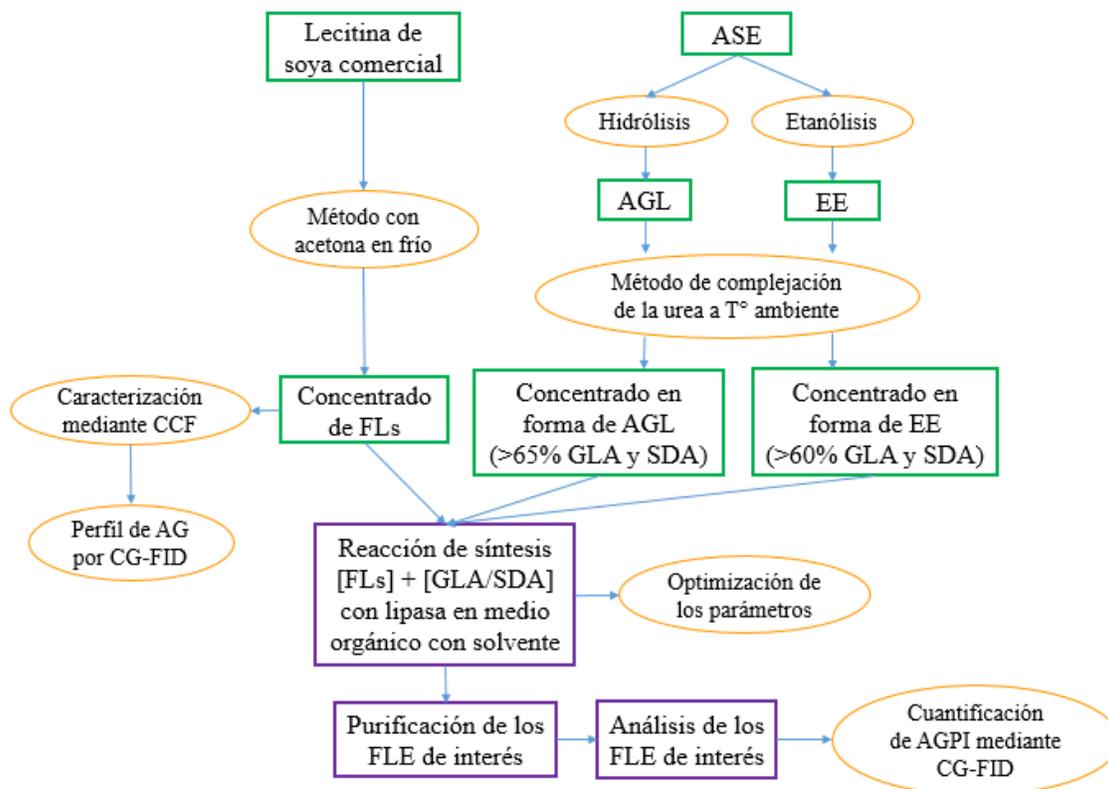


Figura 1: Representación esquemática del procedimiento experimental.

Análisis estadístico

La composición del concentrado de FL extraído de la lecitina de soya y el perfil de ácidos grasos de los concentrados de GLA y SDA (en la forma de AGL y EE) extraídos del ASE, se determinaron como la mediana con el rango intercuartílico. El Factor de Concentración de los concentrados en la forma de AGL y EE se analizaron mediante el test z de Wilcoxon Mann-Whitney para comparación de medianas y un valor-p <0,05 fue considerado como significativo. La comparación de los grados de incorporación de GLA más SDA en sus formas de AGL y EE a los FLE, se analizó mediante el test z de Wilcoxon Mann-Whitney para comparación de medianas y un valor-p <0,05 fue considerado como significativo. Se optimizaron las condiciones de las síntesis enzimáticas en base al diseño estadístico factorial robusto Taguchi (9

combinaciones) con el Software JMPStata, versión 14 y la magnitud de la respuesta (%) de cada una de las variables independientes en los ensayos se evaluará mediante el análisis de varianza (ANOVA).

9. Resultados

Obtención, caracterización y cuantificación del concentrado de FL a partir de lecitina de soya comercial

Se compararon los dos tratamientos con acetona fría aplicados a la lecitina de soya comercial, el tratamiento A sin agitación magnética y el tratamiento B con agitación magnética y un baño de hielo y se evaluó el rendimiento (% de los miligramos de producto con respecto a la masa inicial de la lecitina de soya) y el grado de concentración (% de FL en el concentrado con respecto a la composición total del concentrado). El tratamiento B tuvo una tendencia a un mejor rendimiento y grado de concentración que el tratamiento A, 53,4% (n=3; valor-p 0,513, prueba de Wilcoxon Mann-Whitney) y 77,5% (n=6; valor-p 0,337, prueba de Wilcoxon Mann-Whitney), respectivamente **Tabla 3, Figura 2**.

Tabla 3: Rendimiento y grado de concentración en el tratamiento A y B aplicado a la lecitina de soya.

	Tratamiento A	Tratamiento B	Valor-p
Rendimiento (%)	51,0 (4,7)	53,4 (11,0)	0,513
Grado de concentración			
Fosfolípidos (%)	75,7 (9,5)	77,5 (3,7)	0,337
Glicolípidos (%)	16,9 (6,5)	18,5 (4,1)	0,337
Lípidos neutros (%)	5,0 (6,6)	4,0 (5,3)	0,262

Valores expresados como mediana (rango intercuartílico).

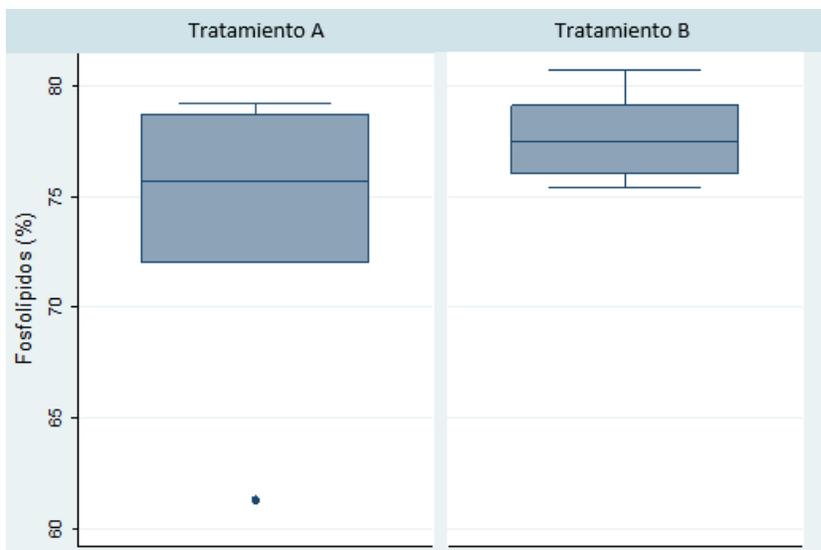


Figura 2: FL presentes en el concentrado en el tratamiento A y B aplicado a la lecitina de soya.

Al caracterizar las clases lipídicas por CCF comparando los Rf con un estándar comercial de FL, se observó la presencia en orden decreciente de lípidos neutros, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, lisofosfatidilcolina y otros lisofosfolípidos (no caracterizados). Las bandas de fosfatidilserina y ácido fosfatídico presentes en el concentrado de FL, debido a que no estaban presentes en el estándar comercial de FL, se caracterizaron según lo reportado por J.M. Nzai y A. Proctor (1998), **Figura 3, Anexo 11**.

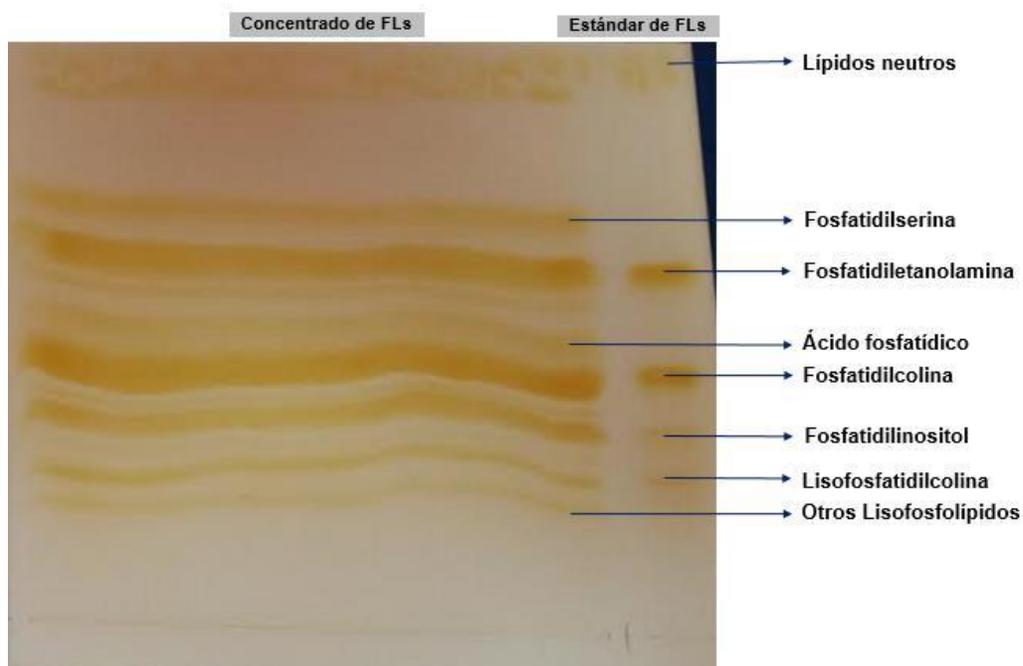


Figura 3: Caracterización de clases lipídicas en el concentrado de FL obtenido tras el tratamiento de lecitina de soya comercial con acetona fría. Las clases lipídicas se caracterizaron por comparación de los factores de retención con un estándar comercial de FL y en base a H. Bueschelberger. (42).

La **Tabla 4** muestra la composición total del concentrado de FL experimental y su cuantificación (%) de cada uno de sus componentes. Luego del tratamiento con acetona fría aplicado a la lecitina de soya, se obtuvo un grado de concentración de FL favorable (cercano al 80%), y el 20% restante está constituido principalmente por glicolípidos lo cual demuestra que el contenido de TAG inicial de la lecitina de soya fue extraído casi en su totalidad (<4%). Además, el concentrado de FL obtenido se asemeja a los resultados de un concentrado de FL adaptado de bibliografía (42).

Tabla 4: Caracterización y cuantificación de una Lecitina de soya comercial, un Concentrado de FL y el Concentrado de FL experimental.

Compuestos	Lecitina de soya comercial (%)*	Concentrado de FL (%)	Concentrado de FL experimental (%)
Total lípidos neutros	38 - 44	2,5	4,0 (5,3)
Glicolípidos	6	10	18,5 (4,1)
Fosfatidilcolina	9 - 17	20 - 23	28,5 (2,3)
Fosfatidilinositol	8 - 11	12 - 18	18,6 (0,6)
Fosfatidiletanolamina	8 - 15	16 - 21	15,3 (0,7)
Ácido fosfatídico	3 - 10	7 - 11	7,2 (1,3)
Fosfatidilserina	-	-	3,3 (0,2)
Lisofosfolípidos	-	-	4,6 (1,5)
Otros fosfolípidos	5 - 10	8 - 13	-
Total fosfolípidos	56	86	77,5 (3,7)

*Adaptado de H. Bueschelberger. (42). Valores en el concentrado de FL experimental expresados como mediana (rango intercuartílico); n=6.

