



Universidad de Chile
Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos INTA



“Obtención de Fosfolípidos Marinos Ricos en Omega-3 con Fines Nutricionales, a partir de Productos y Subproductos de la Industria Pesquera y Acuícola”.

Proyecto de grado presentado como requisito final para optar al grado de

Magíster en Nutrición y Alimentos

Mención Alimentos Saludables

Jairo Alonso Torres García.

Ingeniero de Alimentos

Director de tesis

Alfonso Valenzuela Bonomo.

Doctor en Ciencias

Santiago, Diciembre de 2013.

Tabla de contenido

1	Resumen.....	4
2	Planteamiento del problema y estado del arte.....	5
2.1	Lípidos de Buena Calidad en la Dieta Humana.....	6
2.2	Importancia de los Ácidos Grasos de Cadena Larga Omega-3 (EPA y DHA) en la Nutrición Humana.....	6
2.2.5	Necesidades actuales de Omega-3: EPA y DHA	8
2.2.6	Consumo actual de Ácidos Grasos Omega-3.....	9
2.2.7	Oferta de Productos con Ácidos Grasos Omega-3	10
2.3	Otras Fuentes de Ácidos Grasos Omega-3.....	10
2.4	Fosfolípidos	13
2.4.1	Fosfolípidos e Importancia Nutricional	14
2.5	Fosfolípidos Marinos (FM).....	17
2.5.1	Proceso Digestión y Absorción de Fosfolípidos.....	19
2.5.1	Biodisponibilidad de Fosfolípidos de Origen Marino	20
2.5.2	Mercado Actual de FM Ricos en Ácidos Grasos Omega-3;	21
2.6	Situación Actual en Chile; Aceite de Pescado y Ácido Grasos Omega- 3	22
2.7	Proceso Tradicional de Obtención de Aceites y Harina de Pescado	24
2.8	Identificación y selección de materias primas a usar.....	25
2.9	Técnicas de extracción de FM y producción actual.....	26
2.9.1	Técnicas de extracción de FM con etanol	26
2.9.2	Técnicas de extracción enzimática de FM.....	28
2.10	Purificación y concentración de Fosfolípidos.....	30
3	Objetivo general.....	33
3.1	Objetivos específicos.....	33

4	Diseño de estudio y metodología.....	33
4.1	Muestras.....	33
4.2	Equipos a emplear.....	34
4.3	Diseño experimental	35
4.4	Análisis de laboratorio y técnicas a emplear.....	35
5	Desarrollo del Proyecto.....	36
5.1	Fase 1 extracción de material lipídico ricos en fosfolípidos.....	36
5.1.1	Caracterización de materias primas.....	37
5.1.2	Obtención del extracto graso.....	37
5.1.3	Análisis estadístico y selección de condiciones óptimas.....	38
5.1.4	Modelo experimental de extracción por etanol	38
5.1.5	Extracción por método enzimático	41
5.1.6	Clasificación de las variables fase 1.....	45
5.1.7	Análisis estadístico	46
5.2	Fase 2 purificación y/o concentración de fosfolípidos.....	46
5.2.1	Clasificación de las variables fase 2.....	48
5.3	Fase 3 caracterización de fosfolípidos	48
5.3.1	Clasificación de las variables fase 3.....	49
5.3.2	Análisis estadísticos.....	49
5.3.3	Evaluación económica.....	49
5.4	Fase 4 patente y divulgación de resultados	49
6	Plan de trabajo	50
7	Resultados esperados	51
8	Recursos solicitados	52
9	Bibliografía	54

1 Resumen

Investigaciones han demostrado que los fosfolípidos marinos (FM) ricos ácidos grasos Omega-3 son beneficiosos para la salud. En la actualidad, su oferta es escasa, por lo que es necesario investigar productos y subproductos de la industria alimentaria para la extracción y caracterización de componentes lipídicos de alto valor nutricional, como lo son los FM. El objetivo de esta propuesta es la obtención de FM ricos en ácidos grasos Omega-3 mediante técnicas enzimáticas (enzimas proteolíticas Protamex® y Alcalaza®) o técnicas químicas (Etanol), a partir de torta de Anchoveta (*Engraulis ringens*) y de torta de residuos de la industria salmonicultora.

El proyecto comprende cuatro fases:

1. Extracción de material lipídico rico en fosfolípidos: Pretende usar un diseño experimental de superficie respuesta, aplicando técnicas de extracción con enzimas proteolíticas y con solventes (Etanol), con el fin de obtener el mejor proceso de extracción de lípidos con alto contenido de FM, ricos en Omega-3.
2. Purificación y/o concentración de fosfolípidos: Se utilizarán técnicas como la liofilización, para concentrar FM, y/o técnicas como insolubles en acetona, para purificar los FM.
3. Caracterización de fosfolípidos: Se realizará una evaluación de las principales características fisicoquímicas de los FM, con el fin de conocer sus potencialidades nutricionales.
4. Patentar y divulgar los resultados: Se realizarán los trámites para tener la propiedad intelectual de la técnica óptima y, posteriormente, se hará una divulgación parcial de la investigación.

Este proyecto está diseñado para un tiempo total de ejecución de 24 meses, y requiere una inversión total de \$ 134.620.000. Se espera, al finalizar el proyecto, encontrar una técnica de extracción y purificación de fosfolípidos viable a nivel industrial. Además de conocer las características fisicoquímicas que poseen los productos extraídos, con el fin de darle un valor agregado a los productos y subproductos de la industria

pesquera y acuícola. Adicionalmente, se busca aportar una nueva materia prima con alto valor nutricional, que pueda ser empleada en la industria alimentaria, nutracéutica y farmacéutica.

2 Planteamiento del problema y estado del arte

La composición química de los aceites de peces, y otras especies de origen marino, ha sido ampliamente descrita, pudiéndose demostrar su gran valor nutricional, en especial, en lo referido a los ácidos grasos esenciales Omega-3. Hasta hace poco tiempo, el enfoque de la industria apuntaba principalmente a estos ácidos grasos presentes en los triglicéridos (TGs), tal como los que se encuentran en el aceite de pescado tradicional. Sin embargo, a partir de nuevas investigaciones, los FM han comenzado a resaltar como una potencial fuente de ácidos grasos Omega-3 destinados a consumo humano. Es importante mencionar que, entre otras características, la anfipaticidad de estos compuestos aumenta su biodisponibilidad (Ramirez, 2001), volviéndolos más aprovechables, situación que se traduce en una oportunidad para utilizarlos a nivel industrial, tanto con fines farmacológicos, como en alimentos funcionales y suplementos dietéticos.

Los peces y materias primas utilizados con el objetivo de extraer ácidos grasos Omega-3 escasean en forma creciente, debido a diversas causas. Es por esta razón que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas para suplir estas necesidades y, al mismo tiempo, maximizar la utilización de subproductos derivados de la industria pesquera y acuícola. Adicionalmente, se debe considerar que, en su gran mayoría, los procesos de extracción de estos compuestos son poco amigables, ya que se realizan mediante técnicas que utilizan solventes orgánicos potencialmente tóxicos. En este sentido, la tendencia actual apunta, tanto al uso de compuestos menos tóxicos, como a la utilización de procesos biotecnológicos. Para resolver este paradigma, se comenzará por describir y definir algunos conceptos importantes. Sin embargo, es importante mencionar en primer lugar, que el postulante precisa que parte de la información plasmada en este escrito ha sido obtenida por medio de prácticas en laboratorio, gracias a la gran oportunidad de

acceder a una beca otorgada por el Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile, para realizar una pasantía de investigación en el reconocido Laboratorio de *Oleos e Gorduras* de la Universidad de Campinas, Brasil. La información recolectada durante dicha pasantía resultó de gran utilidad, ya que sirvió de soporte para reafirmar que muchas de los puntos propuestos en este proyecto son viables de realizar, además de conocimiento previo de algunas técnicas analíticas propuestas.

2.1 Lípidos de Buena Calidad en la Dieta Humana

Entre las numerosas estructuras que conforman el grupo de los lípidos, una de las más relevantes corresponde a los ácido grasos polinsaturados de cadena larga Omega-3, a los que se han atribuido diversos efectos beneficiosos para la salud; (Lluis and Taltavull, 2013, Barrett, 2013). Respecto a los requerimientos de los seres humanos, estos ácidos grasos deben representar sólo el 1 % del consumo total de grasa. Sin embargo, las constantes modificaciones de la alimentación a lo largo de los siglos, ha hecho surgir deficiencias en el consumo de estos ácidos grasos. La principal teoría que explica esta situación, corresponde a la reducción en el consumo de pescados y mariscos, prefiriendo el consumo de alimentos procesados, que contienen otro tipo de lípidos, en su mayoría, poco saludables (IFFO, 2010). Dicha situación ha contribuido al surgimiento de numerosas patologías, que se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. Las tendencias actuales indican que estas enfermedades están relacionadas directamente con la calidad, y no la cantidad, de grasa ingerida. Por esta razón, las políticas actuales apuntan a disminuir el consumo de grasas saturadas y colesterol, y a incrementar el consumo de grasas insaturadas y poliinsaturadas (FAO, 2012).

2.2 Importancia de los Ácidos Grasos de Cadena Larga Omega-3 (EPA y DHA) en la Nutrición Humana.

Los aceites marinos están compuestos por mezclas de TGs, siendo la mayoría de los ácidos grasos que los componen, insaturados (mono-insaturados o poliinsaturados). Entre los ácidos grasos poliinsaturados se encuentra la serie de ácidos grasos Omega, de los

cuales, unos de los más importantes son los Omega-3. Algunos aceites de origen vegetal terrestre también contienen ácidos grasos Omega-3, y se diferencian de aquellos de origen marino, debido a que estos tienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 de cadena larga, siendo los más importantes: ácidos eicosapentanoico (EPA, C20:5 Omega-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 Omega-3), debido a sus propiedades nutricionales (Mohd Ali et al., 2012).

En teoría, los animales pueden realizar la conversión del el ácido alfa Linolénico en los ácidos grasos EPA y DHA, necesarios para el organismo y, particularmente, para el cerebro. La eficiencia de este proceso es variada, sin embargo, en el caso de los humanos la conversión de ácido alfa Linolénico a EPA corresponde sólo al 5 %, y menos de un 0.5 % a DHA (Jackson, 2008). Por esta razón es importante la ingesta de estos lípidos durante determinadas etapas de la vida de humanos y animales aportando, además, múltiples beneficios para la salud, los que serán mencionados a continuación:

2.2.1 Durante la etapa perinatal y el crecimiento:

Los ácidos grasos Omega-3 son importantes durante la gestación, debido a que son componentes estructurales del cerebro y la retina del recién nacido. Además incrementan el peso al nacimiento, y otorgan mayor nivel de intelectualidad en la vida adulta. Reducen las tasas de depresión post parto y, durante la etapa de crecimiento, tienden a tener mayor capacidad de atención, mayor coeficiente intelectual y mejor agudeza visual (Sapieha et al., 2012, Valenzuela and Nieto, 2003).

2.2.2 Sobre el sistema cardiovascular:

Se ha descrito que los ácidos grasos Omega-3 de cadena larga aportan beneficios cardiacos, tanto a personas sanas, como a aquellas que padecen enfermedades cardiovasculares, debido a sus efectos anti-trombóticos, anti-arritmicos e hipocolesterolémicos, además de mejorar la sensibilidad a la insulina. En pacientes hipertensos, disminuyen la agregación plaquetaria y la respuesta inflamatoria (Castro, 2002, Reiffel and McDonald, 2006, Din et al., 2013).

2.2.3 Sobre el sistema nervioso y la salud mental:

Es un hecho conocido que los ácidos grasos Omega-3 son esenciales para lograr un adecuado desarrollo y funcionamiento del cerebro y del sistema nervioso. Al respecto, se ha reportado la capacidad de estos compuestos en la corrección de defectos visuales y cerebrales en pacientes con deficiencia demostrada, mejorando también aspectos asociados a la ubicación espacial, ansiedad, habilidad de aprendizaje, memoria, depresión, esquizofrenia, demencia, enfermedad de Alzheimer, dislexia y psicosis, además de reducir el deterioro cognitivo (Maclean et al., 2005a, Wurtman et al., 2006, Valenzuela et al., 2009).

2.2.4 Prevención del cáncer:

Los ácidos grasos EPA y DHA influyen en la disminución de las manifestaciones del cáncer, mediante la disminución de la inflamación, proliferación celular, invasividad de tejidos, inducción de apoptosis, reducen la presentación de metástasis, disminuyen la inflamación, mejoran la respuesta inmune y disminuyen la angiogénesis (Theodoratou et al., 2007, MacLean et al., 2006, Maclean et al., 2005b).

2.2.5 Necesidades actuales de Omega-3: EPA y DHA

Los ácidos grasos Omega-3 de cadena larga son esenciales en periodos determinados, tal es el caso del embarazo, ya que el feto requiere de altas concentraciones de DHA, el cual es aportado por la madre a partir de sus reservas, o de la alimentación (Lei et al., 2013). Durante el envejecimiento, se produce una pérdida de DHA en el sistema nervioso, tanto en las neuronas, como las células gliales. Por esta razón, cobra relevancia la suplementación de este grupo de riesgo con DHA, con el objetivo prevenir la presentación o aliviar los síntomas de patologías tales como demencia senil y Alzheimer (Jicha and Markesbery, 2010).

La FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) / OMS (Organización Mundial de la Salud) recomienda un consumo diario de 500 mg / día de EPA + DHA como mínimo en adultos, mientras que el consumo mínimo recomendado

para madres en lactancia es de 300 mg / día de DHA, y para lactantes y escolares una dosis de aproximadamente 150 mg / día (FAO, 2012). Sin embargo, las recomendaciones actuales apuntan a incrementar el consumo de ambos ácidos grasos mediante la ingesta de pescados grasos, a través de alimentos funcionales, nutracéuticos o consumiendo alimentos suplementados (Riediger et al., 2009, FAO, 2012). Por esta razón, países que no cumplen con la ingesta recomendada, como Chile, deben promover el consumo de productos marinos y suplementos que contengan ácidos grasos Omega-3.

2.2.6 Consumo actual de Ácidos Grasos Omega-3

Respecto al consumo actual de ácidos grasos Omega-3 de cadena larga, es relevante destacar que sólo una cantidad limitada de alimentos procesados presentan cantidades significativas de estos compuestos, por lo que se considera a los aceites marinos como la única fuente alimenticia significativa de DHA y EPA. Adicionalmente, se considera que en algunos países hasta un 75 % de la población no consume estos alimentos, siendo esta tendencia aún más marcada en personas jóvenes (Jackson, 2008).

Países como Suiza, Alemania, Italia, España, Francia, Estados Unidos y Chile, han promovido su consumo en políticas de salud pública, por ejemplo, mediante la inclusión de DHA en fórmulas lácteas infantiles y orientadas a mujeres embarazadas (Valenzuela, 2009).

Los seres humanos podemos incrementar el consumo de ácidos grasos Omega-3 de cadena larga, al aumentar el consumo de:

- Pescados y mariscos silvestres.
- Pescados y mariscos cultivados alimentados con fuentes que contengan niveles adecuados de ácidos grasos Omega-3 de cadena larga, tales como harinas o aceites de origen marino.
- Cápsulas de aceite de pescado, u otros suplementos que contengan EPA y DHA.
- Carne, huevos o leche proveniente de animales cuyo alimento haya sido suplementado con niveles adecuados de ácidos grasos Omega-3 de cadena larga.

- Alimentos enriquecidos durante su elaboración con ácidos grasos Omega-3 de cadena larga.

2.2.7 Oferta de Productos con Ácidos Grasos Omega-3

Según la organización mundial del EPA y DHA (IFFO), el mercado de estos ácidos grasos ha presentado una demanda creciente, proyectándose un incremento anual del 13,6 %, hasta el año 2016 (Grebow.J., 06 junio 2012 [citado 13 mayo 2013]). En este sentido, la motivación de compra por parte de los consumidores, proviene de los resultados de diversas investigaciones, en los que se comprueban sus numerosos efectos beneficiosos para la salud, ya mencionados. Por otra parte, la exigencia de los consumidores que ingieren ácidos grasos Omega-3 a través de cápsulas también ha incrementado, prefiriendo productos más concentrados, que contengan mayor cantidad de EPA y DHA. Por esta razón, la industria ha desarrollado técnicas que permiten la elaboración de productos tres veces más concentrados, potenciando el desarrollo de las industrias nutracéutica y farmacéutica (IFFO, 2010). En este sentido, algunas empresas se han orientado a la extracción de aceite de pescado con técnicas que excluyen la utilización de productos químicos o transformaciones físicas que utilicen temperaturas elevadas. En este sentido, se han desarrollado técnicas de extracción mediante procesos de hidrólisis enzimática, que permiten conservar completamente la calidad del producto en estado natural, obteniéndose un aceite fresco, con muy bajos niveles de oxidación (Gbogouri et al., 2006) .

