



**“PRODUCCIÓN DE 1,3-DIACILGLICÉRIDOS CON ÁCIDOS ALFA-LINOLÉNICO, GAMMA-LINOLÉNICO Y ESTEARIDÓNICO OBTENIDOS A PARTIR DE UN CONCENTRADO DERIVADO DE ACEITE DE SEMILLA DE *ECHIUM PLANTAGINEUM*, MEDIANTE SÍNTESIS ENZIMÁTICA ”.**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS MENCIÓN ALIMENTOS SALUDABLES.**

**Tesista: Carla Alejandra Cifuentes Collari.**

**Director de Tesis: Miguel Ángel Rincón Cervera.**



## AUTORIZACIÓN

El siguiente documento presentado como Tesis por la Estudiante Carla Alejandra Cifuentes Collari, 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.

Miguel  
Angel  
Rincon



Digitally signed by Miguel  
Angel Rincon  
DN: cn=Miguel Angel Rincon,  
o=Inta - U de Chile,  
ou=Alimentos,  
email=marincer@inta.uchile.c  
l, c=CL  
Date: 2023.01.16 18:06:17  
+01'00'

Fdo. Miguel Ángel Rincón Cervera  
INTA, Universidad de Chile

**ii. Comisión de Tesis.**

**Doctora Paz Roberts;** Profesora Titular y Directora Académica del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química de la Universidad de Chile.

**Doctor Rodrigo Pulgar;** Profesor Asistente en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos Dr. Fernando Monckeberg (INTA), Universidad de Chile.

**Doctor Luis Valladares;** Profesor Titular en el INTA Dr. Fernando Monckeberg, Universidad de Chile.

### **iii. Dedicatoria.**

Con inmensa gratitud y amor, dedico este trabajo a mi familia, en especial a mis hijos Emilio y Luciano, a mi compañero de vida Nicolás y a mis padres, Carlos y Lina, quienes siempre han sido un apoyo incondicional.

#### **iv. Agradecimientos.**

En esta oportunidad quisiera agradecer a todos quienes me apoyaron en este proyecto, en especial,

A Nicolás, por su amor y respaldo incondicional

A Luciano, por hacerse cargo de sí mismo y por su infinito apoyo y cariño

A Ena, por su amor con mi Emilio

A mi familia, porque siempre me han impulsado a seguir

A la familia Piña-Ogaz, por recibirme siempre que lo necesité

Al Doctor Miguel Ángel Rincón por su excelente temple, buen humor, calidad como docente y por la invitación a la experiencia de hacer ciencia

A la Doctora Ana María Ronco, por la posibilidad

A Héctor Flores, por sus enseñanzas y por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio

Y a todos quienes hicieron posible este desafío...

**Gracias-.**

v. **Índice de contenidos.**

<b>Numeración.</b>	<b>Contenido.</b>	<b>Página.</b>
<b>1</b>	<b>Resumen.</b>	1
<b>2</b>	<b>Abstract.</b>	2
<b>3</b>	<b>Introducción.</b>	3
3.1	Enfermedades asociadas a la malnutrición por exceso.	3
3.2	Bajo consumo de Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega tres de cadena muy larga.	4
3.3	Lípidos estructurados.	4
3.4	Síntesis de 1,3-diacilglicéridos.	4
3.5	Regulación de los diacilglicéridos.	7
3.6	Metabolismo de los 1,3- diacilglicéridos.	7
3.7	Aceite de semilla de <i>Echium plantagineum</i> .	8
<b>4</b>	<b>Hipótesis de trabajo y objetivos.</b>	11
4.1	Hipótesis de trabajo.	11
4.2	Objetivo general.	11
4.3	Objetivos específicos.	11
<b>5</b>	<b>Metodología.</b>	12
5.1	Materiales.	12
5.2	Definición de la muestra.	12
5.3	Definición del diseño de la investigación.	12
5.4	Definición de procedimientos y técnicas.	13
5.5	Definición de variables y conceptos.	14
5.6	Elaboración de plan de análisis.	18

Continuación índice de contenidos.

<b>Numeración.</b>	<b>Contenido.</b>	<b>Página.</b>
5.7	Técnicas estadísticas de análisis.	18
<b>6</b>	<b>Resultados.</b>	<b>19</b>
6.1	Identificación del tipo de lipasa y los valores de las variables, “tiempo de reacción”, “carga enzimática” y “relación molar entre sustratos” que combinados, logren el mayor rendimiento en 1,3-diacilglicéridos conteniendo la mayor proporción de ALA, GLA y SDA mediante la aplicación del Método de Taguchi.	19
6.2	Comparación de los resultados de la síntesis enzimática entre dos modelos a distinta escala.	24
6.3	Concentración de la fracción de diacilglicéridos a través de un proceso de saponificación suave para retirar los ácidos grasos libres del medio de reacción.	25
<b>7</b>	<b>Discusión.</b>	<b>27</b>
7.1	Obtención del concentrado de ácidos grasos libres.	27
7.2	Desarrollo del proceso de esterificación enzimática.	
7.3	Modelos de producción de diacilglicéridos a través de catálisis enzimática	32
7.4	Potenciales beneficios en la salud del consumo de 1,3-diacilglicéridos y de los ácidos grasos $\gamma$ -linolénico y estearidónico.	36
<b>8</b>	<b>Conclusiones.</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>Publicación.</b>	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>Financiamiento.</b>	<b>42</b>
<b>11</b>	<b>Referencias.</b>	<b>43</b>



vi. Índice de tablas.

Nº	Contenido.	Página.
1	Vías de producción de diacilglicéridos.	6
2	Perfil de ácidos grasos de aceite comercial de semilla de <i>Echium plantagineum</i> .	9
3	Condiciones experimentales de la etapa preliminar “Selección de la enzima”.	13
4	Matriz de diseño experimental L9(3)3, de acuerdo con el Método de Taguchi.	16
5	Perfil de ácidos grasos del aceite de semilla de <i>Echium plantagineum</i> y del concentrado de ácidos grasos libres obtenido mediante la formación de complejos de urea.	19
6 a	Distribución molar y perfil de ácidos grasos de los productos de reacción obtenidos de la síntesis catalizada por la lipasa “Lipozyme® RM-IM”.	21
6 b	Distribución molar y perfil de ácidos grasos de las fracciones lipídicas obtenidas de la síntesis catalizada por la lipasa “Lipozyme® 435”.	21
7	Productos de reacción obtenidos según las condiciones experimentales sugeridas por el Método de Taguchi.	22
8	Porcentaje molar de las fracciones lipídicas obtenidas en la síntesis enzimática para las Observaciones 4, 8 y 10.	23
9	Perfil de ácidos grasos y porcentaje molar de los productos de reacción obtenidos por catálisis enzimática en las condiciones experimentales C1 (mínima escala) y C2 (escalamiento x10).	25
10	Perfil de ácidos grasos y porcentaje molar de los productos de reacción obtenidos en la reacción de síntesis enzimática en condiciones C2 antes y después de la etapa de saponificación.	26

**vii. Índice de figuras.**

<b>Numeración.</b>	<b>Contenido.</b>	<b>Página.</b>
1	Formas estereoquímicas de triacilglicéridos y diacilglicéridos.	5
2	Esquema del diseño experimental de investigación.	12
3	Razón Señal/Ruido obtenida en base a las medias, de acuerdo con el Método de Taguchi.	23

**viii. Índice de anexos.**

<b>Número.</b>	<b>Título.</b>	<b>Página.</b>
1	Figura suplementaria 1	Metabolismo de acilglicéridos. 50
2	Tabla suplementaria 1	Especies de la familia <i>Boraginaceae</i> con contenido de GLA, ALA y SDA. 51
3	Tabla suplementaria 2	Especies de otras familias (no <i>Boraginaceae</i> ) con contenido de GLA, ALA y SDA. 53
4	Figura suplementaria 3	Rutas metabólicas de los ácidos grasos esenciales. 54
5	Figura suplementaria 4	Procedimiento de obtención de aductos de urea. 55
6	Figura suplementaria 5	Procedimiento de Cromatografía de Capa Fina. 56
7	Figura suplementaria 6	Derivatización a ésteres metílicos. 57
8	Figura suplementaria 7	Purificación de los productos de reacción por medio de saponificación. 58
9	Figura suplementaria 8	Perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía gaseosa de aceite de <i>Echium plantagineum</i> . 59
10	Figura suplementaria 9	Perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía gaseosa para el concentrado de ácidos grasos libres de aceite de <i>Echium plantagineum</i> . 60
11	Figura suplementaria 10	Valores p para la prueba de Bonferroni para los resultados experimentales del Método de Taguchi. 61
12	Tabla suplementaria 3	Sumas de cuadrados obtenidas del análisis del Método de Taguchi. 62
13	Figura suplementaria 11	Prueba de ANOVA para las observaciones 4, 8 y 10, durante el proceso de optimización de síntesis de 1,3- diacilglicéridos. 63

Continuación Índice de Anexos.

<b>Número.</b>	<b>Título.</b>	<b>Página.</b>	
14	Figura suplementaria 12	Valores p para las pruebas de Shapiro Wilk y t-Student para las condiciones operacionales C1 y C2.	64
15	Figura suplementaria 13	Perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía gaseosa. 1,3-diacilglicéridos.	65
16	Figura suplementaria 14	Formación de aductos de urea.	66
17	Figura suplementaria 15	Estructuras moleculares de ácidos grasos de interés nutricional.	67
18	Tabla suplementaria 4	Porcentaje molar promedio de algunas fracciones lipídicas sobre el total de los productos de reacción obtenidos en la síntesis enzimática de Lípidos Estructurados.	68

## ix. Listado de abreviaturas.

<b>Abreviatura.</b>	<b>Significado.</b>
<b>1,3-DAG</b>	1,3-diacilglicéridos.
<b>15 – HETrE</b>	Ácido 15 - (S) – hidroxil- 8,11,13-eicosatrienoico.
<b>AA</b>	Ácido araquidónico.
<b>AG</b>	Ácidos grasos.
<b>AGE</b>	Ácidos grasos esenciales.
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres.
<b>AGMI</b>	Ácidos grasos monoinsaturados.
<b>AGPI</b>	Ácidos grasos poliinsaturados.
<b>AGS</b>	Ácidos grasos saturados.
<b>ALA</b>	Ácido alfa-linolénico.
<b>AR</b>	Artritis reumatoide.
<b>CE</b>	Carga enzimática.
<b>DAG</b>	Diacilglicéridos.
<b>DGAT</b>	Diacilglicerol acil transferasa.
<b>DHA</b>	Ácido docosahexaenoico.
<b>DM II</b>	Diabetes Mellitus tipo II.
<b>EC</b>	Etil-carbamato.
<b>ECNT</b>	Enfermedades crónicas no transmisibles.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético.
<b>EG</b>	Ésteres de glicidol.
<b>EMAG</b>	Ésteres metílicos de ácidos grasos.

Continuación listado de abreviaturas.

<b>Abreviatura.</b>	<b>Significado.</b>
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentaenoico.
<b>FC</b>	Factores de concentración.
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration.
<b>FOSHU</b>	Food with Specific Health Uses.
<b>GC-FID</b>	Cromatografía gaseosa con detector por ionización de llama.
<b>GLA</b>	Ácido gamma-linolénico.
<b>GRAS</b>	Generally Recognized As Safe.
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial.
<b>HTG</b>	Hipertrigliceridemia.
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer.
<b>INTA</b>	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.
<b>LA</b>	Ácido linolénico.
<b>LE</b>	Lípidos estructurados.
<b>MLAA</b>	Mediadores lipídicos con actividad antiinflamatoria.
<b>MAG</b>	Monoacilglicéridos .
<b>OA</b>	Ácido Oleico.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>O/W</b>	Emulsiones aceite en agua.
<b>RM</b>	Relación molar.
<b>S/R</b>	Señal/ruido.
<b>PGE1</b>	Prostaglandina E1.

Continuación listado de abreviaturas.

<b>Abreviatura.</b>	<b>Significado.</b>
<b>SDA</b>	Ácido estearidónico.
<b>TAG</b>	Triacilglicéridos.
<b>TLC</b>	Thin Layer Chromatography (Cromatografía de Capa Fina).
<b>W/O</b>	Emulsiones agua en aceite.

## 1. Resumen.

Los lípidos estructurados son moléculas lipídicas que han sido modificadas con fines tecnológicos o nutricionales. Los 1,3-diacilglicéridos presentan un grupo hidroxilo libre en la posición *sn*-2, que los distingue de los triacilglicéridos. Existen estudios que sugieren que el reemplazo de triacilglicéridos por 1,3-diacilglicéridos en la dieta favorece la pérdida de peso, la disminución de lípidos séricos y del síndrome metabólico. Por otra parte, se ha observado que los ácidos grasos n-3  $\alpha$ -linolénico y estearidónico, presentes en aceites de semillas y hongos, ambos precursores del ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico y el ácido  $\gamma$ -linolénico, sintetizado a partir del ácido linoleico (serie n-6) presente en la leche humana y en aceites de borraja, cáñamo y viborera (*Echium plantagineum*) son precursores de mediadores lipídicos con actividad antiinflamatoria. El aceite de semilla de *E. plantagineum* es una de las pocas fuentes comerciales con cantidades significativas de ácido  $\alpha$ -linolénico,  $\gamma$ -linolénico y estearidónico.

La metodología más utilizada para producir lípidos estructurados es la síntesis química, sin embargo, ésta requiere de un catalizador inorgánico y elevadas temperaturas que pueden dañar las moléculas lipídicas alterando, además, sus propiedades sensoriales. Es por esto que la industria y la comunidad científica trabajan en metodologías más limpias y eficientes como la biocatálisis enzimática. El objetivo de esta investigación fue producir, a escala de laboratorio, 1,3-diacilglicéridos con contenido mayoritario de ácidos  $\alpha$ -linolénico,  $\gamma$ -linolénico y estearidónico, mediante una lipasa regioespecífica, empleando como sustratos glicerol y un concentrado de ácidos grasos libres procedentes de aceite de semilla de viborera. Tras una etapa preliminar de selección de la lipasa, se combinaron las variables “relación molar entre sustratos”, “cantidad de lipasa” y “tiempo de reacción”, empleando el método de Taguchi, con el objetivo de alcanzar el mayor rendimiento posible en los productos de interés, para finalmente escalar el proceso y purificar el producto.

Finalmente, se observó que la enzima Lipozyme® 435 fue más eficiente que Lipozyme® RM-IM en la incorporación de los ácidos grasos  $\gamma$ -linolénico y estearidónico en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 de la molécula, incorporándolos como ácidos grasos mayoritarios. También se demostró que la saponificación es efectiva para retirar los compuestos de mayor polaridad de los productos de reacción, obteniéndose un lípido estructurado con un 88 % de diacilglicéridos, con 1,3-diacilglicéridos como fracción lipídica principal.

## 2. Abstract.

Structured lipids are lipidic molecules that have been changed for technological or nutritional purposes. The 1,3-diacylglycerides are structured lipids with a free hydroxyl group at the *sn*-2 position, which distinguishes them from triacylglycerides. Previous studies suggest that the replacement of dietary triacylglycerides by 1,3-diacylglycerides promotes weight loss, lowering serum lipids and metabolic syndrome. On the other hand, it has been observed that fatty acids  $\alpha$ -linolenic and stearidonic acids, available in seed oils and mushrooms, both precursors of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, and  $\gamma$ -linolenic acid, synthesized from linoleic acid (n-6 series) which is found in human milk and seed oils from borage, hemp and purple viper's bugloss (*Echium plantagineum*), among others are precursors of lipid mediators with anti-inflammatory activity. *E. plantagineum* seed oil is one of the few commercial sources with significant amounts of  $\alpha$ -linolenic,  $\gamma$ -linolenic and stearidonic acids.

The most common method to produce structured lipids is chemical synthesis, however, this requires an inorganic catalyst and high temperatures that can damage lipid molecules, also altering their sensory properties. Therefore, the industry and the scientific community work on cleaner and more efficient methodologies such as enzymatic biocatalysis.

The aim of this research was to produce, on a laboratory scale, 1,3-diglycerides with  $\alpha$ -linolenic,  $\gamma$ -linolenic and stearidonic acid as main fatty acids, by a regiospecific lipase, using glycerol and a concentrate of free fatty acids from purple viper's bugloss oil as substrates. After a preliminary stage of lipase selection, the variables "molar ratio between substrates", "lipase amount" and "reaction time" were combined, using the Taguchi method, with the aim of achieving the highest possible yield in the products of interest, to finally scale the process and purify the product.

It was found that Lipozyme® 435 was more efficient than Lipozyme® RM-IM in incorporating  $\gamma$ -linolenic and stearidonic acids in *sn*-1 and *sn*-3 positions, in addition to showing better performance. It was also shown that saponification was an effective procedure to remove free fatty acids and monoacylglycerides from the reaction products, obtaining a structured lipid with a 88 % diglycerides, with 1,3-diglycerides as the main lipid fraction.

### **3. Introducción.**

Los lípidos son moléculas que presentan variadas funciones desde el punto de vista organoléptico, tecnológico y nutricional. Los principales lípidos dietarios son los triacilglicéridos (TAG), moléculas formadas por un esqueleto de glicerol unido a tres cadenas de ácidos grasos (AG), a través de enlaces tipo éster (1).

Así, como los lípidos aportan aroma, textura y palatabilidad a los alimentos, aportan más del doble de energía (9 kcal/g) que otros macronutrientes (2). Si bien el consumo elevado de lípidos se asocia a la obesidad (3), las dietas hipocalóricas presentan baja adherencia por ser consideradas menos placenteras (4). Ambas características hacen que, tanto por su aporte energético como por sus propiedades sensoriales, el desarrollo de nuevos lípidos alimentarios (5), en particular de Lípidos Estructurados (LE), sea un desafío tecnológico.

Así, la elevada prevalencia de enfermedades asociadas a la malnutrición por exceso y la exigencia cada vez más alta por parte de los consumidores, justifican el diseño de una molécula con una estructura específica que permita no solo disminuir su aporte calórico y mantener sus propiedades sensoriales, sino que, además, puedan ser útiles en el manejo y tratamiento de patologías metabólicas relacionadas con la obesidad (6).

#### **3.1 Enfermedades asociadas a la malnutrición por exceso.**

Estas enfermedades son las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental (7,8). De acuerdo con la información entregada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia de obesidad se ha triplicado desde 1975 a nivel mundial (7) y en Chile, según la última encuesta nacional de salud, los niveles de obesidad y sobrepeso llegan al 74% de la población mayor de 15 años (8) y al 54% de la población pediátrica (9). Esta condición de salud es provocada por un desequilibrio energético, ocasionado principalmente por una ingesta excesiva de calorías. Además, se ha relacionado con múltiples alteraciones metabólicas, siendo señalado tanto como un factor de riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como una enfermedad por sí misma (10).

Entre las patologías relacionadas con este desequilibrio energético se pueden mencionar enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II (DM II), hipertensión arterial (HTA), hipertrigliceridemia (HTG), hipercolesterolemia, artritis, algunos tipos de cáncer (11) y dolencias como la depresión y la ansiedad (12).

### **3.2 Bajo consumo de Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega tres de cadena muy larga.**

Los principales ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie n-3 de cadena muy larga (>20 átomos de carbono) son los AG eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (1). Entre sus funciones más relevantes se pueden mencionar su rol como precursor de mediadores lipídicos antiinflamatorios, como protector ante factores de riesgo metabólico y ante enfermedades degenerativas (2).

Existen distintas situaciones que explican el bajo consumo de estos AG, cuya fuente principal son los productos marinos (2). Por un lado, el vegetarianismo excluye de la dieta, en distintos grados, los alimentos de origen animal (13) y presenta como variaciones más comunes la dieta ovolactovegetariana (incluye en la alimentación huevos y lácteos) y la vegana (excluye todo tipo de alimentos de origen animal) (14).

Si bien las algas también son una excelente fuente de EPA y DHA (2), existen personas que, independiente de su consumo de productos de origen animal, como pescados y mariscos, evidencian desconfianza hacia los productos procedentes del mar debido a la baja sostenibilidad del sistema actual de producción de recursos marinos (15) y a su potencial contaminación por metales pesados (16), sustancias alquilperfluoradas, dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (17) y microplásticos (6).