Obtención de concentrados de GLA y SDA en forma de ácidos grasos libres y ésteres etílicos

Luego del método de complejación con urea a temperatura ambiente aplicado a los AGL y EE de manera paralela, se obtuvo un grado de concentración de 67,6% de GLA+SDA (sobre ácidos grasos totales) para el concentrado en forma de AGL y de 64,6% de GLA+SDA (sobre ácidos grasos totales) para el concentrado en forma de EE, con respecto a un 23,5% inicial de GLA+SDA en el ASE. La **Tabla 5** muestra el perfil de ácidos grasos de ambos concentrados obtenidos por CG, el factor de concentración (FC) alcanzado es de 2,69 y 2,59 para los AGL y EE respectivamente, logrando concentrar el GLA+SDA casi 3 veces con respecto al ASE original.

Tabla 5: Perfil de ácidos grasos en el aceite de *Echium plantagineum* comercial y en los concentrados de GLA+SDA en la forma de AGL y EE.

Ácidos grasos	Porcentaje sobre ácidos grasos totales		
	Aceite de <i>Echium plantagineum</i> comercial*	Concentrado en la forma de AGL	Concentrado en la forma de EE
16:0	6,82	0,15 (0,06)	0,15 (0,14)
18:0	3,55	0,05 (0,03)	0,06 (0,06)
16:1n7	0,10	-	-
18:1n9	14,16	0,89 (0,30)	1,30 (0,60)
18:1n7	0,53	0,43 (0,63)	-
20:1n9	0,81	-	-
18:2n6	15,74	10,10 (2,24)	10,92 (0,92)
18:3n6 (GLA)	11,01	29,66 (4,14)	28,18 (1,37)
18:3n3	33,36	22,12 (5,72)	22,77 (1,94)
18:4n3 (SDA)	13,90	37,35 (3,67)	36,24 (1,99)
GLA+SDA	24,91	67,01 (7,60)	64,42 (3,27)
Factor de concentración (FC)**	-	2,69 ^a	2,59 ^a

*Adaptado de M.A. Rincón, et al. (49). **FC = % de GLA+SDA en el concentrado (en la forma de AGL y EE, paralelamente)/% de GLA+SDA en el aceite de *Echium plantagineum* comercial. Valores en los concentrados en la forma de AGL y EE expresados como mediana (rango intercuartílico); n=15. Valores con letras en superíndice diferentes son significativamente distintos entre sí, valor-p <0,05; test z prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

Síntesis enzimática de FLE con GLA y/o SDA

En el ensayo de síntesis enzimática de FLE (n=3) se evaluó cuál de las dos formas químicas del concentrado, si como AGL o EE, iba a lograr una mejor incorporación a la molécula de FL y se observó de manera significativa una mejor incorporación de GLA+SDA a los FLE empleando AGL como sustratos (mediana 22,72% sobre ácidos grasos totales) que EE (mediana 19,31 sobre ácidos grasos totales), valor-p 0,04 (**Figura 4**). En base a estos resultados, se decidió optimizar las condiciones de síntesis empleando únicamente el concentrado en forma de AGL como sustrato.



Figura 4: Grado de incorporación de los ácidos grasos GLA+SDA a los FLE, según grupo funcional. AGL: Ácidos grasos libres (grupo carboxílico), EE: Ésteres etílicos (grupo éster). Valores presentados como mediana (n=3), valor-p <0,05 considerado significativo; test z prueba de Wilcoxon Mann-Whitney.

Según lo predicho por el método Taguchi con un total de 9 corridas (n=6), el mejor grado de incorporación de GLA+SDA a los FLE se obtuvo tras 48 horas, con un 20% de lipasa y relación másica de 1:6 (FL:AGL) con respecto al rendimiento máximo teórico (34%) **Figura 5**, sin embargo este no es un resultado experimental. El rendimiento máximo teórico es la proporción de incorporación de GLA y SDA, considerando que el concentrado no es 100% puro y asumiendo que la incorporación de éstos ácidos grasos a la estructura de los FL tiene lugar únicamente en la posición sn-1 (hasta un 50%), ya que la lipasa utilizada es específica de las posiciones sn-1,3 sin embargo, no es posible la incorporación a la posición sn-3 debido a la presencia de un grupo fosfato. La **Tabla 6** muestra los valores de incorporación de GLA+SDA (%) en las 9 corridas ensayadas.

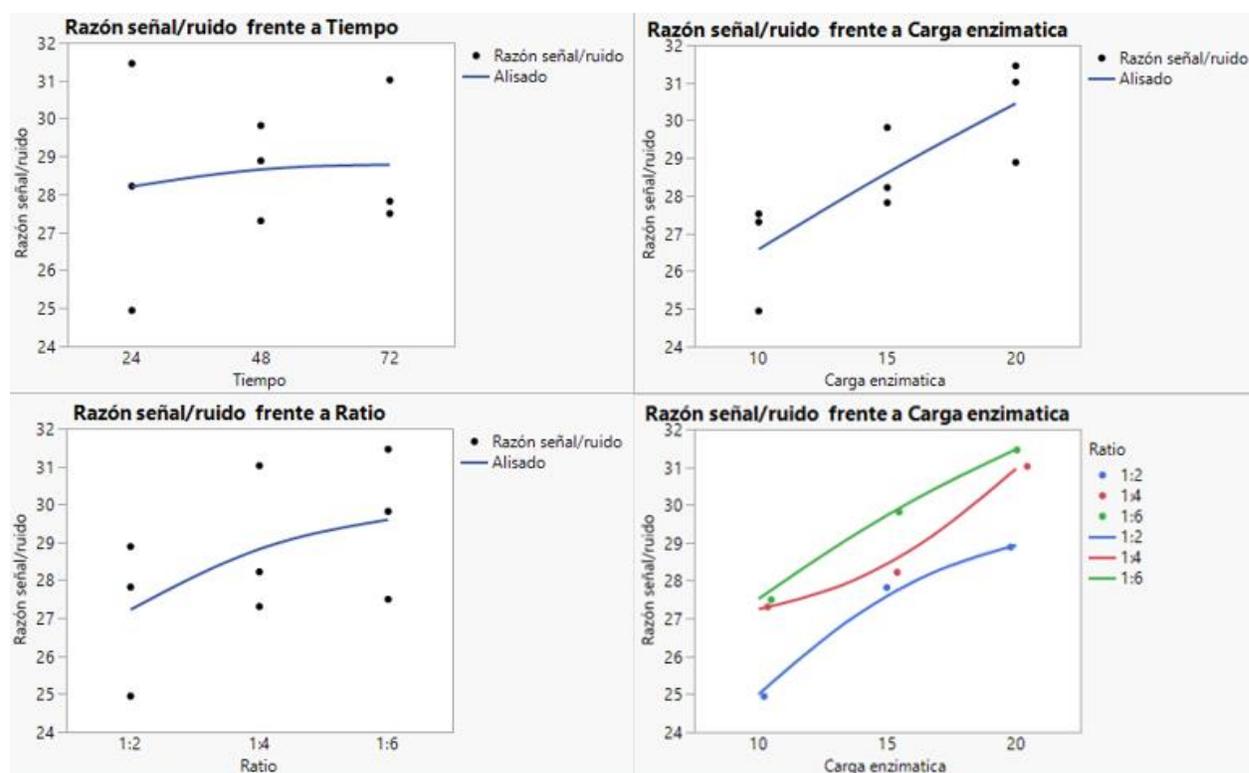


Figura 5: Optimización del diseño de síntesis enzimática. Las gráficas entregan el valor óptimo para cada una de las variables ensayadas para alcanzar el valor máximo de incorporación con respecto al máximo teórico (34%) y a la función objetivo “cuánto más grande mejor”. Datos analizados en base al método Taguchi, 9 corridas (n=6).

Tabla 6: Grado de incorporación de GLA y SDA en los FLE mediante acidólisis*.

N° corrida	Tiempo de reacción (h)	Carga de lipasa (%)	Relación másica entre los sustratos	Incorporación GLA+SDA (%)**	Desviación estándar
1	24	10	1:2	21,6	6,9
2	24	15	1:4	28,1	6,9
3	24	20	1:6	38,1	4,2
4	48	10	1:4	24,1	4,4
5	48	15	1:6	32,3	5,6
6	48	20	1:2	29,9	7,5
7	72	10	1:6	26,5	6,6
8	72	15	1:2	25,6	4,6
9	72	20	1:4	35,8	2,5

*Las reacciones se llevaron a cabo utilizando AGL como acildonador con lipasa comercial inmovilizada RM-IM a 50°C, 11 fuerza g, en un medio con n-hexano (1 ml), MgCl₂ (5% de la masa total de los sustratos) como cofactor y agua (4% de la masa total de los sustratos con la lipasa) para la reacción enzimática. **Valores expresados con respecto al % máximo teórico (asumiendo que la incorporación solo se da en posición sn-1). Número de corridas y combinación de las variables, definido por el método Taguchi. Los resultados se expresan como la media con su desviación estándar.

El análisis de varianza (ANOVA) evalúa la magnitud de respuesta (%) de cada una de las variables independientes. La propiedad básica de ANOVA es que las sumas totales de los cuadrados (SS_T) es igual a la suma de los cuadrados de las desviaciones de todos los factores evaluados junto con el error ($SS_t + SS_i + SS_r + SS_e$). La **Tabla 7** muestra que para la incorporación de GLA+SDA la carga enzimática es el factor más influyente en las síntesis (69,14%), seguido por el ratio (27,13%), mientras que el tiempo casi no tiene repercusión (1,71%) influyendo menos aún que el error (2,02%). Este análisis indica que hubo otro factor necesario de controlar y que no fue considerado, el cual puede estar influyendo aún más que el tiempo.

Tabla 7: Análisis de varianza (ANOVA) para los factores incluidos en el método Taguchi.

Parámetros	SS	SS (%)
Tiempo	0,55689	1,71
Carga enzimática	22,48443	69,14
Ratio	8,82447	27,13
Ruido	0,65578	2,02
Total	32,52156	100,00

Purificación de los FLE

El proceso de purificación de los FLE del resto de los productos de la reacción resultó ser un proceso rápido, sencillo, económico y eficiente. La **Figura 6** muestra el análisis por CCF en donde solo aparece la banda correspondiente a los FLE.

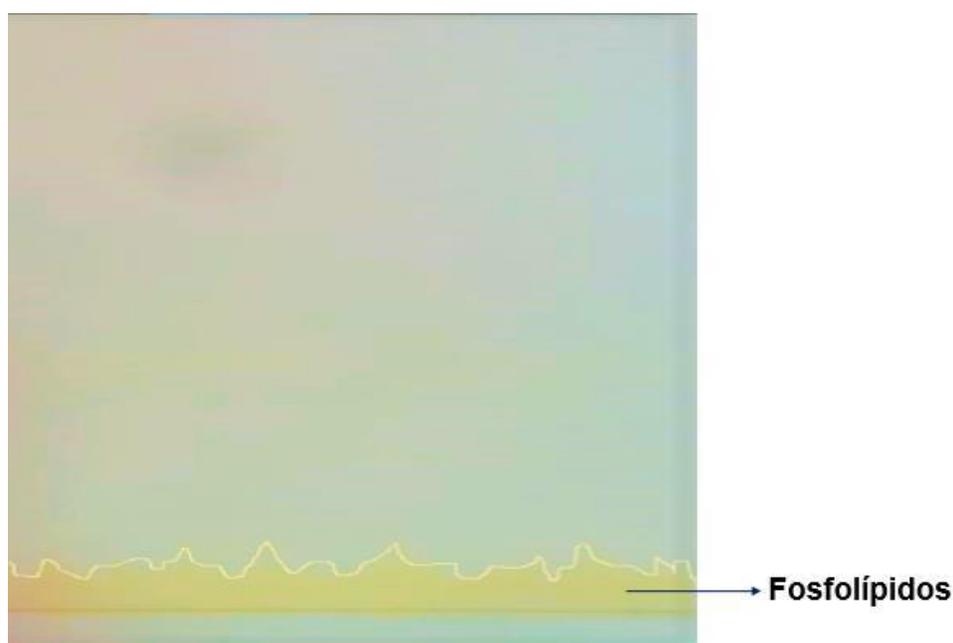


Figura 6: FLE purificados con acetona fría tras la reacción de síntesis enzimática. La banda inferior muestra los compuestos polares, en la parte superior de la placa de sílice no se observa la banda correspondiente a compuestos apolares (AGL).