2.3 Otras Fuentes de Ácidos Grasos Omega-3

Respecto al desafío que implica la búsqueda de nuevas fuentes de ácidos grasos Omega-3 de cadena larga EPA Y DHA, algunas empresas están optando por trabajar con materias primas como el algas, Calamar (*Loligo vulgaris*) y Krill (*Euphausia superba*) (IFFO, 2010, Grebow.J., 06 junio 2012 [citado 13 mayo 2013]).

El Krill (*E. superba*) es un crustáceo de aguas antárticas y se ha postulado como una buena fuente de Omega-3. Y, aunque su explotación es reciente, el consumo de EPA y DHA obtenidos de estos animales incrementó del año 2010 al 2011 en un 41 %. Se ha

planteado que los ácidos grasos provenientes de esta fuente, tienen mayor biodisponibilidad, debido a que el EPA y DHA se encuentran ligados principalmente a fosfolípidos (Schuchardt et al., 2011). Sin embargo, uno de sus limitantes es su alto costo y limitada disponibilidad (Valenzuela, 2012b, Nalda et al., 1996).

A pesar de que en el conocimiento masivo predomine la idea de que las fuentes más comunes de los ácidos grasos EPA y DHA corresponden a mariscos y suplementos elaborados a partir de aceite de pescado, el mercado ha evolucionado significativamente en este ámbito, existiendo cifras que indican que, al menos 4 de 10 consumidores que desean ingerir suplementos de ácidos grasos Omega-3 busca alternativas distintas al aceite de pescado (Schuchardt and Hahn, 2013). En este ámbito, la necesidad de adoptar un estilo de vida más saludable, acompañado de una dieta rica en ácidos grasos Omega-3, ha impulsado el consumo de alimentos enriquecidos, suplementos y alimentos funcionales, los cuales han experimentado tasas de crecimiento en el consumo superiores al 20 % anual, a nivel mundial (Villagra, 2010). Al respecto, el mercado de productos que contienen EPA y DHA ha crecido rápidamente en los últimos años, aumentando su tamaño más de cuatro veces desde el año 2001 hasta el 2009 (Ismail, 2010). Estimándose que, para el año 2009, se consumieron más de 86.000 toneladas a nivel mundial, de aceites que contenían EPA y DHA. Es relevante considerar, en este punto, que dicho consumo no hace referencia sólo a suplementos, sino también a otras matrices a los que son incorporadas, convirtiéndose en alimentos funcionales, entre los que se encuentran alimentos como yogurt, leche, fórmulas infantiles, mayonesa, margarinas, aderezos, carnes, alimentos enlatados, refrescos, productos horneados y de confitería (Ismail, 2010, Nalda et al., 1996). En el caso de los productos tales como carnes procesadas y productos horneados, éstos se han logrado enriquecer con importantes concentraciones de EPA y DHA. Dicha situación se muestra en la **Figura 1**, en la que se observa que algunos productos pueden contener hasta 3 veces más EPA Y DHA que una cápsula de aceite.

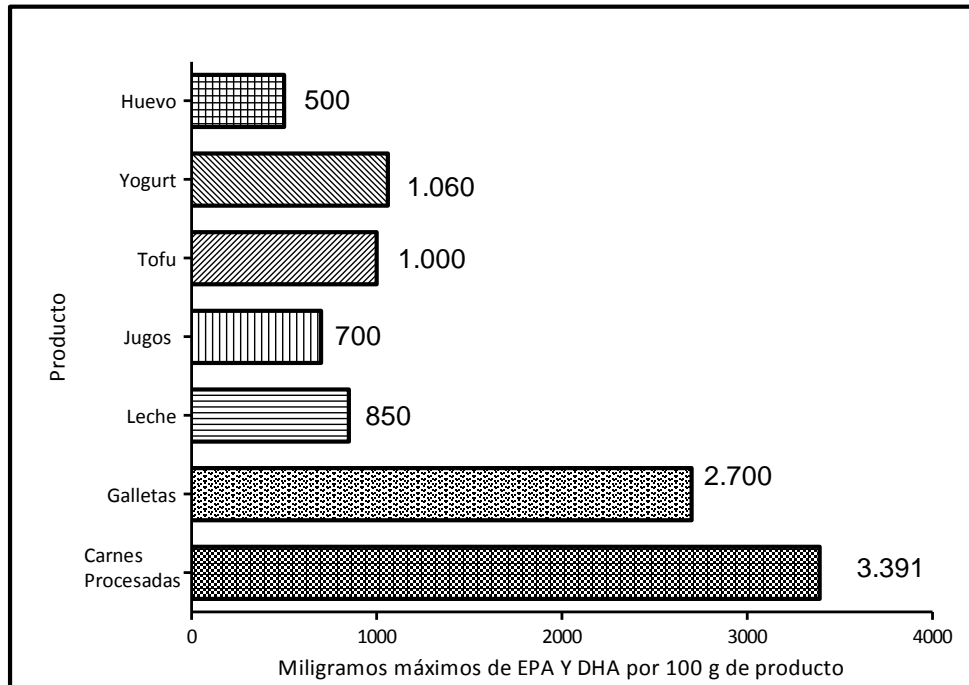


Figura1: Incorporación de EPA Y DHA en diferentes alimentos, expresado como miligramos máximos de EPA Y DHA por 100 g de producto. Fuente: Modificado de (Ismail, 2010)

Existen en el mercado suplementos obtenidos a partir peces o Krill (*E. superba*), que contienen una alta concentración de fosfolípidos ricos en ácidos grasos Omega-3, los cuales cuentan con una mayor biodisponibilidad, que se incorporan en el mercado de forma creciente (Maki et al., 2009). Las cifras entregadas por la compañía de estudios de mercado Packaged Facts[®], indican que el mercado de alimentos y bebidas enriquecidos con ácidos grasos Omega-3 de Estados Unidos, creció de cien millones a dos billones de dólares, durante el año 2006, y que las ventas de suplementos de aceite de pescado se duplicaron entre los años 1995 y 2007 (Shepherd and Jackson, 2013).

Los efectos del consumo de ácidos grasos Omega-3 han sido, y siguen siendo, objeto de investigación desde hace algunos años, situación que se evidencia con el incremento anual de publicaciones. En este sentido, existe una estrecha correlación entre el número de publicaciones y las ventas de productos asociados a estos compuestos cada año (Ismail, 2010). Dicha situación constituye un firme sustento para el mercado de productos que

contienen estos ácidos grasos asignándoles, con el tiempo, un alto valor comercial. Sin embargo, su proyección en el futuro implica la exploración de nuevas fuentes de obtención, ya que las materias primas cada vez son más escasas y la tendencia actual va enfocada al aprovechamiento al máximo de las materias primas y de sus subproductos.

Debido a la demanda pero también escases de materias primas y observando las propiedades nutricionales que tienen los fosfolípidos de origen marino, surge la idea de poder explorar este rubro de la industria acuícola y pesquera, utilizando productos y subproductos para obtener un ingrediente de alto valor biológico.

2.4 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son lípidos anfipáticos, que se encuentran en todas las membranas celulares de plantas y animales, disponiéndose como bicapas lipídicas. Pertenecen al grupo de lípidos derivados del glicerol, presentando una estructura similar a la de los TGs, la que se muestra en la **Figura 2**. En este sentido, los fosfolípidos están compuestos por una molécula de glicerol a la que se unen 2 ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2, estos ácidos grasos pueden presentar distinto largo de su cadena hidrocarbonada, y variar en el grado de insaturación, según su procedencia. Sin embargo, se diferencian de los TGs ya que en la posición sn-3 está ligada una molécula de ácido ortofosfórico, en lugar de un tercer ácido graso. Estos grupos fosfato están siempre unidos a diferentes tipos de moléculas, de esta forma, cuando esta molécula corresponde a colina, se forma la fosfatidilcolina o Lecitina; cuando se une a un aminoácido como serina, se forma la fosfatidilserina; cuando la unión es a la etanolamina, se forma la fosfatidiletanolamina o Cefalina; y cuando se une al polialcohol cíclico inositol, se forma el fosfatidil inositol (Suzumura, 2005, Valenzuela, 2011). Se mencionó anteriormente que los ácidos grasos que conforman los fosfolípidos pueden variar de acuerdo a su origen, sin embargo, lo que otorga especiales características a los FM es la presencia de una gran cantidad de ácidos grasos Omega-3, especialmente los ácidos eicosapentanoico (EPA, C20:5 Omega-3) y docohexaenoico (DHA, C22:6 Omega-3).

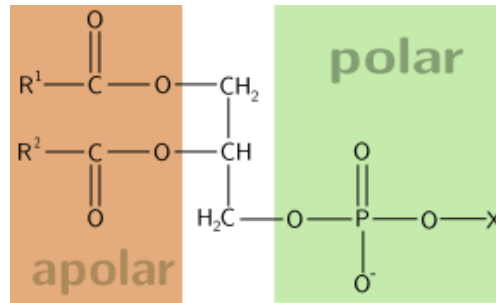


Figura 2: Los fosfolípidos están constituidos por una molécula de glicerol, a la cual se unen dos ácidos grasos en el sector apolar (R1 y R2), y en la fase polar X, se encuentra un amino alcohol. Fuente (Lennert, 25 Noviembre 2005 [citado 13 Mayo 2013]).

2.4.1 Fosfolípidos e Importancia Nutricional

Es un hecho conocido, que los fosfolípidos tienen un impacto positivo, evitando el desarrollo de ciertas patologías. Además, debido a la eficacia de estos compuestos respecto al aporte de ácidos grasos, cuyo efecto se verá reflejado en su incremento a nivel de las membranas celulares, el tipo de fosfolípido administrado será crucial para lograr un efecto determinado. En este sentido, los efectos mayoritariamente conocidos han surgido del estudio de fosfolípidos derivados de la soja, de la yema de huevo, de los lácteos y de los FM (Kullenberg et al., 2012) .

2.4.2 Fosfolípidos y Procesos Inflamatorios

Respecto al desarrollo de procesos inflamatorios, se ha demostrado la eficacia de los fosfolípidos derivados de la soja y el aceite de krill (*Euphausia superba*) en la reducción de la sintomatología de artritis reumatoide y síndrome premenstrual (Sampalis et al., 2003). Los fosfolípidos derivados de la soja han resultado ser efectivos a nivel gastrointestinal, tanto disminuyendo los síntomas asociados al uso regular de Ácido Acetil Salicílico, como en la reducción del proceso inflamatorio en pacientes con colitis ulcerosa. Adicionalmente, se ha logrado mejorar el transporte y biodisponibilidad de medicamentos como el Ácido Acetil Salicílico, al ser administrados en combinación con dichos fosfolípidos (Lichtenberger et al., 2009).

2.4.3 Fosfolípidos y Cáncer

Se ha encontrado que la administración de FM con ácidos grasos Omega-3, extraídos a partir de harina de Calamar (*Loligo vulgaris*) y estrella de mar (*Asterias rubens*), inhibieron la progresión de cáncer de colon inducido químicamente *in vitro* (Sakakima et al., 2007). Además, ratas alimentadas con fosfolípidos abundantes en EPA y DHA mostraron un incremento significativo en la tasa de la apoptosis en ratas inducidas a carcinogénesis de colon con 1,2-dimetilhidracina (Fukunaga et al., 2008).

2.4.4 Fosfolípidos en Sangre y Efectos Cardiovasculares

Diversos autores han informado acerca del efecto de los fosfolípidos en la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total, de especial relevancia en pacientes con hiperlipidemia primaria y diabetes mellitus (Eshigina et al., 2007).

Estudios realizados en ratones, en los que se compararon dietas compuestas por TGs y fosfolípidos con elevado contenido de ácidos grasos Omega-3 DHA / EPA reportaron que, en el grupo alimentado con dietas de fosfolípidos, los animales presentaron una mayor capacidad para conservar un perfil metabólico saludable en condiciones obesogénicas (Rossmeisl et al., 2012). En este sentido, es posible especular que la absorción de los ácidos grasos Omega-3 ligados a un fosfolípido, se incorporan de manera más eficiente en las membranas celulares de diferentes órganos, aportando positivamente a la microestructura de las mismas y a su función.

2.4.5 Fosfolípidos y Desarrollo / Trastornos Neurológicos

Estudios realizados con suplementos de fosfolípidos de soja demostraron ser efectivos respecto a la reducción del estrés, mejorando la memoria, motilidad y cognición, disminuyendo la neurodegeneración en pacientes con enfermedad de Alzheimer, y mejorando parámetros asociados a la concentración en sujetos jóvenes y sanos (Favreliere et al., 2003, Kullenberg et al., 2012).

Estudios reportaron que los fosfolípidos de origen animal son más eficaces en revertir la deficiencia de ácido alfa-linolénico, debido a que proporcionan ácidos grasos

preformados de cadenas más largas (Bourre, 2004). La composición de los fosfolípidos se pudo corrobora en investigaciones realizadas por Torres 2013 (datos sin publicar), donde los FM han demostrado ser portadores importantes de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, ver **Tabla 1 pagina 32**.

Algunos autores han sugerido que la ingesta de fosfolípidos podría tener un efecto antioxidante frente a los cambios cerebrales inducidos posterior a la ingesta de alcohol (Jayaraman et al., 2008).

2.4.6 Fosfolípidos y Enfermedades Hepáticas

Se plantea que durante el consumo de alcohol, existe una reducción de los fosfolípidos en las membranas celulares a nivel hepático y que cuando se suplementa con fosfolípidos derivados de la soja, y de la leche de vaca, los fosfolípidos pueden ser incorporados directamente a este nivel, reduciendo las lesiones hepáticas y la acumulación de lípidos inducidas por el alcohol (Wat et al., 2009).

2.4.7 Fosfolípidos y Visión

Los niños que consumen leche suplementada con fosfolípidos provenientes de huevo enriquecido con Omega-3, presentan una mejor maduración de la agudeza visual (Hoffman et al., 2004).

2.4.8 Fosfolípidos como Antioxidantes

Se ha descrito que preparaciones naturales de fosfolípidos son capaces de estabilizar las membranas celulares frente a la oxidación. Efecto que, probablemente, sea consecuencia de la sustitución de la composición de fosfolípidos de membrana, y a la disminución de las perturbaciones en el sistema antioxidante (Jansen et al., 2013).

2.4.9 Otros Hallazgos Encontrados

La incorporación de FM en la dieta de los peces, se traduce en una mejora significativa de su eficiencia de crecimiento (Trushenski et al., 2013).

2.5 Fosfolípidos Marinos (FM)

Los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 de origen marino se forman en los cloroplastos de micro-algas, que forman parte de fitoplancton o macro-algas. Éstas son consumidas por los peces, quienes concentran los ácidos grasos EPA y DHA, bajo la forma de TGs, almacenados principalmente en el tejido adiposo y en el músculo, o en forma de fosfolípidos, a nivel de las membranas celulares, vísceras y cerebro (Takahashi and Inoue, 2012). La variación del contenido de ácidos grasos Omega-3 de cadena larga de los productos marinos, va a depender de la especie de pez, de la época y lugar de captura, así como del proceso industrial al que sea sometido (Castro, 2004) .

En estudios realizados en moluscos y caballa azul (*Scomber scombrus*), han indicado que la mayoría de los fosfolípidos marinos se componen de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, seguidos por fosfatidilinositol, fosfatidilserina y esfingomielina (Beaulieu et al., 2009). Adicionalmente, investigaciones efectuadas en huevos de atún han evidenciado una mayor cantidad de ácidos grasos Omega-3 en la fracción de fosfolípidos, respecto a la fracción de TGs (Hiratsuka, 2004). Además, los fosfolípidos son más estables a la oxidación que los TGs e incluso, tendrían efectos antioxidantes al ser añadidos a aceites que contienen ácidos grasos de cadena larga (King, 1992). En este sentido, se ha observado que la estabilidad de tejidos animales de origen marino que contienen alto contenido de fosfolípidos, como es el caso de los huevos de Salmón (*S. salar*) y calamar, es mayor respecto de otras especies que tienen mayor proporción de TGs (Eiríkur, 2010).