### **3.3 Lípidos estructurados.**

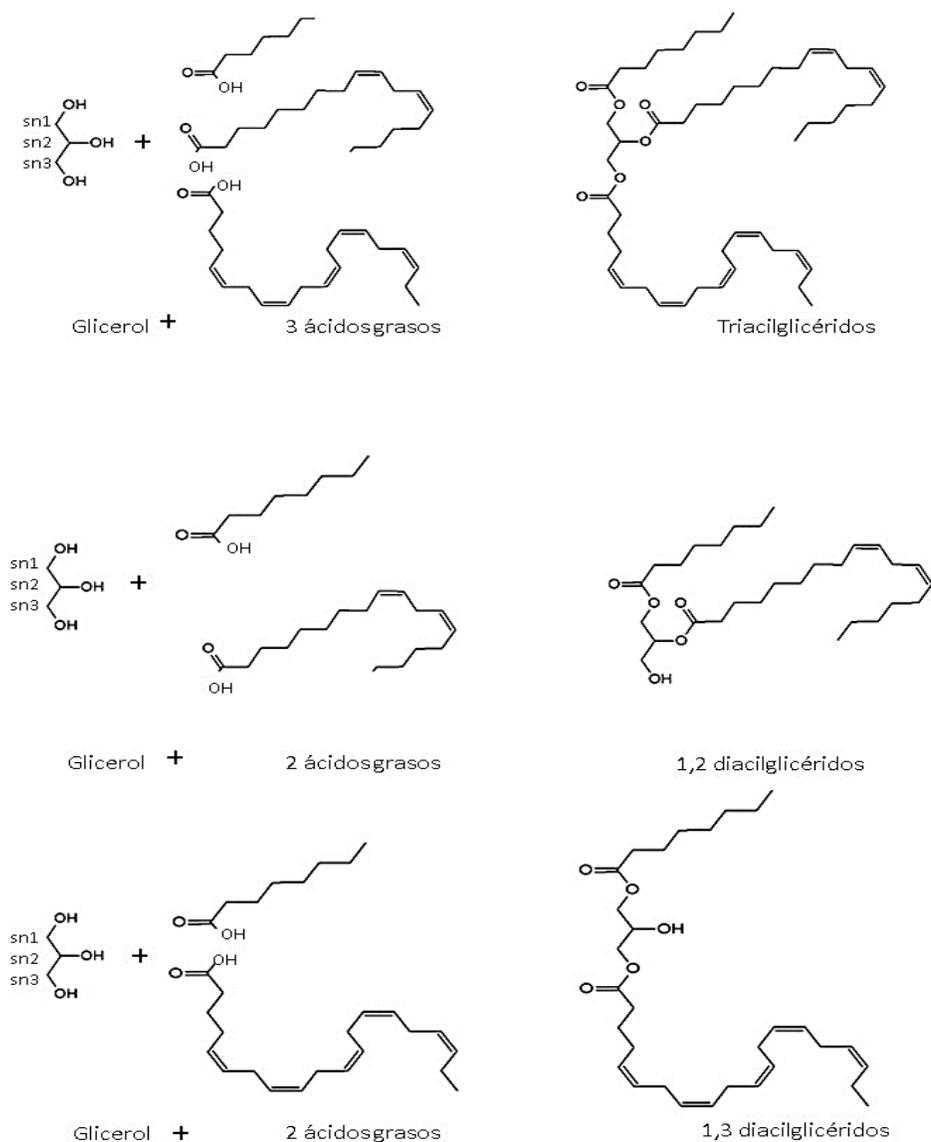
Los Lípidos Estructurados (LE) son acilglicéridos cuya estructura ha sido modificada a través de procesos químicos o enzimáticos que alteran su composición o distribución de AG, con el objetivo de modificar sus propiedades tecnológicas y/o nutricionales (18). Estos compuestos han sido estudiados y desarrollados por la industria alimentaria debido a sus potenciales efectos como sustitutos de las grasas convencionales (19). Los 1,3-diacilglicéridos (1,3-DAG) son lípidos que, si bien se encuentran de forma natural como compuestos minoritarios en algunos alimentos, pueden ser producidos como LE.

Los 1,3-DAG presentan cualidades sensoriales muy similares a las de los TAG, aunque a diferencia de éstos, presentan un grupo hidroxilo libre, característica que les confiere mayor polaridad, punto de fusión y capacidad estabilizante en emulsiones agua/aceite (W/O) y aceite/agua (O/W) (6). Se ha descrito su uso como materia base para la síntesis de compuestos como fosfolípidos, glicolípidos, lipoproteínas o precursores de medicamentos

(6), atributos apreciados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (20).

### 3.4 Síntesis de 1,3 - diacilglicéridos.

Los diacilglicéridos (DAG) son moléculas formadas a partir de glicerol esterificado con 2 moléculas de AG, que pueden resultar en dos formas estereoquímicas, el *sn*-1,3-DAG y *sn*-1,2 (2,3) DAG (Figura 1), siendo *sn*-1,3-DAG el más estable termodinámicamente, generándose en equilibrio, una mezcla compuesta por 30-40% de 1,2 (2,3) DAG y 60-70% de 1,3-DAG (21).



**Figura 1: Formas estereoquímicas de triacilglicéridos y diacilglicéridos.**

Los 1,3-DAG, tal como otros LE, son lípidos diseñados para ser incorporados a la dieta como ingrediente en alimentos funcionales, nutraceúticos o aditivos y pueden producirse a partir de reacciones químicas o enzimáticas (6). La reacción de síntesis química es más utilizada por ser económica y de fácil manejo, sin embargo, esta metodología requiere un elevado consumo de energía y presenta baja especificidad y selectividad (6, 13, 22). Además, las altas temperaturas, en conjunto con los catalizadores inorgánicos requeridos para la reacción podrían dañar las moléculas de AG, tanto en sus propiedades organolépticas como en su estructura (23).

Por otra parte, la industria y la comunidad científica han demostrado interés en buscar alternativas de producción más limpias y sostenibles como la biocatálisis enzimática. Esta técnica es amigable con el medio ambiente y las enzimas empleadas en este proceso son potencialmente reutilizables. Las lipasas son las enzimas preferidas para la síntesis de 1,3-DAG, debido a que éstas poseen la propiedad de ser quimio, estéreo y regioespecíficas, son versátiles y requieren condiciones moderadas de temperatura y pH para la reacción (23). En la siguiente tabla, se esquematizan distintas vías de producción de DAG a través de biocatálisis enzimática (6).

**Tabla 1: Vías de producción de diacilglicéridos.**

Método.	Descripción.	Esquema de reacción.
Reesterificación directa.	Esterificación entre AG y glicerol.	$R1-COOH+R-OH \rightarrow R1-COO-R +H2O$
Interesterificación.	Intercambio intra e intermolecular de los grupos acilo de moléculas de acilglicéridos.	$R1-COO-R2+R3-COO-R4 \rightarrow R1-COO-R4 +R3-COO-R2$
Acidólisis.	Intercambio de enlaces éster entre TAG y AGL.	$R1-COO-R+R2-COOH \rightarrow R2-COO-R + R1-COOH$
Glicerólisis.	Transesterificación entre TAG y glicerol para la producción de MAG y DAG.	$R-COO-R1+R2-OH \rightarrow R-COO-R2 + R1-OH$

El control de variables como el tiempo, temperatura, relación molar entre sustratos y carga enzimática es crítico en el rendimiento de la reacción de síntesis, ya que ciertas condiciones experimentales podrían favorecer el desarrollo de situaciones indeseables como aumento de dificultad en la transferencia de masas (28), acilmigración (24) generación de agua o

disminución de la actividad enzimática (25).

Existen variadas vías de purificación de los DAG del medio de reacción, siendo los métodos más utilizados la destilación corta, la cromatografía líquida en columna preparativa y la saponificación (13).

### **3.5 Regulación de los diacilglicéridos.**

Los DAG son clasificados como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe) por la Food and Drugs Administration (FDA) de Estados Unidos y están autorizados para ser utilizados en diez categorías de alimentos, entre las que se puede mencionar el aceite de uso doméstico, margarina para untar, aderezos para alimentos y platos principales congelados (26). En 1999 el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón, aprobó la clasificación de los DAG como FOSHU (Food for Specified Health Use). Éstos fueron producidos bajo la licencia Econa<sup>TM</sup> alcanzando un mercado aproximado del 14% de los aceites comercializados en ese país. Posteriormente, la licencia se extendió a Estados Unidos bajo el nombre de Enova<sup>TM</sup> y fue autorizada en algunos países de la Unión Europea, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y Brasil. No obstante, en 2009 la Compañía Kao Corporation Japan, productora de Enova<sup>TM</sup>, los retiró del mercado alemán debido a cuestionamientos sobre la seguridad del producto, ocasionados por el hallazgo de ésteres de glicidol (EG) en sus componentes (6). Esta sustancia es clasificada como potencialmente carcinogénica, categorizada como 2A por la International Agency for Research on Cancer (IARC) (17, 27) y es producida por temperaturas superiores a 200 °C durante el proceso de refinamiento de MAG y DAG del aceite de palma realizado durante la síntesis química (22). Sin embargo, Yasunaga *et al* (2004), Kasamatsu *et al* (2005) y Morita y Soni (2009) observaron que la ingesta de DAG no evidenció efectos mutagénicos, carcinogénicos ni genotóxicos en ninguna de las condiciones ensayadas (6).

### **3.6 Metabolismo de los 1,3-diacilglicéridos dietarios.**

Si bien el aporte calórico de los 1,3-DAG dietarios es similar al de los TAG (38.9 kJ/g y 39.6 kJ/g. respectivamente), ambos tipos de moléculas se diferencian en su proceso de reesterificación en el enterocito (28). La hidrólisis de 1,3-DAG y de TAG es realizada por la lipasa pancreática específica-*sn*-1,3 que, en el caso de los TAG, genera 2-MAG y AGL en el intestino delgado durante el proceso de digestión. En este lugar, estos 2-MAG son

absorbidos y reesterificados a TAG a través de la vía metabólica 2-MAG. Una vez que los TAG han sido reesterificados, son incorporados a los quilomicrones los que pueden ser hidrolizados hasta AGL o acumulados en la cara interna de los vasos capilares y en el tejido adiposo (29). Así, mientras la hidrólisis de DAG es igualmente realizada por la lipasa pancreática específica-*sn*-1,3, en lugar de obtener 2-MAG se obtiene como producto 1(3) MAG. En consecuencia, el proceso de reesterificación a TAG es realizado deficientemente, ya que la enzima monoacilglicerol-acil-transferasa (MGAT) sustratoespecífica encargada de la reesterificación a DAG, tiene baja afinidad con 1 (3) MAG (**Anexo 1**). Finalmente, estos últimos son liberados como AGL (6).

Entre los efectos benéficos para la salud que genera el consumo de 1,3-DAG, se destaca su acción en sistemas metabólicos alterados generalmente en la obesidad. Se han descrito propiedades estimulantes de la  $\beta$  oxidación, pudiendo ser utilizados como fuente rápida de energía (13). Además, se asocian a la disminución del peso (23) y del síndrome metabólico (6). Se han realizado estudios que evalúan los efectos de los 1,3-DAG aportados por la dieta en la reducción de la glicemia en ayunas en personas con DM II, encontrándose eficacia en pacientes sin sobrepeso (23). Por último, se han descrito beneficios en el aumento de la densidad ósea con una dieta hiperlipídica alta en DAG (31). Sin embargo, los potenciales efectos beneficiosos de la incorporación de los 1,3-DAG a la dieta estarían presentes cuando el consumo de estos LE corresponde a un porcentaje mayor a 40% m/m de la mezcla de acilglicéridos (32).

### **3.7 Aceite de semilla de *Echium plantagineum*.**

*E. plantagineum*, es una planta de origen terrestre perteneciente a la familia de las boragináceas conocida también como viborera (33). La semilla de esta planta se caracteriza por tener una composición lipídica inusual y de especial interés en el ámbito nutricional, ya que entre sus AG principales destacan los ácidos  $\alpha$ -linolénico (ALA), estearidónico (SDA) y  $\gamma$ -linolénico (GLA); los dos últimos en proporciones similares entre sí (33). La evidencia científica sugiere que la ingesta de estos AG proporciona importantes beneficios desde el punto de vista nutricional (34), sin embargo, existen muy pocas fuentes alimentarias comerciales que los contengan en buena proporción (35).

**Tabla 2: Perfil de ácidos grasos del aceite comercial de *Echium plantagineum* (33).**

Ácidos grasos.	% sobre AG totales
C16:0	6,82
C18:0	3,55
C16:1 n-7	0,10
C18:1 n-9	14,16
C18:1 n-7	0,53
C20:1 n-9	0,81
C18:2 n-6	15,74
C18:3 n-6 (GLA)	11,01
C18:3 n-3 (ALA)	33,36
C18:4 n-3 (SDA)	13,90

### 3.7.1 Ácido $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3).

Los ácidos grasos esenciales (AGE) son AG que deben ser aportados por la dieta, debido a que los seres humanos no poseemos las enzimas necesarias para desaturar enlaces en las posiciones 3 y 6 de la cadena hidrocarbonada (30). El ALA es un AGE disponible principalmente en fuentes vegetales como el aceite de linaza, chía, canola y nuez (2).

El incremento de la relación AGPI n-3/n-6 es un factor relevante dentro de su rol protector ante el riesgo cardiovascular, ya que existe una competencia de ambas series de AGPI por las enzimas  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasas (37).

Los principales destinos metabólicos del ALA son la  $\beta$  oxidación, el depósito y la conversión a eicosanoides antiinflamatorios derivados de EPA y DHA (38).

### 3.7.2 Ácido estearidónico (18:4 n-3).

El SDA es un AGPI n-3 escaso en la naturaleza, encontrándose principalmente en semillas de plantas del género *Echium* y en algunas especies de algas y hongos (**Anexo 2** y **Anexo 3**) (34). Se han descrito efectos benéficos como inhibidor del crecimiento tumoral en fibroblastos y cáncer de mama (34). Además, se han observado efectos antiinflamatorios en la artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica y acné (28, 34), así como la reducción del riesgo cardiovascular a través de la disminución de la hipertrigliceridemia (28).

ALA y SDA forman parte de la misma ruta metabólica y son precursores de EPA y DHA. ALA, que es el primer eslabón de la ruta metabólica de los AGPI n-3, es transformado en

SDA a través de la enzima  $\Delta 6$  desaturasa (**Anexo 4**), enzima que presenta actividad limitada en humanos. Se ha comprobado que la eficiencia metabólica del SDA en su conversión a AG de cadena más larga como el EPA, es aproximadamente 4 veces mayor que ALA (34), por lo que la ingesta directa de SDA podría resolver un problema nutricional en consumidores vegetarianos (37). Además, es relevante mencionar que gran parte de sus efectos favorables se relacionan con el incremento en los niveles plasmáticos de EPA y los beneficios entregados por éste.

### **3.7.3 Ácido $\gamma$ -linolénico (18:3 n-6).**

Las principales fuentes de GLA incluyen aceite de semillas de onagra, borraja, grosella negra y cáñamo (**Anexo 2 y Anexo 3**) (37). Se han descrito efectos terapéuticos en neuropatía periférica diabética (39), AR, eczema atópico y otras afecciones de la piel (31, 40, 41). Es precursor del ácido Di-homo  $\gamma$ -linolénico (DGLA 20:3 n-6) y puede ser metabolizado a prostaglandinas de la serie 1 (PGE1) y a ácido 15 - (S)-hidroxi-8,11,13-eicosatrienoico (15-HETrE) con reconocida actividad antiinflamatoria (40, 41).

Hasta el momento, no se ha estudiado la incorporación de estos AG a moléculas de 1,3-DAG. Esto lo hace interesante, ya que existen diferencias en la afinidad de las enzimas por los distintos AG dependiendo de las características estructurales de éstos, como su grado de saturación, posición del enlace o longitud de la cadena hidrocarbonada (42).

Debido a que las vías implicadas en el metabolismo de los 1,3-DAG dificultan la reconversión de las grasas a TAG, la ingesta de estos LE provocaría un efecto favorable en la reducción de peso y factores de riesgo cardiovascular, junto a los beneficios entregados por los AG seleccionados (30). Por estas razones, en este trabajo experimental, se investigaron las condiciones óptimas para la síntesis enzimática de 1,3-DAG, conteniendo ALA, SDA y GLA, con el objetivo de seleccionar un biocatalizador y evaluar la influencia de tres variables sobre su rendimiento utilizando el Método de Taguchi (43). Dicho método pretende estimar el efecto de los factores y sus niveles en la variabilidad y la media de respuesta. En éste, los niveles se ordenan de acuerdo con el Diseño de Arreglos Ortogonales y luego se comparan usando la razón Señal/Ruido, con el fin de identificar los niveles más adecuados para lograr el mayor rendimiento posible en la síntesis de los LE (44). Tras la síntesis a pequeña escala, se escaló y evaluó el procedimiento de síntesis enzimática y finalmente se procedió a purificar el producto de interés (1,3-DAG).

#### **4. Hipótesis de trabajo y objetivos.**

##### **4.1 Hipótesis de trabajo:**

Es posible incorporar ALA, GLA y SDA en la estructura del glicerol para obtener 1,3-diacilglicéridos (1,3-DAG) como productos mayoritarios de la reacción de síntesis usando una lipasa regioespecífica como biocatalizador y empleando como sustrato un concentrado de ALA, GLA y SDA derivado del aceite de semilla de *E. plantagineum*. Además, se puede purificar la fracción de diacilglicéridos tras la síntesis enzimática mediante un proceso de saponificación.

##### **Objetivo general:**

“Producir 1,3-DAG a escala de laboratorio conteniendo mayoritariamente ALA, GLA y SDA mediante síntesis enzimática con una lipasa regioespecífica, empleando como sustratos glicerol y un concentrado de ácidos grasos de aceite de semilla de viborera”.

##### **4.2 Objetivos específicos:**

- 4.2.1 Identificar el tipo de lipasa y los valores de las variables, “tiempo de reacción”, “carga enzimática” y “relación molar entre sustratos” que combinados, logren el mayor rendimiento en 1,3-DAG conteniendo la mayor proporción de ALA, GLA y SDA mediante la aplicación del Método de Taguchi.
- 4.2.2 Comparar los resultados de la síntesis enzimática entre el modelo a pequeña escala y el modelo a mayor escala debido a las posibles variaciones que podrían aparecer por el cambio del equipamiento.
- 4.2.3 Concentrar la fracción de diacilglicéridos resultante de la síntesis enzimática a través de un proceso de saponificación suave para retirar los ácidos grasos libres presentes en el medio de reacción.

## 5. Metodología.

### 5.1 Materiales.

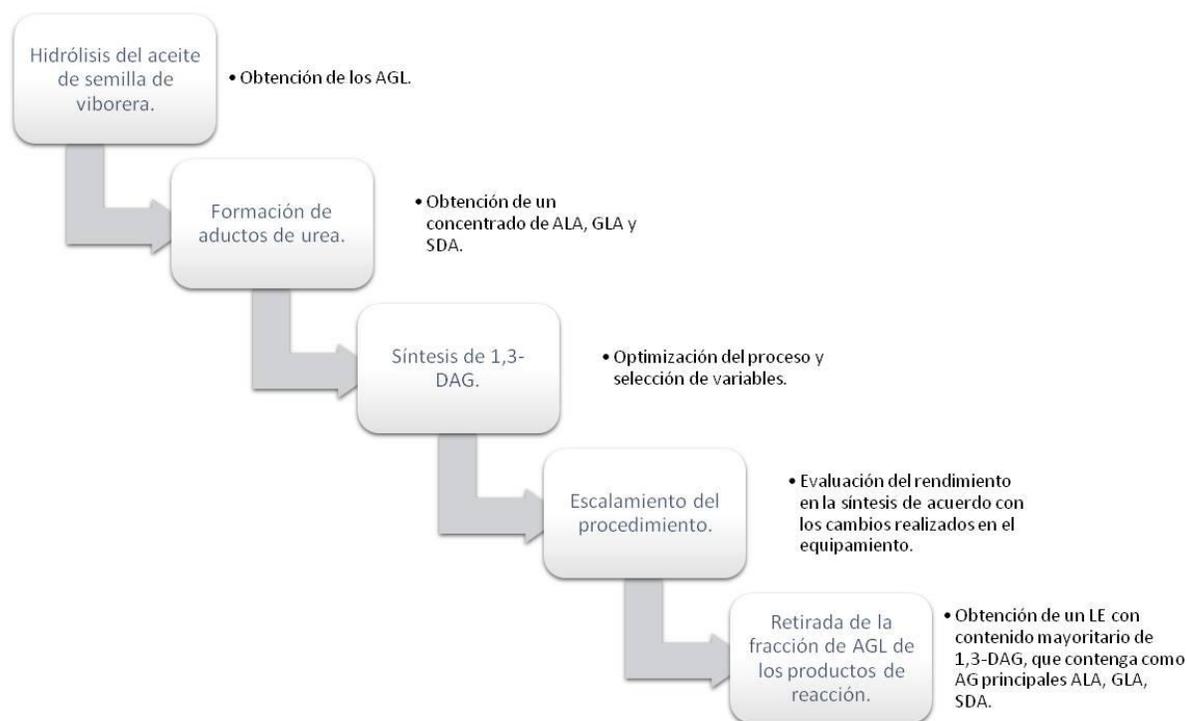
Todos los reactivos y solventes utilizados en la fase experimental de este estudio fueron proporcionados por Merck. El aceite de semilla de *E. plantagineum* fue proporcionado por DeWit Specialty Oils (Texel, Holanda). Las enzimas, Lipozyme® RM-IM, proveniente de *Rhizomucor miehei*, inmovilizada en perlas de resina de intercambio aniónico macroporoso y lipasa recombinante de *Candida antarctica*, Lipozyme® 435, inmovilizada en Lewatit VP OC 1600, fueron de Novozymes (Franklinton, NC, Estados Unidos) (42).