Rendimiento

Los porcentajes de rendimiento alcanzaron un 85% en el total de las corridas ensayadas. No existe asociación entre el rendimiento (%) y la incorporación (%), R^2 : 0,0075 (valor-p 0,6160).

10. Discusión

Obtención del concentrado de FL

Los resultados de caracterización del concentrado de FL en este trabajo fueron idénticos a los obtenidos por J.M. Nzai y A. Proctor (47) quienes analizaron un concentrado de FL extraídos del aceite de soya crudo también con acetona por CCF, utilizando la misma fase móvil (cloroformo:metanol:agua), pero en proporciones levemente distintas (75:25:3 v/v/v) y lograron una buena separación de las distintas clases lipídicas, las cuales al compararlas con una mezcla estándar de FL que contenía fosfatidilcolina (27%) fosfatidiletanolamina (23%) y fosfatidilinositol (17%) y analizarlas luego por densitometría de imagen lograron determinar de manera óptima las principales clases de FL presentes en el aceite de soya. Sin embargo, los resultados del trabajo de L.D. Racicot y A.P. Handel (50) quienes analizaron la composición de FL del aceite de soya crudo y desgomado, muestran diferencias en la posición de la banda de fosfatidilinositol que aparece sobre fosfatidilcolina, pero en este caso los autores utilizan como fase móvil cloroformo:etanol:agua destilada desionizada:triethylamina en una proporción de 30:34:8:35 (v/v/v/v), la cual es más polar en comparación a la fase móvil utilizada en el presente trabajo. Esto puede haber provocado una mayor migración de la molécula de fosfatidilinositol, ya que esta clase de fosfolípidos contiene un azúcar unido al grupo fosfato lo que la hace más polar que la molécula de fosfatidilcolina, la cual contiene una amina cuaternaria unida al grupo fosfato. De todas maneras, al cuantificar las clases de FL, se observó que en general la fosfatidilcolina se encontraba presente en mayor cantidad seguida por fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y lisofosfatidilcolina en último lugar, lo cual es consistente con los resultados de este estudio. En otro estudio llevado a cabo por Akihiko Sugai, et al. (51) se analiza la composición de FL de lecitina de soya utilizando extracto de lípidos crudos mediante separación por CCF bidimensional. En este caso las fases móviles utilizadas fueron cloroformo:metanol:hidróxido de amonio 7N en una proporción de 65:30:4 (v/v/v) para el desarrollo de la placa en la

primera dirección y cloroformo:metanol:ácido acético:agua en una proporción de 170:25:25:6 (v/v/v/v) para la segunda dirección y los resultados obtenidos en la placa de sílice muestran que la posición de la banda de ácido fosfatídico aparece sobre la banda de fosfatidiletanolamina, a diferencia del presente trabajo que sucede lo contrario. Esto probablemente, puede deberse a la menor polaridad de la fase móvil (mayor contenido de cloroformo en el desarrollo de la placa para la segunda dirección) que puede haber generado una mayor migración del ácido fosfatídico, el cual, al no estar unido a ningún alcohol o grupo amino (compuestos polares), es más apolar en comparación al resto de las clases de FL.

Por lo general, el procedimiento de purificación de FL a partir de lecitina de soya, se realiza con acetona, debido a la insolubilidad de los FL en este solvente, además, la extracción con acetona es el método más utilizado en la industria (43). Sin embargo, existen casos en que se han utilizado otros solventes para la purificación como etanol o metanol, pero estos se consideran cuando se requiere extraer una clase de FL en particular y no, un concentrado total de FL, ya que las distintas clases de FL poseen solubilidades diferentes. Por ejemplo, la fosfatidilcolina es altamente soluble en etanol; mientras que el fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico no lo son (42). En un estudio realizado por Vilas V. Patil, et al. (52) se purificó fosfatidilcolina a partir del aceite de soya, para esto probaron distintas mezclas de solventes y etanol puro, concluyendo que la mejor opción era el etanol puro, llegando a un grado de pureza mayor al 40%. Sin embargo, en este estudio se realizó un experimento posterior de precipitación con acetona en múltiples etapas para purificar aún más la fosfatidilcolina, comparándolo con la precipitación con sulfato de magnesio y, a pesar de que la precipitación con sulfato de magnesio generó un mayor porcentaje de pureza de la fosfatidilcolina, se observó que con la acetona aumentó el grado de pureza en un 11% en la primera etapa, llegando a casi un 60% final (52). Otro estudio llevado a cabo por V. Vandana, et al. (53) desarrolló un método de precipitación con acetona fría y refrigeración durante 1 hora muy similar a los procedimientos utilizados en el presente trabajo, logrando enriquecer el contenido de FL en una lecitina de soya comercial a un 60% y 70% con respecto al 50% de FL contenidos inicialmente. B. Maroto, et al. (54) también purificaron FL de lecitina

de soya que contenía de un 60-65% de FL totales inicialmente, para esto, utilizaron un ratio de lecitina:acetona de 1:1 (1.250 g de lecitina:1.250 ml de acetona) y 6 repeticiones, llegando a un grado de pureza del 97% de FL totales. Este trabajo pone en manifiesto que a medida que aumenta el número de repeticiones de lavados con acetona, aumenta el grado de pureza obtenido.

Obtención del concentrado de GLA y SDA

El método de complejación con urea ha sido ampliamente usado por su efectividad y sencillez para concentrar AGPI, debido a la formación de aductos de urea que son altamente estables (55). N. Senanayake y F. Shahidi (55) concentraron DHA del aceite de alga por complejación con urea, en este estudio los autores mezclaron la urea con etanol y la calentaron a 60°C para luego cristalizarla a temperaturas de refrigeración y obtuvieron gracias a la formación de aductos de urea, que los ácidos grasos saturados totales disminuyeron de un 25,9% a un 1,1% en el concentrado final y que los AGPI presentes en el aceite de alga (18:2, 22:5 y 22:6; DHA) aumentaron de un 48,9% a un 98,2%. Adicionalmente, el aceite de alga contenía ácidos grasos de cadena más corta (10:0, 12:0 y 14:0), los cuales no lograron ser eliminados por su incapacidad para complejarse con la urea. Otro estudio muy similar al de N. Senanayake y F. Shahidi fue el realizado por W.M.N. Ratnayake, et al. (56) quienes concentraron EPA y DHA de distintos aceites de pescado por complejación con urea, utilizando como solvente etanol al 95%, y evaluaron la relación de urea:AGL junto con la temperatura para la cristalización de la urea, encontrando que la mejor relación de urea:AGL fue de 3:1 y que la temperatura que generó el rendimiento más alto (91,4%) fue de 1°C. Sin embargo, el método de complejación con urea a altas temperaturas tiene la desventaja de poder degradar los AGPI, los cuales son más susceptibles debido al mayor número de dobles enlaces en su estructura (56), además de la formación de carbamato de etilo por el uso de etanol, sustrato requerido para su formación. Según lo reportado por L. Vázquez, et al. (57) el método de complejación con urea funciona mejor a temperatura ambiente que a altas temperaturas al utilizar ASE y otros aceites como sustrato de partida, consiguiendo un mejor rendimiento (%) de los AGPI,

especialmente de GLA y SDA, y una menor producción de carbamato de etilo. El carbamato de etilo o uretanos son una clase de compuestos derivados del ácido carbámico y se ha comprobado que puede ser cancerígeno en varias especies como ratones, ratas, hámsters, monos y probablemente en humanos, según un estudio de 2 años en roedores. En este trabajo, el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente evitando la degradación de los ácidos grasos y la formación de carbamato de etilo según el estudio de L. Vázquez, et al. (57) y la técnica resultó ser bastante eficiente, ya que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados fueron principalmente complejados por la urea, pasando de un 25,97% inicial a un 1,52% aproximadamente en los concentrados de AGL y EE, por otro lado, los AGPI pasaron de un 74% inicial a un 99% aproximadamente en los concentrados; siendo los ácidos grasos de interés GLA y SDA los que mejor se concentraron, probablemente por la mayor presencia de dobles enlaces en su estructura. La metodología utilizada en este trabajo para concentrar GLA y SDA por complejación con urea, se basa en un reciente estudio realizado por M.A. Rincón Cervera, et al. (49) quienes a partir de ASE comercial y ASE extraído de semillas chilenas de forma paralela, concentraron los mismos ácidos grasos a temperatura ambiente y no por cristalización a bajas temperaturas, a diferencia de otros autores, logrando obtener un grado de concentración del 64,15% para AGL y del 60,09% para EE con un FC de 2,57 y 2,41, respectivamente para el procedimiento aplicado al ASE comercial. Estos resultados fueron un poco más bajos a los obtenidos en el presente estudio en donde se logró aumentar el FC (2,69 para AGL y 2,59 para EE) debido a un mayor grado de concentración de GLA y SDA obtenido para la forma de AGL y EE (67,01% y 64,42%, respectivamente). Sin embargo, no sucedió lo mismo para el caso del ASE extraído de semillas chilenas donde los valores fueron más altos, aunque estos resultados no son comparables debido a que el perfil de ácidos grasos en este aceite contenía un 19% de GLA+SDA inicial comparado a un 24% inicial en el ASE comercial, lo que lleva a aumentar el FC (49). Los mayores grados de concentración obtenidos en el presente trabajo, probablemente puedan deberse a que se procuró moler completamente la urea hasta conseguir un polvo muy fino y luego de pasarla a los matraces de base plana, se volvió a separar ya que la urea

tiende a aglomerarse formando grumos fácilmente, posterior a esto al agregar los solventes a los matraces se agitó nuevamente la urea para evitar la formación de grumos, esto pudo haber generado una mayor superficie expuesta al momento de la agitación.

En los estudios en donde los autores utilizaron altas temperaturas y luego bajas para la cristalización de la urea, los resultados son muy similares a los obtenidos en el presente trabajo en donde se utilizó la técnica más reciente (someter la urea a temperatura ambiente para generar el proceso de complejación). Por otro lado, a pesar de que el ASE original no contiene ácidos grasos de cadena corta o con un número de carbono inferior a 16, el porcentaje remanente de ácidos grasos saturados en el concentrado final de AGL y EE no puede deberse a la incapacidad de complejarse con la urea; sino más bien, puede deberse a la relación de urea para los solventes utilizados (n-hexano y etanol absoluto, estando el primero en mayor cantidad). La relación de urea:AGL utilizada en el presente trabajo fue mucho mayor (15:1) en comparación lo reportado por W.M.N. Ratnayake, et al. (56), sin embargo, se utilizó n-hexano y etanol absoluto como solventes y no solo etanol, similar al método descrito por L. Vázquez, et al. (57) además, la mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente para la formación de aductos, en vez de ser sometida a bajas temperaturas.