Los fosfolípidos de origen marino se están convirtiendo en un atractivo producto para industria farmacéutica y nutracéutica, esencialmente debido a que estos compuestos corresponden a la forma habitual que tienen los ácidos grasos Omega-3 en el organismo, por ejemplo, a nivel de membranas celulares y órganos. Al respecto, los ácidos grasos araquidónico y DHA ejercen sus funciones metabólicas formando parte de la estructura de los fosfolípidos que componen las membranas celulares, particularmente, la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina. Debido a su alto grado de poliinsaturación, estos ácidos grasos le aportan fluidez a las membranas, una característica esencial que permite la movilidad de las proteínas a este nivel (canales iónicos, receptores, uniones comunicantes, enzimas,

estructuras formadoras de vesículas, entre otras), ya sea en la superficie o en el interior de la bicapa lipídica (Schuchardt and Hahn, 2013).

Los fosfolípidos pueden estar conformados por diferentes tipos de ácidos grasos, sin embargo, el hecho que aporta características especiales a aquellos de origen marino, es que presentan en su composición un porcentaje alto de ácidos grasos Omega-3 (EPA y DHA) (Suzumura, 2005), como se puede observar en la **Figura 3**, donde se puede evidenciar que la abundancia relativa de fosfolípidos que contienen EPA Y DHA está alrededor de un 40,9 % para los lípidos insolubles en acetona que provienen de una harina de pescado (IA HP), mientras que para los lípidos insolubles en acetona de huevo enriquecido con Omega-3 (IA HO) no supera un 2 % y, como es obvio, ni la soja (IA S) ni el huevo convencional (IA H) tienen fosfolípidos con EPA y DHA.

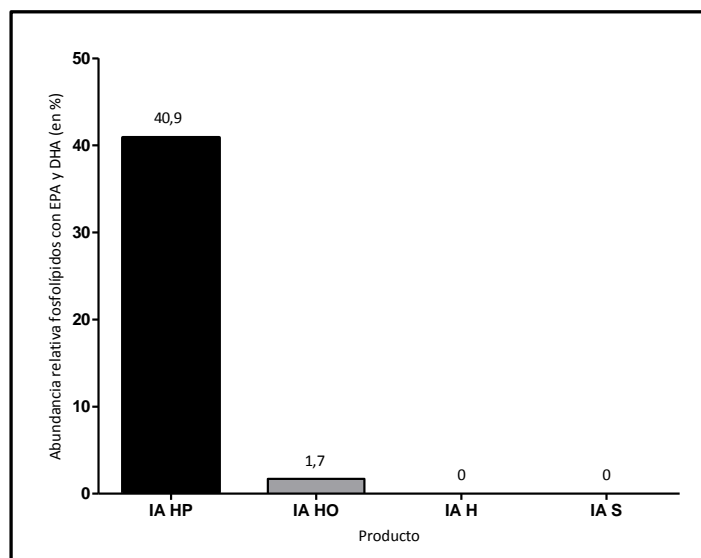


Figura 3. Abundancia relativa de fosfolípidos con EPA y DHA, expresada como porcentaje del total de fosfolípidos, realizada por espectroscopia de masas en diferentes productos. IA HP: lípidos insolubles en acetona de harina de pescado, IA HO: lípidos insolubles en acetona de huevo con Omega-3, IA H: lípidos insolubles en acetona de huevo, IA S: lípidos insolubles en acetona de la Soja. Fuente: (Torres, Datos sin publicar 2013)

2.5.1 Proceso Digestión y Absorción de Fosfolípidos

Se plantea que el 90 % de la digestión de los fosfolípidos ocurre a nivel intestinal. Dicho proceso ocurre como consecuencia de la actividad de dos enzimas provenientes del páncreas: las fosfolipasas A1 y A2. Estas enzimas hidrolizan en forma selectiva los ácidos grasos que se encuentran en las posiciones sn-1 y sn-2 de la molécula de glicerol, dando como resultado moléculas de lisofosfolípidos. La actividad de cada fosfolipasa es excluyente, situación que se traduce en que, si la fosfolipasa A1 hidroliza la unión del ácido graso en la posición sn-1 del fosfolípido, la fosfolipasa A2 no actuará sobre el lisofosfolípido formado. A su vez, si la fosfolipasa A2 actúa sobre la posición sn-2, no actuará la fosfolipasa A1. El producto obtenido de hidrólisis de los fosfolípidos siempre serán lisofosfolípidos, estando en mayor proporción los ácidos grasos unidos, principalmente, a la posición sn-2. Dicha situación se debe a que la fosfolipasa A1 es aproximadamente cien veces más activa que la fosfolipasa A2 (Arisz and Munnik, 2013). Respecto a la posición sn-3, ésta estará siempre ocupada por el grupo fosfato el que, a su vez, estará unido a una molécula de colina, etanolamina, serina, inositol, entre otras. Posteriormente, las moléculas serán absorbidas por los enterocitos como ácidos grasos libres y lisofosfolípidos, los que pueden ser re-esterificados como glicerofosfolípidos, y entrar en el torrente sanguíneo incorporándose a los quilomicrones y, en una pequeña proporción, en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Valenzuela, 2011). Sin embargo, algunos autores han mencionado que cerca del 20 % de los fosfolípidos intestinales son absorbidos pasivamente y sin hidrolizar, incorporándose directamente al colesterol HDL (Zierenberg and Grundy, 1982). A partir del colesterol HDL, los glicerofosfolípidos pueden ser transferidos a las membranas plasmáticas de diversas células a nivel de hígado, músculo, riñones, pulmón, células tumorales, entre otras, sin embargo, el metabolismo gastrointestinal de fosfolípidos de origen dietario, y los mecanismos de su incorporación en las membranas celulares para alcanzar efectos beneficiosos en la salud, no se conocen totalmente (Kullenberg et al., 2012).

Se ha demostrado que los glicerofosfolípidos provenientes de la dieta, son capaces de entregar sus ácidos grasos para ser incorporados en las membranas celulares alterando, de este modo, la composición de las mismas (Taylor et al., 2010). En síntesis, la ingesta de fosfolípidos con una composición específica de ácidos grasos tiene el potencial de modificar la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana en determinados tipos celulares. Como consecuencia, las funciones celulares, incluyendo la señalización, transporte, y actividad de las enzimas unidas a la membrana, también podrían ser moduladas por los fosfolípidos de origen dietario y, por lo tanto, podrían contribuir a los beneficios para la salud.

Los fosfolípidos cumplen un importante rol durante la absorción intestinal de lípidos, facilitando la formación de micelas, como fosfolípidos y, posteriormente, como lisofosfolípidos (Cohn et al., 2010). Al respecto, se ha especulado que la adición de una cantidad excesiva de fosfolípidos a nivel intestinal, debido a la suplementación con fosfatidilcolina, conduciría a la formación de micelas de gran tamaño, junto a la producción de enzimas para alcanzar el contenido del núcleo micelar, y a la reducción de la absorción de lípidos y colesterol; por otra parte, los fosfolípidos intestinales tienen la capacidad de interactuar con la membrana celular de los enterocitos, reduciendo su capacidad de absorción de colesterol (Cohn et al., 2010). Además, se ha descrito que, tanto el grado de saturación, como la longitud de cadena de los ácidos grasos unidos a los fosfolípidos, regulan la cantidad de colesterol absorbido a nivel intestinal. En este sentido, a mayor grado de saturación, y mayor longitud de cadena del ácido graso, menor es la absorción de colesterol (Cohn et al., 2010, Cohn et al., 2008).

2.5.2 Biodisponibilidad de Fosfolípidos de Origen Marino

Estudios realizados en niños, indican que los fosfolípidos de la dieta serían mejor absorbidos que los TGs (Ramirez, 2001). En este sentido, los fosfolípidos siguen el proceso de digestión y distribución en el cuerpo humano de manera simple. Por el contrario, los TGs son insolubles en agua, requiriendo de arduos procesos enzimáticos y de la acción de sales biliares, con el objetivo de formar micelas y ser absorbidos en el intestino delgado,

otra cualidad de los fosfolípidos en que al ser anfipáticos, los fosfolípidos tienen propiedades emulsionantes estando, además, involucrados en la formación de micelas mixtas, lo que puede incrementar la absorción de lípidos (Valenzuela, 2012a).

La biodisponibilidad a corto plazo de los FM ha sido evaluada a nivel de plasma y suero. En este sentido, la determinación de los niveles de los ácidos grasos EPA y DHA en las membranas de los eritrocitos proporcionan el mejor indicador de su biodisponibilidad en los tejidos a largo plazo, la que puede variar entre individuos (Schuchardt and Hahn, 2013).

El aceite de krill (*E. superba*), que contiene un porcentaje muy alto de fosfolípidos con ácidos grasos Omega-3 ha resultado ser más biodisponibles, encontrándose mayores niveles de EPA y DHA en el plasma (Maki et al., 2009, Schuchardt et al., 2011)

2.5.3 Mercado Actual de FM Ricos en Ácidos Grasos Omega-3;

Actualmente, la producción de FM a partir de diferentes materias primas constituye una práctica industrial consolidada en algunos países. A continuación, se mencionarán los productos de los cuales se obtienen y las principales marcas que se encuentran disponibles en el mercado:

- Noruega: la materia prima utilizada en la extracción de FM corresponde al Krill (*E. superba*), algas, cabezas de pescado (entre ellos, Salmón; *S. salar*). Las marcas comerciales más conocidas son: Superba® y Omegalec®/Qrill®, ambas de Aker BioMarine; Vectomega®, de EuroPharma.
- Dinamarca: las principales materias primas utilizadas en la extracción de FM son la harina y el aceite de pescado. Siendo las principales marcas comerciales: LIPAMIN MP 40®, de LECICO.
- Nueva Zelandia: las principales materias primas utilizadas corresponden a los Choritos, siendo la marca más importante Tripernol®, de BIO-MER9.
- Estados Unidos: la materia prima utilizada en la extracción de FM corresponde al aceite de Krill (*E. superba*). Y las marcas comerciales más importantes son: MarineOmega®, de Pharmanex, y Phosphaline®, de Ximogen.

- Francia: entre las materias primas más utilizadas en la extracción de FM están el Salmón (*S. salar*), y el aceite de tiburón y otros peces. Las marcas comerciales principales son: Brain Synergy®/Caviar Phospholipides®, de Novastell.
- Canadá: la principal marca corresponde a NKO®, de Neptune Technologies & Bioresources.

2.6 Situación Actual en Chile; Aceite de Pescado y Ácido Grasos Omega- 3

Actualmente, en Chile el aceite de pescado no sólo es utilizado en aspectos asociados a la nutrición humana, sino también corresponde a una materia prima fundamental en la industria acuícola. Dicha industria se encuentra en una fase de recuperación, posterior a la crisis ocasionada por el virus causante de la anemia infecciosa del salmón (ISA). En la actualidad, la demanda de aceite de pescado supera a la oferta, lo que provoca la gran elevación del precio de este producto (U\$ 1,800/tonelada), situación que ha obligado a importar este producto desde otros países, como Perú (Valenzuela, 2012b), situación que se observa en la **Figura 4** donde, en Chile, la demanda supera la oferta . Es por esta razón que surge la necesidad de maximizar el aprovechamiento de los recursos pesqueros producidos nacionalmente. Adicionalmente, las industrias alimentaria, farmacéutica y nutracéutica representan también un porcentaje elevado de la demanda actual de estos productos, utilizados bajo la forma de cápsulas, concentrados de ácidos grasos Omega-3, emulsiones, u otras formas comestibles (Jackson, 2008).

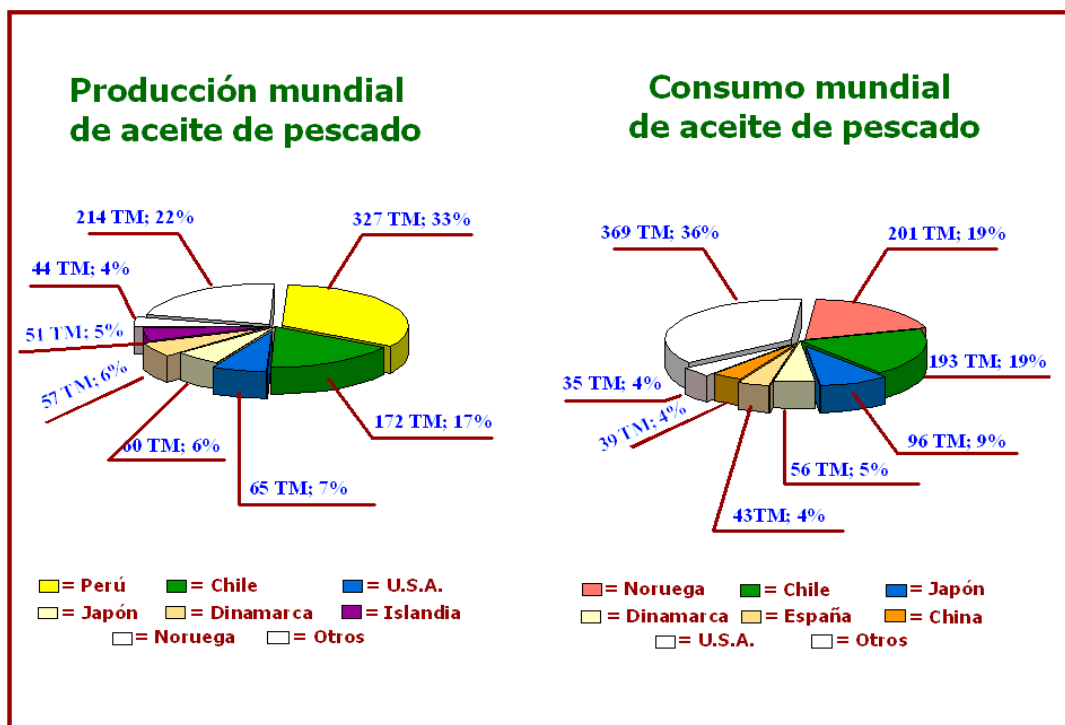


Figura 4. Producción y consumo mundial de aceite de pescado, expresado como toneladas métricas. Fuente (Valenzuela, 2012b)

En la actualidad, los recursos pesqueros en Chile están sujetos a un mayor control estatal ya que se ha debido limitar los volúmenes de captura. Situación que deriva, tanto de factores humanos, como naturales, tales como la depredación descontrolada del recurso y el terremoto ocurrido en el año 2010, que trasladó la zona de captura varias millas mar adentro, disminuyendo los niveles de obtención de estos productos, lo que se traduce en un incremento de los costos y el posterior aumento de su precio (Shepherd, 2008). Por otra parte, la industria farmacéutica, nutracéutica y de alimentos de mascotas han incrementado su demanda por aceites de pescado de forma significativa, lo que se observa en la **Figura 5** donde se puede detectar que la demanda de este producto sigue en forma creciente desde el año 2004 hasta la fecha, y se proyecta que puede seguir incrementando en los próximos años. Dicha situación, acrecienta la escasez y, por ende, su precio, como puede observarse en algunos informes de la Secretaría de Pesca (Secretaría de Pesca, 2012), en los que se aprecia cómo ha incrementado representativamente el valor del aceite de pescado, pasando de tener un valor de 610

dólares la tonelada en el año 2005, a tener un valor máximo en el año 2012 de 1.533 dólares por tonelada y, si dicha situación no se revierte, se proyecta que éste siga su tendencia al alza.