### 5.2 Definición de la muestra.

La muestra estuvo compuesta por los productos de la reacción enzimática generados en el trabajo experimental. Cada ensayo se realizó por triplicado en el laboratorio de Lípidos del Instituto de Nutrición y Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

### 5.3 Definición del diseño de la investigación.

En esta tesis se empleó un diseño experimental basado en 5 etapas que se esquematizan a continuación:



**Figura 2: Esquema del diseño experimental utilizado en la investigación.**

## 5.4 Definición de variables y conceptos.

### 5.4.1 Variables independientes.

1) **Tipo de lipasa:** se ensayaron dos lipasas en las mismas condiciones de reacción (tiempo, temperatura, carga enzimática y relación molar entre sustratos), con el fin de seleccionar la más idónea en términos de mayor rendimiento del producto de interés (1,3-DAG) y a la vez mayor proporción de ALA, GLA y SDA incorporados.

2) **Relación molar entre sustratos:** se emplearon distintas relaciones molares entre los sustratos glicerol y AGL (1:2, 1:3 y 1:4) durante el proceso de optimización de la síntesis enzimática (23, 25, 47).

3) **Concentración o carga enzimática:** corresponde a la proporción de enzima empleada en la síntesis respecto de la masa total de los sustratos. En la etapa de optimización de la síntesis enzimática se emplearon valores del 2, 6 y 10% de carga enzimática (28, 52).

4) **Tiempo de reacción:** en la etapa de optimización del proceso de obtención de 1,3-DAG fueron evaluados tres niveles de tratamiento: 2, 3 y 4 horas (20).

5) **Temperatura de reacción:** la temperatura a la cual se llevó a cabo la reacción fue una constante. De acuerdo con la literatura, en ensayos similares se han utilizado las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® 435 y la temperatura “60 °C” ha mostrado resultados óptimos (13, 28, 29, 52).

**Tabla 3: Condiciones experimentales de la etapa preliminar “Selección de la enzima”.**

Variables.	Experimento 1.	Experimento 2.
Enzima	Lipozyme® RM-IM	Lipozyme® 435
Carga enzimática	6 %	6 %
Relación molar AGL/glicerol	2:1	2:1
Tamiz molecular	5% m/m	5% m/m
Tiempo	120 min	120 min
Temperatura de reacción	60 °C	60 °C
Repeticiones	Mínimo dos veces (cada una por triplicado)	Mínimo dos veces (cada una por triplicado)

### 5.4.2 Variables dependientes.

1) **Factor de concentración de AG:** variable cuantitativa continua, cuantificada como la relación entre el porcentaje de cierto AG en el aceite inicial y el porcentaje obtenido luego

del proceso de concentración (33).

**2) Rendimiento de síntesis de 1,3-DAG:** variable cuantitativa continua, cuantificada como porcentaje molar de los 1,3-DAG sobre el total de los productos de reacción.

**3) Grado de incorporación de los AG en la molécula de 1,3-DAG:** variable cuantitativa continua, cuantificada como porcentaje de incorporación de ALA, GLA y SDA sobre AG totales incorporados en la estructura de los 1,3-DAG.

## **5.5 Definición de procedimientos y técnicas.**

### **5.5.1 Obtención del concentrado de AGL de aceite de semilla de *Echium plantagineum*.**

#### **5.5.1.1 Hidrólisis del aceite de semilla de viborera.**

Este procedimiento fue realizado en botellas de vidrio de 500 ml, en las cuales se incorporaron 50 g de aceite en 160 ml de una solución hidroalcohólica (1/1 v/v) de hidróxido de potasio (KOH) 3,7 N más 0,15% m/v de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en un baño térmico LabTech, modelo LSB-130S a 60°C con agitación mecánica a 120 rpm, por un tiempo de 120 min. Posteriormente, el contenido de la botella se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 40 ml de agua destilada. Seguidamente, se acidificó con una solución acuosa de ácido clorhídrico (HCl) 4M hasta conseguir un pH inferior a 2. Luego, se incorporaron 40 ml de agua destilada a la mezcla, la que fue agitada vigorosamente de forma manual en un embudo de decantación de 1000 ml. En éste, los AGL fueron separados de la mezcla de productos, para luego, extraer con 80 ml de n-hexano los remanentes de AGL contenidos en la fase hidroalcohólica. Finalmente, se evaporó el hexano en un evaporador rotatorio Scilogex RE100-Pro con sistema de vacío, a 100 rpm a temperatura constante de 40 °C. Los AGL obtenidos fueron almacenados en botellas de vidrio de 250 ml con atmósfera modificada con gas nitrógeno a -20°C y en oscuridad hasta su posterior uso.

#### **5.5.1.2 Concentración de ALA, GLA y SDA mediante el método de formación de complejos de urea.**

Para la concentración de los AG seleccionados, 20 g de los AGL obtenidos tras la hidrólisis del aceite de viborera fueron dispuestos en botellas de vidrio Duran-Schott de 1000 ml y se adicionó una mezcla de solventes compuesta por 800 ml de n-hexano y 40 ml de etanol

absoluto. En seguida, se agregaron 300 g de urea que fueron previamente pulverizados en una procesadora Thomas Elektrogeräte, modelo TH-300PB. La mezcla fue agitada vigorosamente y refrigerada a temperatura de 4°C durante un tiempo mínimo de 24 h. Pasado este tiempo, el contenido fue filtrado a través de una bomba de vacío. La fracción sólida fue desechada y la fracción líquida reservada. Ésta última fue depositada en un embudo de decantación al cual se adicionó el 40% volumen, respecto de la fase hexánica, de solución acuosa de ácido sulfúrico 1% v/v y fue agitado fuertemente. Luego de la separación de las fases, la fase inferior fue desechada y la superior reservada para ser lavada con 40% v/v de agua destilada. Nuevamente, la fase superior fue reservada y filtrada con sulfato de sodio anhidro. Finalmente, el hexano fue evaporado en el evaporador rotatorio a 40 °C y recuperado en el matraz esférico del rotavapor tras la condensación en el sistema refrigerante del equipo. El remanente (concentrado de ALA, GLA y SDA) fue cuantificado por gravimetría. (**Anexo 5**).

### **5.5.2 Selección de la enzima.**

La síntesis de LE fue efectuada en viales de vidrio termorresistentes de fondo cónico (10 ml) Reacti-vials, añadiendo 1 mmol de glicerol (92,1 mg) y 2 mmoles de AGL (556 mg), dejando los viales durante 5 minutos en un bloque térmico con módulo de agitación magnética Reacti-Therm III (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 60 °C. A continuación, se añadió a una muestra la lipasa Lipozyme® RM-IM y a la otra Lipozyme® 435 y un tamiz molecular de 0,4 nm de diámetro. Tras tapar el vial, su contenido fue agitado magnéticamente, dejando transcurrir la reacción durante 2 horas a 60 °C. Pasado el tiempo de reacción, ésta se detuvo filtrando el contenido del vial a través de una columna de sulfato de sodio anhidro granular para retirar la lipasa inmovilizada y el tamiz molecular. La separación de los productos de reacción se realizó por cromatografía de capa fina (TLC) (23). Para esto, se colectaron 6-8 mg del conjunto de los productos de la reacción de síntesis enzimática y fueron disueltos en 100 µl de n-hexano. Los productos de la reacción fueron separados en placas de TLC preparativa de sílice activado a 100 °C durante 1 hora (Sílica gel 60 0,5 mm, 20 x 20 cm), empleando como fase móvil una mezcla de n-hexano:éter dietílico:ácido acético 80:20:1 v/v/v. Tras el desarrollo de la placa, ésta fue revelada con una corriente de yodo en nitrógeno (**Anexo 6**). Las bandas correspondientes a los MAG, 1,2(2,3)-DAG, 1,3-DAG, AGL y TAG fueron raspadas y colocadas en tubos de

ensayo termorresistentes de vidrio para la etapa de derivatización.

### 5.5.3 Optimización de la síntesis enzimática de 1,3-diacilglicéridos.

En esta etapa la síntesis de 1,3-DAG se realizó por medio de la enzima Lipozyme® 435 siguiendo el procedimiento experimental señalado en el apartado anterior. El número de ensayos y las combinaciones de factores y variables para optimizar la producción de 1,3-DAG fue planificado a través del Diseño de “Arreglos Ortogonales” de Taguchi, usando la matriz de diseño experimental L9(3)<sup>3</sup> especificada a continuación.

**Tabla 4: Matriz de diseño experimental L9 (3)<sup>3</sup>, de acuerdo con el método de Taguchi.**

Tiempo(horas)	Carga enzimática (% de la masa total de los sustratos)	Relación molar entre sustratos (glicerol:AGL)
2	2	1:2
2	6	1:3
2	10	1:4
4	2	1:3
4	6	1:4
4	10	1:2
6	2	1:4
6	6	1:2
6	10	1:3

### 5.5.4 Determinación del perfil de ácidos grasos de los productos de reacción enzimática.

Tras la separación de los productos de reacción por TLC y el correspondiente raspado de los mismos, éstos fueron derivatizados añadiendo 1 ml de n-hexano de calidad cromatográfica y 2 ml de una mezcla metanol: cloruro de acetilo (20:1 v/v). A continuación, los tubos fueron cerrados y permanecieron a 100 °C durante 30 minutos en un bloque térmico. Tras dejar enfriar, se añadió 1 ml de agua destilada a cada tubo y se procedió a centrifugar a 3500 rpm durante 5 min. Por último, se recogió la fase superior conteniendo los ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG) y se colocó en un vial de vidrio para el análisis cromatográfico. Se empleó metil heptadecanoato (C17:0) como estándar interno con fines de cuantificación (**Anexo 7**).

Para la identificación y cuantificación de AG se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama Agilent 6890N con autoinyector 7683 B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) con temperatura inicial del horno de 140

°C mantenida constante durante 5 minutos tras la inyección. Luego se incrementó la temperatura en 4 °C/min hasta los 190 °C, en 1 °C/min hasta los 220°C y a 4 °C/min hasta los 240°C, manteniéndose esta temperatura durante 5 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas portador con una relación de split de 1:100. La temperatura del inyector y el detector fue de 270 y 260 °C respectivamente. Se utilizó una columna capilar Supelco SP-2560 (100 m x 25mm x 0,2 µm). Los EMAG fueron identificados en función de su tiempo de retención en base a la comparación con estándares analíticos (37 component FAME mix y PUFA Mix n° 3, de Supelco, Sigma-Aldrich).

### **5.5.5 Escalamiento del procedimiento.**

La etapa de síntesis enzimática de los 1,3-DAG fue escalada (considerando al menos un factor de x10) empleando los valores óptimos de las variables ensayadas según el Método de Taguchi, con el propósito de evaluar los resultados con un equipamiento que permita trabajar con mayores cantidades de sustratos. A diferencia de la primera etapa, donde se emplearon como reactores viales de fondo cónico de 10 mL y un tamiz molecular para retener el agua formada en la reacción según lo descrito en el subapartado 5.5.2, en el escalamiento se dispusieron los sustratos y la lipasa en un matraz esférico de 100 ml que actuó como reactor. La reacción tuvo lugar tras colocar el matraz en un evaporador rotatorio con baño de agua a 60 °C y 120 rpm de agitación, y trabajando a baja presión para retirar el agua generada en la reacción enzimática, la cual fue activada durante 10 min a intervalos de 20 min.

### **5.5.6 Retirada de los AG.**

Esta fue realizada por medio del procedimiento descrito por Hita en 2007 (46), consistente en una saponificación suave utilizada para retirar los AGL del total de los productos de la reacción de síntesis enzimática. Para esto, 30 g del producto de síntesis, fueron disueltos en n-hexano hasta completar los 375 ml. Posteriormente, 300 ml de Hidróxido de Potasio (KOH) 0,8 N en solución hidroalcohólica (30% etanol) fueron incorporados (junto a los AGL) en un embudo de decantación y fueron vigorosamente agitados. Luego, se recuperó la fase hexánica y la fase hidroalcohólica fue nuevamente adicionada con 100 ml de hexano para extraer los posibles remanentes de acilglicéridos. Finalmente, con una temperatura constante de 40°C, se retiró el hexano mediante el rotavapor y se procedió a pesar el

producto final (**Anexo 8**).

### **5.6 Elaboración de plan de análisis.**

Para el análisis de los datos correspondientes a los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico, se utilizó el programa de Microsoft Excel básico para calcular el rendimiento alcanzado. La etapa de optimización del proceso fue analizada con el software Excel XL-STAT de acuerdo con el Modelo de Arreglos Ortogonales o Modelo de Taguchi, donde se evaluó el rendimiento de cada factor (variable) y sus niveles (tratamientos).

### **5.7 Técnicas estadísticas de análisis**

#### **5.7.1 Medidas de resumen y de dispersión.**

Las medidas de resumen y de dispersión a utilizar en este proyecto corresponden al promedio (P) y la desviación estándar (DE) de los valores obtenidos correspondientes al porcentaje molar para cada especie lipídica respectivamente, además de la proporción en que se encuentren los distintos AG.

#### **5.7.2 Análisis Estadístico.**

Para identificar la combinación de variables que produjo la mayor proporción de 1,3-DAG, fueron realizadas las pruebas estadísticas de Shapiro Wilk y de Bartlett. Tras comprobar que la distribución de los datos fuera normal, se realizó la prueba ANOVA. La diferencia entre grupos se comparó según la prueba de Bonferroni. La razón Señal/Ruido (S/R) fue determinada por el software Excel XL-STAT.

Para comparar el rendimiento como porcentaje molar en la producción de 1,3-DAG en dos condiciones de equipamiento, se utilizó la prueba paramétrica de t-Student (27). En todas las pruebas estadísticas se consideró un 95% de confianza ( $p < 0,05$ ).

## 6. Resultados.

**6.1 Identificación del tipo de lipasa y los valores de las variables, “tiempo de reacción”, “carga enzimática” y “relación molar entre sustratos” que combinados, logren el mayor rendimiento en 1,3-DAG conteniendo la mayor proporción de ALA, GLA y SDA mediante la aplicación del método de Taguchi.**

**6.1.1 Obtención del concentrado de ácidos grasos libres proveniente de aceite de semilla de *Echium plantagineum* a través de la formación de complejos de urea.**

Durante la primera etapa del proyecto se buscó la obtención de un concentrado de AGL que contuviera principalmente SDA, GLA y ALA, a través de la formación de complejos de urea. Este procedimiento fue simple y efectivo y se obtuvieron como AG mayoritarios el SDA (36,98%), GLA (30,28%) y ALA (21,82%). Además, se pudo observar que, como se esperaba, los factores de concentración (FC) calculados demostraron un aumento en la concentración de GLA y SDA, (2,61 y 2,68 respectivamente) y, por el contrario, para ALA, una disminución proporcional en su concentración (FC 0,69). Los resultados de esta etapa se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5: Perfil de ácidos grasos (% sobre el total de ácidos grasos) del aceite de semilla de *Echium plantagineum* y del concentrado de AGL obtenido mediante la formación de complejos de urea.**

Ácidos grasos.	Aceite de <i>E. plantagineum</i> .	Concentrado de AGL.	Factores de Concentración.
C16:0	7,17	0,00 ± 0,00	0,00
C18:0	3,81	0,00 ± 0,00	0,00
C18:1 n-9	14,84	0,00 ± 0,00	0,00
C18:1 n-7	0,80	0,92±0,35	0,91
C18:2 n-6	16,14	9,99±0,54	0,62
C18:3 n-6	11,60	30,28±0,85	2,61
C18:3 n-3	31,86	21,82±1,13	0,69
C18:4 n-3	13,80	36,98±0,65	2,68

AGL: ácidos grasos libres; FC: Factores de concentración; los resultados se muestran como P ± DE.

En conclusión, es posible afirmar que el procedimiento aplicado para la formación de aductos de urea fue efectivo y permitió la obtención de un concentrado de AGL con un perfil lipídico concordante con lo esperado y un porcentaje promedio de 88,3% de los AG de interés sobre el total de AG. En el **Anexo 9** y **Anexo 10** se muestran los cromatogramas

correspondientes al aceite de *E. plantagineum* y al concentrado de AGL.

### **6.1.2 Tipo de lipasa.**

Para evaluar el rendimiento de la reacción de síntesis enzimática de 1,3-DAG conteniendo mayoritariamente ALA, GLA y SDA, de dos lipasas regioespecíficas de posición *sn*-1 y *sn*-3, se comparó el rendimiento de la producción de 1,3-DAG (en porcentaje molar sobre el total de productos de reacción), además del perfil de AG de los 1,3-DAG obtenido por cromatografía gaseosa. Para esto, se utilizaron las enzimas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® 435. Ambas enzimas están disponibles comercialmente y han sido referenciadas en trabajos donde se sintetizaron LE vía catálisis enzimática.

La reacción de síntesis buscada fue la esterificación de los AG de interés en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del glicerol. Cuando la reacción fue catalizada por la lipasa Lipozyme® RM-IM la proporción molar de 1,3-DAG fue del 7,2%, segunda luego de los MAG (17,9%). El perfil de los AG incorporados en los 1,3-DAG fue en orden decreciente: ALA (44,9%), LA (27,7%), GLA (14%) y SDA (9,7%).

La reacción de síntesis catalizada por la lipasa Lipozyme® 435 alcanzó una proporción molar de 1,3-DAG del 25,8%, siendo el segundo producto después de los MAG (29,1%). En esta síntesis se logró un perfil de AG donde GLA, ALA y SDA arrojaron porcentajes molares similares entre sí, alcanzando en conjunto una suma de 83,9% del total de AG incorporados (GLA 29,9%; ALA 26,1% y SDA 28,0 % molar).

Por estas razones, se decidió utilizar la lipasa Lipozyme® 435 para la optimización de la reacción de síntesis enzimática, ya que fue más eficiente en las condiciones ensayadas. Además de esto, la distribución de AG observada en los 1,3-DAG sintetizados con esta enzima es concordante con lo que se busca en la investigación.

Por último, se observa que, en las condiciones ensayadas, la enzima Lipozyme® RM-IM presenta una mayor afinidad por ALA y LA que por los AG de interés, por lo cual es descartada. Los valores de distribución molar y perfil de AG de ambas enzimas se encuentran en la **Tabla 6a y 6b**.

### **6.1.3 Aplicación del método de Taguchi.**

En el siguiente paso de la etapa experimental se implementó el método de Taguchi para definir las condiciones en las que se llevaría a cabo cada observación. Para este diseño

experimental los distintos niveles (tratamientos) de las variables (factores), señalados como categorías 1, 2 y 3, fueron determinados en base a lo reportado en la literatura para reacciones de síntesis de 1,3-DAG. Esta categorización fue necesaria para establecer los niveles o categorías óptimas para cada variable.

**Tabla 6a: Distribución molar y perfil de ácidos grasos (mol%) de los productos de reacción obtenidos de la síntesis catalizada por la lipasa “Lipozyme® RM-IM”.**

<b>Lipasa Lipozyme® RM-IM</b>					
	<b>MAG</b>	<b>1,2-DAG</b>	<b>1,3-DAG</b>	<b>AGL</b>	<b>TAG</b>
<b>C18:1n-7</b>	0,84±1,46	n.d.	3,70±1,92	0,26±0,45	n.d.
<b>C18:2n-6</b>	23,28±2,28	n.d.	27,72±1,48	7,05±0,30	n.d.
<b>C18:3n-6</b>	16,24±2,91	n.d.	13,98±0,63	38,12±1,42	n.d.
<b>C18:3n-3</b>	44,54±1,38	n.d.	44,89±0,56	14,57±0,83	n.d.
<b>C18:4n-3</b>	15,09±1,40	n.d.	9,71±1,93	40,00±0,59	n.d.
<b>% molar</b>	17,88±2,20	n.d.	7,20±0,28	74,92±2,47	n.d.

MAG: monoacilglicéridos, DAG: diacilglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; TAG: triacilglicéridos. n.d.: no detectado; Los resultados se muestran como P ± DE.

**Tabla 6b: Distribución molar y perfil de ácidos grasos (mol%) de los productos de reacción obtenidos de la síntesis catalizada por la lipasa “Lipozyme® 435”.**

<b>Lipozyme® 435</b>					
	<b>MAG</b>	<b>1,2-DAG</b>	<b>1,3-DAG</b>	<b>AGL</b>	<b>TAG</b>
<b>C18:1n-7</b>	n.d.	n.d.	1,49±0,21	n.d.	n.d.
<b>C18:2n-6</b>	13,88±1,60	4,77±4,14	14,59±1,53	12,10±1,14	n.d.
<b>C18:3n-6</b>	20,86±14,70	28,93±1,15	29,86±0,41	30,26±0,40	33,33±57,54
<b>C18:3n-3</b>	28,90±5,16	25,94±1,65	26,06±0,72	25,28±0,46	n.d.
<b>C18:4n-3</b>	36,36±8,25	40,36±2,91	28,01±2,80	32,37±1,98	n.d.
<b>% molar</b>	26,67±6,93	5,22±2,25	25,82±1,03	39,77±3,37	0,07±0,12

MAG: monoacilglicéridos, DAG: diacilglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; TAG: triacilglicéridos. n.d.: no detectado; Los resultados se muestran como P ± DE.

Los ensayos se realizaron por triplicado con el objetivo de aumentar su replicabilidad. En la Tabla 7, se muestran los arreglos entregados por el programa (Observaciones) y los resultados de los ensayos, con sus respectivos promedio y desviación estándar, donde se evidencia que, en cuanto a las diferencias estadísticamente significativas observadas según

el método de Bonferroni, las corridas 1, 2, 3, 5, 6 y 7 son estadísticamente iguales entre sí y 4 es igual a 8 y 9. Por último, 9 es igual estadísticamente a todas excepto a 6.