Síntesis enzimáticas de los FLE

Para la síntesis de FLE se pueden utilizar fosfolipasas o lipasas como catalizadores enzimáticos. Las fosfolipasas son estereoespecíficas, permitiendo modificar los ácidos grasos de la posición sn-1 o sn-2 en la estructura de los FL (fosfolipasas A1 o A2, respectivamente). Sin embargo, son más costosas en comparación a las lipasas y se comercializan en forma libre por lo que son de difícil manipulación. Por otro lado, el uso de lipasas se ha generalizado para la síntesis de lípidos estructurados, tanto TAG como FL. Esto porque son económicas, se comercializan inmovilizadas, siendo de fácil manipulación y se pueden retirar fácilmente una vez realizada la reacción ya sea por filtración o centrifugación, son reutilizables, ofrecen una alta selectividad en posición sn-1 y condiciones suaves de reacción. En cuanto

a eficiencia las lipasas no se han quedado atrás, logrando alcanzar grados de incorporación mayores al 30% al igual que las fosfolipasas, e incluso mayores al 40% en algunos estudios (38).

Nuestros resultados obtenidos en la optimización de las variables para la el mejor grado de incorporación de GLA+SDA a los FLE, demostraron que el tiempo, a pesar de conseguir la incorporación más alta a las 48 horas según el método Taguchi, no tuvo una influencia significativa. Por el contrario, el trabajo de M. Hossen, et al. (58) quienes sintetizaron FLE con AL conjugado, demostró que el tiempo de reacción medido a las 12, 24, 48 y 72 horas, sí influyó en las síntesis mediadas por enzimas logrando el mayor grado de incorporación (16%) a las 72 horas, y que luego de las 50 horas de reacción aumentaba considerablemente la hidrólisis. En cuanto a la relación másica entre los sustratos (FL:AGL), en el presente trabajo se observó que a medida que aumentaba esta relación, aumentaba la incorporación de GLA+SDA a los FLE. Resultados similares fueron obtenidos por X. Li, et al. (45) quienes sintetizaron fosfatidilcolina con EPA y DHA y obtuvieron los mayores grados de incorporación con una relación másica entre los sustratos de 1:6, observando además, que al continuar aumentando la relación (1:7) el efecto se anulaba. Para las demás variables medidas sus mejores resultados de incorporación se lograron a las 24 horas, con un 15% de lipasa (% sobre los sustratos totales), 1,25% de agua agregada (% sobre los sustratos totales más la lipasa) y a los 60°C. Aunque es importante mencionar que en este estudio los autores utilizaron fosfolipasa A1 para mediar las síntesis.

La metodología utilizada en el presente trabajo ha sido basada en el estudio de N. Marsaoui, et al. (2015) (59) quienes realizaron la síntesis, mediada por lipasa inmovilizada RM-IM, de FLE a partir de lecitina de soya y EE de EPA y DHA. En este estudio los autores evaluaron el efecto de la cantidad de agua, la relación másica de EE:lecitina de soya, el tiempo, la presencia o ausencia de hexano y el uso de aditivos (urea con Ca^{2+} o con Mg^{2+}), y observaron que los mejores grados de incorporación se consiguieron con un 4% de agua, una relación másica de EE:lecitina de soya de 3:1 y que luego de las 48 horas de reacción la incorporación

fue más alta con la presencia de hexano y urea + Mg^{2+} como cofactor (50,0%), sin embargo, luego de las 72 horas de reacción la incorporación fue más alta con urea + Mg^{2+} como cofactor independiente de la presencia o ausencia de hexano (56,8% y 45,7% respectivamente, valor-p >0,05), **Anexo 12**. A su vez, la metodología del estudio mencionado anteriormente, fue basada en un estudio de N. Marsaoui, et al. (2013) (60), en donde se realizó la transesterificación de lecitina de soja con ésteres metílicos de EPA y DHA en un medio con hexano, comparando el efecto de varias lipasas disponibles comercialmente y distintos aditivos (histidina, arginina, urea, Ca^{2+} , Mg^{2+} , o una combinación de urea con los cationes divalentes; Ca^{2+} y Mg^{2+}), todos agregados al 5% de la masa total de los sustratos y se observó, al igual que en el estudio anterior, que al utilizar lipasa inmovilizada RM-IM y Mg^{2+} se obtuvo los mejores resultados de incorporación, sugiriendo el uso de esta lipasa como catalizador para reacciones de interesterificación en un medio con solvente orgánico y bajo contenido de agua. Estos resultados justifican el uso de un 4% de agua, 5% de Mg^{2+} como cofactor y hexano en el presente trabajo, a pesar de que el hexano no mostró diferencias luego de las 72 horas, se decidió utilizarlo de igual manera para homogeneizar los sustratos en el medio de reacción y así, facilitar la actividad de la lipasa en la incorporación de GLA y SDA a los FL.

El cálculo para el análisis de varianza (ANOVA) se realizó en base al ratio S/N o eta (η) y a la suma de cuadrados totales, según lo reportado por S. Athreya, et al. (61). Este análisis demuestra que la carga de lipasa ha sido el factor más importante en las síntesis, aumentando proporcionalmente la incorporación de GLA+SDA a los FLE, sin embargo, solo se analizó hasta una carga del 20% y no sabemos que sucede si la aumentamos aún más; probablemente está directamente relacionada con el ratio de FL:AGL, ya que si este último se mantiene constante y se aumenta la carga de lipasa, en algún momento se acabará el sustrato limitante (concentrado de AGL) no habiendo nada disponible para la actividad de la lipasa, quedando ésta última en exceso. Por otro lado, se observó que la repercusión del tiempo en las síntesis fue bastante baja, llegando a ser aún menor que la repercusión del error medido, lo cual significa que hubo algún otro factor que influyó y que no fue considerado, como por ejemplo la temperatura de reacción, la fuerza centrífuga

relativa (fuerza g) en la agitación magnética, que probablemente influyen de manera directa en la transferencia de masa, la cantidad de agua agregada, el tipo y la cantidad de cofactor agregado o el medio de reacción (libre de solvente o con solvente).

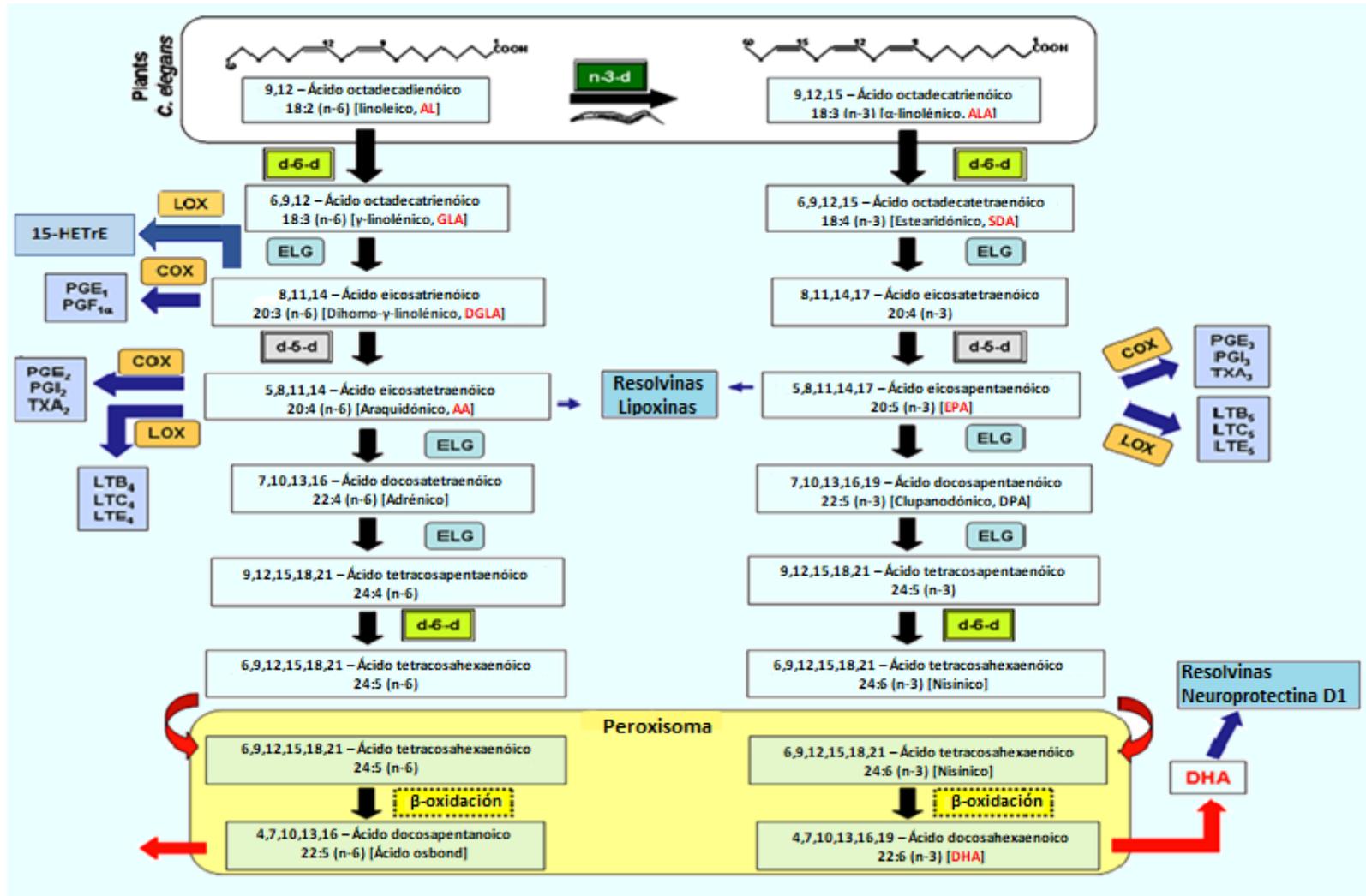
Dentro de las fortalezas de este estudio, se considera (1) el número de ensayos realizado para cada una de las corridas en el método Taguchi para la optimización de las síntesis enzimáticas (mayor a 5), lo cual genera datos que pueden ser reproducibles; (2) el uso de lipasa para llevar a cabo las síntesis, las cuales son más económicas, fáciles de recuperar y de manipular que las fosfolipasas; (3) a pesar de la técnica de CCF utilizada para clasificar las clases de FL, que no se considera una técnica muy precisa a diferencia de otros métodos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), los datos de caracterización y cuantificación de las clases de FL resultaron ser altamente precisos (con una baja variabilidad de los datos) y válidos (comparables a lo reportado en la literatura); (4) las técnicas utilizadas para la obtención de los sustratos, las síntesis enzimáticas y la purificación de los FLE, ya que en general son técnicas sencillas, económicas, eficientes y que utilizan solventes de grado alimentario, lo cual convierte a este proceso de síntesis de FLE en una alternativa más fácil de escalar a nivel industrial que otras metodologías existentes. En cuanto a las limitaciones, (1) hubo variables que no se controlaron en lo relativo a las síntesis enzimáticas, ya sea por falta de tiempo y de recursos. Hubiese sido interesante comparar la actividad de la lipasa comercial inmovilizada RM-IM con otras lipasas usualmente utilizadas para la síntesis de lípidos estructurados, como por ejemplo lipasa A *Candida antarctica*, lipasa B *Candida antarctica* o lipasa *Thermomyces lanuginosus*.