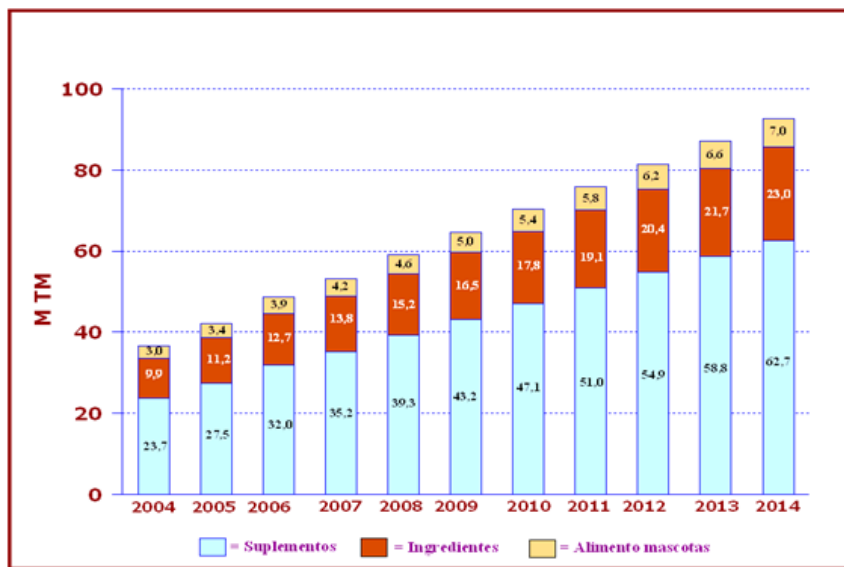


Figura 5. Volúmenes del mercado mundial de aceites marinos como suplementos, ingredientes y alimentos para mascotas, expresado como miles de toneladas métricas. Fuente:(Valenzuela, 2012b)

A modo de síntesis, es posible mencionar que el mercado de los productos que contienen ácidos grasos Omega-3 resulta atractivo, debido al permanente incremento en sus precios, y el constante aumento de su demanda. Sin embargo, un punto relevante a considerar corresponde al factor limitante que significan las materias primas, razón por la cual es necesario continuar en la búsqueda de materias primas alternativas, como pueden ser los subproductos que generados por la industria pesquera y acuícola.

2.7 Proceso Tradicional de Obtención de Aceites y Harina de Pescado

Tanto el aceite, como la harina de pescado se obtienen a partir de peces grasos, de captura o de subproductos de la industria acuícola, como lo son las cabezas, colas, vísceras, y otros residuos. El proceso de obtención de estos productos consiste en someter las materias primas a temperatura de cocción (100 - 120°C), durante 2 o 3 horas, con el fin de conseguir la desnaturalización de las proteínas, liberar la grasa, y eliminar

microorganismos patógenos. Luego se someten a un proceso de prensado, momento en el que el producto es denominado “torta”, obteniéndose un producto sólido que, posteriormente, es secado en túneles de calor a una temperatura de 50 – 60 °C, hasta conseguir un 8 % de humedad, momento en el cual el producto es molido, hasta obtener harina, la que es envasada con un porcentaje variable de grasa siendo, habitualmente, de un 6 - 10 % (Jackson, 2008). La fase líquida resultante es decantada y centrifugada con el propósito de separar el aceite de la fase acuosa.

2.8 Identificación y selección de materias primas a usar

Para identificar las posible materias primas es importante conocer los productos que se encuentran disponibles en el país y las características que éstos tienen, también es relevante poder conocer experiencias de trabajos anteriores que nos aporten una guía de cómo puede ser el trabajo. Según lo investigado, la harina o torta de pescado pueden ser las materias primas más viables. En este sentido, se ha encontrado que, en una harina de pescado con un 13,7 % de lípidos totales, éstos lípidos pueden estar distribuidos de la siguiente manera: 8,1 % de triglicéridos, 1,6 % de ácidos grasos libres, 0,6 % de colesterol, 0,3 % de diglicéridos, 0,3 % de lípidos polares móviles con acetona, 2,1 % de fosfatidilcolina y 0,7 % otros no identificados (Ackman, 1996). En otras investigaciones (Eiríkur, 2010) se encontró eficaz extraer fosfolípidos a partir de torta de pescado, que corresponde a una fase intermedia de la producción de harina de pescado, donde el producto tiene un 12 % de humedad, y ha sido sometido durante menos tiempo a altas temperaturas, evitando oxidación de lípidos, lo que podría entregar un producto con mejores condiciones.

Otro aspecto importante respecto a las harinas de pescado es que el porcentaje de grasa es perjudicial, ya que produce rancidez y oxidación, trayendo problemas como incendios o malas características organolépticas cuando se utilizan para alimentación animal. Con el propósito de solucionar este problema, se deben adicionar gran cantidad de antioxidantes, es por esto que también resulta interesante generar un proceso intermedio para reducir al máximo el porcentaje de grasa.

Para determinar la disponibilidad de las diferentes materias primas, se revisaron las estadísticas del sector pesquero y acuícola de Chile hasta el año 2012, concluyendo que los productos de mayor producción y exportación en Chile son la harina de pescado y los productos congelados (Secretaría de Pesca, 2012). Estos productos, a su vez, generan subproductos, tales como cabezas, colas, vísceras, que luego también son convertidos en harina. Además, se observó que, a nivel pesquero, los volúmenes más representativos de desembarque de peces pelágicos, y que ha permanecido más estables en el tiempo, es la Anchoqueta (*E. ringens*) (Secretaría de Pesca, 2012). Si observamos desde el sector acuícola, el pez que más se produce en Chile es el Salmón (*S. salar*) y, a pesar de que ha tenido algunos descensos, en estos momentos se encuentra en una fase de recuperación (Secretaría de Pesca, 2012).

2.9 Técnicas de extracción de FM y producción actual

2.9.2 Técnicas de extracción de FM con etanol

Se han realizado investigaciones para extraer fosfolípidos de origen marino, mediante el uso de solventes menos tóxicos, como el etanol al 99 % (Eiríkur, 2010), como en el uso de materias primas tales como: cabezas de Salmón (*S. salar*), Anguila (*Ophichthus spp*) y peces enteros como la Caballa (*Scomber japonicus peruanus*). En la presente investigación, se encontraron muy buenos resultados, ya que permitió extraer hasta un 27 % de grasa total en algunos productos, y hasta un 1 % de fosfolípidos, con respecto a la masa total. En estos procesos, la temperatura es una variable crítica en los efectos de la extracción, y se plantea que las condiciones óptimas son entre 60 y 75 °C. Los tiempos de proceso y agitación pueden variar desde los 10 minutos hasta los 40 minutos para hallar una extracción óptima. Otro aspecto relevante es la relación solvente:sustrato, la cual puede emplear desde 2:1 a 10:1 y los resultados van a depender de: la matriz, de los tiempos, y también de las temperaturas, para que el proceso sea óptimo. Además, la harina o sustrato no debe superar el 12 % de humedad.

El argumento que sustenta la idea de que el etanol es efectivo para la extracción de los fosfolípidos es el siguiente: los lípidos se clasifican en dos grupos, los lípidos neutros y

no polares (tri-, di- y mono-glicéridos y esteroides) y los lípidos polares (ácidos grasos libres, los esfingolípidos y fosfolípidos). Considerando que los lípidos neutros y no polares se disuelven bien en disolventes apolares, los lípidos polares, en particular fosfolípidos, sólo se disuelven en disolventes relativamente polares y uno de esos es el etanol, pero no se disuelven en solventes como la acetona, por esta razón denominamos a los fosfolípidos como insolubles en acetona (IA) (Suzumura, 2005).

Para corroborar las diferencias y la eficacia que tienen varios solventes sobre los fosfolípidos, se realizaron diversos ensayos durante la pasantía de investigación que se realizó en el laboratorio de *Oleos e Gorduras*, Universidad de Campinas Brasil. En esta instancia se tuvo la oportunidad de evaluar la extracción de lípidos y fosfolípidos en harina de pescado, utilizando diferentes solventes, situación que se aprecia en la **Figura 6**, donde se evidencia que la extracción de fosfolípidos es mayor cuando se usa como solvente el etanol. La **Figura 7** muestra que mediante el uso de etanol, se observa una mayor cantidad de lípidos insolubles en acetona, lo que quiere decir que al realizar la extracción con etanol, se obtiene una mayor cantidad de fosfolípidos.

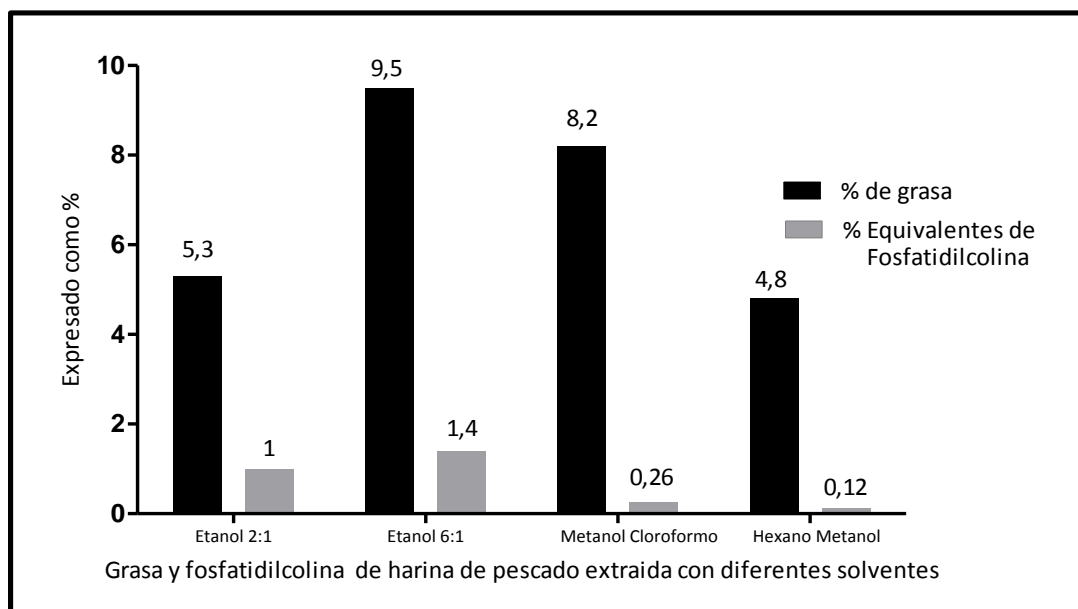


Figura 6. Extracción de material lipídico de harina de pescado utilizando diferentes solventes y mezclas de solventes, expresado como porcentaje de grasa y como porcentaje de equivalentes de fosfatidilcolina del total del producto.

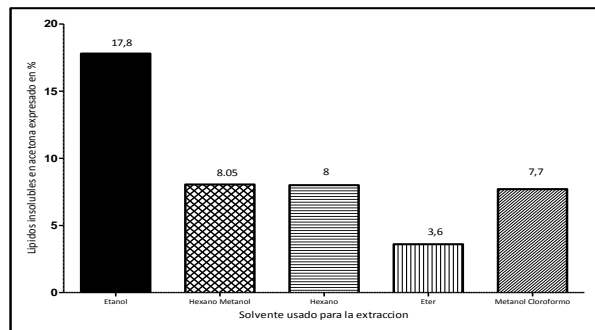


Figura 7. Insolubles en acetona de extracto graso de harina de pescado obtenido con diferentes solvente, expresado como porcentaje del total de extracto graso. Fuente (Torres, Datos sin publicar 2013).

Se han descrito y patentado otras técnicas de extracción de fosfolípidos que utilizan disolventes como hexano, fluidos supercríticos con CO₂, Etanol, y acetona (Jensen et al., 2003, Breivik, 2007b, Breivik, 2007a), sin embargo, estos procesos no se consideran óptimos, ya que pueden generar características indeseables en los productos alimenticios, o tener sistemas de baja capacidad y/o alto costo. Por lo que la industria ha comenzado a indagar en técnicas más amigables con el medio ambiente, con el consumidor y económicamente rentables.

2.9.3 Técnicas de extracción enzimática de FM

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas, que degradan los sustratos de origen proteico, dando como resultado cadenas más cortas (péptidos) o aminoácidos libres. El mecanismo asociado consiste en la degradación de las cadenas polipeptídicas de los complejos proteínas-sustrato, hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad (Carrera, 2003). Un enlace peptídico corresponde a la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua. Los principales usos que se han asociado a este tipo de enzimas se encuentran en la industria de los alimentos, e incluyen la elaboración de bebidas, en panificaciones, en galletería y como ablandadores de carne.

Una de las formas de dar valor agregado a los subproductos de pescado es convertirlos en hidrolizados por medio de enzimas proteolíticas. De esta forma, la parte proteica y a fase lipídica pueden ser aprovechadas. La fase proteica ha sido muy usada en

alimentación animal, y para elaborar medios de cultivo microbianos, como las peptonas. El precio de estos productos puede ser superior a la harina o ensilaje que se elaboran con tradicionalmente con los subproductos (Aspmo et al., 2005).

En algunos hidrolizados de vísceras de pescado se han aprovechado las enzimas endógenas (Šližytea et al., 2005), normalmente se realizan a temperaturas bajas y la multiplicación microbiana se controla mediante la disminución del pH, sin embargo, la adición de enzimas externas es un método más controlable y reproducible. Las enzimas más comúnmente usadas son las de origen bacteriano, como la Alcalaza[®], Neutrasa y Protamex[®] o vegetales como papaína, bromelina y ficina, y se han encontrado buenos resultados (Beaulieu, 2009, Kechaou et al., 2009, Liaset et al., 2000) (Gbogouri et al., 2006, Hathwar et al., 2011).

Evidentemente, en este proceso se hidrolizan las proteínas y, por consiguiente, se liberan los fosfolípidos que se encuentran en las membranas celulares. Por esta razón, se han encontrado diversas investigaciones en las que se realizan proteólisis controladas, las cuales, posteriormente, son sometidas a un proceso de separación por centrifugación. De esta forma se obtiene tres fases: lipídica, proteica, y acuosa, en la que se ha encontrado que los fosfolípidos están en mayor proporción (Kechaou et al., 2009, Dumay et al., 2009). También se plantea que las proteínas forman complejos con los lípidos polares (Aspmo et al., 2005), en este caso, los fosfolípidos forman emulsiones bastante estables.

Entre las investigaciones encontradas se visualizó que las enzimas que proporcionan mejores resultados son Protamex[®] y Alcalaza[®], en estos procesos, mediante la hidrólisis enzimática de las proteínas, se ha logrado recuperar hasta 74 % de los lípidos contenidos en peces. En este sentido, la mayoría de las investigaciones utilizan una dilución de 1:1 torta:agua y, entre las variables que se deben controlar en el proceso están: el pH, la temperatura, concentración de la enzima y tiempos de hidrólisis (Beaulieu et al., 2009). Para profundizar un poco más, vamos a describir las características que tienen las dos enzimas sugeridas.

- Protamex[®]: Producida por Novozymes[®], fue desarrollado para la hidrólisis de proteínas de los alimentos y cumple con las exigencias de pureza para las enzimas

de grado alimenticio, fijada por la FAO / OMS, (Jefta) y el *Food Chemicals Codex* (FCC) (Dumay, 2006). Es un complejo de clase hidrolasa, péptido desarrollado por varias especies de *Bacillus*. Protamex® corresponde a una mezcla de enzimas Alcalaza® y Neutrase; debido a que es una mezcla de enzimas, presenta la siguiente codificación: EC 3.4.21.62 y EC 3.4.24.28. La actividad que declara Protamex® es de 1,5 UA / g. Las condiciones óptimas de trabajo son: un pH entre 5,5 y 7,5 y una temperatura de entre 35 y 60 °C, para ser inactivada se puede hacer mediante calentamiento a 85 °C durante 10 minutos, cuando el pH es 8 (Dumay et al., 2009).