Finalmente, las categorías ideales fueron seleccionadas de acuerdo con la razón S/R, indicador que tiene como objetivo minimizar la interferencia del ruido en la señal de la respuesta y utilizando “más grande mejor”, de acuerdo con el porcentaje molar de 1,3-DAG, producidos en las distintas condiciones experimentales.

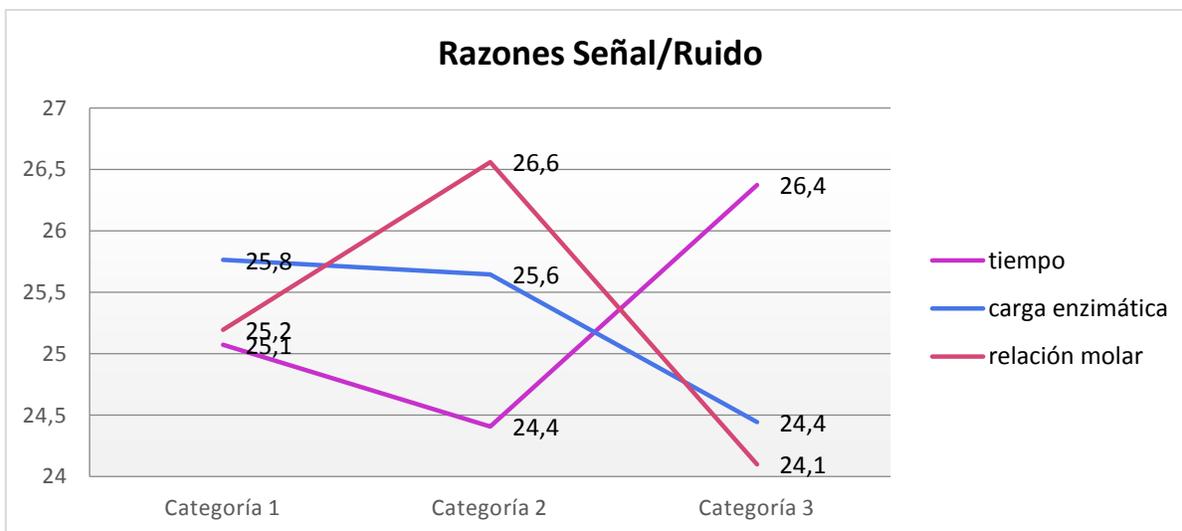
**Tabla 7: Productos de reacción obtenidos según las condiciones experimentales sugeridas por el método de Taguchi.**

Obs	t	C.E.	R.M.	MAG	1,2-DAG	1,3-DAG	AGL	TAG
1	2	2	1:2	19,96 ± 0,82	2,08 ± 1,94	17,89 ± 3,33 <sup>ad</sup>	59,63 ± 5,33	0,44 ± 0,77
2	2	6	1:3	16,26 ± 0,42	0,83 ± 0,72	19,67 ± 2,02 <sup>ae</sup>	62,58 ± 2,44	0,64 ± 1,12
3	2	10	1:4	3,63 ± 2,19	0,00 ± 0,00	17,24 ± 0,29 <sup>ac</sup>	77,95 ± 3,13	1,52 ± 1,32
<b>4</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1:3</b>	<b>13,75 ± 1,15</b>	<b>3,59 ± 1,34</b>	<b>24,83 ± 2,01<sup>eg</sup></b>	<b>55,84 ± 1,70</b>	<b>1,98 ± 1,17</b>
5	4	6	1:4	5,76 ± 2,66	3,27 ± 0,64	13,94 ± 1,23 <sup>ab</sup>	72,32 ± 1,36	4,71 ± 1,72
6	4	10	1:2	4,50 ± 2,07	0,00 ± 0,00	13,68 ± 1,77 <sup>a</sup>	74,89 ± 4,79	6,93 ± 2,74
7	6	2	1:4	7,43 ± 0,47	3,51 ± 0,38	17,28 ± 0,33 <sup>af</sup>	68,07 ± 1,00	3,71 ± 0,87
<b>8</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1:2</b>	<b>30,24 ± 1,76</b>	<b>6,75 ± 2,14</b>	<b>26,33 ± 2,48<sup>g</sup></b>	<b>29,12 ± 2,75</b>	<b>7,56 ± 1,95</b>
9	6	10	1:3	12,47 ± 1,94	3,97 ± 0,64	20,41 ± 2,64 <sup>bcd<sup>efg</sup></sup>	50,12 ± 4,32	13,04 ± 3,38

Los valores de p para el análisis Post-Hoc de Bonferroni se presentan en el Anexo 11.

Obs: Observación; t: tiempo; CE: carga enzimática; RM: Relación molar entre sustratos; Los resultados se muestran como P ± DE. Los superíndices iguales indican que no existen diferencias significativas en la proporción molar de 1,3-DAG entre experimentos.

La figura siguiente muestra el análisis ejecutado por el software XL-STAT para el Método de Taguchi y las razones S/R. Este análisis considera como combinación de variables óptima la categoría 3 de la variable “tiempo” (6 h), la categoría 1 de la variable “carga enzimática” (2%) y la categoría 2 para “relación molar entre sustratos” (1:3 Glicerol: AGL), señalada en este documento como Observación 10, ya que esta combinación de categorías de variables no había sido asignada previamente en los arreglos del Método de Taguchi. Por último, al observar los resultados de las sumas de cuadrados, calculados para evaluar la influencia de las variables en el procedimiento experimental, se puede concluir que en orden decreciente corresponde a la relación molar entre sustratos, seguida del tiempo y por último la carga enzimática (**Anexo 12**).



**Figura 3: Razones S/R obtenidas en base a los promedios, de acuerdo con el Método de Taguchi.**

Luego, al comparar los resultados de los experimentos con mejor rendimiento, 4 y 8, con combinaciones de valores de variables incluidas en el diseño  $L9(3)^3$  y 10, síntesis realizada con los valores óptimos de cada variable ensayada según lo arrojado por el análisis del Método de Taguchi (Tabla 8), se observó que la producción de 1,3-DAG a través de la reacción de esterificación o síntesis enzimática catalizada por la lipasa Lipozyme® 435, no difería significativamente en las tres condiciones experimentales seleccionadas, de acuerdo con la prueba paramétrica de ANOVA ( $\alpha < 0,05$ ) (Anexo 13).

**Tabla 8: Porcentaje molar de las fracciones lipídicas obtenidas en la síntesis enzimática para las Observaciones 4, 8 y 10.**

Obs	Condiciones Experimentales	MAG	1,2-DAG	1,3-DAG	AGL	TAG
Obs.4	4 h; 2% CE; 3:1RM	13,75±1,15	3,59±1,34	24,83±2,01	55,84±1,70	1,98±1,17
Obs.8	6 h, 6% CE; 2:1RM	30,24±1,76	6,75±2,14	26,33±2,48	29,12±2,75	7,56±1,95
Obs.10	6 h, 2% CE; 3:1RM	36,66±1,91	6,18±2,32	22,74±3,69	30,95±1,58	3,47±0,43

Shapiro Wilk  $p = 0,433$ . Prueba de Bartlett  $p = 0,725$ . Análisis de la Varianza ANOVA  $p = 0,357$ . Los resultados se muestran como  $P \pm DE$ .

Si bien el porcentaje molar de 1,3-DAG es mayor en la Observación 8 que en la Observación 4 y 10, no existen diferencias significativas entre las distintas condiciones

experimentales de tratamiento. Además, el aporte proporcional de los MAG es mayor al de 1,3-DAG, tanto en la Observación 8 como en la 10. Esta condición es relevante, ya que tras la saponificación se deberían eliminar los AGL y no todos los productos de la reacción distintos de 1,3-DAG. Por lo tanto, al elegir las Observaciones 8 o 10, tras la purificación del producto, teóricamente, los MAG serían el producto principal.

Por otra parte, la disminución en el tiempo de síntesis enzimática admite una reducción en la utilización de energía respecto de las condiciones señaladas por el Método de Taguchi, lo que supone un ahorro mayor.

Finalmente, por las razones anteriormente expuestas se decide utilizar las condiciones de tratamiento de la Observación 4 (4 horas; 2% carga enzimática; relación molar 1:3).

## **6.2 Comparación de los resultados de la síntesis enzimática entre el modelo a pequeña escala y el modelo a mayor escala debido a las posibles variaciones que podrían aparecer por el cambio del equipamiento.**

En esta etapa del trabajo experimental se evaluó el porcentaje molar de la producción de 1,3-DAG en dos distintas condiciones de equipamiento. El aumento en la cantidad de reactantes necesarios para escalar x10 el procedimiento demandó un cambio en el equipo utilizado para la reacción, ya que la capacidad del reactor empleado a menor escala no permitía el incremento en la cantidad de reactantes y productos. Durante las condiciones iniciales o modelo a pequeña escala (C1), la esterificación ocurrió mediante la agitación magnética del medio de reacción en viales de fondo cónico (10 ml) en un módulo de calentamiento y agitación Reacti-Therm III (Thermo Scientific) y se utilizó un tamiz molecular para retirar el agua formada en la reacción. En las condiciones experimentales 2 o modelo a mayor escala (C2) la cantidad de reactantes fue 10 veces mayor que en C1, por lo que la síntesis enzimática se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de 100 ml en un evaporador rotatorio Scilogex RE100-Pro a 120 rpm, donde se aplicó vacío durante 10 minutos desde el inicio de la reacción, a intervalos de 20 minutos, con el propósito de retirar el agua formada.

De acuerdo con la prueba estadística t-Student no se observaron diferencias significativas en el porcentaje molar de 1,3-DAG en ambas condiciones de equipamiento ( $p=0,802$ ). Sin embargo, se detectó una disminución significativa en el porcentaje molar de MAG en C2.

En cuanto a la distribución de AG se observó que existen diferencias significativas en la

incorporación de los AG de interés en las distintas condiciones operacionales, siendo significativamente mayor la incorporación de SDA y GLA y menores LA y ALA en C2.

Por último, se observó que los AG de interés son los principales encontrados en el producto (1,3-DAG). Los valores de p para la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y para la comparación de medias de t-Student se encuentran en el **Anexo 14**. Los resultados obtenidos en esta etapa se resumen en la **Tabla 9**.

**Tabla 9: Perfil de ácidos grasos y porcentaje molar de los productos de reacción obtenidos por catálisis enzimática en las condiciones experimentales C1 (mínima escala) y C2 (escalamiento x10).**

C1					
	MAG	1,2-DAG	1,3-DAG	AGL	TAG
<b>C18:1 n-7</b>	n.d.	n.d.	1,44±0,47	1,14±0,11	2,26±2,40
<b>C18:2 n-6</b>	12,35±1,50	8,07±1,33	14,16±0,06	11,62±0,54	18,66±8,03
<b>C18:3 n-6</b>	30,18±1,07	26,41±1,92	30,54±0,93	29,24±0,14	29,49±3,93
<b>C18:3 n-3</b>	25,04±1,16	23,12±2,53	25,42±0,69	25,21±0,29	24,54±0,87
<b>C18:4 n-3</b>	32,43±0,74	42,40±0,78	28,44±0,65	32,80±0,61	25,05±3,39
<b>Molar %</b>	13,75±1,15	3,59±1,34	24,83±2,01	55,84±1,70	1,98±1,17
C2					
<b>C18:1 n-7</b>	1,18±1,12	0,68±1,18	1,10±0,28	0,86±0,58	1,63±2,83
<b>C18:2 n-6</b>	11,52±0,69	8,29±1,27	11,83±0,18*	11,46±0,29	11,69±2,05
<b>C18:3 n-6</b>	31,05±1,23	30,17±1,10**	32,76±0,87**	30,61±0,67**	35,64±2,34
<b>C18:3 n-3</b>	21,15±0,65*	16,45±6,48	21,79±1,14*	22,35±1,09*	17,84±1,17*
<b>C18:4 n-3</b>	35,15±0,68**	44,41±3,17	32,53±0,86**	34,72±0,58**	33,19±3,38**
<b>Molar %</b>	8,68±1,19*	4,70±0,78	24,44±1,49	60,03±2,68	2,14±1,81

Los valores acompañados de un asterisco indican una disminución estadísticamente significativa y los valores acompañados de dos asteriscos indican un aumento estadísticamente significativo en C2 de acuerdo con la prueba de t-Student. Los resultados se muestran como  $P \pm DE$ .

### **6.3 Concentración de la fracción de diacilglicéridos resultante de la síntesis enzimática a través de un proceso de saponificación suave para retirar los ácidos grasos libres presentes en el medio de reacción.**

El proceso de saponificación suave es una técnica utilizada para retirar los AGL de la mezcla de productos de la reacción enzimática. Este procedimiento fue aplicado en el

experimento para concentrar los 1,3-DAG y se observó que es efectivo para este propósito. Se observó, además, que el proceso de saponificación suave también es adecuado para retirar exitosamente la mayor parte de los MAG generados como subproductos en la reacción de síntesis (Tabla 10).

**Tabla 10: Perfil de ácidos grasos y porcentaje molar de los productos de reacción obtenidos en la reacción de síntesis enzimática en condiciones C2 antes y después de la etapa de saponificación.**

	MAG		1,2-DAG		1,3-DAG		AGL		TAG		ΣDAG	
	A.S.	T.S.	A.S.	T.S.	A.S.	T.S.	A.S.	T.S.	A.S.	T.S.	A.S.	T.S.
<b>C18:1n-7</b>	1,18±1,12	n.d.	0,68±1,18	<b>0,12±0,20</b>	1,10±0,28	<b>0,98±0,10</b>	0,86±0,58	n.d.	1,63±2,83	<b>1,61±0,12</b>	1,78	<b>1,09</b>
<b>C18:2n-6</b>	11,52±0,69	<b>5,69±9,85</b>	8,29±1,27	<b>8,48±1,44</b>	11,83±0,18	<b>12,10±0,87</b>	11,46±0,29	n.d.	11,69±2,05	<b>10,41±0,22</b>	20,12	<b>20,58</b>
<b>C18:3n-6</b>	31,05±1,23	<b>53,01±40,87</b>	30,17±1,10	<b>28,89±0,81</b>	32,76±0,87	<b>32,69±1,03</b>	30,61±0,67	n.d.	35,64±2,34	<b>34,30±1,55</b>	62,93	<b>61,58</b>
<b>C18:3n-3</b>	21,15±0,65	<b>16,73±15,60</b>	16,45±6,48	<b>20,58±0,94</b>	21,79±1,14	<b>21,98±0,51</b>	22,35±1,09	n.d.	17,84±0,1,17	<b>19,60±1,58</b>	38,24	<b>42,56</b>
<b>C18:4n-3</b>	35,15±0,68	<b>24,58±21,31</b>	44,41±3,17	<b>41,92±3,15</b>	32,53±0,86	<b>32,26±0,77</b>	34,72±0,58	n.d.	33,19±3,38	<b>34,08±1,88</b>	76,93	<b>74,18</b>
<b>% molar</b>	8,68±1,19	<b>1,49±1,34</b>	4,70±0,78	<b>20,72±2,19</b>	24,44±1,49	<b>68,00±1,33</b>	60,03±2,68	n.d.	2,14±1,81	<b>9,79±2,47</b>	29,15	<b>88,72</b>

A.S.: antes de saponificar; T.S.: tras saponificar. Los resultados se muestran como valor P ± DE.

Tras el proceso de purificación los DAG totales superaron el 88,7% del producto concentrado. Al cuantificar las fracciones lipídicas se observaron en orden decreciente los siguientes porcentajes molares de productos: 1,3-DAG (68,0%), 1,2-DAG (20,7%), TAG (9,8%) y MAG (1,5%), sobre el total de productos de la reacción. La razón entre 1,3 y 1,2-DAG es de 3,3:1, lo que corresponde a 76,7% de 1,3-DAG y 23,3% de 1,2-DAG del total de DAG. Además, se pudo observar que el perfil de AG de los 1,3-DAG no cambió significativamente tras la saponificación.

Con los resultados obtenidos a partir de los ensayos de esterificación enzimática realizados por triplicado se puede inferir que la saponificación aplicada fue efectiva para eliminar los AGL de los productos de reacción, ya que estos fueron retirados en su totalidad en todos los ensayos realizados y que, además, son efectivos para retirar la mayor parte de los MAG presentes en el medio de reacción. En el **Anexo 15** se muestra un cromatograma obtenido de la fracción lipídica 1,3-DAG del producto final.

## 7. Discusión.

### 7.1 Obtención del concentrado de ácidos grasos libres.

La primera etapa de este trabajo experimental consideró la hidrólisis del aceite de semilla de *E. plantagineum* a través de métodos químicos y la posterior obtención de un concentrado de AGL mediante el procedimiento de formación de complejos de urea.

Si bien esta etapa del proceso fue fundamental para el desarrollo del proyecto, no fue considerada parte de los objetivos ya que se trató de una réplica de métodos utilizados con anterioridad y no de un proceso de optimización. En particular, la concentración de AGL se realizó con pequeñas modificaciones respecto del método original, ya que, previamente (33) los reactantes debían ser agitados continuamente mediante un agitador magnético a temperatura ambiente y, en esta ocasión, se mantuvo a temperatura de refrigeración (4°C) durante 24 h sin agitación permanente (33). No obstante, al comparar los resultados el rendimiento fue similar, ya que, anteriormente se obtuvo un 26,9±2,2% de producción y en esta ocasión se consiguió 26,0±1,42% de concentrado respecto del hidrolizado procedente del aceite de viborera. Además, se pudo observar que el procedimiento fue efectivo para aumentar la concentración de SDA y GLA, reflejado en los FC calculados (2,68 y 2,61 respectivamente).

El mecanismo propuesto por diversos autores para explicar la concentración de AG es la formación de complejos de urea, ya que, al cristalizar, la urea forma cavidades hexagonales que son capaces de capturar cadenas hidrocarbonadas a través de fuerzas de Van-der Waals. De acuerdo con este modelo, la estabilidad del aducto depende de la geometría de la molécula, disminuyendo a medida que aumentan sus dobles enlaces (**Anexo 16**) (50). Sin embargo, aunque el ALA (FC 0,68) es isómero de GLA, no presenta el mismo comportamiento.

Los modelos moleculares muestran que ALA presenta un segmento de su cadena más extendido que GLA debido a la posición de sus dobles enlaces. En particular, ALA ( $\Delta$  9, 12, 15-octadecatrienoico) no posee enlaces en la posición  $\Delta$ 6, a diferencia de GLA y SDA que sí los presentan ( $\Delta$  6, 9, 12-octadecatrienoico y  $\Delta$  6, 9, 12, 15-octadecatetraenoico, respectivamente) (**Anexo 17**). Esto explicaría la similitud en el comportamiento del LA ( $\Delta$  9, 12-octadecadienoico) y del ALA en el proceso de formación de aductos de urea, ya que la tendencia observada en la concentración de los AG coincide con lo reportado por

Vázquez (2018) y Rincón-Cervera (2018). Esto podría indicar que, ante la misma cantidad de dobles enlaces, su posición es relevante (33, 50).

Este procedimiento también ha sido utilizado con resultados exitosos en la concentración de EPA y DHA provenientes de aceites de pescado ( $\Delta$  5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico y  $\Delta$  4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoico) (51). Estos AG presentan un elevado número de insaturaciones que, además, se encuentran más cerca del grupo carboxilo al inicio de la cadena hidrocarbonada, lo que no admite prácticamente un segmento lineal que permitiera la formación de aductos con la urea, confirmando lo anterior.

La formación de complejos de urea es altamente estable, económica y replicable; condiciones que favorecen el proceso de recuperación de los AGL, ya que no necesita condiciones especiales de tratamiento (34).

Para la reacción es necesario hexano, solvente de grado alimentario (52) utilizado frecuentemente en la industria de los aceites y también en el proceso de concentración de AG. A pesar de que éste puede ser tóxico para el ser humano de manera crónica o aguda, al evaporarse totalmente no constituye riesgo para la salud (34). Además, puede ser recuperado y reutilizado en repetidas ocasiones, lo que hace a este método escalable a nivel industrial (51). Por otra parte, la temperatura utilizada en el procedimiento, disminuye la formación de peróxidos y la degradación de los AG (33, 34).

No obstante, a pesar de las ventajas mencionadas, este procedimiento podría involucrar la formación de etil-carbamatos (EC) a través de la reacción entre el etanol y la urea, compuesto considerado cancerígeno por la IARC (33, 34,50, 51). Sin embargo, la evidencia existente ha demostrado que el descenso de la temperatura hasta temperatura ambiente en el procedimiento de obtención del concentrado (33) y el lavado de los AGL con ácido sulfúrico al 1% disminuye el contenido de EC hasta un nivel indetectable por técnicas altamente sensibles como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) (33, 51).

Algunas alternativas al proceso de concentración con urea son la cristalización fraccionada a baja temperatura (winterización) o el fraccionamiento por fluidos supercríticos. La winterización consiste en la separación de los AG según su punto de fusión, a través de la cristalización parcial del aceite seguida de un proceso de filtrado. Este proceso es utilizado a nivel industrial en la refinación y concentración de aceite de pescado (53). El

fraccionamiento por fluidos supercríticos es otra técnica que ha ganado interés por parte de los investigadores, ya que presenta numerosas ventajas como, por ejemplo, condiciones moderadas para la reacción, utilización de ambientes libres de oxígeno y obtención de productos de alta pureza. Sin embargo, su principal desventaja es el costo asociado al proceso, lo cual limita su uso a nivel industrial (51, 53).