11. Conclusiones

Es posible obtener FLE conteniendo GLA y SDA en la posición sn-1, empleando lipasa comercial inmovilizada RM-IM a partir de sustratos de procedencia vegetal terrestre. La obtención de los sustratos (concentrado de FL por un lado y de GLA y SDA por otro lado), a través de procedimientos relativamente sencillos y a su vez, costo-efectivo de escalar a nivel industrial y el uso de lipasas que son más económicas, fáciles de manipular y recuperar en comparación a las fosfolipasas, favorece las condiciones para disponer de un producto con potencialidad alimentaria, el cual podría estar disponible a futuro para ser empleado por la industria alimentaria como potencial ingrediente para la elaboración de alimentos funcionales.

Los FLE conteniendo GLA y SDA podrían ser una alternativa innovadora y sustentable al consumo de alimentos de origen marino ricos en EPA y DHA, los cuales también cumplen una importante función antiinflamatoria en el organismo, sin embargo, la disponibilidad de varias especies de este grupo de alimentos (pescados y mariscos) debido a la sobreexplotación y la pesca ilegal, ha disminuido a los largo del tiempo. Sumado a esto, la aceptabilidad de pescados y mariscos en la población chilena, en general es baja y no logra cumplir con las recomendaciones, por lo que aumentar la gama de alimentos con contengan estos FLE en particular, podría contribuir a un mayor consumo de ácidos grasos con propiedades antiinflamatorias aprovechando sus beneficios para la salud y potenciando el consumo en personas veganas y/o vegetarianas.

12. Anexos

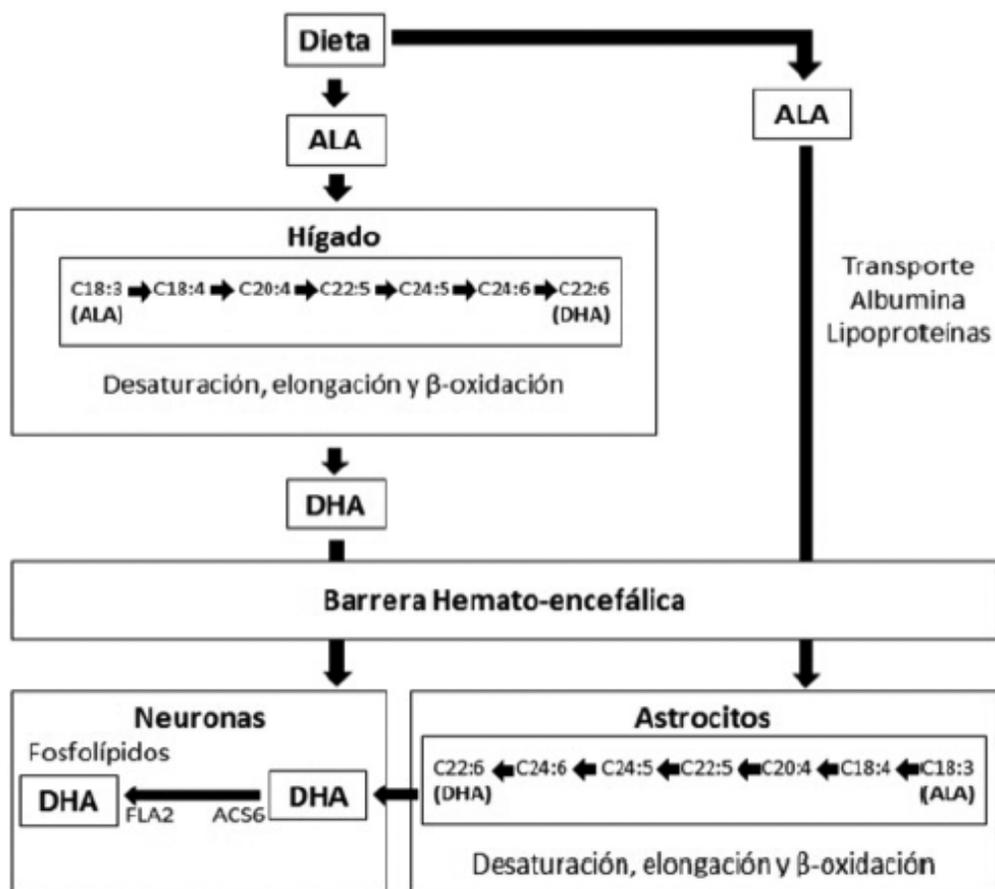


Anexo 1. Biosíntesis de AGPI. ELG: Elongasas. Δ -6-d y Δ -5-d: Desaturasas. En las plantas y *C. elegans* una enzima desaturasa (n-3-d) convierte el AL y el ALA. Los mamíferos convierten el AL y el ALA a ácidos grasos de cadena larga usando una serie de reacciones de desaturación y elongación en el Retículo Endoplasmático Liso. La síntesis de DHA desde C24:6 n-3 y de ácido osbond desde C24:5 n-6 requiere la síntesis de C24:6 n-3 y de C24:5 n-6 en el Retículo Endoplasmático Liso y su transporte a los peroxisomas donde se someten a un ciclo de beta oxidación para producir DHA y ácido osbond que vuelven al Retículo Endoplasmático Liso (flechas rojas). La síntesis de eicosanoides desde AA, EPA y DGLA por enzimas COX y LOX también es mostrada (flechas azules). También se muestra la formación de Rv y P desde el DHA. Figura adaptada de G. Russo. (21) y S. Sergeant, et al. (36).

Anexo 2. Principales fuentes vegetales de ALA.

Nombre común	Nombre científico	Contenido de ALA (% sobre ácidos grasos totales)
Linaza (semilla)	<i>Linum usitatissimum</i>	23
Chía (semilla)	<i>Salvia hispánica</i>	17
Sclarea (semilla)	<i>Salvia sclarea</i>	15
Chía (aceite)	<i>Salvia hispánica</i>	65
Linaza (aceite)	<i>Linum usitatissimum</i>	54
Sclarea (aceite)	<i>Salvia sclarea</i>	60
Sacha inchi (aceite)	<i>Plukenetia volubilis</i>	46
Camelina (camelina)	<i>Camelina sativa</i>	38
Rosa mosqueta (aceite)	<i>Rosa rubiginosa</i>	26-37
Canola/colza (aceite)	<i>Brassica campestris</i>	11-9
Soja (aceite)	<i>Glycine max</i>	7
Nueces	<i>Juglans regia</i>	9

Adaptado de J. Morales, et al. (17).

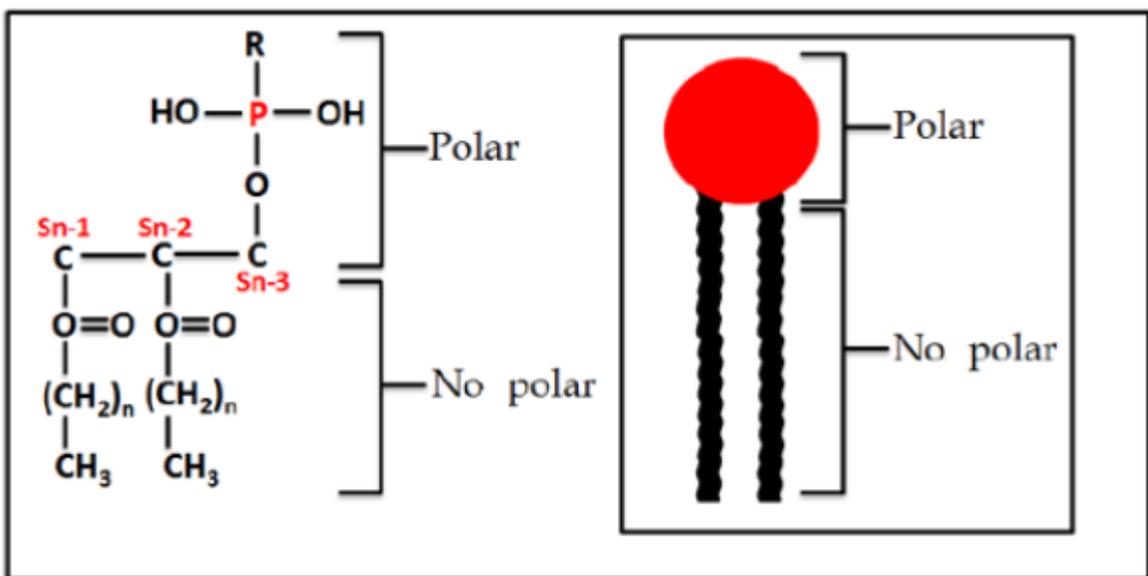


Anexo 3. Conversión del ALA a DHA en hígado y cerebro. Figura adaptada de J. Morales, et al. (17).

Anexo 4. Composición de ácidos grasos típicos de aceites que contienen SDA.

Ácido graso	Porcentaje sobre ácidos grasos totales			
	Grosella negra	Echium	Soja-SDA	Ahiflower
16:0	9,3	7,1	12,9	4,5
18:0	2,1	3,7	4,5	1,8
18:1 n-9	16,6	15,4	20,1	8,5
18:2 n-6	41,9	18,8	24,4	12,5
18:3 n-6	13,8	11,0	6,1	6,0
18:3 n-3	12,9	28,4	9,9	41,5
18:4 n-3	2,6	12,5	19,9	20,0

Solo se muestran los principales ácidos grasos. Adaptado de M. Surette. (24).

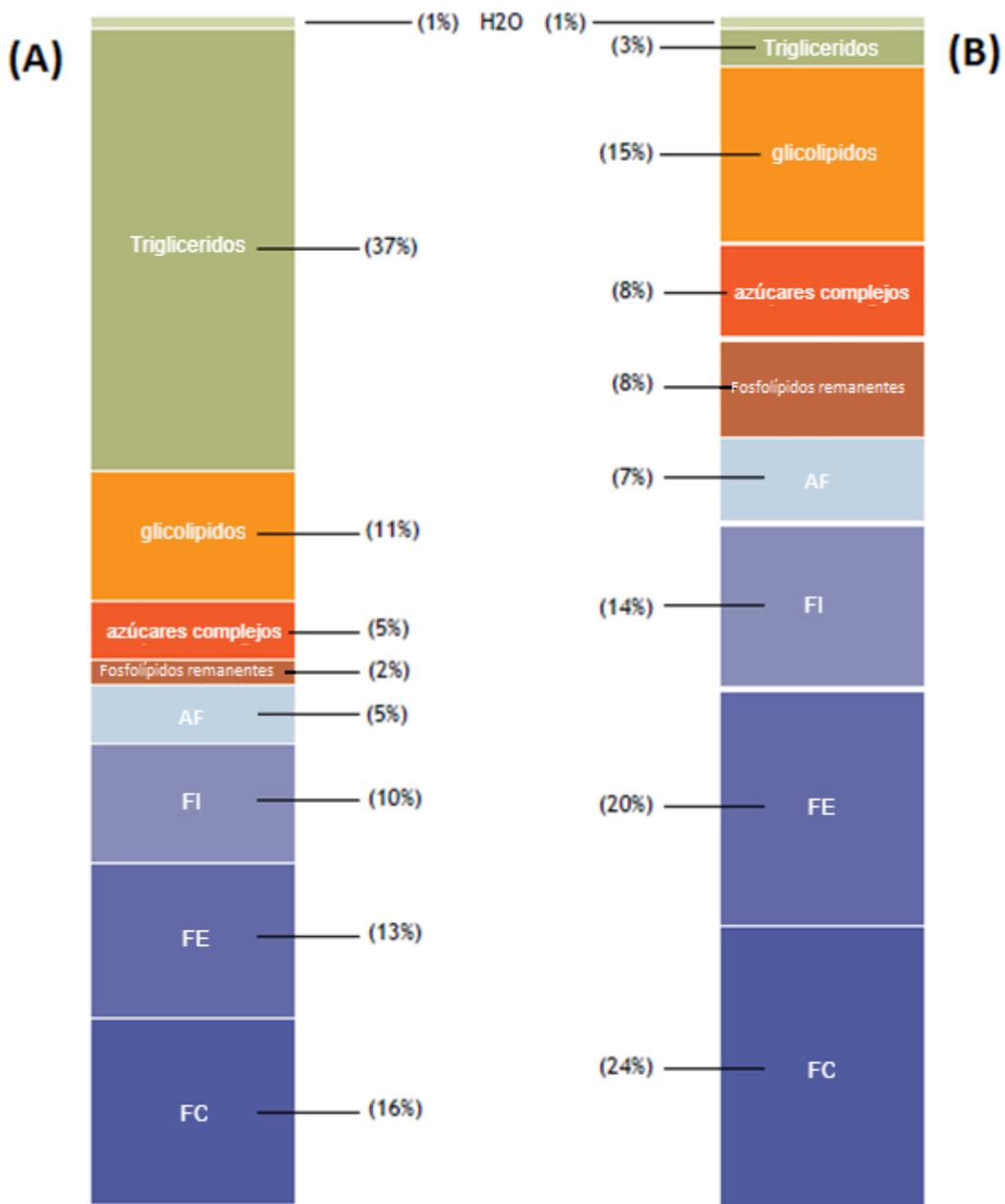


Anexo 5. Estructura química del ácido fosfatídico y su representación simplificada. Figura adaptada de R. Valenzuela, et al. (41).