- Alcalaza®: Producida por Novozymes®, se elabora por fermentación de una cepa seleccionada de bacteria *Bacillus licheniformis*, su componente principal es la enzima subtilisina A (Subtilisina Carlsberg), una endopeptidasa que tiene residuos de serina como sitio catalizador (Dumay, 2006). Esta enzima tiene los permisos de la FAO para ser utilizada en Alimentos, el número de enzimas es Alcalaza® EC 3.4.21.62, 3.4.21.19 y 3.4.22.31. Las condiciones óptimas para la hidrólisis son: temperatura entre 55 y 70 °C y un pH entre 6,5 y 8,5. La actividad se declara 2,4 AU / g. La Alcalaza® puede ser inactivada por calentamiento a 85 °C durante 10 minutos cuando el pH es 8 (Dumay et al., 2009)

2.10 Purificación y concentración de Fosfolípidos

Para la extracción de los fosfolípidos se requiere de aislar de otros componentes como triglicéridos, proteínas, aminoácidos, péptidos, polisacáridos, azúcares (Suzumura, 2005), en la literatura se han encontrado varias formas de concentración y purificación entre ellas :

- Separación en columna de sílice
- Separación por micro y nano filtración
- Separación por insolubles en acetona

Separación en columna: el fosfolípido tiene un grupo fosfato y grupos amino, una parte de la porción de la molécula es hidrófila, esto indica que se debe emplear una mezcla disolvente que sea suficientemente polar para recuperar los fosfolípidos de la muestra, pero no lo suficiente para disolver los lípidos neutros y no polares (Suzumura, 2005). De esta forma, en una columna o fase estacionaria se incorpora la matriz y, posteriormente, se adiciona una fase móvil de diferentes solventes o mezclas de solventes de forma escalonada, todo esto con el propósito de retirar cada fracción lipídica (Fernandes et al., 2012). Posterior a la separación en columna, a cada fracción se le retira el solvente mediante evaporación.

Nano y micro filtración: este procedimiento se ha realizado en hidrolizado de subproductos de pescado y consiste en pasar la materia prima por filtros de diferente dimensión, dejando en cada uno de los tamices los diferentes tipos de lípidos (Dumay, 2006). Sin embargo, para alcanzar este objetivo se requiere contar con equipos más sofisticados, y los rendimientos y nivel de separación no son óptimos, ya que los hidrolizados también cuentan con una gran cantidad de interferentes como aminoácidos y proteínas, entre otros.

Insolubilidad y precipitación en acetona: este procedimiento consiste en adicionar a la materia grasa, cantidades representativas de acetona, tanto a temperaturas bajas como altas. En la acetona sólo se solubilizan los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y una cantidad mínima de fosfolípidos, posterior a esto se realiza una centrifugación, donde precipitan los fosfolípidos y posteriormente pueden ser retirados (AOCS, 2011). Esta técnica también fue aplicada durante la pasantía de investigación en el laboratorio de *Oleos e Gorduras*, de la Universidad de Campinas, y se encontró que se pueden purificar los fosfolípidos. Otro hallazgo importante consistió en que los contenidos de ácidos grasos Omega-3 que están presentes en el extracto lipídico, no se ven perjudicados por el proceso de purificación con acetona. Se observa que, una vez purificados los fosfolípidos, los ácidos grasos que más disminuyen son los de cadena corta, y los de cadena larga,

tienden a permanecer o concentrarse más. Esto quiere decir que los fosfolípidos tienen incorporados en su gran mayoría ácidos grasos de cadenas más largas ver **Tabla 1**.

Liofilización: es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente, sin pasar por el estado líquido, lo que hace que el producto no tenga que exponerse a altas temperaturas, protegiéndolo de procesos como la oxidación (Mohammed-Saeid et al., 2012).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de extracto lipídico y de insolubles en acetona (fosfolípidos) de diferentes productos.

Ácido graso	Harina de pescado				Huevo con Omega-3				Soja			
	EG		IA de EG		EG		IA de EG		EG		IA de EG	
	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-	%	+/-
C12:0	0,39	0,02	0,00	0,00	0,12	0,03	0,02	0,03	0,07	0,03	0,09	0,13
C14:0	4,50	0,04	2,83	0,02	0,39	0,04	0,14	0,03	0,13	0,05	0,18	0,08
C15:0	0,96	0,00	0,83	0,00	0,07	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	22,76	0,10	23,69	0,13	21,70	0,07	26,71	0,10	10,93	0,08	23,11	0,03
C16:1	6,87	0,04	4,67	0,05	3,70	0,07	1,11	0,01	0,10	0,00	0,11	0,02
C17:0	2,39	0,01	2,44	0,07	0,22	0,00	0,24	0,00	0,10	0,00	0,18	0,00
C17:1	0,62	0,01	0,62	0,01	0,20	0,01	0,08	0,00	0,05	0,00	0,05	0,01
C18:0	6,69	0,05	10,96	0,03	8,56	0,11	17,30	0,06	4,44	0,08	4,48	0,15
C18:1	18,80	0,62	20,16	0,13	44,41	0,23	28,38	0,10	25,21	0,10	13,45	0,21
C18:2T	0,21	0,02	0,17	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2	2,40	0,21	1,75	0,12	13,53	0,16	12,72	0,05	51,13	0,33	51,66	0,40
C18:3 T	0,25	0,00	0,37	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,09	0,04
C18:3	1,10	0,05	0,61	0,01	3,36	0,05	0,66	0,01	6,60	0,06	5,46	0,04
C20:0	1,61	0,02	0,90	0,01	0,14	0,00	0,11	0,03	0,40	0,01	0,21	0,01
C20:1	1,34	0,04	1,13	0,05	0,21	0,02	0,15	0,00	0,21	0,02	0,14	0,03
C20:4	1,92	0,01	2,54	0,04	1,10	0,03	3,92	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,24	0,00	0,33	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,47	0,01	0,53	0,02
C20:5 EPA	7,89	0,11	4,53	0,02	0,08	0,01	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,81	0,01	2,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,02	0,36	0,00
C24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,01	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5	1,33	0,00	1,34	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6 DHA	16,94	0,04	17,95	0,01	1,92	0,06	7,65	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00

EG = extracto graso IA = grasa insoluble en acetona

Fuente :(Torres, Datos sin publicar 2013)

3. Objetivo general

Obtención de FM ricos en Omega-3 mediante técnicas enzimáticas o químicas, a partir de torta de Anchoqueta (*E. ringens*) y de torta de residuos de la industria salmonicultora.

3.1 Objetivos específicos

- Diseñar procedimientos de extracción de los FM Omega-3 por medio de métodos químicos y/o biotecnológicos (enzimáticos) aplicables en la industria alimentaria.
- Desarrollar procedimientos de purificación y concentración de los FM Omega-3.
- Caracterizar los compuestos obtenidos después del proceso de extracción por medio de análisis fisicoquímicos.
- Evaluar los resultados obtenidos a través de la caracterización de los FM Omega-3 de las diferentes fuentes.

4. Diseño de estudio y metodología

En el proyecto se plantea un estudio de tipo descriptivo - comparativo, en el cual las matrices: torta de Salmón (*S. salar*) y torta de Anchoqueta (*E. ringens*), serán sometidas a diferentes tratamientos de extracción de lípidos usando técnicas enzimáticas y solventes. También se pretende concentrar o purificar los fosfolípidos de la materia grasa. Posteriormente, se realizarán pruebas fisicoquímicas para describir cuál de éstas tiene las mejores características fisicoquímicas y nutricionales.

4.1 Muestras

De acuerdo a la información recopilada, se concluyó que la materia prima más viable de utilizar es la torta de pescado, que es un producto intermedio de la producción de la harina de pescado, a la que no se ha extraído totalmente la humedad. En este punto se puede plantear un paso más en el proceso productivo, donde se optimice más el recurso,

extrayendo un elemento de alto valor comercial y nutricional como lo son los fosfolípidos. Las dos especies seleccionadas, debido a su abundancia y volúmenes de producción en el país, son el Salmón (*S. salar*) y la Anchoveta (*E. ringens*).

La torta de Salmón (*S. salar*) proviene de los subproductos de la industria acuícola, en este caso se incluirán: cabezas, colas, piel, aletas, vísceras y trozos de peces que no cumplen con las especificaciones. En el caso de la torta de Anchoveta (*E. ringens*), se utilizará la que proviene de la producción de aceite y harina, que fue elaborada con el pescado entero. Para ambos casos, las muestras deberán tener entre un 8 a 12 % de humedad. Una vez recibidas, las muestras deberán ser almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso, empleando 2 Kg de muestra, como máximo.

4.2 Equipos a emplear

Para los procesos de obtención de fosfolípidos se va utilizar un Birreactor con 4 litros de capacidad útil, cuerpo y tapa en acero inoxidable 316, incluye sistema de control de temperatura, agitación, pH y carga-descarga, chaqueta calefactora, motor de agitación de 0 - 500 rpm, termorregulador, sensor y controlador de pH, bomba dosificadora de ácido-base, compresor rotámetro, manómetro, termocupla, toma muestras, válvulas de seguridad.

Para la caracterización y análisis de fosfolípidos se utilizarán los siguientes equipos:

- Rancimat
- Rota evaporador
- TLC-FID
- Balanzas
- Centrífuga
- Liofilizador
- Espectrofotómetro

4.3 Diseño experimental

Se utilizará un modelo matemático y estadístico que permite modelar y analizar cómo las variables pueden influir sobre una variable de interés. El objetivo principal consiste en optimizar la variable más relevante, lo que se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema (Chacin, 2000). Para este caso, y en todos los experimentos nuestras variables de interés son: el extracto lipídico, contenido de fosfolípidos, y abundancia de ácido grasos Omega-3 de cadena larga. Las variables a controlar y manipular serán: concentración de solvente, concentración de enzima, temperatura y tiempo de proceso. De esta forma, se busca establecer los valores óptimos de estas variables, accediendo a usar modelo que nos permita optimizar los recursos, para encontrar el mayor rendimiento posible.

4.4 Análisis de laboratorio y técnicas a emplear

Tabla 2: Análisis de laboratorio y técnicas a emplear

Análisis	Técnica
Humedad	Método para determinar la humedad y cualquier material volátil en las condiciones de la prueba, estufa calefactora (AOCS, 2009a).
Grasa total	Método Bligh y Dyer extracción de lípidos en frío con Metanol y Cloroformo (Beaulieu et al., 2009).
Proteínas	Método Kjeldahl, Determinación de la concentración de nitrógeno presente en la muestra para luego ser transformado a través de un factor en proteína.
Índice de Peróxidos	Determinación de peróxidos mediante la oxidación del yoduro potasio. (AOCS, 2013)
TBA	Determinación directa del valor de ácido 2-tiobarbitúrico (AOCS, 2009c).
Acidez	Determinación de ácidos grasos libres existentes en la muestra (AOCS, 2012).
pH	pH metro.

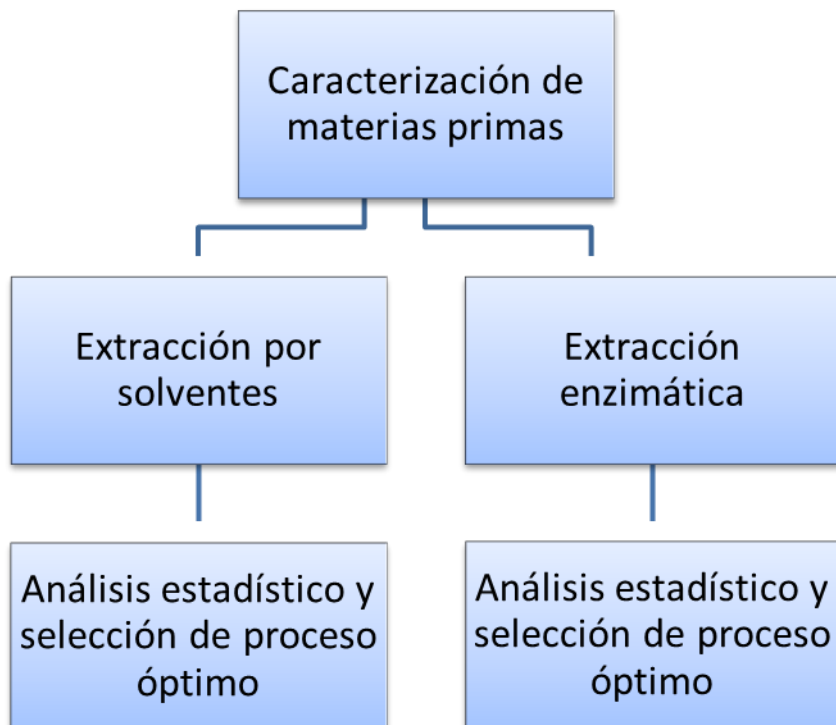
Composición en ácidos grasos	Cromatografía de gases (AOCS, 2006).
Fosfolípidos totales	Técnica colorimétrica espectroscopía UV, reacción entre ferrotiocianato de amonio y fosfolípido. (Dumay et al., 2009).
Contenido de colesterol.	Cromatografía TLC-FID (Dumay et al., 2009).
Perfil TG, DG, MG, AG.	Determinación de mezclas de glicéridos mediante cromatografía de adsorción sólido-líquido TLC-FID (Dumay et al., 2009) o TLC (AOCS, 2009b).
Periodo de inducción	Rancimat

5. Desarrollo del Proyecto

5.1 Fase 1 extracción de material lipídico rico en fosfolípidos

La primera fase comprende los siguientes aspectos: extracción de materia grasa rica en fosfolípidos, caracterización de materias primas, desarrollo de modelos experimentales para método enzimático y con solventes, evaluar variables de proceso y realizar análisis estadísticos para seleccionar el proceso más óptimo de obtención de fosfolípidos, para mayor detalle ver flujograma de proceso **Figura 8** y su descripción.

Figura 8: Flujograma del proceso general de la fase 1: extracción de material lipídico rico en fosfolípidos



5.1.1 Caracterización de materias primas

En esta primera instancia se requiere caracterizar la materia prima, realizando análisis de Humedad, grasa total, proteína, índice de peróxido, TBA, acidez, composición de ácidos grasos, fosfolípidos totales, colesterol, perfil de triglicéridos y pH. Con el objetivo de conocer las condiciones iniciales de las muestras y observar, posteriormente, si existe algún cambio.

5.1.2 Obtención del extracto graso

Las grasas se extraerán con etanol y enzimas (Alcalaza® y Protamex®), cada método tendrá un diseño experimental de superficie – respuesta que permite escoger el proceso óptimo dentro de cada técnica, cuya metodología será explicada posteriormente.

5.1.3 Análisis estadístico y selección de condiciones óptimas

- Si se requiere se realizaran test de hipótesis por Kruskal Wallis (Sheskin, 2004).
- Se debe realizar un análisis estadístico utilizando la metodología de superficie-respuesta a cada una de las técnicas, para definir las condiciones óptimas, esta técnica utiliza como herramientas: gráficos de contornos y ecuaciones de notación matricial, para encontrar un punto de respuesta máximo, mínimo o silla, de nuestra variable de interés.

5.1.4 Modelo experimental de extracción por etanol

El proceso de extracción con solvente consiste en suspender la materia prima en etanol 99 %, durante un tiempo y temperatura determinados **Figura 9**. Posteriormente, el producto se somete a una filtración y rota evaporación, con el objetivo de retirar el alcohol y dejar sólo el material lipídico.

Se utilizarán diferentes condiciones de temperatura, tiempo y relación sustrato: solvente, lo cual permitirá hallar el modelo óptimo de extracción, optimizando las variables mencionadas, lo que puede ser económicamente representativo para la industria.

Basado en estudios anteriores (Eiríkur, 2010) se decide probar tiempos de extracción y agitación de 10, 20, 40 minutos, relación de Etanol:sustrato de 4:1, 5,5:1 y 7:1 y, con respecto a las temperaturas, se emplearán 60 y 75 °C, esto nos da un total de 18 ensayos por separado ver **Figura 10**, los cuales se realizaran por triplicado. Realizar este gran número de experimentos puede resultar de gran utilidad, ya que existen muchas formas de evaluar el proceso y optimizar los rendimientos. Cada resultado de extracción se expresará como porcentaje extraído de la muestra total (rendimiento para grasa total y fosfolípidos). Es importante mencionar que, en cada uno de los experimentos, se va a emplear antioxidante TBHQ a una concentración de 200 ppm, para evitar la oxidación de los lípidos.

Figura 9: Flujograma del proceso de obtención material lipídico rico en fosfolípidos Omega-3, por medio de la técnica de Etanol.



Figura 10. Extracción de lípidos con Etanol, se especifica: proporción (materia prima: sustrato), tiempo y temperatura de proceso.