Por otra parte, investigadores como Vázquez *et al.* han estudiado un proceso alternativo para realizar el fraccionamiento por aductos de urea, evaluando la eficacia del proceso en aceite hidrolizado de *E. plantagineum*, salmón y de microalgas, reemplazando el alcohol y el hexano por solventes que, además de ser amigables con el medio ambiente y de bajo costo, sean de volatilidad intermedia, polaridad equivalente, estables y sin grupo etilo en su estructura. Para esto, utilizaron ácido propiónico en combinación con limoneno, anisol o  $\alpha$ -pineno en reemplazo del hexano (50), obteniendo como resultados la nula formación de EC y FC de GLA, ALA y SDA similares a los observados en el proceso tradicional, además de buen rendimiento en la reutilización de los solventes.

## **7.2 Desarrollo del proceso de esterificación enzimática.**

Para efectuar la esterificación enzimática, en este estudio se utilizaron como sustratos el glicerol y un concentrado de AGL proveniente de *E. plantagineum*, y se ensayaron alternativamente dos enzimas inmovilizadas para evaluar su desempeño en la síntesis de los 1,3-DAG de interés.

El glicerol o propanotriol es un producto de elevada viscosidad a temperatura ambiente (1,414 Pa·s), lo que afecta la transferencia de masas durante la síntesis y dificulta el desarrollo de la reacción (6, 28, 30). Para solucionar este problema algunos investigadores han agregado solventes al medio de reacción con buenos resultados (23, 49). Otra opción para disminuir la viscosidad es el aumento de la temperatura. Este método, además, de ser amigable con el medio ambiente, evita la generación de residuos y disminuye los riesgos asociados al uso de solventes (6, 23, 28).

El aumento de la temperatura hasta los 60°C es seguro, ya que la viscosidad disminuye lo suficiente (0,082 Pa·s) para el desarrollo de la síntesis y temperaturas superiores podrían afectar la actividad enzimática (24). No obstante, si el contenido de glicerol es muy alto, la viscosidad y la polaridad aumentan, disminuye la transferencia de masas, la lipasa es

fácilmente depositada al fondo del matraz, se dificulta la mezcla de los sustratos y finalmente, se reduce el rendimiento del proceso de esterificación. (24).

Las enzimas evaluadas en la síntesis de 1,3-DAG con contenido principal de GLA, ALA y SDA, fueron las lipasas o glicerol-éster hidrolasas Lipozyme® RM-IM y Lipozyme® 435, utilizadas previamente en estudios donde se sintetizaron LE de similares características (6, 23, 25, 45, 48, 50).

En 1998 Arcos *et al.* estudiaron la formación de DAG a través de la esterificación de glicerol y LA conjugado utilizando Lipozyme® RM- IM (23). Posteriormente Rosu en 1999, utilizó la misma lipasa para evaluar la incorporación de LA y ácido oleico (OA) (entre otros) a una molécula de DAG (45). Recientemente, se ha investigado la incorporación de OA, LA y AGS a un DAG estructurado (24, 25). Yüksel en 2017 utilizó esta enzima para evaluar la incorporación de AG de cadena media en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 en el esqueleto de glicerol y SDA en la posición *sn*-2 con resultados promisorios (46). Si bien, existe gran cantidad de estudios que avalan la capacidad de Lipozyme® RM- IM para la síntesis de DAG y otros LE, también existe evidencia de la utilidad de la enzima Novozyme® 435 (24, 42). Vázquez *et al.* en 2016, evaluaron la incorporación de AG de cadena media y corta a 1,3-DAG con Lipozyme® RM- IM y Novozyme® 435, siendo esta última la que entregó mejores resultados (28). Es relevante mencionar que Novozyme® 435 y Lipozyme®435 son obtenidas de *Candida antarctica* y son inmovilizadas en Lewatit VP OC 1600 (28, 46).

Si bien el bajo rendimiento de la enzima Lipozyme® RM-IM, coincide con lo reportado por Tangkam *et al.* en 2018 (48), se ha descrito su efectividad en la síntesis de 1,3-DAG mediante esterificación enzimática, alcanzando una productividad superior al 80% con ácido cáprico y ácido caprílico (50). En otros experimentos donde se utilizó LA como sustrato (23, 25, 50), el tiempo transcurrido para que la reacción alcanzara resultados óptimos fue de 8 horas, con lo que se obtuvo un 69% de rendimiento (53). Zhong y su equipo, en 2013, obtuvieron un rendimiento de 80% a las 3 horas de reacción, utilizando LA y glicerol como sustratos (25).

Por otra parte, el material de inmovilización de la enzima Lipozyme® RM-IM es hidrofílico, a diferencia del soporte de Lipozyme® 435 que es hidrofóbico. Esto podría

provocar que el glicerol, molécula polar, interactúe con el sitio activo de la enzima Lipozyme® RM-IM y afecte el rendimiento de la reacción, disminuyéndolo (24).

Finalmente, en esta investigación, la enzima Lipozyme® 435 demostró mayor rendimiento en menor tiempo y mayor afinidad por GLA, ALA y SDA, incorporándolos de manera homogénea.

De acuerdo con los análisis realizados, la prueba ANOVA evidenció que la influencia de las variables fue, en orden decreciente: relación molar, tiempo y por último la carga enzimática (49,8; 32,7 y 17,5% respectivamente), lo cual coincide con lo reportado por el análisis del Método de Taguchi y los valores de la razón S/R.

Durante el desarrollo de la reacción a menor escala se pudo apreciar que la CE de 10% afectó la miscibilidad de los reactantes, ya que existió mayor dificultad en la agitación de los reactivos y tendencia a la aglomeración, situación que pudo verse facilitada por el equipo utilizado (Reacti-Therm III) y la forma de los viales (fondo cónico). De acuerdo con Meng, los sitios hidrofóbicos de la molécula se atraen debido a su polaridad, fenómeno favorecido por la ausencia de solventes en el medio de reacción, disminuyendo así la transferencia de masas o los sitios activos de la enzima (24).

Los resultados experimentales indican que la observación que exhibe la menor producción de 1,3-DAG (Obs.6) muestra, además, una de las mayores proporciones de AGL. No obstante, a pesar de la baja tasa de conversión, esta combinación de variables evidencia formación de MAG y TAG (CE 10 %, 4 horas y RM 1:2).

En cuanto a las proporciones de las fracciones lipídicas producidas en la reacción, (sin considerar los AGL), las observaciones 1, 2 y 3 evidencian algunas de las mayores proporciones de MAG, así como también los menores rendimientos en la reacción de esterificación. De esto se puede inferir que el tiempo de reacción fue insuficiente y que probablemente ésta requería de mayor tiempo para la formación de los DAG. Por otra parte, si bien la Obs. 8 (CE 6%, 6 h y RM 1:2) fue la alternativa que generó mayor contenido final de 1,3-DAG, también fue la alternativa que presentó mayor producción de MAG, así como el valor superior en la suma de MAG y TAG. Asimismo, las observaciones que presentan mayor proporción de TAG (de los productos de reacción) son aquellas que corresponden al nivel 3 de la CE (10%). Por último, la mayor proporción de TAG se observó en la corrida 9.

La elevada proporción de MAG y TAG como productos de reacción en dichas combinaciones de variables sugiere que el aumento en la CE y el aumento en el tiempo transcurrido para la reacción podrían incrementar la acil-migración, favoreciendo la formación de TAG (24, 25). Finalmente, si bien el contenido de MAG varía en las distintas observaciones, todas muestran acumulación inicial de 1,3-DAG, lo que indica especificidad de la enzima (24).

Luego de la realización de los ensayos con la combinación de variables óptimas, según el Método de Taguchi (Obs.10), se comparó con las observaciones con mejores resultados (Obs. 4 y 8) y se determinó que la Obs. 4 fue la más conveniente ya que, obtuvo mayor porcentaje de 1,3-DAG de los productos de reacción, además de requerir menor tiempo para la síntesis (**Anexo 18**). Si bien una de las consideraciones para la elección de la combinación de variables tenía que ver con la producción de MAG y su influencia en la proporción final de 1,3-DAG, al escalar la síntesis, se observó una significativa disminución en la producción de MAG y, posterior a la purificación, se pudo observar que la saponificación suave es efectiva para retirar los productos de mayor polaridad como los AGL y los MAG. En experimentos similares, para la purificación de los productos buscados en la reacción se han utilizado métodos como la destilación corta (6), destilación molecular y cromatografía de columna (33). No obstante, para la destilación molecular son necesarias elevadas temperaturas, lo que puede dañar las moléculas de AG y la cromatografía de columna requiere de la utilización de solventes y un prolongado tiempo de procesamiento (51).

Finalmente, se observó que el procedimiento empleado para la producción de 1,3-DAG con la incorporación de GLA, ALA y SDA como AG principales fue efectivo, así como también se observó que la saponificación es un método seguro, económico y rápido para aumentar la pureza y concentración de los productos de interés.

### **7.3 Modelos de producción de diacilglicéridos a través de catálisis enzimática.**

#### **7.3.1 Otros modelos de producción de diacilglicéridos a escala de laboratorio.**

Como fue mencionado en la sección 3.4 (Tabla 1), existen distintas vías para la producción de 1,3-DAG (6).

La técnica utilizada en este estudio fue la esterificación enzimática en un sistema libre de solventes. Estos últimos, generalmente son empleados para disminuir la viscosidad en el medio de reacción y mejorar la transferencia de masas (28).

Lipozyme® RM-IM fue la lipasa de elección para Watanabe en 2001, donde logró un rendimiento mayor al 80% en la producción de 1,3-DAG utilizando hexano como solvente (25°C, 4,2% de carga enzimática, relación molar de 2/1 de AGL/glicerol, durante 8 horas), en un sistema de vacío. Si bien este es un resultado auspicioso, otros investigadores como Tripathi *et al.* en 2006 alcanzaron un rendimiento de 33% utilizando una temperatura de 55°C, 5% de carga enzimática basado en el peso del aceite, relación molar de 2/1 (AGL/glicerol) durante 72 horas utilizando hexano (23).

Lipozyme® 435 también ha sido utilizada en presencia de solventes, como *t*-butanol y CO<sub>2</sub> expandido más acetona, obteniendo en ambas condiciones un rendimiento cercano al 40% (23).

En otros diseños experimentales, en presencia o ausencia de solventes, se agregó sílice en gel, para evitar la interacción de la enzima con el glicerol (sustrato polar), y así incrementar el rendimiento de síntesis de DAG (19, 23, 28). Sin embargo, el rendimiento en estas condiciones (60%) fue inferior a lo obtenido luego del proceso de optimización en esta investigación (23, 28).

A pesar de las ventajas que podrían significar la incorporación de solventes o la utilización de gel de sílice, estas involucran pasos adicionales en la síntesis lo que significa un aumento en el tiempo y la dificultad en el trabajo, lo cual podría impactar negativamente en los resultados (6, 19).

Otros métodos de obtención de 1,3-DAG, como la glicerólisis enzimática, además de las lipasas, utiliza glicerol y aceite en lugar de AGL para la producción de estos LE. Si bien el rendimiento de la síntesis podría ser menor que en el proceso de esterificación, la industria del biodiesel genera grandes cantidades de glicerol que pueden ser utilizadas como materia prima en la producción de DAG, lo cual significa una reducción importante en los costos. Esta metodología presenta inconvenientes similares a los observados en la esterificación enzimática, relacionados con la miscibilidad de los sustratos, polaridad y viscosidad del glicerol y la transferencia de masas (19).

La hidrólisis enzimática parcial utiliza enzimas, aceite y agua para el proceso de síntesis, teniendo el área interfacial lípido-agua un efecto significativo en el rendimiento de la síntesis. Durante el proceso de hidrólisis se forma continuamente glicerol. Este no puede ser removido por sistema de vacío y además es polar, lo que podría causar la inhibición parcial de la actividad enzimática (19). Por otra parte, la incorporación de emulsionantes y la velocidad de agitación pueden mejorar la transferencia de masas y ser claves en el rendimiento de la síntesis (23), sin embargo, el emulsionante es de difícil remoción (6) y una velocidad de agitación muy elevada puede dañar las enzimas (23).

Por otra parte, el biorreactor de tanque agitado permite la síntesis enzimática a mayor escala. Al igual que en modelos de laboratorio, se observó que la velocidad de agitación de la mezcla es un factor relevante para aumentar el área interfacial entre los reactantes y así mejorar la transferencia de masas, ya sea a través de agitación mecánica o magnética. Sin embargo, a pesar de que una elevada velocidad de mezcla es favorable por la formación de emulsiones que disminuyen el tamaño de las partículas, la enzima se puede desnaturalizar. Si bien el biorreactor de tanque agitado es un modelo versátil que aumenta la tasa de conversión y es de fácil mantenimiento, solo es utilizado para estudios preliminares y no representa una alternativa de producción industrial (23).

### **7.3.2 Producción a escala industrial.**

Para replicar el proceso de catálisis enzimática a nivel industrial se deben tener en consideración variables como la estabilidad de la enzima, aumento en la eficiencia de la reacción en cuanto a producción y calidad y disminución en costos e inversión (23). Si bien la utilización de enzimas en la industria alimentaria está en permanente desarrollo, en la industria de grasas y aceites aún es exigua (18).

El reactor de lecho empacado es el más utilizado a nivel industrial para la producción de DAG. Éste presenta bajo costo de construcción y funcionamiento y hace posible la reutilización de la enzima. No obstante, se han reportado bajas tasas de transferencia de masa interna y externa, desarrollo de gradientes de calor dentro de la columna del lecho, distribución desigual del flujo, contaminación de la enzima durante el proceso y caída de presión significativa (23, 47). Sugiura *et al.* (2002) demostraron que la reacción de esterificación catalizada por la lipasa Lipozyme® TL-IM entre el glicerol y OA, utilizando

vacío para la eliminación del agua producida en la reacción, es capaz de producir DAG con un 66% de rendimiento en un corto intervalo (120 s).

Por otra parte, se ha estudiado la producción industrial de 1,3-DAG a través de un biorreactor de columna de burbujas de aire en relación con el rendimiento del biorreactor de columna de burbujas de nitrógeno, con el objetivo de disminuir tanto riesgos para los operarios como costos de producción. Los riesgos que se asocian al manejo del nitrógeno incluyen síntomas y signos como debilidad, inconsciencia, sofocos e incluso muerte (25). Entre las principales ventajas del biorreactor de columna de burbujas se puede mencionar un elevado coeficiente de transferencia de calor y de masa, bajo capital de inversión y mantenimiento, posee pocas partes móviles y su manejo es de baja complejidad (19, 23, 25). El biorreactor de columna de burbujas determina la transferencia de calor y masa en función de la tasa de aspersion del gas. Zhong y su equipo emplearon este método evaluando la producción de LE con las enzimas Lipozyme® RM-IM, Lipozyme® TL-IM (*Thermomyces lanuginosus*) y Novozyme® 435 y la incorporación de ácido láurico (dodecaenoico) a la molécula de 1,3-DAG donde observó que la obtención de éstos alcanzó su máximo rendimiento a las 4 h, produciéndose de manera simultánea un aumento de 1,2-DAG. Pudo observar, además, que no hubo diferencias estadísticamente significativas para las enzimas Novozyme® 435 y Lipozyme® RM-IM y que el mayor incremento en la producción se presentó con una CE de 3 a 5 %. Asimismo, al evaluar la actividad de la lipasa se observó que esta alcanzó un 80,2% de rendimiento luego de 10 reacciones sucesivas. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la incorporación de ácido láurico entre el procedimiento con nitrógeno y con aire.

Guo *et al.* en el año 2007 emplearon un biorreactor de columna de burbujas de nitrógeno al vacío para sintetizar 1,3-DAG en un sistema libre de solventes, utilizando la enzima Novozyme® 435 y ácido linoleico conjugado. Los resultados obtenidos, en condiciones óptimas, arrojaron un rendimiento en la producción de 1,3-DAG de hasta un 93%, donde, al ampliar la reacción hasta 100 g de 1,3-DAG, logró un 90,7% de producción; resultados prometedores para escalar el proceso a nivel industrial (23).

En el reactor de membrana la reacción enzimática ocurre de manera simultánea a la separación de las fases orgánica y acuosa, a través de una membrana sólida donde la biocatálisis ha sido inmovilizada. Las principales ventajas del sistema reactor de membrana

son la posibilidad de producción continua de acilglicéridos parciales, la separación de fases y la resistencia a la transferencia de masas es relativamente baja. Entre los inconvenientes se encuentran el costo de las membranas y la necesidad de su reemplazo regular.

Trabajos anteriores evaluaron la adopción de reactor de membrana hidrofóbica con una lipasa inmovilizada para estudiar la reacción de esterificación entre el glicerol y OA y LA (23). Los sustratos de la reacción AG y solución de glicerol-agua-lipasa se separaron por una capa de membrana y alimentaron continuamente el sistema de reactor de membrana. Como resultado se obtuvo una conversión del 90 % en condiciones óptimas, concentraciones equimolares de MAG y DAG y una cantidad insignificante de TAG (23). Teóricamente, el sistema de reactor de membrana es una configuración aceptable. Sin embargo, se deben realizar más estudios antes de que la aplicación real sea factible.

#### **7.4 Potenciales beneficios en la salud del consumo de 1,3-diacilglicéridos y de los ácidos grasos $\alpha$ -linolénico, $\gamma$ -linolénico y estearidónico.**

La característica principal del aceite de semilla de *E. plantagineum*, es una composición lipídica equilibrada en cuanto a su contenido de SDA y GLA (33, 34). Aunque existen otras especies y otras familias de plantas que también contienen estos AG (**Anexo 3**), estos no se encuentran en proporciones similares entre sí. Además, *E. plantagineum* o viborera, planta del género *Echium* de la familia *Boraginaceae*, ha sido referenciada como una de las mayores fuentes comerciales de SDA y GLA, cuyo perfil concuerda con el perfil de AG observado (4, 33, 50).

EPA y DHA son precursores de mediadores lipídicos con actividad antiinflamatoria (**Anexo 4**) con efectos positivos sobre la salud cardiovascular, neurológica, en sistemas metabólicos alterados como la DM II o la dislipidemia, en enfermedades degenerativas y enfermedades inflamatorias (38), por lo que su consumo tiene un rol protector relevante.

Si bien la principal fuente de EPA y DHA son las fuentes marinas como pescados, mariscos y algas, existen barreras para su consumo como la preocupación por la sostenibilidad de la industria, la contaminación por metales pesados (16), dioxinas y microplásticos (6), factores económicos, la geografía (4) e incluso síntomas gastrointestinales (38).

Las algas, aunque buenas fuentes de AGPI n-3, presentan la desventaja de no poseer características uniformes en cuanto a su composición lipídica, ya que esta depende de la estación del año en que son cosechadas, la profundidad del cultivo y la etapa de maduración

de la planta (4, 33). Por otra parte, la estabilidad de los aceites marinos ricos en AGPI de cadena muy larga se ve afectada por su elevado grado de insaturación (34).

Estas dificultades podrían ser superadas con el concentrado de aceite de semillas de *Echium*, debido a que es una planta terrestre que produce un aceite de semilla con una composición estable y señalada como una de las mejores fuentes de los AG seleccionados (33, 34). Además, estos presentan menor grado de insaturación y menor longitud de cadena que los aceites de pescado, lo cual, en caso de comercialización como nutraceutico, aditivo o aceite comestible, aumentaría su vida de anaquel (4, 33). Sin embargo, la producción de este aceite a nivel industrial es escasa, ya que la variabilidad genética de *E. plantagineum* la hace difícil de domesticar, además presenta una baja productividad. Como solución a este problema se ha desarrollado, de manera experimental, la soya transgénica cuyo contenido y producción de aceite de SDA es superior (4, 53).

Por su parte, el SDA, como fuera mencionado, es un AG de la serie n-3 que prescinde de la enzima limitante  $\Delta 6D$  para la formación de EPA. La ingesta de SDA presenta distintas propiedades terapéuticas asociadas a una conversión más eficiente a este AG que la del ALA, aproximadamente 4 veces mayor (34). Esta afirmación indicaría que la actividad de la enzima  $\Delta 5D$  y de las elongasas es eficiente, ya que al evaluar los niveles plasmáticos de SDA posteriores a su administración, estos se han observado estáticos (4, 34). No obstante, mientras la proporción de EPA aumenta, el DHA se mantiene estable, lo que podría indicar que la actividad de la  $\Delta 6D$  no mejora con la administración de SDA, sino que da señales de que la actividad limitante de esta enzima puede también afectar la conversión del AG tetracosapentaenoico (24:5 n-3) a tetracosahexaenoico (24:6 n-3) en el retículo endoplasmático antes de la  $\beta$ -oxidación en el peroxisoma (4, 34).