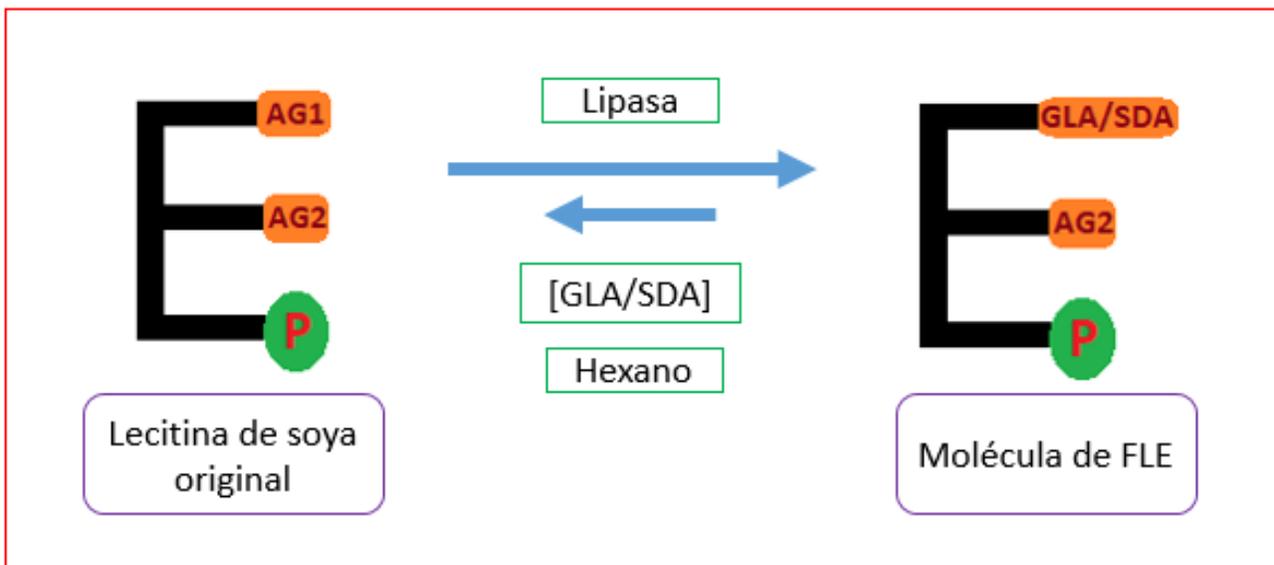
Anexo 6. Perfil de ácidos grasos promedio en extractos de lecitina de plantas y animales.

Ácido graso	Porcentaje sobre ácidos grasos totales				
	Soya	Canola	Girasol	Maíz	Yema de huevo
16:0	21	18	15	23	30
18:0	4	1	3	1	16
18:1 n-9	12	21	13	26	29
18:2 n-6	57	48	69	48	14
18:3 n-3	6	7		1	1
20:4 n-6					5
22:6 n-3					3

Adaptado de H. Bueschelberger. (42).



Anexo 7. Composición de la lecitina de soya líquida estándar (A) y de su forma granular o en polvo en donde la mayoría de los TAG y AGL son eliminados (B). H2O: Agua, PA: Ácido fosfatídico, PI: Fosfatidilinositol, PE: Fosfatidiletanolamina, PC: Fosfatidilcolina. Figura adaptada de American Lecithin Company. (44).



Anexo 8. Descripción esquemática de la síntesis de un FLE, mediada por lipasa.

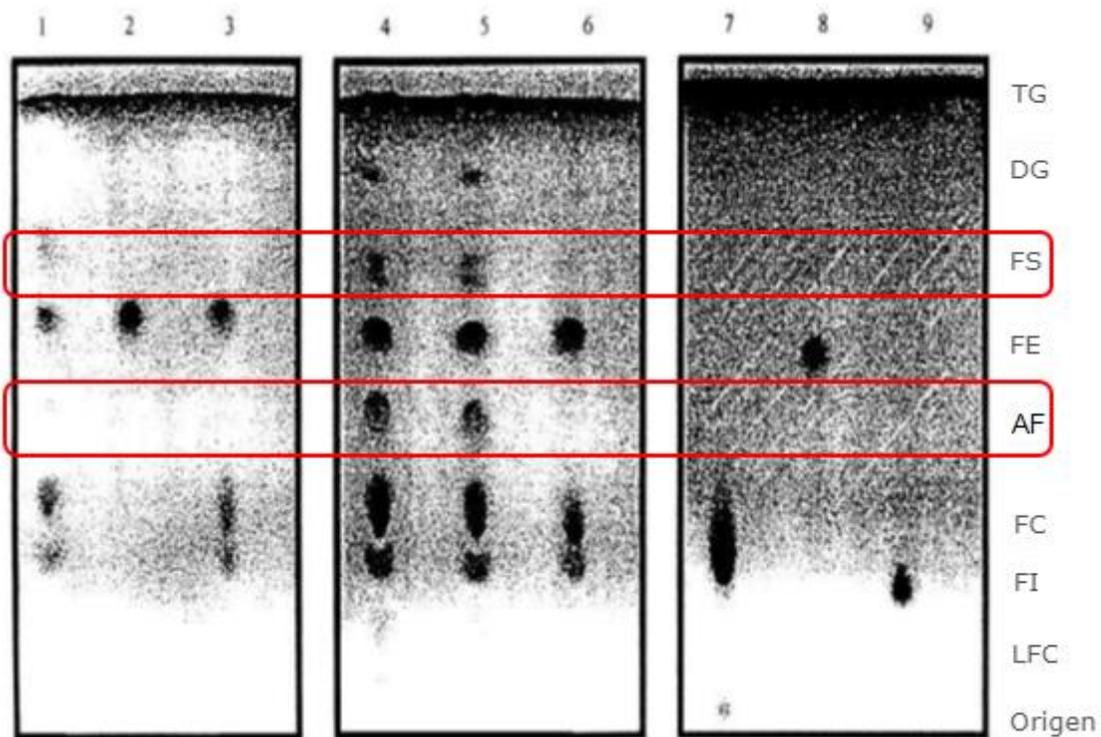
Anexo 9. Composición del estándar comercial de FL.

Clases fosfolípídicas	Concentración (mg/ml)
Fosfatidilcolina	1,5
Fosfatidiletanolamina	1,2
Fosfatidilinositol	0,9
Lisofosfatidilcolina	0,3

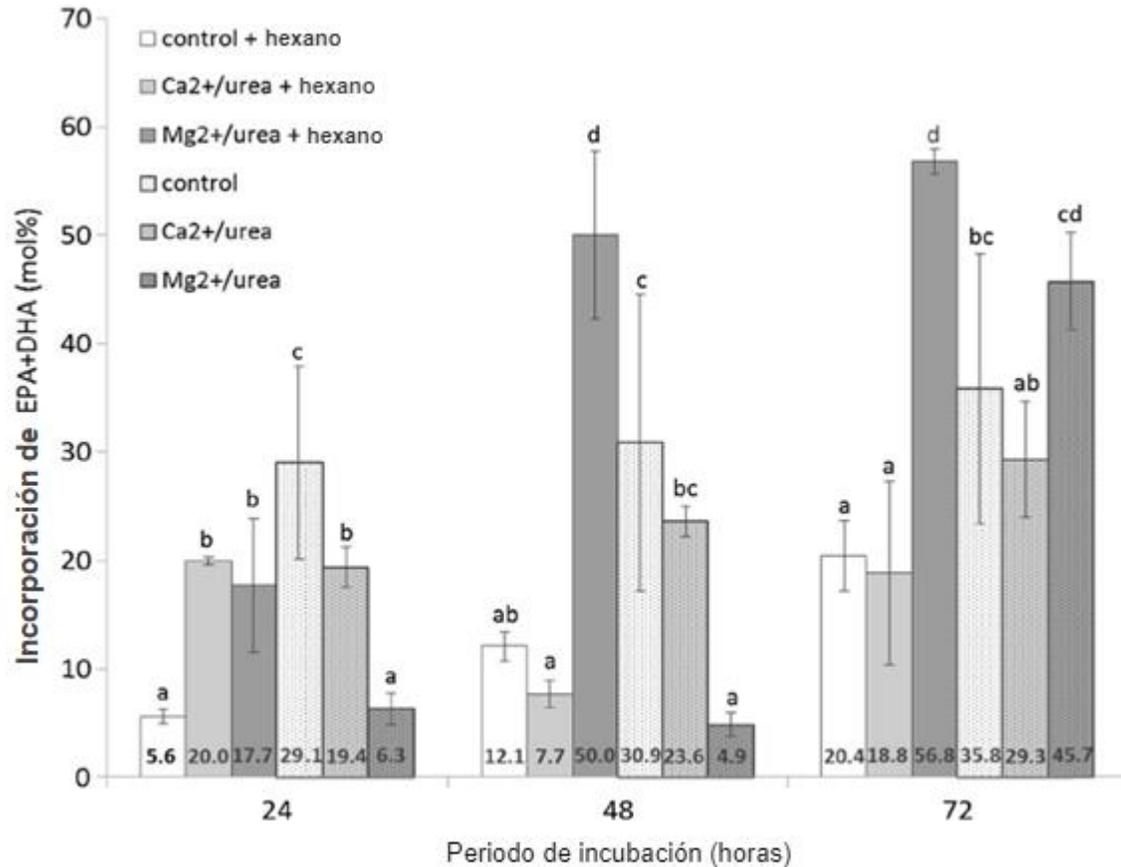
Anexo 10. Factores de retención en el concentrado y estándar comercial de FL.

Clases lipídicas	Concentrado de FL (Rf)*	Estándar comercial de FL (Rf)*
Lípidos neutros	0,697	-
Fosfatidilserina	0,634	-
Fosfatidiletanolamina	0,617	0,617
Ácido fosfatídico	0,485	-
Fosfatidilcolina	0,434	0,440
Fosfatidilinositol	0,342	0,343
Lisofosfatidilcolina	0,251	0,257
Otros Lisofosfolípidos	0,200	-

*Rf = Distancia recorrida por las bandas desde la base de la placa de sílice/distancia recorrida por el solvente desde la base de la placa de sílice (cm).