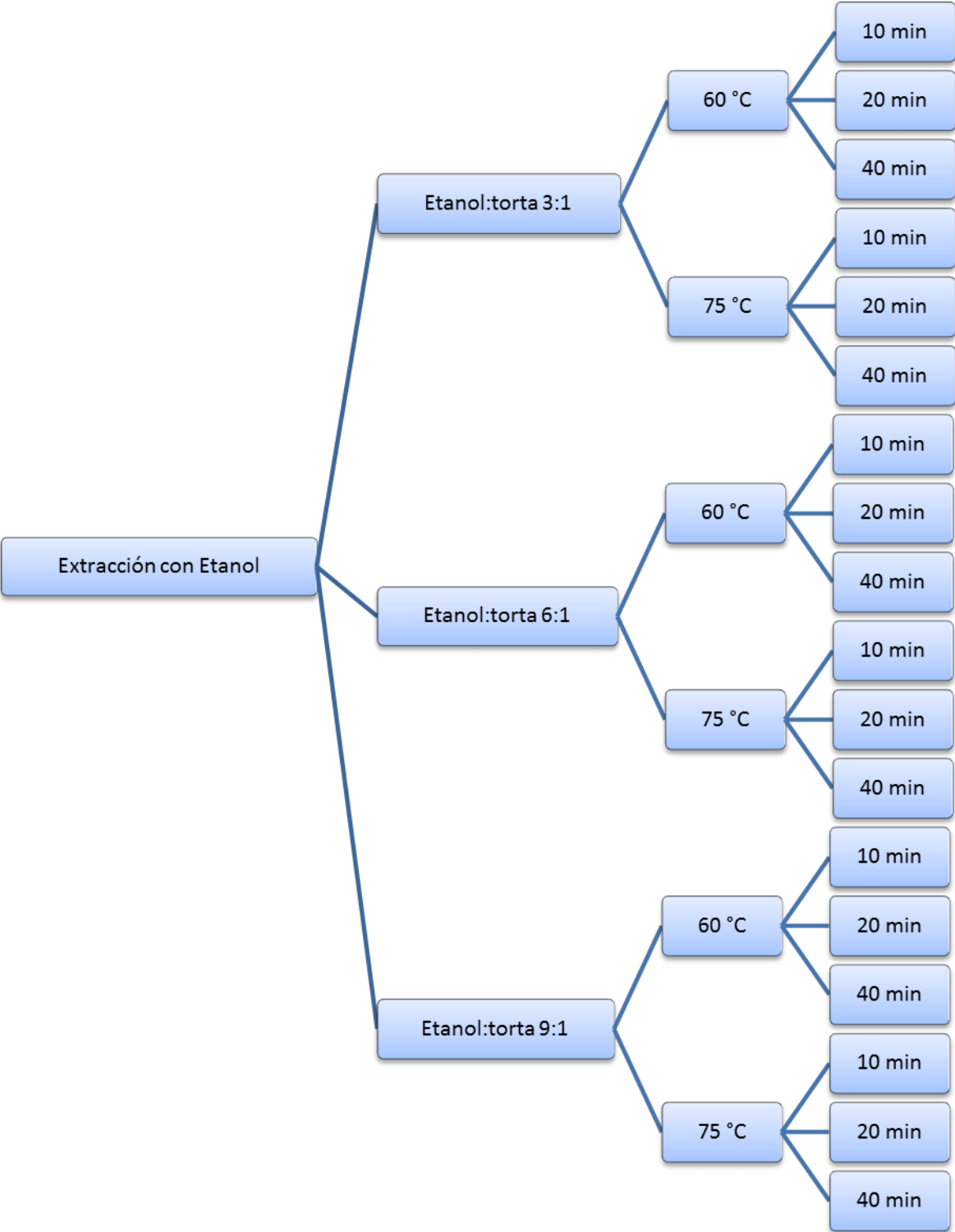


Tabla 6. Variables a controlar, o evaluar, en cada una de las etapas del método con solventes.

ETAPA	VARIABLE
Obtención de la torta y estandarización de humedad 12 %	Humedad.
Adición de alcohol y antioxidante	pH, temperatura.
Tratamiento Térmico	Tiempo, temperatura.
Filtración	No aplica
Cuantificación de fosfolípidos	Grasa total, Fosfolípidos totales.
Al proceso seleccionado como el mejor, se le realizarán diversos análisis.	Humedad, grasa total, proteína, índice de peróxido, TBA, acidez, composición en ácidos grasos, fosfolípidos totales, colesterol, perfil triglicéridico, periodo de inducción, pH.

5.1.5 Extracción por método enzimático

El proceso de hidrólisis se realiza en bioreactor, bajo condiciones controladas de pH, temperatura y velocidad de agitación. En el caso de la torta de pescado, se mezcla y homogeneiza con agua destilada (relación 1/1, w/v), se añade la enzima y a se agita a 700 rpm. Durante la hidrólisis, el pH permanece constante (pH 8,0), para lograr esta condición, se adiciona NaOH 2M cada vez que se requiera. Luego, se eleva la temperatura, según el experimento, y se espera el tiempo requerido ver **Figura 12 y Figura 13**. Una vez finalizado el proceso de hidrólisis, se procede a inactivar las enzimas a una temperatura de 80 °C por 10 minutos, para posteriormente centrifugar para separar las fases. También se empleará un modelo experimental de superficie respuesta, para buscar mejores rendimientos.

Figura 11: Flujograma del proceso de obtención material lipídico rico en fosfolípidos Omega-3 por medio de la técnica de hidrólisis enzimática.

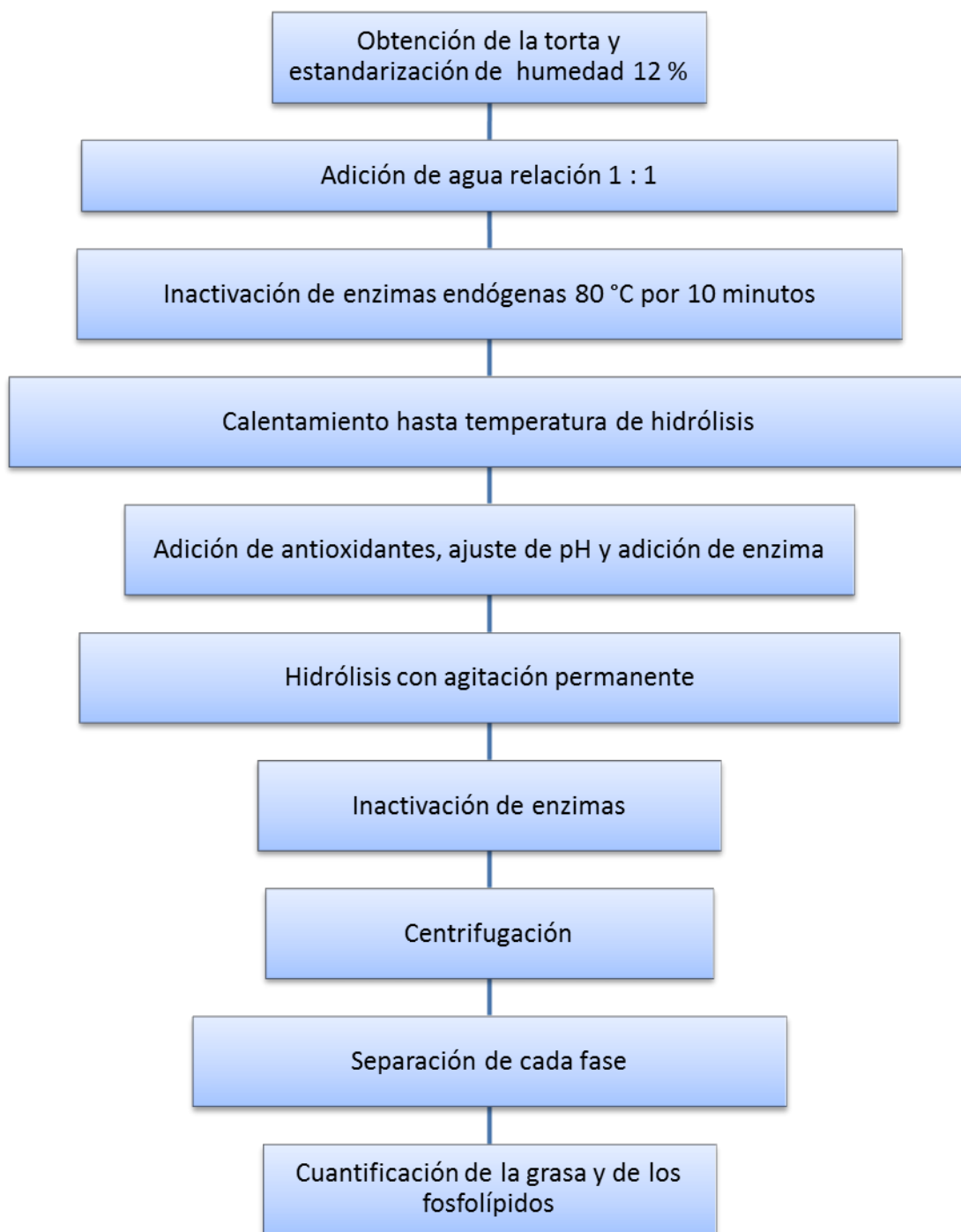


Figura 12: Extracción de lípidos con enzima Protamex®, se especifica: concentración de la enzima, tiempo y temperatura de proceso.

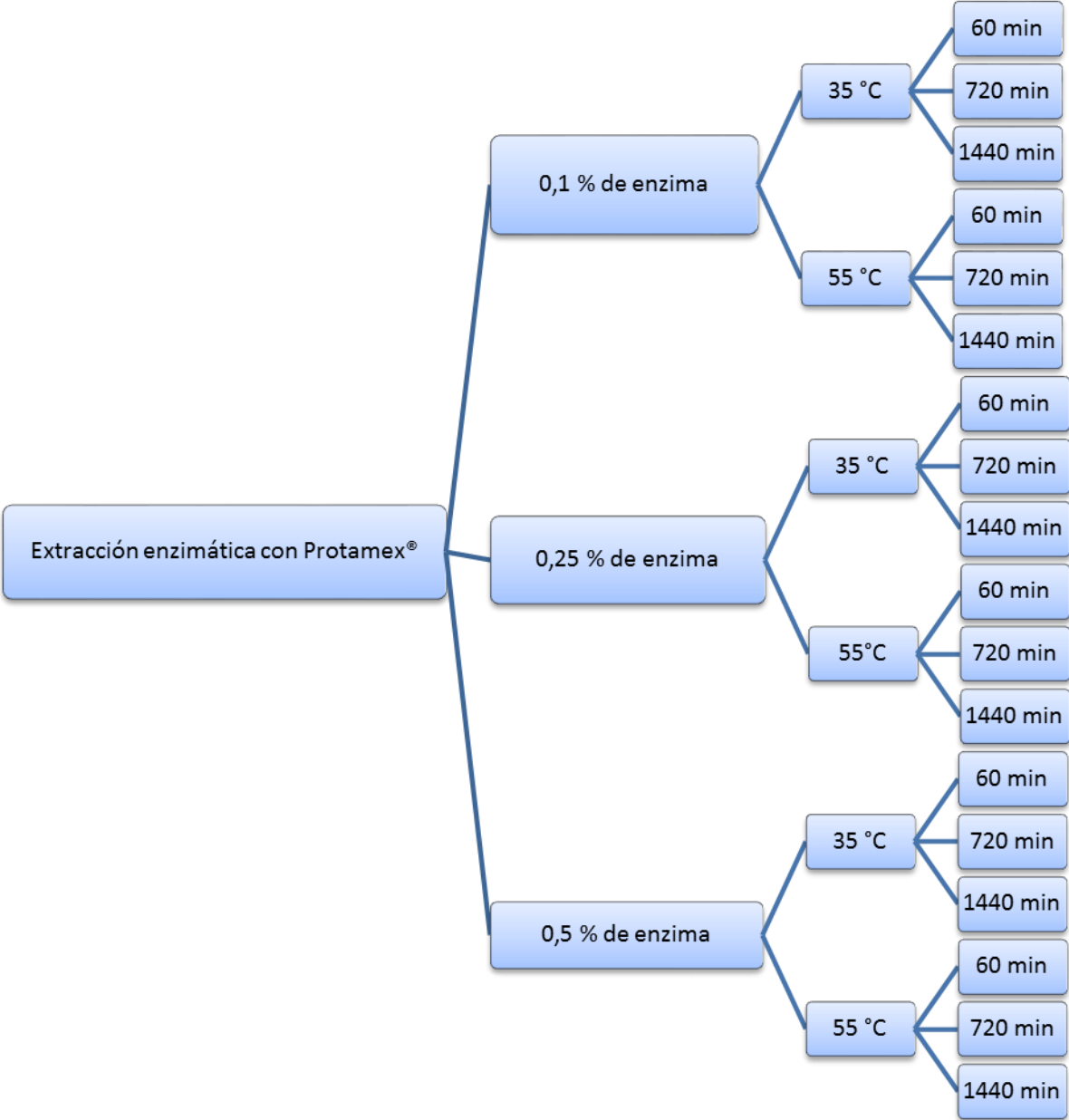


Figura 13. Extracción de fosfolípidos con enzima Alcalaza®, se especifica: concentración de la enzima, tiempo y temperatura de proceso.

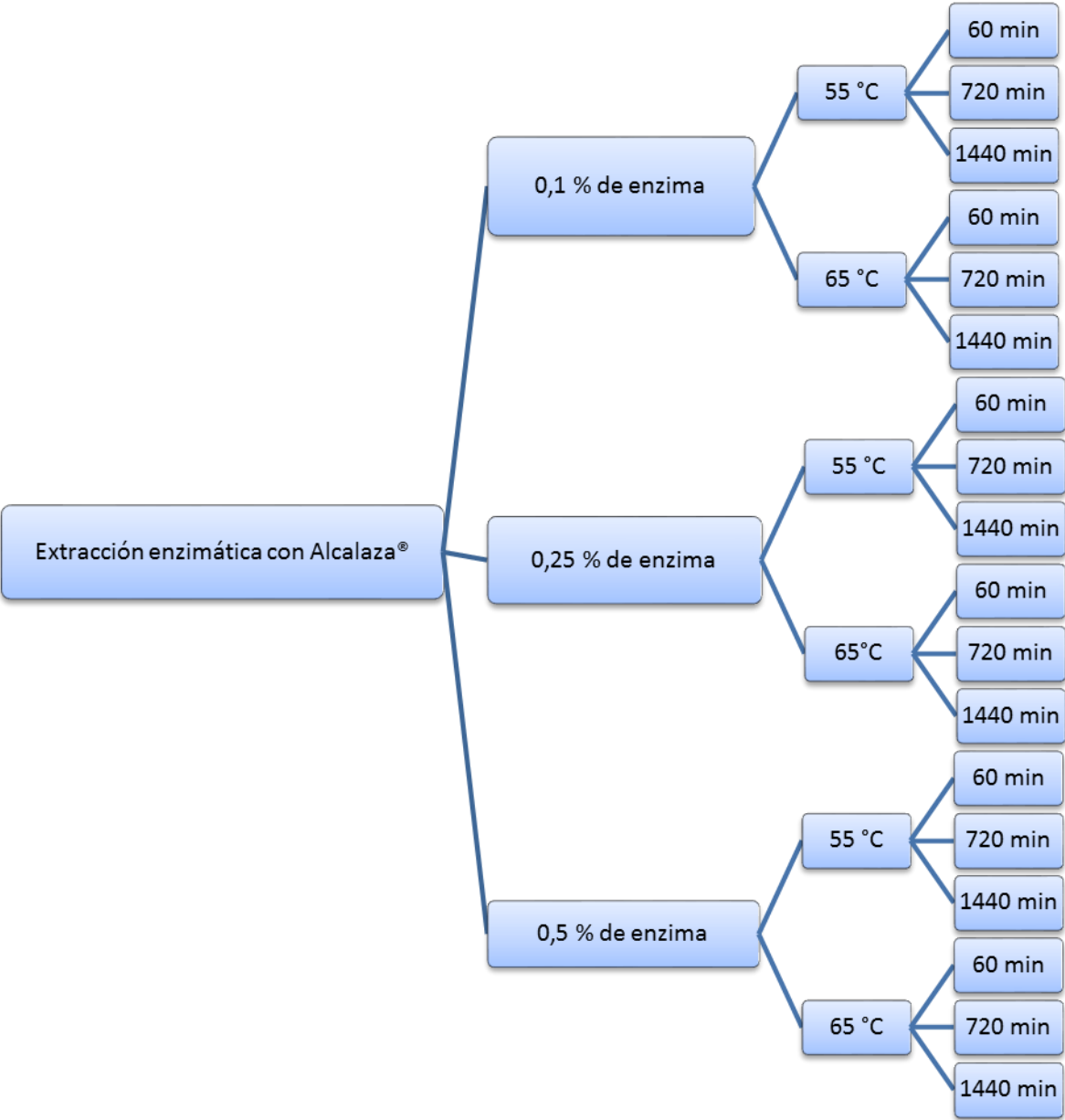


Tabla 9. Variables a evaluar en cada una de las etapas del método enzimático

ETAPA	VARIABLE
Estandarización de torta	Humedad.
Inactivación de enzimas	Temperatura.
Estandarización de pH y adición de enzima	pH, temperatura.
Hidrólisis	pH, temperatura , tiempo, vacío.
Inactivación de enzimas	Temperatura, tiempo.
Separación de fases	
Cuantificación de lípidos y fosfolípidos	Humedad, grasa total, proteína, índice de peróxido, TBA, acidez, composición en ácidos grasos, fosfolípidos totales, colesterol, perfil triglicéridico, periodo de inducción, pH.