Se ha descrito que el SDA proveniente de aceite de *E. plantagineum* es capaz de mejorar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad y a la enfermedad hepática no alcohólica y es capaz de modular procesos inflamatorios y la respuesta inmune. Asimismo, se ha observado que estimula el desarrollo visual y cerebral en niños, disminuye las enfermedades degenerativas asociadas a la vejez y modula la depresión y desórdenes del estado de ánimo (4,54). Además, se ha descrito su función como precursor de mediadores lipídicos antiinflamatorios, atenuando la función de la 5 lipooxigenasa, aunque es menos eficiente que el DGLA, derivado del GLA (4, 41).

En cuanto al uso de GLA se han observado resultados prometedores en ensayos clínicos realizados en paciente crítico, asma y marcadores de la inflamación, aunque sin resultados concluyentes, ya que el diseño experimental ha sido cuestionado por bajo número de sujetos de estudio o por la administración simultánea con AG de la serie n-3 (34, 41). Sin embargo, de acuerdo con Sergeant, la administración de EPA y DHA en conjunto con GLA, inhiben la formación de ácido araquidónico (AA) desde DGLA. Este último, comparte el depósito de AG con el AA, compite por la formación de eicosanoides, inhibe la agregación plaquetaria, se ubica en la membrana fosfolipídica y, además, puede ser incorporado a glicerolípidos. Luego de la activación celular, puede ser liberado por la Fosfolipasa A2 y convertido vía enzimática a metabolitos antiinflamatorios (41).

Por otra parte, se han realizado estudios a corto y largo plazo sobre los efectos del consumo de 1,3-DAG sin observarse consecuencias negativas (21, 54). Existen distintos estudios en los que se ha administrado DAG en una sola dosis para evaluar efectos a corto plazo en matrices como aceite, mayonesa o emulsión, observándose disminución en TAG séricos, en quilomicrones y su tamaño y en lipoproteínas ricas en TAG. Estos efectos se han observado entre las 2 y 8 h posteriores a la ingesta, las cuales han sido entre 10 g y 44 g/día (53). Además, de acuerdo con lo señalado en revisiones realizadas por Yanai (21) y Takase (54), se han realizado estudios a largo plazo entre 12 semanas y hasta dos años de duración con dosis controladas y *ad libitum*, observándose que la administración diaria de 10 g de DAG favorece la disminución de peso, de grasa visceral, abdominal y total en sujetos sanos; la disminución de la hemoglobina glicosilada en diabéticos y la disminución de las lipoproteínas VLDL y aumento de las HDL en pacientes sujetos a hemodiálisis (54). En otro estudio se evaluaron los efectos del consumo de entre 34 y 56 g de DAG (dependiente de la ingesta calórica total) en 24 semanas, observándose disminución de peso y grasa corporal total en sujetos con sobrepeso y obesos (21, 54). En dos estudios con consumo de DAG *ad libitum*, durante 9 y 24 meses, se observó disminución en la circunferencia de cintura, índice de masa corporal, factores de riesgo cardiovascular y aumento en los niveles de HDL (53).

Los DAG han sido aprobados por la FDA para su uso como aceite para cocinar, para untar, como ingrediente en aderezos para ensaladas, mayonesa, bebidas y productos de panadería (6). En Chile, el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) no especifica un límite para

DAG (o MAG) en alimentos, sino que recomienda su uso de acuerdo con Buenas Prácticas de Fabricación (Art. 147) (55).

En cuanto a su posible utilización como alimento se define como aceite de DAG cuando este componente se encuentra en un porcentaje igual o mayor al 80%, sin embargo, su uso más común en los sistemas alimentarios es como aditivo alimentario con función emulsionante (4, 5, 6) en productos de panadería, pastelería, elaboración de chocolates, embutidos, lácteos, helados y, en general, en la mayor parte de los alimentos que requieran estabilizar mezclas homogéneas que involucren aceite y agua (23). Igualmente, se ha observado que puede mejorar la estabilidad oxidativa en emulsiones O/W, ya que posee excelentes propiedades de retención de agua (6). Mori *et al.* utilizaron DAG para freír papas, pollo y donas, encontrando menor contenido de agua en el producto final, ampliando su vida de anaquel. Se han observado buenos resultados con un leve aumento de la viscosidad en mayonesa (O/W) (5, 23) y Miklos *et al.* en 2011, observaron mejoras en la hidratación y en las propiedades de ligación en una emulsión de carne (6).

El contenido aproximado de GLA, ALA y SDA por cada gramo de la molécula sintetizada equivale a 372,9 mg; 197,5 mg y 330,2 mg respectivamente, de acuerdo con los datos obtenidos empíricamente, por lo que 3 g serían suficientes para cumplir los requerimientos de EPA (33), además de presentar una relación de AGPI n-6/n-3 de 0,88.

Por lo tanto, los beneficios potenciales del consumo de estos 1,3-DAG no se limitan a su composición de AG, sino que también están relacionados con su forma química, por lo que, además de ser empleados en sistemas alimentarios, pueden ser utilizados como un coadyuvante en el tratamiento y prevención de las enfermedades asociadas a la obesidad (41).

## 8. Conclusiones.

La etapa de selección de la enzima arrojó como resultados que la lipasa Lipozyme® RM-IM presentó mayor afinidad por LA y ALA y menor rendimiento de síntesis de 1,3-DAG en las condiciones iniciales de tratamiento, por lo cual fue descartada para la etapa de optimización. Por el contrario, la lipasa Lipozyme® 435 fue más eficiente en la producción de 1,3-DAG y además mostró mayor afinidad, en orden decreciente, por SDA, GLA y ALA, ajustándose a los objetivos de la investigación.

En el análisis realizado en la etapa de optimización del proceso de síntesis enzimática se observó que la relación molar fue el factor más influyente de los tres ensayos de acuerdo con el Método de Taguchi. En contraste, el factor menos influyente fue la carga enzimática. Además, el aumento de ésta demostró menor rendimiento en todas las reacciones, aglomeración de la enzima y mayor producción proporcional de MAG y TAG. Resultados similares se observaron al aumentar el tiempo de reacción. Al escalar el procedimiento la replicabilidad de los resultados fue adecuada, ya que no se observaron diferencias significativas en las distintas fracciones lipídicas producidas en la reacción, excepto por una menor formación de MAG en el procedimiento a mayor escala donde se utilizó vacío para retirar el agua formada durante la reacción. Si bien el contenido de MAG fue considerado al momento de determinar la combinación de variables, la saponificación los arrastró parcialmente de la mezcla de acilglicéridos, así como también retiró los AGL.

Finalmente, fue posible obtener un aceite DAG, con 68% de 1,3-DAG y 20% 1,2-DAG del total de los productos de reacción, con un contenido promedio de 30,8% de GLA, 21,3% de ALA y 37,1% de SDA, por lo que se puede afirmar que, a escala de laboratorio, es posible obtener 1,3-DAG como productos mayoritarios de la reacción de esterificación enzimática usando la lipasa regioespecífica Lipozyme® 435 como biocatalizador y empleando como sustratos un concentrado de ALA, GLA y SDA derivado del aceite de semilla de *E. plantagineum* y glicerol.

Considerando el uso que hasta el momento se ha dado a los DAG, y los prometedoros resultados obtenidos en estudios donde se han evaluado las propiedades organolépticas y aceptabilidad por parte de los consumidores, considero que las matrices alimentarias ideales para la incorporación de los 1,3-DAG serían aquellas con elevado aporte calórico y lipídico como, por ejemplo, mantequillas, mayonesas, aderezos, confitería y chocolatería.

## **9. Publicación.**

Este trabajo de tesis generó la publicación de un artículo en la revista Food Science and Technology (LWT) en diciembre de 2022, citado a continuación:

Cifuentes C, Valenzuela R, Akoh C, Guil J, Rincón M. “Lipase-catalyzed synthesis of 1,3-diacylglycerols containing stearidonic,  $\gamma$ -linolenic and  $\alpha$ -linolenic acids in a solvent-free system”. LWT. 2022; 170: 1-7.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114107>.

## **10. Financiamiento.**

Este trabajo de tesis ha sido financiado por el proyecto "Síntesis enzimática de 1,3-diglicéridos con ácidos grasos gamma-linolénico y estearidónico y evaluación de sus propiedades antiinflamatorias en un modelo de obesidad en ratón" (ENL13/20), adjudicado por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile.

## 11. Referencias

1. Valenzuela R, Valenzuela A. Overview about lipid structure. In Valenzuela R. Ed. Lipid Metabolism. Intech Open. 2012:1-19.
2. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta. Madrid: FESNAD, 2015.
3. Valenzuela A, Sanhueza J. Estructuración de lípidos y sustitutos de grasas, ¿lípidos del futuro? Rev Chil Nutr. 2008; 35: 394-405.
4. Prasad P, Anjali P, Sreedhar R. Plant-based stearidonic acid as sustainable source of omega-3 fatty acid with functional outcomes on human health. Crit Rev Food Sci Nutr. 2021; 61: 1725–1737.
5. García M, Gallegos J, González R. Organogeles como mejoradores del perfil lipídico en matrices cárnicas y lácteas. Ciencia UAT. 2019; 14:121-132.
6. Lee Y, Tang T, Phuah E, Tan C, Wang Y, Li Y, *et al.* Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020; 60: 2509-2525.
7. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Consultado el día 1 de octubre de 2021.
8. Encuesta Nacional de Salud (ENS). Departamento de Epidemiología División de Planificación Sanitaria Subsecretaría de Salud Pública. Santiago: MINSAL, 2017.
9. Rodríguez I, Valderrama P. Sedentary lifestyle and obesity in pediatrics: the other pandemic. Rev Chil Nutr. 2017; 44: 3.
10. Fastenau J, Kolotkin R, Fujioka K, Alba M, Canovatchel W, Traina S. A call to action to inform patient-centred approaches to obesity management: Development of a disease-illness model. Clin Obes. 2019; 9: 1-10.
11. Muzzo S, Monckeberg F. Reflexiones sobre el aumento de la obesidad en Chile. Rev Chil Nutr. 2012; 39 :113-115.
12. Müller R. Psychische Folgeprobleme der Adipositas.Übersichtsarbeiten. Consecuencias psicológicas de la obesidad. Reseña. Therapeutische Umschau. 2013; 70: 87–91.

13. Rojas D, Figueras F, Durán S. Ventajas y desventajas nutricionales de ser vegano o vegetariano. *Rev Chil Nutr.* 2017; 44: 1-10.
14. García E, Gallego A, Vaquero M. Are vegetarian diets nutritionally adequate? A revision of the scientific evidence. *Nutr Hosp.* 2019; 36:950-961.
15. Villasante S, Carballo C, Penela A. The sustainability of fisheries: theoretical foundations and analysis within the framework fisheries policy. *Revista Galega de Economía.* 2006; 15: 1-27.
16. Raimann X, Rodríguez L, Chávez P, Torrejón C. Mercury in fish and its importance in health. *Rev Med Chile.* 2014; 142: 1174-1180.
17. Yusà V, Dualde P, Pardo O, Coscollà C, López A, Fernández S. Evaluación de la exposición a contaminantes alimentarios y ambientales mediante biomonitorización humana en la Comunitat Valenciana. Valencia: Fisabio, 2020.
18. Ferreira S, Sandoval G, Plou F, Valero F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *E J Biotechnol.* 2013; 16:1-38.
19. Guo Y, Cai Z, Xie Y, Ma A, Zhang H, Rao P, *et al.* Synthesis, physicochemical properties, and health aspects of structured lipids: A review. *Rev Food Sci Food Saf.* 2020; 19:759–800.
20. Zhao X, Sun Q, Qin Z, Liu Q, Kong B. Ultrasonic pretreatment promotes diacylglycerol production from lard by lipase-catalysed glycerolysis and its physicochemical properties. *Ultrason Sonochem.* 2018; 48: 11–18.
21. Yanai H, Tomono Y, Ito K, Furutani N, Yoshida H, Tada N. Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome. *Nutrition J.* 2007; 43:43-49.
22. Wenzl T, Samaras V, Giri A, Buttinger G, Karasek L, Zelinkova Z. Development and validation of analytical methods for the analysis of 3-MCPD (both in free and ester form) and glycidyl esters in various food matrices and performance of an ad-hoc survey on specific food groups in support to a scientific opinion on comprehensive risk assessment on the presence of 3-MCPD and glycidyl esters in food. *EFSA Supporting Publication.* 2015. 778:1-78.

23. Phuah E, Tang T, Lee Y, Choong T, Tan C, Lai O. Review on the Current State of Diacylglycerol Production Using Enzymatic Approach. *Food Bioprocess Technol.* 2015; 8:1169–1186.
24. Meng Z, Lu S, Geng W, Huang J, Wang X, Liu W. Preliminary Study on Acyl Incorporation and Migration in the Production of 1,3-diacylglycerol by Immobilized Lipozyme RM IM-catalyzed Esterification. *Food Sci Technol.* 2014; 2: 175-182.
25. Zhong N, Gui Z, Xu L, Huang J, Hu K, Gao Y, *et al.* Solvent-free enzymatic synthesis of 1, 3-Diacylglycerols by direct esterification of glycerol with saturated fatty acids. *Lipids Health Dis.* 2013; 12:1-7.
26. Center for Food Safety and Applied Nutrition. GRAS Notice for Alpha-Linolenic Acid Diacylglycerol (ALA DAG) Oil for the Addition to Finished Food. Washington DC: Food and Drug Administration (FDA), 2020.
27. Gómez S, Vivó M, Soria E. Pruebas de significación en Bioestadística. *Rev Diagn Biol* vol. 2001; 50: 207-218.
28. Vázquez L, González N, Reglero G, Torres C. Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of diacylglycerols as low-calorie food ingredients. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016; 4:1-10.
29. Liu N, Wang Y, Zhao Q, Zhang Q, Zhao M. Fast synthesis of 1,3-DAG by Lecitase Ultra-catalyzed esterification in solvent-free system. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011; 113:973-979.
30. Flickinger B, Matsuo N. Nutritional characteristics of DAG oil. *Lipids.* 2003; 38:129–32.
31. Hibi M, Takase H, Yasunaga K, Yamaguchi T, Shiiba D, Saito S, *et al.* Greater fat oxidation with diacylglycerol oil consumption for 14 days compared with triacylglycerol oil consumption in overweight men and women. *Int J Obesity.* 2008; 32:1841–1847.
32. Zheng J, Wang L, Lin M, Yang H, Li D. BMI status influences the response of insulin sensitivity to diacylglycerol oil in Chinese type 2 diabetic patients. *Asia Pac J Clin Nutr* 2015; 24:65-72.
33. Rincón MA, 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; 120: 1800208-1800213

34. Guil JL, Rincón MA, Venegas E. Gamma linolenic and stearidonic acids: Purification and upgrading of C18 PUFA oils. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2010; 112:1068 – 1081.

35. Kitessa S, Nichols P, Abeywardena M. Purple viper's Bugloss (*Echium plantagineum*) seed oil in human health. Chapter 112: 951-958.

36. 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: 297-300.

37. Guil J, Gómez F, Ramos R, Rincón M, Venegas E. Restricted-ranged boraginaceae species constitute potential valuable fatty acids. *JAOCS.* 2014; 91; 301-308.

38. Morales J, Valenzuela R, González D, González M, Tapia G, Sanhueza J, *et al.* New dietary sources of alpha-linolenic acid: a critical view. *Rev Chil Nutr.* 2012; 39:1-9.

39. Won J, Kwon H, Moon S, Chun S, Kim C, Park B *et al.*  $\gamma$ -Linolenic acid versus  $\alpha$ -Lipoic acid for treating painful diabetic neuropathy in adults: a 12-week, double- placebo, randomized, noninferiority trial. *Diabetes Metab J.* 2020; 44:542-554.

40. Balic A, Vlastic D, Zuzul K, Marinovic B, Bukvic Z. Omega-3 versus Omega polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of inflammatory skin diseases. *Int J Mol Sci.* 2020; 21:741.

41. Sergeant S, Rahbar E, Chilton C. Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, eicosanoids and inflammatory processes. *Eur J Pharmacol.* 2016; 785:77- 86.

42. Wang X, Chen Y, Ma Y, Jin Q. Lipozyme® 435 -catalyzed synthesis of eicosapentaenoyl ethanolamide in a solvent-free system. *J Mol Catal B: Enzym.* 2015; 122: 233–239.

43. Khentout A, Kezzar M, Khochemane L. Taguchi optimization and experimental investigation of the penetration rate of compact polycrystalline diamond drilling bits in calcareous rocks. *Int J Technol.* 2019; 10: 226-235.

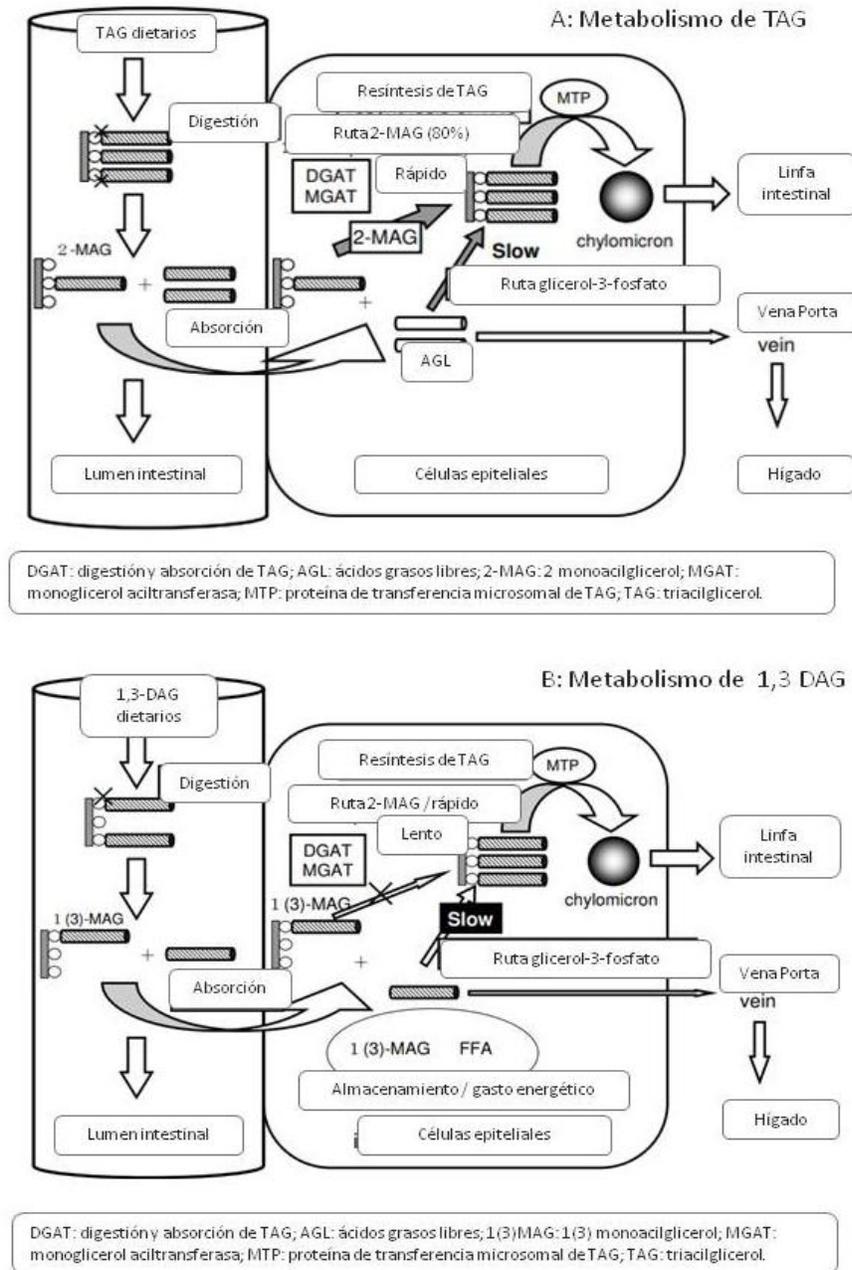
44. Willet S, Akoh C. Application of Taguchi Method in the Enzymatic Modification of Menhaden Oil to Incorporate Capric Acid. *JAOCS.* 2018; 95:299-311.

45. Rosu R, Yasui M, Iwasaki Y, Yamane T. Enzymatic Synthesis of Symmetrical 1,3-Diacylglycerols by Direct Esterification of Glycerol in Solvent-Free System Laboratory of Molecular Biotechnology, Graduate School of Bio- and Agro-Sciences, Nagoya University
46. Yüksel A, Sahin-Yesilcubk N. Use of *Echium* oil fatty acids and tricaprylin as substrates of enzymatic interesterification for the production of structured lipids. *Grasas y aceites*. 2018; 69: e-236.
47. Moreno N, Perea A. Producción de lípidos estructurados por transesterificación enzimática del aceite de soja y aceite de palmiste en reactor de lecho empacado. *Grasas y Aceites*. 2008; 59: 337-345.
48. Tangkam K, Weber N, Wiede B. Solvent-free lipase-catalyzed preparation of diglycerides from co-products of vegetable oil refining, *Grasas y Aceites*. 2008; 59: 245-253.
49. Hita E, Robles A, Camacho B, Ramirez A, Esteban L, JimKénez M. Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipase. *Process Biochem*. 2007; 42: 415–422.
50. Vázquez L, Sánchez M, de la Iglesia L, Reglero G, Torres C. A new urea adducts method for PUFA concentration using green food grade solvents and avoiding ethyl carbamate formation. *Food Chem*. 2022; 392: 133197-133205.
51. Romero J, Rodríguez A, Siche R. Maximizing content of Omega-3 (EPA and DHA) in the process of enzymatic acidolysis of canola oil and concentrated of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in supercritical CO<sub>2</sub> conditions. *Scientia Agropecuaria*. 2015; 6: 313 – 323.
52. Diario oficial de la Unión Europea (DOUE). Directiva 2009/32/CE, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. 2009;141 :3-11.
53. Bonilla J, Hoyos J. Métodos de extracción, refinación y concentración de aceite de pescado como fuente de ácidos grasos omega-3. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria*, 2018; 19:621-644.
54. Takase H. Metabolism of diacylglycerol in humans. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007; 16:398-403.