Anexo 11. CCF de FL del aceite de soya y estándar de FL individual. Muestras: 1 y 3, mezcla de estándar de FL conteniendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol; 4, 5 y 6, muestras de extractos de FL; 2 y 8, fosfatidiletanolamina; 7, fosfatidilcolina; y 9, fosfatidilinositol. TG = triglicéridos, DG = diglicéridos, PS = Fosfatidilserina, PE = Fosfatidiletanolamina, PA = ácido fosfatídico, PC = fosfatidilcolina, PI = Fosfatidilinositol, LPC = Lisofosfatidilcolina. Figura adaptada de J.M. Nzai, et al. (47).



Anexo 12. Efecto de la presencia o ausencia de solventes o aditivos (cationes divalentes, urea) en la incorporación de EPA y DHA en fosfolípidos de soja por transesterificación. Para las síntesis a 24 a 72 h de incubación, se utilizó lipasa comercial *Rhizomucor miehei* (RM-IM), 4% de agua y una relación másica entre los sustratos EE:FL de 3:1. Las barras de error representan la desviación estándar basada en experimentos por triplicado ($n = 3$). Los valores numéricos se escriben en las barras respectivas. Las letras diferentes entre las condiciones experimentales indican diferencias significativas (prueba de LSD con un valor $p < 0.05$ como significativo).

13. Referencias

1. Encuesta Nacional de Salud Primeros resultados. MINSAL, Gobierno de Chile [Base de datos en línea]. Chile: 2016-2017. [Fecha de acceso 1 de julio de 2018]. URL disponible en: http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf
2. FAO, OPS, OMS. Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional. América Latina y el Caribe. 2017. Santiago, Chile.
3. Reyes M. Características Inflamatorias de la Obesidad. Rev Chil Nutr. 2010; 37 (4): 498-504.
4. Reyes M, Quintanilla C, Burrows R, Blanco E, Cifuentes M, Gahagan S. Obesity is associated with acute inflammation in a sample of adolescents. Pediatr Diabetes. 2014; 16 (2): 109-16.
5. Zeyda M, Stulnig T. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance - A Mini-Review. Gerontology. 2009; 55 (4): 379-86.
6. Calder P. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. Nutrients. 2010; 2 (3): 355-74.
7. Castro-González M.I. Ácidos grasos omega 3: Beneficios y fuentes. Interciencia [Internet]. 2002; 27 (3): 128-36.
8. Naciones Unidas. Panorama de la situación de la pesca en el mundo. En: Conferencia de Revisión continuada del Acuerdo Relativo a la Conservación y Ordenación de Poblaciones de Peces Transzonales y las Poblaciones de Peces altamente migratorios. Estados Unidos: Département de l'Information de Nations Unies; 2010.
9. The World Bank. Fish to 2030 Prospects for Fisheries and Aquaculture. En: Agriculture and Environmental Services Discussion Paper 03. United States: 2013.
10. Raimann X, Rodríguez L, Chávez P, Torrejón C. Mercurio en pescados y su importancia en la salud. Rev Med Chil. 2014; 142 (9): 1174-80.
11. Díaz O, Encina F, Recabarren E, Del Valle S, Pastene R, Montes S, et al. Estudio de la concentración de arsénico, mercurio, plomo y fenantreno en la macha

(*Mesodesma donacium*). Implicancias alimentarias y toxicológicas. *Rev Chil Nutr.* 2008; 35 (1): 53-60.

12. Jara Ramírez C. Elementos base para la gestión ambiental del mercurio en Chile. [Tesis de pregrado]. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2007.

13. Encuesta Nacional de Salud Segundos resultados. MINSAL, Gobiernos de Chile [Base de datos en línea]. Chile: 2016-2017. [Fecha de acceso 14 de julio de 2018]. URL disponible en: http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/01/2-Resultados-ENS_MINSAL_31_01_2018.pdf

14. Leighton F, Echeverría G, Urquiaga I. The Chilean Diet and the Omega-6/Omega-3 Balance. *World Rev Nutr Diet.* 2011; 102: 57-72.

15. Guil-Guerrero J. Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2007; 109: 1226–36.

16. Valenzuela A, Valenzuela R. Ácidos grasos omega-3 en la nutrición ¿cómo aportarlos? *Rev Chil Nutr.* 2014; 41 (2): 205-11.

17. Morales J, Valenzuela R, González D, González M, Tapia G, Sanhueza J, et al. Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Rev Chil Nutr.* 2012; 39 (3): 79-87.

18. Guil-Guerrero J, Rincón M, Venegas E. Gamma-linolenic and stearidonic acids: Purification and upgrading of C18-PUFA oils. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2010; 112: 1068–81.

19. Simopoulos A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients.* 2016; 8(3): 128.

20. MIR M. Echium oil: A valuable source of n-3 and n-6 fatty acids. *Sources D'Oméga-3.* 2008; 15(4): 252-6.

21. Russo G. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical pharmacology.* 2009; 77(6): 937-46.

22. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(3): 438-63.

23. Rincón M, Valenzuela R, Valenzuela A. El ácido estearidónico: un ácido graso omega-3 de origen vegetal con gran potencialidad en salud y nutrición. *Rev Chil Nutr.* 2015; 42 (3): 297-300.
24. Surette M. Dietary omega-3 PUFA and health: Stearidonic acid-containing seed oils as effective and sustainable alternatives to traditional marine oils. *Mol Nutr Food Res.* 2013; 57: 748–59.
25. COMMISSION DECISION authorising the placing on the market of refined echium oil as novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. (2008/558/EC).
26. Berti M, Johnson B, Dash S, Fischer S, Wilckens R, Hevia F. Echium: A Source of Stearidonic Acid Adapted to the Northern Great Plains in the US. *American Society for Horticultural Science.* 2007; 120-5.
27. *Echium plantagineum* Plantas vasculares [Base de datos en línea]. Uruguay: Base de datos de Invasiones Biológicas para Uruguay; 2011. [Fecha de acceso 1 de agosto de 2018]. URL disponible en: http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas_de_especies/DATAonline/DBASEonline/Echium_plantagineum_w.pdf
28. Cópola B, César D. Aspectos a tener en cuenta en la intoxicación por “Flor morada” o “Lengua de vaca”. *BIENESTAR Y SALUD ANIMAL.* 2014; 60-2.
29. *Echim plantagineum*. [Base de datos en línea]. Australis: 2016. [Fecha de acceso 16 de Octubre de 2019]. URL disponible en: https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/echium_plantagineum.htm.
30. *Echium plantagineum* (Paterson's curse). [Base de datos en línea]. European Union: 2018. [Fecha de acceso 16 de Octubre de 2019]. URL disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/20400>.
31. Payne G, Lad M, Foster T, Khosla A, Gray D. Composition and properties of the surface of oil bodies recovered from *Echium plantagineum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces.* 2014; 116: 88-92.

32. Y-Y FAN, R Chapkin. Mouse Peritoneal Macrophage Prostaglandin E₁ Synthesis is Altered by Dietary Gamma-Linolenic Acid. *J Nutr.* 1992; 122 (8): 1600-6.
33. M Surette, I Koumenis, M Edens, K Trampusch, F Chilton. Inhibition of Leukotriene Synthesis, Pharmacokinetics, and Tolerability of a Novel Dietary Fatty Acid Formulation in Healthy Adult Subjects. *Clin Ther.* 2003; 25 (3): 948-71.
34. E Miles, T Banerjee, P Calder. The influence of different combinations of g-linolenic, stearidonic and eicosapentaenoic acids on the fatty acid composition of blood lipids and mononuclear cells in human volunteers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004; 70 (6): 529-38.
35. Gamma-Linolenic Acid (GLA). *Alternative Medicine Review.* 2004; 9(1): 70-8.
36. Sergeant S, Rahbar E, Chilton F. Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. *Eur J Pharmacol.* 2016; 785: 77-86.
37. D Kullenberg, L Taylor, M Schneider, U Massing. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* 2012; 11 (3): 2-16.
38. Hama S, Ogino C, Kondo A. Enzymatic synthesis and modification of structured phospholipids: recent advances in enzyme preparation and biocatalytic processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(19): 7879-91.
39. J Schuchardt, A Hahn. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013; 89 (1): 1-8.
40. Kim B, Akoh C. Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. *J Food Sci.* 2015; 80(8): 1713-24.
41. Valenzuela R, Valenzuela A. Overview About Lipid Structure, Lipid Metabolism. 2013.
42. Bueschelberger H. Lecithins. En: Whitehurst R, ed. *Emulsifiers in Food Technology.* V Norn; 2004: 1-39.
43. Liu D, Ma F. Soybean Phospholipids. En: Krezhova D, ed. *Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products.* China: 2011: 483-500.
44. American Lecithins Company. *Lecithins and Phospholipids. A Simple Guide to Use and Selection.* Oxford: 1-19.

45. Li X, Chen J, Yang B, Li D, Wang Y, Wang W. Production of Structured Phosphatidylcholine with High Content of DHA/EPA by Immobilized Phospholipase A1-Catalyzed Transesterification. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 15244-58.
46. Yang G, Yang L. Increase of Oleic Acid Content in Phosphatidylcholine through Lipase-catalyzed Interesterification: Optimization by Response Surface Methodology. *J Oleo Sci.* 2015; 64(6): 673-82.
47. Nazay J.M, Proctor A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry. *Food Chemistry.* 1998; 63 (4): 571-6.
48. Vázquez L, Akoh C. Concentration of Stearidonic Acid in Free Fatty Acid and Fatty Acid Ethyl Ester Forms from Modified Soybean Oil by Winterization. *J Am Oil Chem Soc.* 2011; 88: 1775–85.
49. Rincón M, Galleguillos R, González V, Valenzuela R, Valenzuela A. Concentration of gamma-linolenic and stearidonic acids as free fatty acids and ethyl esters from viper's bugloss seed oil by urea complexation. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2018; 1-10.
50. Racicot L.D, Handel A.P. Degumming of Soybean Oil: Quantitative Analysis of Phospholipids in Crude and Degummed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 1983; 60 (6): 1098-101.
51. Sugai A, Sakuma R, Fukuda I, Itoh Y, Itoh T. Improved Method for Determining Soybean Phospholipid Composition by Two-dimensional TLC-phosphorus Assay. *J Jpn Oil Chem Soc.* 1992; 41 (10): 1029-34.
52. Patil V, Galge R, Thorat B. Extraction and purification of phosphatidylcholine from soyabean lecithin. *Separation and Purification Technology.* 2010; 75: 138–44.
53. Vandana V, Karuna M, Vijayalakshmi P, Prasad R. A Simple Method to Enrich Phospholipid Content in Commercial Soybean Lecithin. *JAOCS.* 2001; 78 (5): 555-6.
54. Maroto B, Camusso C. Purificación de lecitina de soja. 1-Selección de equipamiento y determinación de las condiciones operativas. 2-Obtención de diagrama de equilibrio. *Grasas y Aceites.* 1992; 43 (1): 6-10.