5.1.6 Clasificación de las variables fase 1

Variables dependientes

- % de materia grasa obtenida
- % de equivalentes de fosfatidilcolina

Variables independientes

- pH
- Temperatura
- Concentración de Etanol
- Concentración de enzima
- Tiempo
- Velocidad de agitación
- Cantidad de agua y torta

5.1.7 Análisis estadístico

- Se realizan test de hipótesis por Kruskal Wallis (Sheskin, 2004).
- Se debe realizar un análisis estadístico utilizando la metodología de superficie-respuesta a cada una de las técnicas, para definir las condiciones óptimas.

5.2 Fase 2 purificación y/o concentración de fosfolípidos

Una vez obtenida la materia lipídica por medio de solventes, o el hidrolizado – centrifugado, proveniente de la hidrólisis enzimática, se pretende encontrar una presentación más pura, o más concentrada para entregarla al cliente, la que va a depender del tipo de extracto que obtengamos. En el caso de la extracción con etanol, se espera un extracto graso que podrá ser manejado con la técnica de insolubles en acetona, y en el caso de la técnica enzimática se obtiene un producto acuoso, en el cual se propone la liofilización para su concentración.

Insolubilidad de fosfolípidos en acetona: Esta técnica consiste en aprovechar que los fosfolípidos son insolubles a la acetona. El procedimiento se realiza aplicando al extracto graso, acetona fría 4°C, luego se pone baño agua a 52 °C, luego se pone en baño agua hielo y finalmente se centrifuga para obtener el precipitado, que son los fosfolípidos. Ver **Figura 14**.

El producto resultante de la hidrólisis enzimática posee un elevado contenido de humedad, esto hace que sea compleja la purificación usando solventes. Razón por la cual se plantea liofilizarlo para retirar la humedad sin necesidad de calentar.

Figura 14: Flujograma del proceso de purificación de fosfolípidos Omega-3 por medio de la técnica de insolubles en acetona.

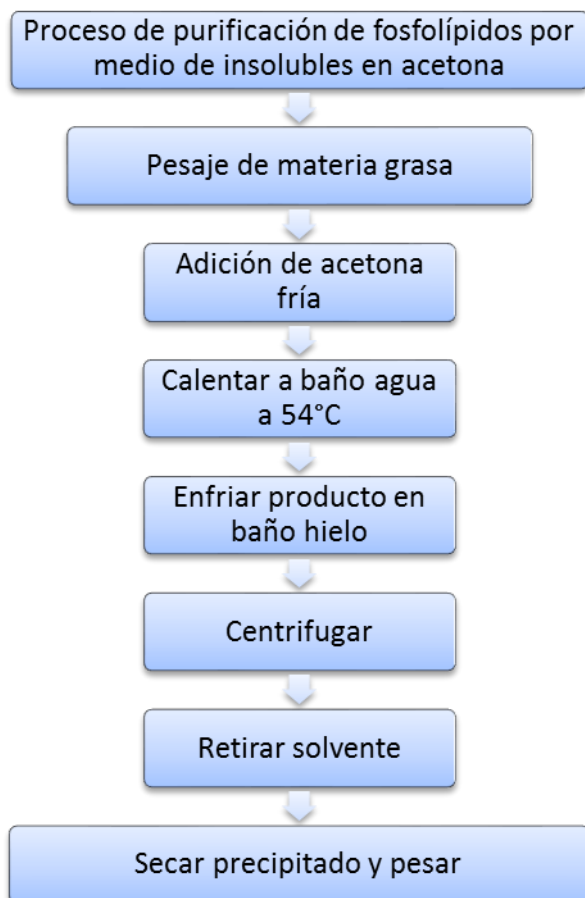


Tabla 10 Análisis de laboratorio a realizar:

Análisis a realizar
Humedad, grasa total, proteína, índice de peróxido, TBA, acidez, composición en ácidos grasos, fosfolípidos totales, colesterol, perfil de triglicéridos, periodo de inducción, pH.

5.2.1 Clasificación de las variables fase 2

Variables dependientes

- Porcentaje (%) de insolubles en acetona
- Extracto seco liofilizado
- Porcentaje (%) equivalentes de fosfatidilcolina

Variables independientes

- Temperatura
- Tiempo
- Presión

Análisis estadístico

Para este caso se aplican pruebas de hipótesis por Kruskal Wallis (Sheskin, 2004).

5.3 Fase 3: caracterización de fosfolípidos

Una vez extraídos y asilados los fosfolípidos, es importante conocer sus características dentro de ellas planteo realizar los siguientes análisis:

Tabla 11 Variables a evaluar

Análisis
Composición en ácidos grasos.
Cuantificación específica de cada fosfolípido.
Contenido de colesterol.
Perfil TG, DG, MG, AG.
Contenido de proteína.

5.3.1 Clasificación de las variables fase 3

Variables dependientes

- Perfil de ácido grasos
- % de equivalentes de fosfatidicolina
- Colesterol

Variables independientes

pH

Temperatura

5.3.2 Análisis estadísticos

- Se realizan test de hipótesis por Kruskal Wallis (Sheskin, 2004).

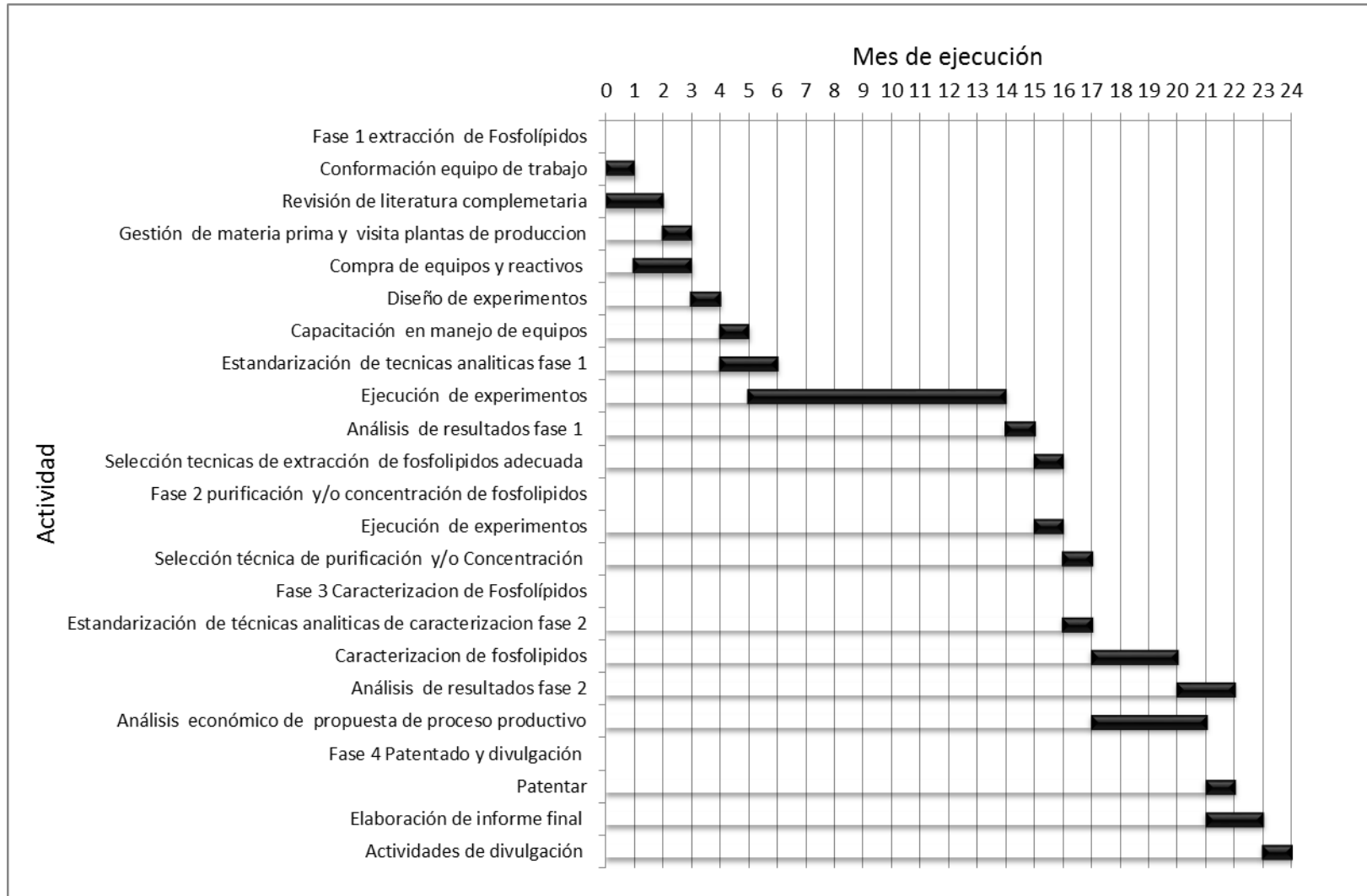
5.3.3 Evaluación económica

Se plantea realizar la evaluación económica contando con la asesoría de un consultor experto en análisis de costos, para esto se requiere recopilar toda la información que concierne al proceso balance masas, tiempos de producción, mano de obra, lista de elementos y reactivos utilizados entre otros datos que sean relevantes.

5.4 Fase 4 patente y divulgación de resultados

Una vez seleccionado el mejor proceso de obtención y el producto con mejores características fisicoquímicas, se procede a patentar la metodología ante el Departamento de Propiedad Industrial (DPI) del Ministerio de Economía. Una vez el proceso este patentado pasaría a una fase divulgación parcial de la información mediante, seminarios y publicaciones científicas.

6. Plan de trabajo



7. Resultados esperados

- Encontrar un método de extracción de fosfolípidos aplicable en la industria alimentaria.
- Encontrar un procedimiento de purificación de fosfolípidos ricos en Omega-3, para poder ser entregados a la industria.
- Reconocer las principales características de los fosfolípidos obtenidos, con el fin de poder ser recomendadas en la industria farmacéutica, nutracéutica y alimentaria.
- Encontrar una de las formas más eficientes para extraer fosfolípidos de origen marino.
- Encontrar fosfolípidos omega-3 con características de alto valor nutricional.
- Entregar una materia prima para la industria nutracéutica y farmacéutica, que podrá ser empleada para estudio en usos terapéuticos en ciertas patologías.
- Aprovechar los subproductos de la industria pesquera, con el fin de dar valor agregado a un residuo que posee intrínsecamente un componente de alto valor nutricional, como son los fosfolípidos ricos en Omega-3.
- Entregar un importante aporte a los consumidores, consistente en un nuevo producto con alto valor nutricional, para suplir las necesidades actuales.
- Aportar a la industria nuevos procesos, mediante los cuales se pueda lograr un mayor aprovechamiento de las materias primas, obteniendo una mejor rentabilidad.

8. Recursos solicitados

En las siguientes tablas se encuentran en detalle los recursos requeridos para la ejecución del proyecto, los valores están expresados en pesos chilenos

Presupuesto global de la propuesta			
Rubro	Año 1	Año 2	Total
Gastos de personal	25.200.000	25.200.000	50.400.000
Equipos de uso propio	750.000	500.000	1.250.000
Equipos que se planea adquirir	40.400.000	0	40.400.000
Salidas de campo	1.000.000	3.000.000	4.000.000
Materiales, suministros	16.000.000	22.000.000	38.000.000
Gastos de patentado		12.000.000	12.000.000
Total	90.100.000	44.520.000	134.620.000

Descripción de los gastos de personal					
Nombre	Función dentro del proyecto	Dedicación (h/sem)	Año 1	Año 2	Total
Jairo Alonso Torres	Investigador principal	30	18.000.000	18.000.000	36.000.000
Auxiliar de laboratorio	Análisis de laboratorio	40	4.800.000	4.800.000	9.600.000
Tesista	Análisis de laboratorio	40	2.400.000	2.400.000	4.800.000
Total			25.200.000	25.200.000	50.400.000

Descripción y cuantificación de los equipos de uso propio			
Equipo	Año 1	Año 2	Total
Mantenimiento de equipos existentes en el laboratorio, balanzas, Rancimat, Espectrofotómetro, refrigeradores.	500.000	250.000	750.000
Equipos de computación	250.000	250.000	500.000
Total	750.000	500.000	1250.000

Descripción de equipos que se planea adquirir				
Equipo	Justificación	Año 1	Año 2	Total
TLC-FID IATROSCAN	Determinación de diferentes componentes en lípidos	31.700.000	0	31.700.000
Bioreactor	Ensayos piloto	8.700.000	0	8.700.000
Total				40.400.000

Valoración de las salidas de campo			
Descripción	Año 1	Año 2	Total
Visitas a la empresa productoras de aceite y harina de pescado	1.000.000		1.000.000
Asistencia a congresos y otros		3.000.000	2.000.000
Total	1.000.000	3.000.000	4.000.000

Materiales, suministros				
Materiales*	Justificación	Año 1	Año 2	Total
Papelería (incluye papel, tinta para impresión)	Generación de informes y material de divulgación	100.000	2.000.000	3.000.000
Reactivos de laboratorio para diversos análisis	Pruebas piloto y análisis de muestras	10.000.000	12.000.000	22.000.000
Material de vidrio para laboratorio	Análisis de muestras	3.000.000	1.000.000	4.000.000
Análisis de laboratorio realizados por terceros	Análisis de muestras con técnicas no implementadas en el laboratorio	2.000.000	7.000.000	9.000.000
Total		16.000.000	22.000.000	38.000.000

9. Bibliografía

- ACKMAN, R. 1996. *Avances en Nutrición Acuícola III* Canadian Institute of Fisheries Technology, Technical University of Nova Scotia.
- AOCS 2006. The fatty acid methyl esters (FAME) were separated GC. AOCS Official Method Ce 2-66.
- AOCS 2009a. Moisture and Volatile Matter. AOCS Method number: Aa 3-38.
- AOCS 2009b. Quantitative Separation of Monoglycerides, Diglycerides, and Triglycerides by Silica Gel Column Chromatography. AOCS Official Method Cd 11c-93.
- AOCS 2009c. Thiobarbituric Acid Value Direct Method. AOCS Official Method Cd 19-90.
- AOCS 2011. Acetone-Insoluble Matter. AOCS Official Method Ja 4-46.
- AOCS 2012. Free Fatty Acids. AOCS Official Method Ca 5a-40.
- AOCS 2013. Peroxide Value. AOCS Official Method Ja 8-87.
- ARISZ, S. A. & MUNNIK, T. 2013. Use of phospholipase A2 for the production of lysophospholipids. *Methods Mol Biol*, 1009, 63-8.
- ASPMO, S. I., HORN, S. J. & H. EIJNSINK, V. G. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40, 1957-1966.
- BARRETT, S. J. 2013. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular health. *Altern Ther Health Med*, 19 Suppl 1, 26-30.
- BEAULIEU, L., ET AL. 2009. Proteolytic processing of atlantic mackerel and biochemical characterization of hydrolysates. *Int.J. Food Sci. Technol.*, 44, 1609-1618.
- BEAULIEU, L., THIBODEAU, J., BRYL, P. & CARBONNEAU, M. E. 2009. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoectes opilio*) by-product fractions: a source of high-valued biomolecules. *Bioresour Technol*, 100, 3332-42.
- BEAULIEU, L., THIBODEAU, J., BRYLC, P. & CARBONNEAU, M. 2009. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoectes opilio*) by-product fractions: A source of high-valued biomolecules. *Bioresource Technology*, 100, 3332-3342.
- BOURRE, J. M. 2004. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J Nutr Health Aging*, 8, 163-74.
- BREIVIK. 2007a. *Patente 20100143571* Washington patent application.
- BREIVIK. 2007b. *Proceso para la producción de fosfolípidos ricos en Omega 3 de Krill*. Washington patent application.
- CASTRO, M. 2002. Ácidos grasos Omega 3 beneficios y fuentes. *Rev. Cienc. y Tecnol de Am.*, 27 (3), 128-136
- CASTRO, M., OJEDA, A., SILENCIO, J., ET AL. 2004. Perfil lipídico de 25 pescados marinos mexicanos con especial énfasis en sus ácidos grasos Omega-3 como componentes nutracéuticos. *Arch. Lat. Nutr.*, 54 (3), 35-45.
- COHN, J. S., KAMILI, A., WAT, E., CHUNG, R. W. & TANDY, S. 2010. Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients*, 2, 116-27.
- COHN, J. S., WAT, E., KAMILI, A. & TANDY, S. 2008. Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 19, 257-62.
- CHACIN, L. 2000. *Diseño y análisis de experimentos para generar superficies de respuesta*, Maracay : Universidad Central de Venezuela, 2000.