55. Reglamento sanitario de los alimentos. Santiago (RSA): Jurídica Manuel Montt, 1996.

## **12. Anexos**

## Anexo 1



**Figura Suplementaria 1: Metabolismo de acilglicéridos.**

Adaptado de Lee Y, Tang T, Phuah E, Tan C, Wang Y, Li Y, *et al.* Production, safety, health effects and applications of diacylglycerol functional oil in food systems: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020; 60: 2509-2525.

## Anexo 2

**Tabla Suplementaria 1: Especies de la familia *Boraginaceae* con contenido de GLA, ALA y SDA.**

<b>Especie.</b>	<b>Nombre común.</b>	<b>GLA</b>	<b>ALA</b>	<b>SDA</b>	<b>Referencia</b>
<i>Asperugo procumbens.</i>	Asperilla.	5,4	36,5	11,8	1
<i>Buglossoides arvensis.</i>	Aljófara, mijo de sol.	6,4	39,7	14,1	1
<i>Buglossoides purpureo-caerulea.</i>	Lengua de pedrisca, aljófara derramado.	18,5	33,7	9,2	2
<i>Cerintho minor.</i>	Ceriflor.	9,4	34,6	6,7	3
<i>Echium albicans albicans.</i>	Viborera.	10,0	34,3	10,0	3
<i>Echium albicans frutescens.</i>	Viborera.	10,7	35,9	11,2	3
<i>Echium arenarium.</i>	Viborera.	11,2	25,2	11,3	4
<i>Echium asperrimum.</i>	Viborera.	9,6	35,3	21,1	1
<i>Echium boissieri.</i>	Viborera.	5,5	47,1	14,3	1
<i>Echium cantabricum.</i>	Viborera azul.	11,5	33,6	14,7	3
<i>Echium creticum.</i>	Viborera.	9,7	42,7	14,7	1
<i>Echium gaditanum.</i>	Viborera.	12,4	24,4	10,5	4
<i>Echium humile.</i>	Viborera.	8,0	31,2	5,9	1
	*	10,9	35	15,1	4
<i>Echium lusitanicum.</i>	Viborera.	10,9	33,3	12,3	2
<i>Echium petiolatum.</i>	Viborera.	12,5	36,0	10,8	4
<i>Echium pininana.</i>	Viborera.	17,1	34,5	11,7	3
<i>Echium plantagineum.</i>	Viborera.	10,1	34,2	13	4
<i>Echium ruscicum.</i>	Viborera.	15,8	26,6	10,6	2
<i>Echium sabulicola.</i>	Viborera.	10,9	40,4	14,7	1
	*	11,8	34,1	13,8	4
<i>Echium vulgare.</i>	Viborera.	11,7	34,1	9,7	1
		10,9	39,3	13,3	2
<i>Echium vulgare pustulatum.</i>	Viborera.	10,3	35,6	11,3	3
* <i>Glandora prostrata.</i>	Sanguinaria.	12,8	32,3	9,6	3
<i>Glandora nítida.</i>	Glandora.	19,2	17,0	8,7	3
<i>Lappula pátula.</i>		5,4	40,0	13,6	3
<i>Lithodora maroccana.</i>	Sanguinaria, zamarilla.	20,2	23,2	8,2	4
<i>Lithospermum incisum.</i>	Puco, semilla de piedra de hoja.	5,5	34,0	11,0	2
<i>Lithospermum latifolium.</i>	Semilla de piedra de hoja.	23,9	27,4	8,2	2
<i>Myosotis alpina.</i>	Nomeolvides alpina.	4,4	18,0	8,4	1
<i>Myosotis arvensis.</i>	Nomeolvides de campo.	4,1	14,8	7,0	2
<i>Myosotis secundae.</i>	Nomeolvides.	12,2	15,6	4,3	1
<i>Myosotis traversii cantábrica.</i>	Nomeolvides.	10,8	12,3	8,7	1
<i>Nonea lútea.</i>	Chupamieles.	12,7	16,4	5,2	3
<i>Nonea vesicaria.</i>	Lauda blanca, hierba del traidor.	9,4	13,9	4,9	1
<i>Onosma caucásica.</i>	Pulmonaria.	8,0	37,1	9,4	3
<i>Onosma rígida.</i>	Pulmonaria.	8,1	40,3	6,2	3
<i>Onosma tricerisperma granatensis.</i>	Pulmonaria.	8,2	23,2	6,1	3

Valores expresados como porcentaje del total de AG. \*: Valores promedio.

1. Guil J, García F, Gimenez A. Fatty acid profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of  $\gamma$ -linolenic acid. *JAOCS*. 2001; 78: 677–684.

2. Guil J, García F, Vilches-Ferrón M, López-Alonso D. Gamma-linolenic acid from fourteen boraginaceae species. *Ind. Crops Prod.* 2003; 18: 85-89.
3. Guil J, Gómez F, Ramos R, Rincón M, Venegas E. Restricted-ranged boraginaceae species constitute potential valuable fatty acids. *JAOCs.* 2014; 91; 301-308.
4. Guil J, López J, Gómez F, Campra P. Gamma-linolenic acid and stearidonic acids from Moroccan Boraginaceae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006; 108: 43–47.

### Anexo 3

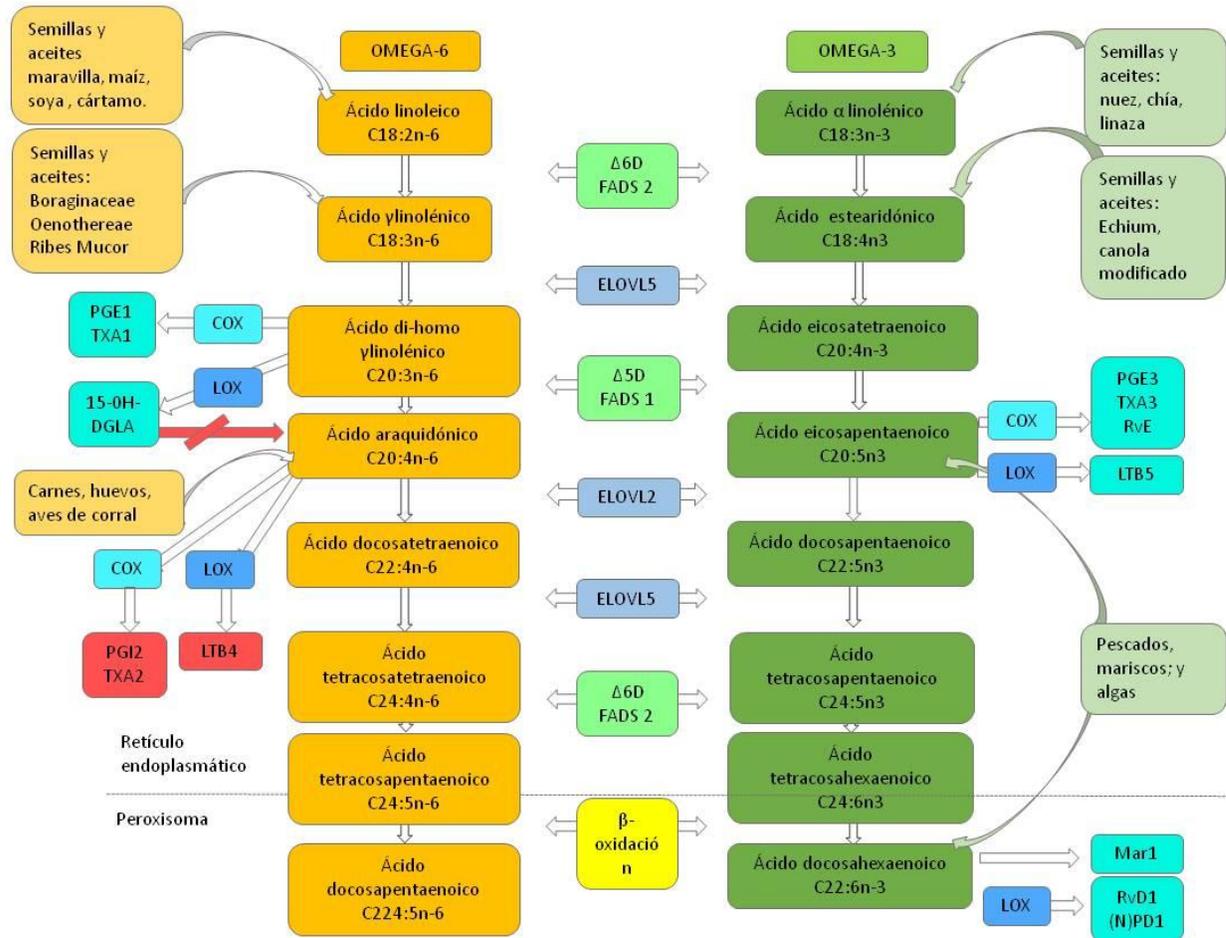
**Tabla Suplementaria 2: Especies de otras familias (no *Boraginaceae*) con contenido de GLA, ALA y SDA.**

Espece.	Nombre común.	GLA	ALA	SDA
<i>Araucariaceae.</i>				
<i>Agathis robusta.</i>	Árbol de kauri.	0,5	11,0	0,2
<i>Cannabinaceae.</i>				
<i>Cannabis sativa.</i>	Marihuana, cáñamo.	3,9	21,7	1,9
<i>Primulaceae.</i>				
<i>Aleuritia scotica.</i>	Prímula de Escocia.	2,2	29,0	22,5
<i>Aleuritia farinosa.</i>	Flor de primavera bermeja.	1,8	29,2	17,5
<i>Primula macrophila.</i>	Prímula de hoja larga.	0,8	55,4	17,0
<i>Primula sikkimensis.</i>	Prímula del Himalaya.	3,5	11,3	14,9
<i>Saxifragaceae.</i>				
<i>Ribes alpinum.</i>	Grosella de Los Alpes.	9,6	22,0	4,4
<i>Ribes nigrum.</i>	Grosella negra, zarzaparrilla negra.	18,0	13,0	3,0
<i>Ribes uva-crispa.</i>	Grosella espinosa, uva espina.	11,0	11,0	4,5

Valores expresados como porcentaje del total de AG. \*: Valores promedio.

Adaptación de “Guil-Guerrero J. Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses, and natural sources. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007”, pág.8, Tabla 3.

## Anexo 4



**Figura Suplementaria 2: Rutas metabólicas de los ácidos grasos esenciales.**

Guil-Guerrero J. Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses, and natural sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007; 109 1226–1236.

Kitessa S, Nichols P, Abeywardena M. Purple viper's Bugloss (*Echium plantagineum*) seed oil in human health. Chapter 112: 951-958.

Prasad P, Anjali P, Sreedhar R. Plant-based stearidonic acid as sustainable source of omega-3 fatty acid with functional outcomes on human health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021; 61: 1725–1737.

Sergeant S, Rahbar E, Chilton C. Gamma-linolenic acid, Dihommo-gamma linolenic, eicosanoids and inflammatory processes. *Eur. J. Pharmacol.* 2016; 785:77- 86.

## Anexo 5

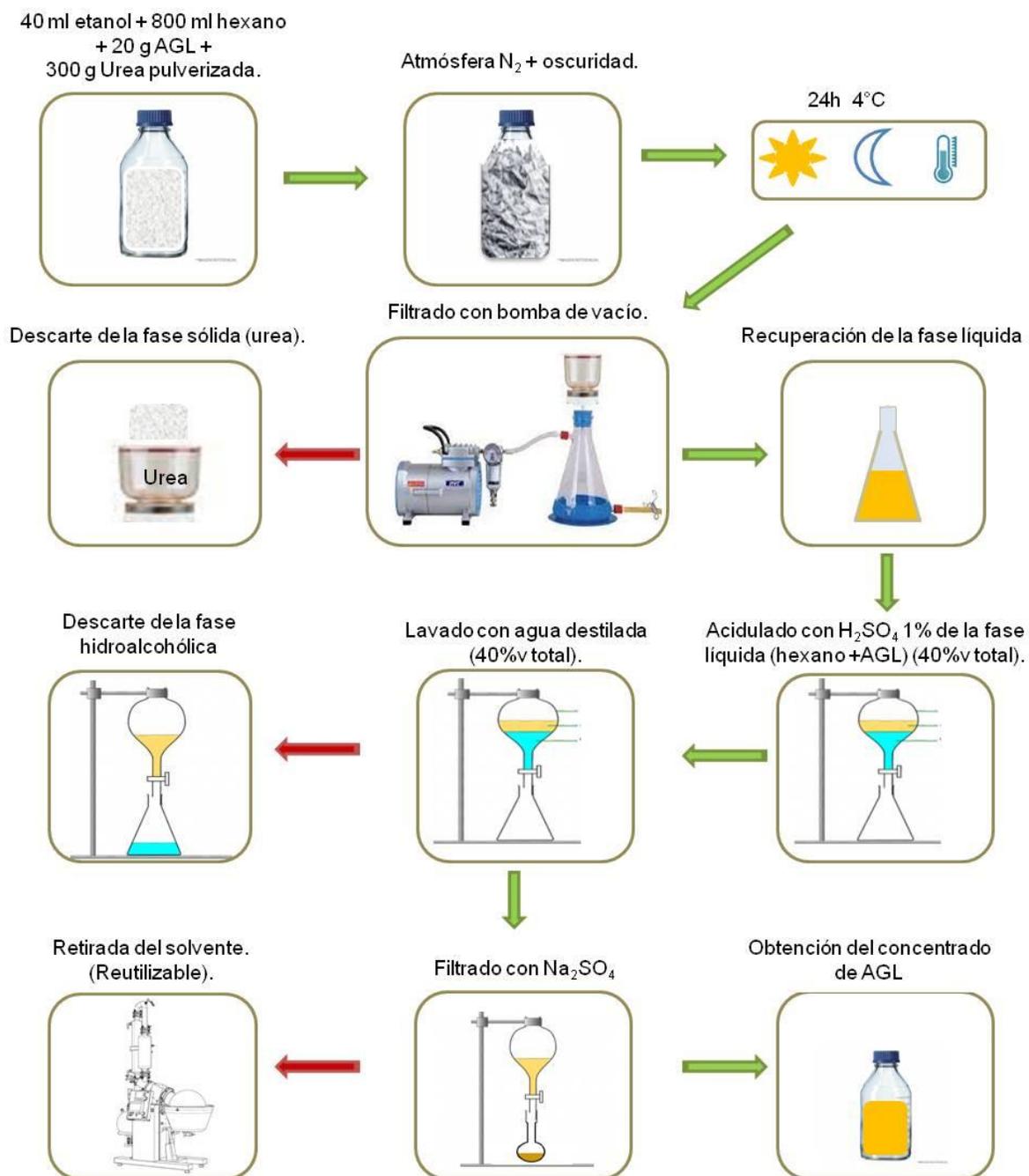


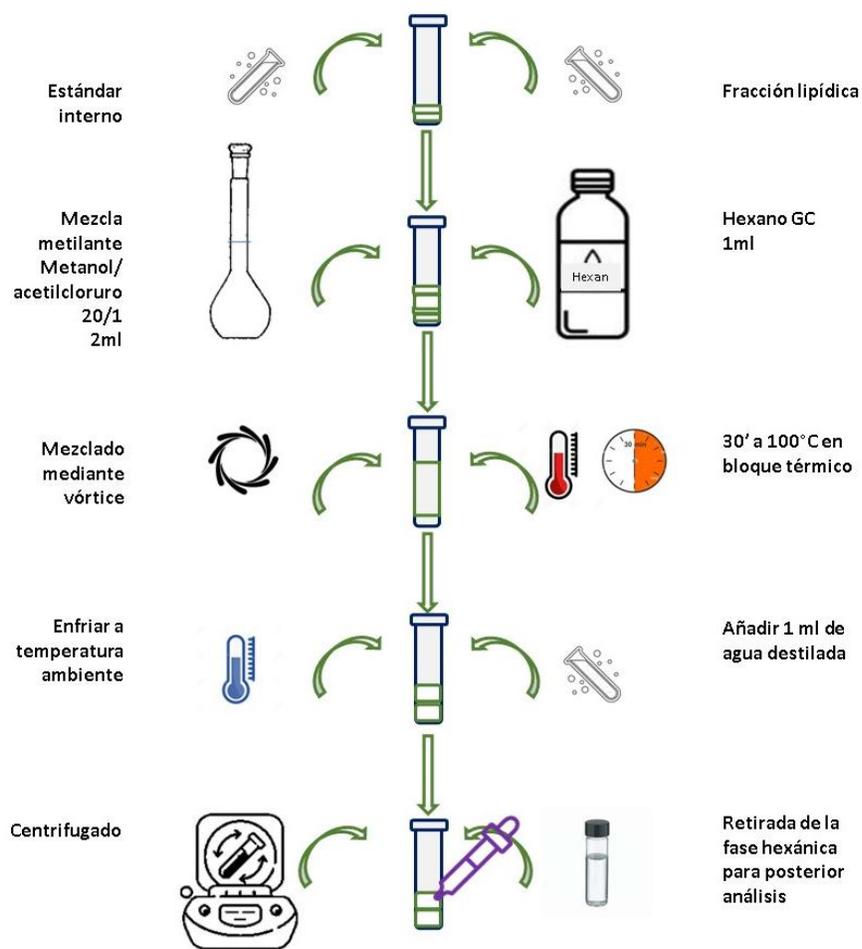
Figura Suplementaria 3: Procedimiento de obtención de aductos de urea.

## Anexo 6



**Figura Suplementaria 4: Procedimiento para el desarrollo del fraccionamiento por Cromatografía de Capa Fina (TLC).**

## Anexo 7



**Figura Suplementaria 5: Derivatización de AG a ésteres metílicos.**

## Anexo 8

1 Para 10 g de producto: completar hasta 125 ml con n-hexano + 100 ml de KOH 0,8N (solución al 30% de etanol). Agitar durante 1'

2 Recuperar fase hexánica

3 Recuperar de la fase hidroalcohólica el remanente orgánico con 100 ml de hexano.

4 Filtrar con sulfato de sodio

5 Evaporar el solvente en rotavapor

5a Recuperar remanente con cloroformo y luego eliminar en corriente de  $N_2$

6 Reunir toda la fase orgánica y pesar el producto final

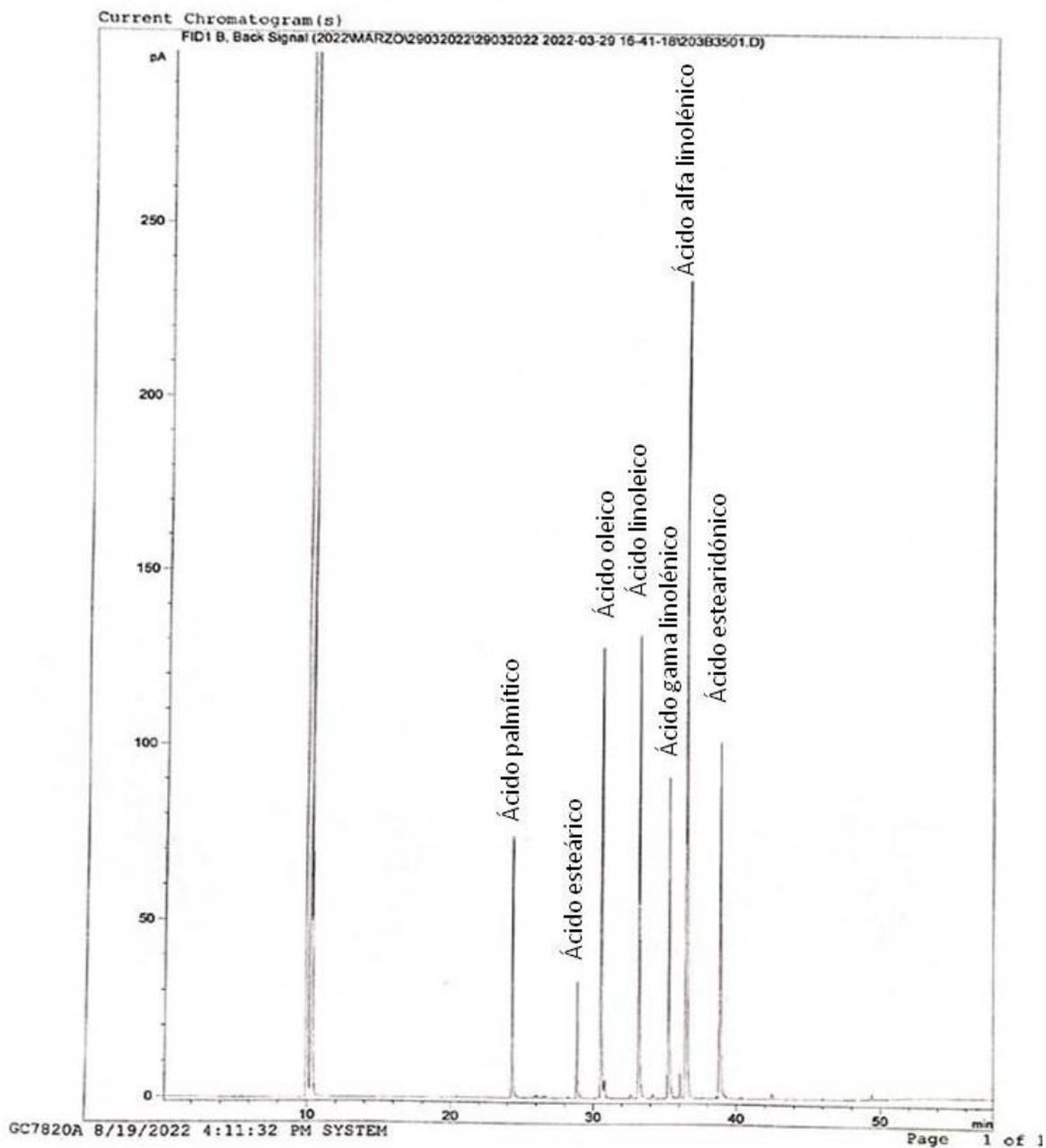
The diagram illustrates the purification process of reaction products through saponification. It consists of six main steps, each accompanied by a small illustration:

- Step 1:** Preparation of the reaction mixture. Two bottles labeled 'Hexano' are shown pouring liquid into a separatory funnel. A third bottle labeled 'KOH 0,8N' is also shown.
- Step 2:** Recovery of the hexane phase. A separatory funnel is shown with two layers. The bottom layer is labeled 'Fase Hexánica' and is being poured into a flask. The top layer is labeled 'FASE Hidroalcohólica' and is being poured into a beaker.
- Step 3:** Recovery of organic residue from the hydroalcoholic phase. A beaker labeled 'FASE Hidroalcohólica' is shown pouring liquid into a separatory funnel. A bottle labeled 'Hexano' is also shown pouring liquid into the funnel.
- Step 4:** Filtration with sodium sulfate. A separatory funnel is shown pouring liquid through a funnel containing a filter into a flask labeled 'Fase Hexánica'.
- Step 5:** Evaporation of the solvent in a rotary evaporator. A rotary evaporator is shown with a flask containing the residue.
- Step 5a:** Recovery of the residue with chloroform and elimination of the solvent with a nitrogen stream. A flask containing the residue is shown being heated over a Bunsen burner. A nitrogen gas cylinder is shown with a tube leading to the flask.
- Step 6:** Collection of the organic phase and weighing of the final product. A flask containing the final product is shown on a balance scale.