55. Senanayake N. CONCENTRATION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA) FROM ALGAL OIL VIA UREA COMPLEXATION. *Journal of Food Lipids*. 2000; 7: 51-61.
56. Ratnayake W.M.N, Matthews D, Ackman R.G. Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oils via Urea Complexation. *Fat Sci Technol*. 1988; 90 (10): 381-6.
57. Vázquez L, Reglero G, Torres C.F. Identification and quantification of ethyl carbamate occurring in urea complexation processes commonly utilized for polyunsaturated fatty acid concentration. *Food Chemistry*. 2017; 229: 28-34.
1. Encuesta Nacional de Salud Primeros resultados. MINSAL, Gobierno de Chile [Base de datos en línea]. Chile: 2016-2017. [Fecha de acceso 1 de julio de 2018]. URL disponible en: http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf
 2. FAO, OPS, OMS. Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional. América Latina y el Caribe. 2017. Santiago, Chile.
 3. Reyes M. Características Inflamatorias de la Obesidad. *Rev Chil Nutr*. 2010; 37 (4): 498-504.
 4. Reyes M, Quintanilla C, Burrows R, Blanco E, Cifuentes M, Gahagan S. Obesity is associated with acute inflammation in a sample of adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2014; 16 (2): 109-16.
 5. Zeyda M, Stulnig T. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance - A Mini-Review. *Gerontology*. 2009; 55 (4): 379-86.
 6. Calder P. Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes. *Nutrients*. 2010; 2 (3): 355-74.
 7. Castro-González M.I. Ácidos grasos omega 3: Beneficios y fuentes. *Interciencia [Internet]*. 2002; 27 (3): 128-36.
 8. Naciones Unidas. Panorama de la situación de la pesca en el mundo. En: Conferencia de Revisión continuada del Acuerdo Relativo a la Conservación y Ordenación de Poblaciones de Peces Transzonales y las Poblaciones de Peces altamente migratorios. Estados Unidos: Département de l'Information de Nations Unies; 2010.

9. The World Bank. Fish to 2030 Prospects for Fisheries and Aquaculture. En: Agriculture and Environmental Services Discussion Paper 03. United States: 2013.
10. Raimann X, Rodríguez L, Chávez P, Torrejón C. Mercurio en pescados y su importancia en la salud. Rev Med Chil. 2014; 142 (9): 1174-80.
11. Díaz O, Encina F, Recabarren E, Del Valle S, Pastene R, Montes S, et al. Estudio de la concentración de arsénico, mercurio, plomo y fenantreno en la macha (*Mesodesma donacium*). Implicancias alimentarias y toxicológicas. Rev Chil Nutr. 2008; 35 (1): 53-60.
12. Jara Ramírez C. Elementos base para la gestión ambiental del mercurio en Chile. [Tesis de pregrado]. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2007.
13. Encuesta Nacional de Salud Segundos resultados. MINSAL, Gobiernos de Chile [Base de datos en línea]. Chile: 2016-2017. [Fecha de acceso 14 de julio de 2018]. URL disponible en: http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/01/2-Resultados-ENS_MINSAL_31_01_2018.pdf
14. Leighton F, Echeverria G, Urquiaga I. The Chilean Diet and the Omega-6/Omega-3 Balance. World Rev Nutr Diet. 2011; 102: 57-72.
15. Guil-Guerrero J. Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. Eur J Lipid Sci Technol. 2007; 109: 1226–36.
16. Valenzuela A, Valenzuela R. Ácidos grasos omega-3 en la nutrición ¿cómo aportarlos? Rev Chil Nutr. 2014; 41 (2): 205-11.
17. Morales J, Valenzuela R, González D, González M, Tapia G, Sanhueza J, et al. Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. Rev Chil Nutr. 2012; 39 (3): 79-87.
18. Guil-Guerrero J, Rincón M, Venegas E. Gamma-linolenic and stearidonic acids: Purification and upgrading of C18-PUFA oils. Eur J Lipid Sci Technol. 2010; 112: 1068–81.
19. Simopoulos A. An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. Nutrients. 2016; 8(3): 128.
20. MIR M. Echium oil: A valuable source of n-3 and n-6 fatty acids. Sources D'Oméga-3. 2008; 15(4): 252-6.

21. Russo G. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical pharmacology*. 2009; 77(6): 937-46.
22. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*. 1991; 54(3): 438-63.
23. Rincón M, Valenzuela R, Valenzuela A. El ácido estearidónico: un ácido graso omega-3 de origen vegetal con gran potencialidad en salud y nutrición. *Rev Chil Nutr*. 2015; 42 (3): 297-300.
24. Surette M. Dietary omega-3 PUFA and health: Stearidonic acid-containing seed oils as effective and sustainable alternatives to traditional marine oils. *Mol Nutr Food Res*. 2013; 57: 748–59.
25. COMMISSION DECISION authorising the placing on the market of refined echium oil as novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. (2008/558/EC).
26. Berti M, Johnson B, Dash S, Fischer S, Wilckens R, Hevia F. Echium: A Source of Stearidonic Acid Adapted to the Northern Great Plains in the US. *American Society for Horticultural Science*. 2007; 120-5.
27. *Echium plantagineum* Plantas vasculares [Base de datos en línea]. Uruguay: Base de datos de Invasiones Biológicas para Uruguay; 2011. [Fecha de acceso 1 de agosto de 2018]. URL disponible en: http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas_de_especies/DATAonline/DBASEonline/Echium_plantagineum_w.pdf
28. Cópola B, César D. Aspectos a tener en cuenta en la intoxicación por “Flor morada” o “Lengua de vaca”. *BIENESTAR Y SALUD ANIMAL*. 2014; 60-2.
29. *Echim plantagineum*. [Base de datos en línea]. Australis: 2016. [Fecha de acceso 16 de Octubre de 2019]. URL disponible en: https://keyserver.lucidcentral.org/weeds/data/media/Html/echium_plantagineum.htm.
30. *Echium plantagineum* (Paterson's curse). [Base de datos en línea]. European Union: 2018. [Fecha de acceso 16 de Octubre de 2019]. URL disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/20400>.

31. Payne G, Lad M, Foster T, Khosla A, Gray D. Composition and properties of the surface of oil bodies recovered from *Echium plantagineum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2014; 116: 88-92.
32. Y-Y FAN, R Chapkin. Mouse Peritoneal Macrophage Prostaglandin E₁ Synthesis is Altered by Dietary Gamma-Linolenic Acid. *J Nutr*. 1992; 122 (8): 1600-6.
33. M Surette, I Koumenis, M Edens, K Tramposch, F Chilton. Inhibition of Leukotriene Synthesis, Pharmacokinetics, and Tolerability of a Novel Dietary Fatty Acid Formulation in Healthy Adult Subjects. *Clin Ther*. 2003; 25 (3): 948-71.
34. E Miles, T Banerjee, P Calder. The influence of different combinations of g-linolenic, stearidonic and eicosapentaenoic acids on the fatty acid composition of blood lipids and mononuclear cells in human volunteers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004; 70 (6): 529-38.
35. Gamma-Linolenic Acid (GLA). *Alternative Medicine Review*. 2004; 9(1): 70-8.
36. Sergeant S, Rahbar E, Chilton F. Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, Eicosanoids and Inflammatory Processes. *Eur J Pharmacol*. 2016; 785: 77-86.
37. D Kullenberg, L Taylor, M Schneider, U Massing. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis*. 2012; 11 (3): 2-16.
38. Hama S, Ogino C, Kondo A. Enzymatic synthesis and modification of structured phospholipids: recent advances in enzyme preparation and biocatalytic processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(19): 7879-91.
39. J Schuchardt, A Hahn. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013; 89 (1): 1-8.
40. Kim B, Akoh C. Recent Research Trends on the Enzymatic Synthesis of Structured Lipids. *J Food Sci*. 2015; 80(8): 1713-24.
41. Valenzuela R, Valenzuela A. Overview About Lipid Structure, Lipid Metabolism. 2013.
42. Bueschelberger H. Lecithins. En: Whitehurst R, ed. *Emulsifiers in Food Technology*. V Norn; 2004: 1-39.

43. Liu D, Ma F. Soybean Phospholipids. En: Krezhova D, ed. Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products. China: 2011: 483-500.
44. American Lecithins Company. Lecithins and Phospholipids. A Simple Guide to Use and Selection. Oxford: 1-19.
45. Li X, Chen J, Yang B, Li D, Wang Y, Wang W. Production of Structured Phosphatidylcholine with High Content of DHA/EPA by Immobilized Phospholipase A1-Catalyzed Transesterification. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 15244-58.
46. Yang G, Yang L. Increase of Oleic Acid Content in Phosphatidylcholine through Lipase-catalyzed Interesterification: Optimization by Response Surface Methodology. *J Oleo Sci.* 2015; 64(6): 673-82.
47. Nazay J.M, Proctor A. Phospholipids determination in vegetable oil by thin-layer chromatography and imaging densitometry. *Food Chemistry.* 1998; 63 (4): 571-6.
48. Vázquez L, Akoh C. Concentration of Stearidonic Acid in Free Fatty Acid and Fatty Acid Ethyl Ester Forms from Modified Soybean Oil by Winterization. *J Am Oil Chem Soc.* 2011; 88: 1775–85.
49. Rincón M, Galleguillos R, González V, Valenzuela R, Valenzuela A. Concentration of gamma-linolenic and stearidonic acids as free fatty acids and ethyl esters from viper's bugloss seed oil by urea complexation. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2018; 1-10.
50. Racicot L.D, Handel A.P. Degumming of Soybean Oil: Quantitative Analysis of Phospholipids in Crude and Degummed Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 1983; 60 (6): 1098-101.
51. Sugai A, Sakuma R, Fukuda I, Itoh Y, Itoh T. Improved Method for Determining Soybean Phospholipid Composition by Two-dimensional TLC-phosphorus Assay. *J Jpn Oil Chem Soc.* 1992; 41 (10): 1029-34.
52. Patil V, Galge R, Thorat B. Extraction and purification of phosphatidylcholine from soyabean lecithin. *Separation and Purification Technology.* 2010; 75: 138–44.
53. Vandana V, Karuna M, Vijayalakshmi P, Prasad R. A Simple Method to Enrich Phospholipid Content in Commercial Soybean Lecithin. *JAOCS.* 2001; 78 (5): 555-6.

54. Maroto B, Camusso C. Purificación de lecitina de soja. 1-Selección de equipamiento y determinación de las condiciones operativas. 2-Obtención de diagrama de equilibrio. *Grasas y Aceites*. 1992; 43 (1): 6-10.
55. Senanayake N, Shahidi F. CONCENTRATION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA) FROM ALGAL OIL VIA UREA COMPLEXATION. *Journal of Food Lipids*. 2000; 7: 51-61.
56. Ratnayake W.M.N, Matthews D, Ackman R.G. Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oils via Urea Complexation. *Fat Sci Technol*. 1988; 90 (10): 381-6.
57. Vázquez L, Reglero G, Torres C.F. Identification and quantification of ethyl carbamate occurring in urea complexation processes commonly utilized for polyunsaturated fatty acid concentration. *Food Chemistry*. 2017; 229: 28-34.
58. Hossen M, Hernandez E. Enzyme-catalyzed synthesis of structured phospholipids with conjugated linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2005; 107: 730–6.
59. Marsaoui N, Baah J, Raies A, Laplante S. Incorporation of Ethyl Esters of EPA and DHA in Soybean Lecithin Using *Rhizomucor miehei* Lipase: Effect of Additives and Solvent-Free Conditions. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015; 176: 938–46.
60. Marsaoui N, Raies A, Naghmouchi K. Incorporation of omega-3 polyunsaturated fatty acids into soybean lecithin: effect of amines and divalent cations on transesterification by lipases. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013; 2233-8.
61. Athreya S, Venkatesh Y.D. Application of Taguchi Method For Optimization Of Process Parameters In Improving The Surface Roughness Of Lathe Facing Operation. *Engineering and Science*. 2012; 1 (3): 13-9.