- DIN, J. N., SARMA, J., HARDING, S. A., LYALL, K., NEWBY, D. E. & FLAPAN, A. D. 2013. Effect of omega-3 fatty acid supplementation on endothelial function, endogenous fibrinolysis and platelet activation in patients with a previous myocardial infarction: a randomised controlled trial. *BMJ Open*, 3, e003054.
- DUMAY, J. 2006. *Extraction de lipides en voie aqueuse par bioreacteur enzymatique combine à l'ultrafiltration :Application a la valorisation de co-produits de poisson (Sardina pilchardus)*. Université de Nantes.
- DUMAY, J., ALLERY, M., DONNAY, C., BARNATHAN, G., JAOUEN, P., CARBONNEAU, M. & PASCAL, J. 2009. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1599-1606.
- EIRÍKUR, K. 2010. *Ethanol extraction of marine phospholipids from fishmeal and by-products of fish*. Technical University of Denmark.
- ESHIGINA, S., GAPPAROV, M. M., MAL'TSEV, G. & KULAKOV, S. N. 2007. [Influence of dietary therapy containing sunflower oil fortified with phospholipids on the lipid metabolism in patients with hypertension and obesity]. *Vopr Pitan*, 76, 58-62.
- FAO. 2012. *RE: Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos*.
- FAVRELIERE, S., PERAULT, M. C., HUGUET, F., DE JAVEL, D., BERTRAND, N., PIRIOU, A. & DURAND, G. 2003. DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiol Aging*, 24, 233-43.
- FERNANDES, G. D., ALBERICI, R. M., PEREIRA, G. G., CABRAL, E. C., EBERLIN, M. N. & BARRERA-ARELLANO, D. 2012. Direct characterization of commercial lecithins by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Food Chem*, 135, 1855-60.
- FUKUNAGA, K., HOSSAIN, Z. & TAKAHASHI, K. 2008. Marine phosphatidylcholine suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats by inducing apoptosis. *Nutr Res*, 28, 635-40.
- GBOGOURI, G., LINDER, M., FANNI, J. & PARMENTIER, M. 2006. Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 766-775.
- GREBOW.J. 06 junio 2012 [citado 13 mayo 2013]. *En todas partes los ácidos grasos Omega.*, Disponible en: <http://www.nutritionaloutlook.com/1206/Omega> [Online].
- HATHWAR, S. C., BIJINU, B., RAI, A. K. & NARAYAN, B. 2011. Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. *Appl Biochem Biotechnol*, 164, 115-24.
- HIRATSUKA, S., KITAGAWA, T., MATSUE, Y., HASHIDUME, M., AND WADA, S. 2004. Lipid class and fatty acid composition of phospholipids from the gonads of skipjack tuna. *FISHERIES Sci.*, 70, 903-909.
- HOFFMAN, D. R., THEUER, R. C., CASTANEDA, Y. S., WHEATON, D. H., BOSWORTH, R. G., O'CONNOR, A. R., MORALE, S. E., WIEDEMANN, L. E. & BIRCH, E. E. 2004. Maturation of visual acuity is accelerated in breast-fed term infants fed baby food containing DHA-enriched egg yolk. *J Nutr*, 134, 2307-13.
- IFFO 2010. La importancia de los ácidos grasos omega-3 EPA y DHA en la salud de humanos y animales. . Reino Unido: College Yard and IFFO Ltda.

- ISMAIL, A. 2010. Marine lipids overview: markets, regulation, and the value chain. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides.*, 17(4) 205-208.
- JACKSON, A. 2008. Guía de los ácidos grasos Omega-3 de cadena larga EPA Y DHA en el aceite de pescado. Reino Unido: IFFO Ltda.
- JANSEN, D., ZERBI, V., ARNOLDUSSEN, I. A., WIESMANN, M., RIJPMAN, A., FANG, X. T., DEDEREN, P. J., MUTSAERS, M. P., BROERSEN, L. M., LUTJOHANN, D., MILLER, M., JOOSTEN, L. A., HEERSCHAP, A. & KILIAAN, A. J. 2013. Effects of Specific Multi-Nutrient Enriched Diets on Cerebral Metabolism, Cognition and Neuropathology in AbetaPP^{swe}-PS1^{dE9} Mice. *PLoS One*, 8, e75393.
- JAYARAMAN, T., KANNAPPAN, S., RAVICHANDRAN, M. K. & ANURADHA, C. V. 2008. Impact of Essential L on ethanol-induced changes in rat brain and erythrocytes. *Singapore Med J*, 49, 320-7.
- JENSEN, S., HAGGBERG, L., JORUNSDOTTIR, H. & ODHAM, G. 2003. A quantitative lipid extraction method for residue analysis of fish involving nonhalogenated solvents. *J Agric Food Chem*, 51, 5607-11.
- JICHA, G. A. & MARKESBERY, W. R. 2010. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 5, 45-61.
- KECHAOU, E. S., DUMAY, J., DONNAY-MORENO, C., JAOUEN, P., GOUYGOU, J. P., BERGE, J. P. & AMAR, R. B. 2009. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: effects on lipid distribution and amino acid composition. *J Biosci Bioeng*, 107, 158-64.
- KING, M. F., BOYD, L.C. AND SHELDON, B.W. 1992. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. of the Am, Oil Chemists' Society.*, 69, 545-551.
- KULLENBERG, D., TAYLOR, L. A., SCHNEIDER, M. & MASSING, U. 2012. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis*, 11, 3.
- LEI, X., ZHANG, W., LIU, T., XIAO, H., LIANG, W., XIA, W. & ZHANG, J. 2013. Perinatal supplementation with omega-3 polyunsaturated Fatty acids improves sevoflurane-induced neurodegeneration and memory impairment in neonatal rats. *PLoS One*, 8, e70645.
- LENNERT, B. 25 Noviembre 2005 [citado 13 Mayo 2013]. *Phospholipid.*, Disponible en:<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phospholipid.svg?uselang=es> [Online]. 2012].
- LIASET, B., LIED, E. & ESPE, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 581-589.
- LICHTENBERGER, L., ROMERO, J. J. & DIAL, E. J. 2009. Gastrointestinal safety and therapeutic efficacy of parenterally administered phosphatidylcholine-associated indomethacin in rodent model systems. *Br J Pharmacol*, 157, 252-7.
- LLUIS, L. & TALTAVULL, N. M.-C., M. SANCHEZ-MARTOS, V. ROMEU, M. GIRALT, M. MOLINAR-TORIBIO, E.TORRES, J. L. PEREZ-JIMENEZ, J. PAZOS, M. MENDEZ, L.GALLARDO, J. M. MEDINA, I. NOGUES, M. R. 2013. Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids Health Dis*, 12, 140.

- MACLEAN, C. H., ISSA, A. M., NEWBERRY, S. J., MOJICA, W. A., MORTON, S. C., GARLAND, R. H., HILTON, L. G., TRAINA, S. B. & SHEKELLE, P. G. 2005a. Effects of omega-3 fatty acids on cognitive function with aging, dementia, and neurological diseases. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, 1-3.
- MACLEAN, C. H., NEWBERRY, S. J., MOJICA, W. A., ISSA, A., KHANNA, P., LIM, Y. W., MORTON, S. C., SUTTORP, M., TU, W., HILTON, L. G., GARLAND, R. H., TRAINA, S. B. & SHEKELLE, P. G. 2005b. Effects of omega-3 fatty acids on cancer. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*, 1-4.
- MACLEAN, C. H., NEWBERRY, S. J., MOJICA, W. A., KHANNA, P., ISSA, A. M., SUTTORP, M. J., LIM, Y. W., TRAINA, S. B., HILTON, L., GARLAND, R. & MORTON, S. C. 2006. Effects of omega-3 fatty acids on cancer risk: a systematic review. *JAMA*, 295, 403-15.
- MAKI, K. C., REEVES, M. S., FARMER, M., GRIINARI, M., BERGE, K., VIK, H., HUBACHER, R. & RAINS, T. M. 2009. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. *Nutr Res*, 29, 609-15.
- MOHAMMED-SAEID, W., MICHEL, D., EL-ANEED, A., VERRALL, R. E., LOW, N. H. & BADEA, I. 2012. Development of lyophilized gemini surfactant-based gene delivery systems: influence of lyophilization on the structure, activity and stability of the lipoplexes. *J Pharm Pharm Sci*, 15, 548-67.
- MOHD ALI, N., YEAP, S., K.HO, W., Y.BEH, B., K.TAN, S. & W.TAN, S. G. 2012. The promising future of chia, *Salvia hispanica* L. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 171956.
- NALDA, R., PAZ, R. & LILIA, M. 1996. Composicion de acidos grasos y aporte de colesterol de conservas de Jurel, Sardina, Salmon al natural. *Arch. Lat. Nutr.*, 46 N 1, 75-77.
- RAMIREZ, M., AMATI, L. AND GIL, A. 2001. Absorption and sistribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development* , 65, 95-101.
- REIFFEL, J. A. & MCDONALD, A. 2006. Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*, 98, 50i-60i.
- RIEDIGER, N. D., OTHMAN, R. A., SUH, M. & MOGHADASIAN, M. H. 2009. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc*, 109, 668-79.
- ROSSMEISL, M., JILKOVA, Z. M., KUDA, O., JELENIK, T., MEDRIKOVA, D., STANKOVA, B., KRISTINSSON, B., HARALDSSON, G. G., SVENSEN, H., STOKNES, I., SJOVALL, P., MAGNUSSON, Y., BALVERS, M. G., VERHOECKX, K. C., TVRZICKA, E., BRYHN, M. & KOPECKY, J. 2012. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS One*, 7, e38834.
- SAKAKIMA, Y., HAYAKAWA, A., NAGASAKA, T. & NAKAO, A. 2007. Prevention of hepatocarcinogenesis with phosphatidylcholine and menaquinone-4: in vitro and in vivo experiments. *J Hepatol*, 47, 83-92.
- SAMPALIS, F., BUNEA, R., PELLAND, M. F., KOWALSKI, O., DUGUET, N. & DUPUIS, S. 2003. Evaluation of the effects of Neptune Krill Oil on the management of premenstrual syndrome and dysmenorrhea. *Altern Med Rev*, 8, 171-9.

- SAPIEHA, P., CHEN, J., STAHL, A., SEAWARD, M. R., FAVAZZA, T. L., JUAN, A. M., HATTON, C. J., JOYAL, J. S., KRAH, N. M., DENNISON, R. J., TANG, J., KERN, T. S., AKULA, J. D. & SMITH, L. E. 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids preserve retinal function in type 2 diabetic mice. *Nutr Diabetes*, 2, e36.
- SCHUCHARDT, J. P. & HAHN, A. 2013. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 89, 1-8.
- SCHUCHARDT, J. P., SCHNEIDER, I., MEYER, H., NEUBRONNER, J., VON SCHACKY, C. & HAHN, A. 2011. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids Health Dis*, 10, 145.
- SECRETARIA DE PESCA, G. D. C. C. S. 2012. *Informes sectoriales de pesca y acuicultura anuales 2005-2011* [Online]. <http://www.subpesca.cl/institucional/602/w3-channel.html>.
- SHEPHERD, C. J. & JACKSON, A. J. 2013. Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets. *J Fish Biol*, 83, 1046-1066.
- SHEPHERD, J. 2008. Annual Inform. *International Fishmeal and Fish Oil Organization.*, 12-23.
- SHEKIN, D. 2004. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures.*, USA, CRC Press.
- ŠLIŽYTEA, R., DAUKŠASA, E., FALCHA, E. & STORRØA, I. 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 1415-1424.
- SUZUMURA, M. 2005. Phospholipids in marine environments: a review. *Talanta*, 66, 422-34.
- TAKAHASHI, K. & INOUE, Y. 2012. Marine by-product phospholipids as booster of medicinal compounds. *Adv Food Nutr Res*, 65, 31-46.
- TAYLOR, L. A., PLETSCHE, L., ARENDS, J., UNGER, C. & MASSING, U. 2010. Marine phospholipids--a promising new dietary approach to tumor-associated weight loss. *Support Care Cancer*, 18, 159-70.
- THEODORATOU, E., MCNEILL, G., CETNARSKYJ, R., FARRINGTON, S. M., TENESA, A., BARNETSON, R., PORTEOUS, M., DUNLOP, M. & CAMPBELL, H. 2007. Dietary fatty acids and colorectal cancer: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 166, 181-95.
- TORRES, J. Datos sin publicar 2013. *RE: Informe pasantia de investigación , caracterizacion de fosfolipidos de difentes matrices .*
- TRUSHENSKI, J., SCHWARZ, M., PESSOA, W. V., MULLIGAN, B., CROUSE, C., GAUSE, B., YAMAMOTO, F. & DELBOS, B. 2013. Amending reduced fish-meal feeds with marine lecithin, but not soy lecithin, improves the growth of juvenile cobia and may attenuate heightened responses to stress challenge. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 97, 170-80.
- VALENZUELA, A. 2012a. Digestion y absorcion de los lipidos. *Diplomado en grasas y aceites en la nutricion humana.* [Online].
- VALENZUELA, A., DE LA BARRA, F., DURÁN, R. 2011. Fosfolipidos de origen marino: su potencialidad nutricional y economica. *Informe INNOVA-CORFO.*, 1-12.

- VALENZUELA, A. & NIETO, S. 2003. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual *Rev Chil Pediatr*, 74, 149-157.
- VALENZUELA, A., SANHUEZA, J., DE LA BARRA, F. 2012b. El aceite de pescado: Ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Rev Chil Nutr* . 39 (2), 201-208.
- VALENZUELA, A., SANHUEZA, J. 2009. Marine Oils; Nutritional And Food Science Relevanc. *Rev. Chi. Nutr.*, 36, 246- 257.
- VALENZUELA, R., BASCUÑAN, K., VALENZUELA, A. & CHAMORRO, R. 2009. Omega-3 fatty acids, neurodegenerative and psychiatric diseases: a new preventive and therapeutic approach. *Rev Chil Nutr* 36 (4), 1120-1228.
- VILLAGRA, Y. 2010. Las oportunidades del oro líquido. *AQUA*, 46-49.
- WAT, E., TANDY, S., KAPERA, E., KAMILI, A., CHUNG, R. W., BROWN, A., ROWNEY, M. & COHN, J. S. 2009. Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis*, 205, 144-50.
- WURTMAN, R. J., ULUS, I. H., CANSEV, M., WATKINS, C. J., WANG, L. & MARZLOFF, G. 2006. Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. *Brain Res*, 1088, 83-92.
- ZIERENBERG, O. & GRUNDY, S. M. 1982. Intestinal absorption of polyenephosphatidylcholine in man. *J Lipid Res*, 23, 1136-42.