**Figura Suplementaria 6: Purificación de los productos de reacción por medio de saponificación.**

## Anexo 9

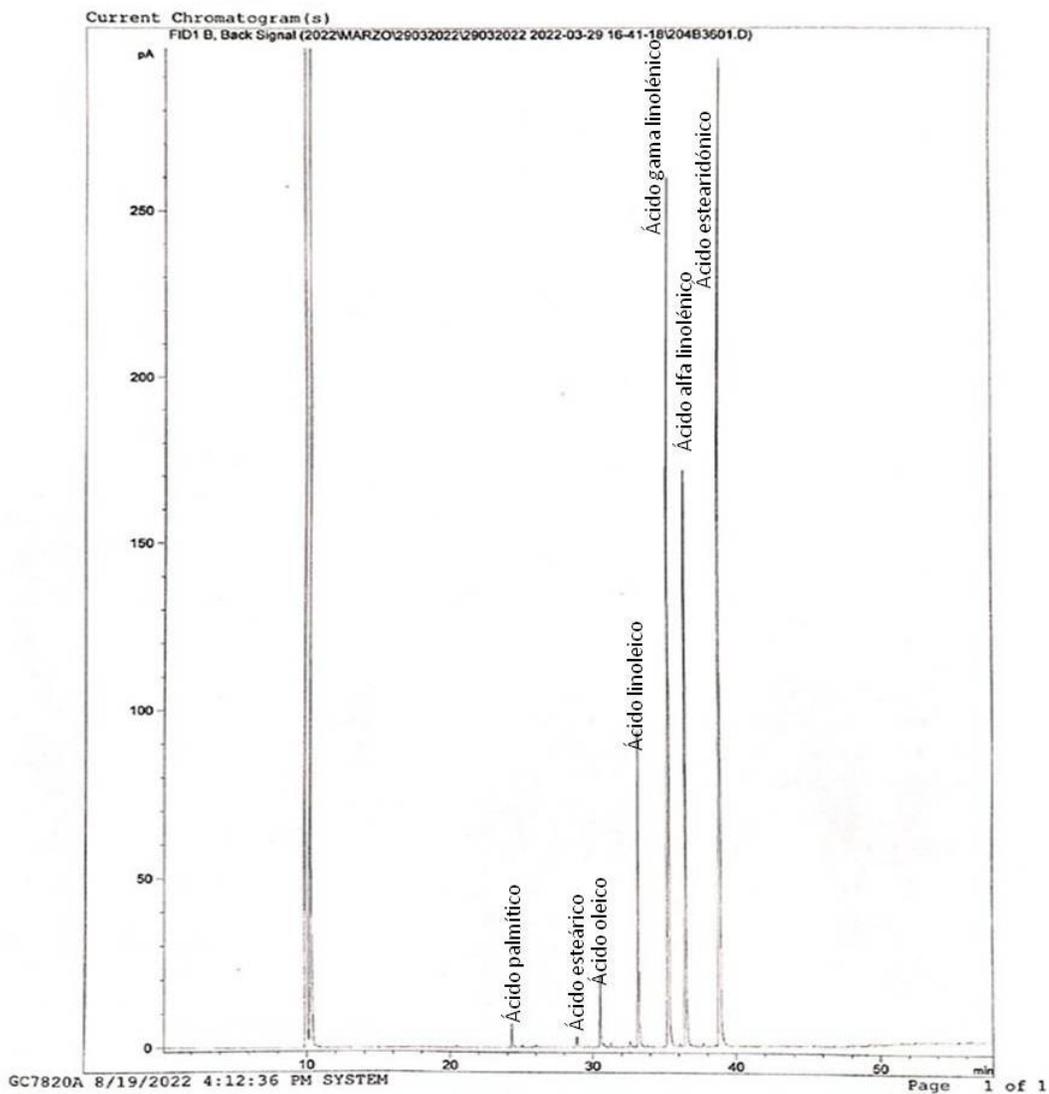
### Aceite de *Echium plantagineum*



**Figura Suplementaria 7: Perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía gaseosa de aceite de *Echium plantagineum*.**

## Anexo 10

### Cromatograma de concentrado de AGL



**Figura Suplementaria 8: Perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía gaseosa para el concentrado de AGL de aceite de *Echium plantagineum*.**

## Anexo 11

SHAPIRO-WILK W TEST FOR NORMAL DATA

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
1,3-DAG	27	0.95509	1.320	0.571	0.28410

ANALYSIS OF VARIANCE

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	454.81083	8	56.8513537	13.78	0.0000
Within groups	74.2622	18	4.12567778		
Total	529.07303	26	20.3489627		

BARTLETT'S TEST FOR EQUAL VARIANCES:  $\chi^2(8) = 11.9111$  Prob> $\chi^2 = 0.155$

BONFERRONI: Comparison of resultados by observaciones

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	1,000	X	X	X	X	X	X	X	X
3	1,000	1,000	X	X	X	X	X	X	X
4	0,020	0,217	0,008	X	X	X	X	X	X
5	1,000	0,102	1,000	0,000	X	X	X	X	X
6	0,741	0,071	1,000	0,000	1,000	X	X	X	X
7	1,000	1,000	1,000	0,009	1,000	1,000	X	X	X
8	0,003	0,029	0,001	1,000	0,000	0,000	0,001	X	X
9	1,000	1,000	1,000	0,566	0,038	0,027	1,000	0,078	X

Los valores presentados en color rojo indican diferencias significativas.

**Figura Suplementaria 9: Salida STATA-15 para el análisis estadístico (ANOVA) del Diseño de Taguchi.**

## Anexo 12

**Tabla Suplementaria 3: Análisis Suma de Cuadrados (Relaciones S/R)  
correspondientes al Método de Taguchi.**

<b>Variable</b>	<b>Suma de cuadrados</b>
Tiempo	5,989
Carga enzimática	3,203
Relación molar	9,131

## Anexo 13

SHAPIRO-WILK W TEST FOR NORMAL DATA

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
B	9	0.92470	1.106	0.170	0.43253

ANALYSIS OF VARIANCE

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	19.5336402	2	9.76682012	1.23	0.3567
Within groups	47.6358015	6	7.93930025		
Total	67.1694418	8	8.39618022		

BARTLETT'S TEST FOR EQUAL VARIANCES:  $\chi^2(2) = 0.6433$  Prob> $\chi^2 = 0.725$

BONFERRONI: Comparison of 1,3dag by obs

OBS	10	4
4	1,000	
8	0,508	1,000

**Figura Suplementaria 10: Salidas STATA-15 para análisis estadístico (ANOVA) observaciones 4, 8 y 10.**

## Anexo 14

A: VALORES PARA "P" OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE NORMALIDAD Y HOMOCEASTICIDAD DE LOS DATOS.

FRACCIÓN LIPIDICA	S.WILK	F-FISHER
<b>MAG</b>	0.583	0.967
<b>1,2-DAG</b>	0.648	0.504
<b>1,3-DAG</b>	0.303	0.710
<b>AGL</b>	0.374	0.574
<b>TAG</b>	0.549	0.587

B: VALORES PARA "P" OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE COMPARACIÓN DE MEDIAS (T-STUDENT)

FRACCIÓN LIPIDICA	MAG	1,2DAG	1,3DAG	AGL	TAG
<b>AO</b>	0,1424	0,3739	0,3329	0,4642	0,7856
<b>LA</b>	0,4315	0,8485	*0,000	0,6741	0,2192
<b>GLA</b>	0,4061	**0,0423	**0,0387	**0,0264	0,0803
<b>ALA</b>	*0,0072	0,1723	*0,0091	**0,0118	*0,0014
<b>DAS</b>	**0,0101	0,3470	*0,0028	**0,0165	**0,0423
<b>MMOLES</b>	<b>*0,0060</b>	<b>0,2805</b>	<b>0,8018</b>	<b>0,0848</b>	<b>0,9024</b>

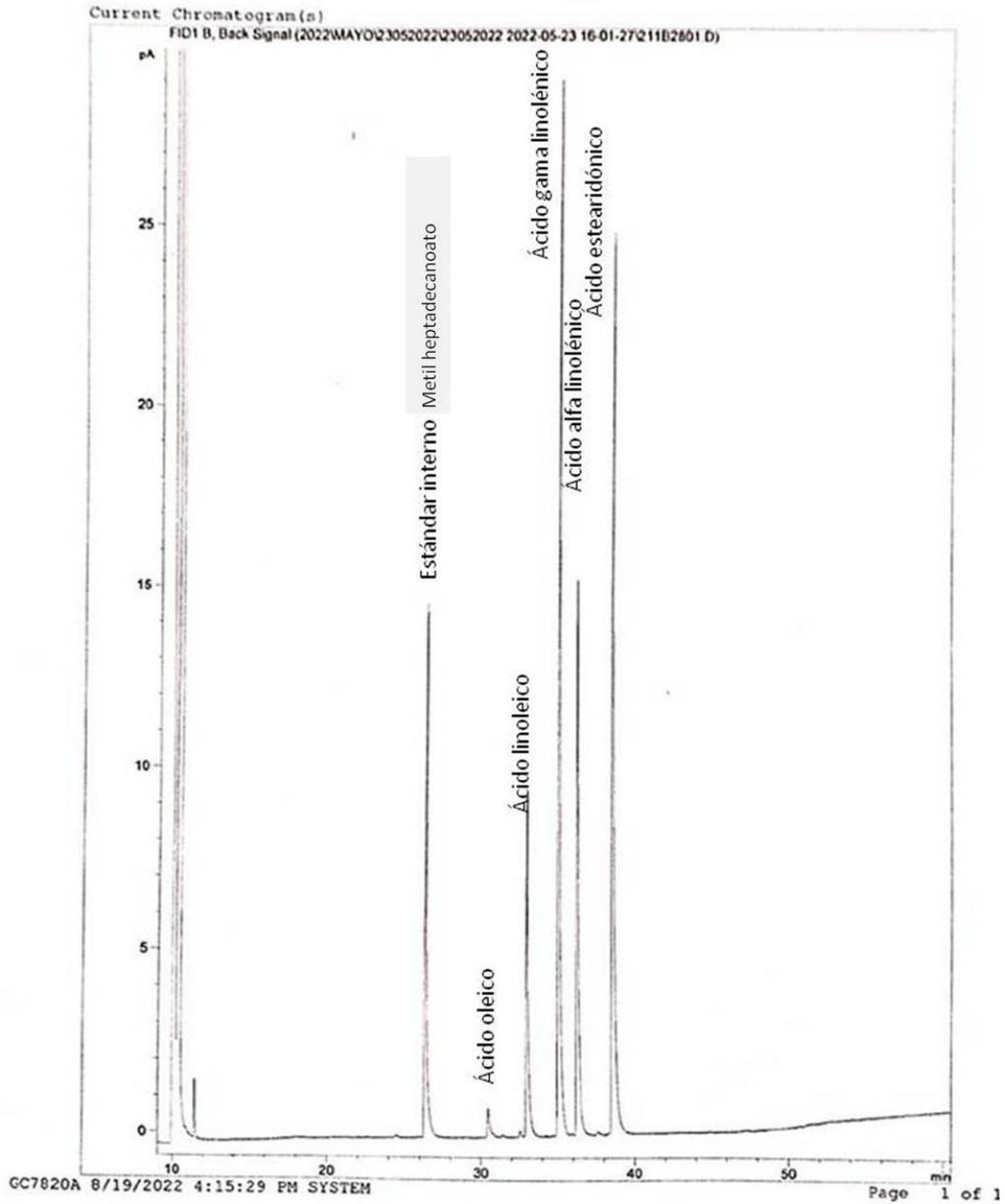
\*: Menor en C2

\*\* : Mayor en C2

**Figura Suplementaria 11: Valores "p" para análisis estadístico comparación de medias C1-C2 (T-Student).**

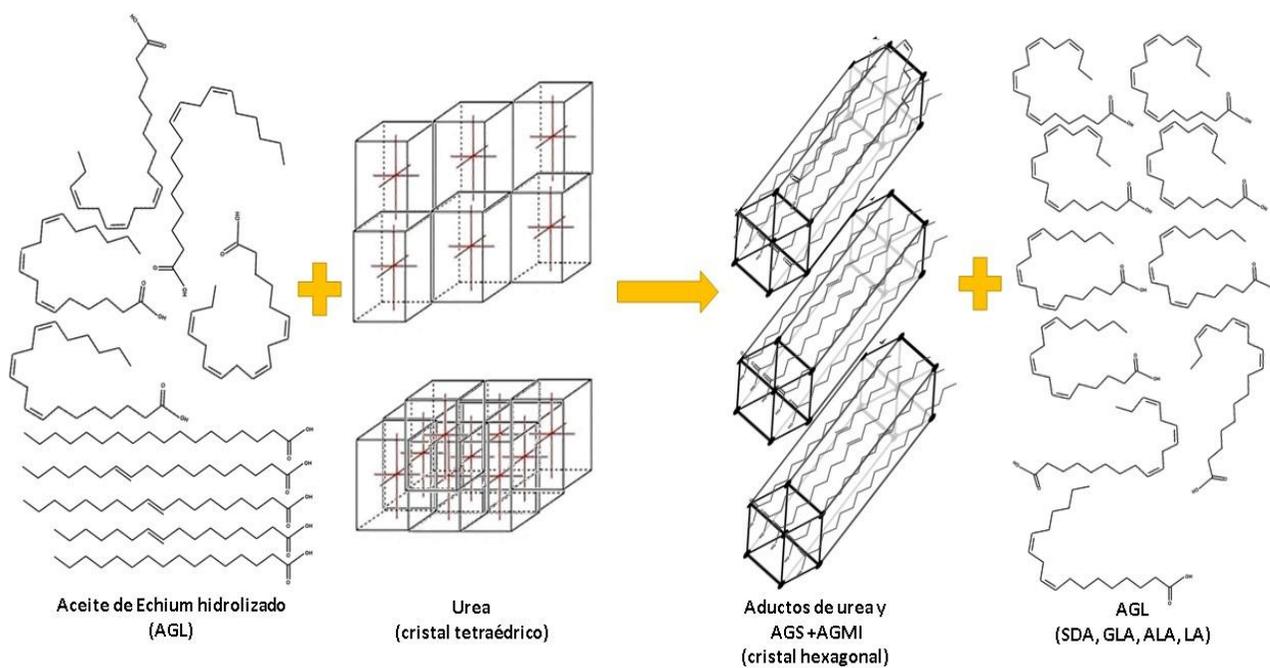
## Anexo 15

### Cromatograma de la fracción lipídica 1,3-DAG



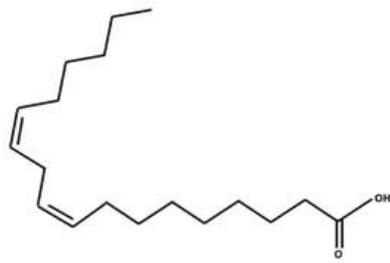
**Figura Suplementaria 12: Perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía gaseosa. 1,3-diacilglicéridos.**

## Anexo 16

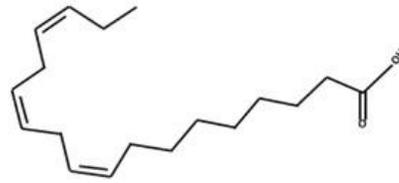


**Figura Suplementaria 13: Formación de aductos de urea.**

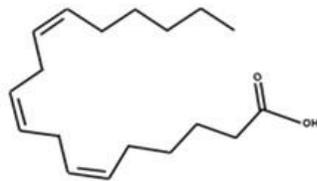
## Anexo 17



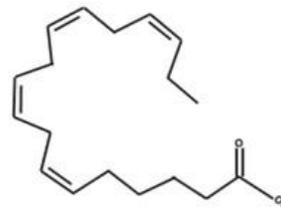
Ácido linoleico  
C18:2n-6  
 $\Delta$ 9,12-octadecadienoico



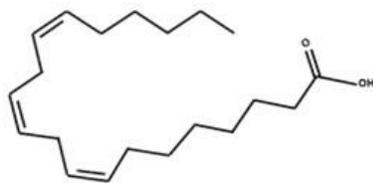
Ácido  $\alpha$ -linolénico  
C18:3n-3  
 $\Delta$ 9,12,15-octadecatienoico



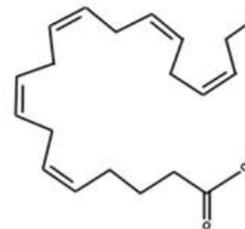
Ácido  $\gamma$ -linolénico  
C18:n-6  
 $\Delta$ 9,12,15-octadecatienoico



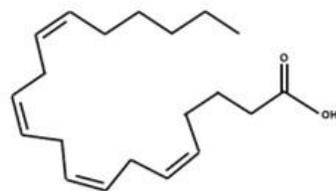
Ácido estearidónico  
C18:4n-3  
 $\Delta$ 8,11,14,17-octadecatetraenoico



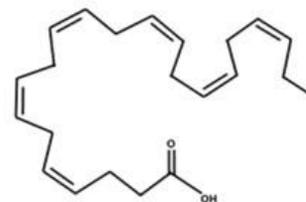
Ácido di-homo- $\gamma$ -linolénico  
C20:3n-6  
 $\Delta$ 9,12,15-eicosatrienoico



Ácido eicosapentaenoico  
C20:5n-3  
 $\Delta$ 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico



Ácido araquidónico  
C22:4n-6  
 $\Delta$ 9,12,15,18-docosatetraenoico



Ácido docosahexaenoico  
C22:6n-3  
 $\Delta$ 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico

**Figura Suplementaria 14: Estructuras moleculares de ácidos grasos de interés nutricional.**

## Anexo 18

**Tabla 4: Porcentaje molar promedio de algunas fracciones lipídicas sobre el total de los productos de reacción obtenidos en la síntesis enzimática de Lípidos Estructurados.**

Obs	MAG (% molar)	1,2DAG (% molar)	1,3DAG (% molar)	TAG (% molar)	ΣDAG (% molar)	MAG+TAG (% molar)
4	31,1	8,1	*56,2	4,5	*64,3	35,6
8	42,7	*9,5	37,2	*10,7	46,7	53,4
10	*53,1	9,0	32,9	5,0	41,9	*58,1

Obs: Observación; MAG: Monoacilglicéridos; DAG: Diacilglicéridos; TAG: Triacilglicéridos; PR: Productos de reacción; ΣDAG: Sumatoria de DAG.

Los valores más altos son señalados con un asterisco (\*).

