

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ACIDÓLISIS ENZIMÁTICA  
EN DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO DE ACEITE DE  
CANOLA (*Brassica napus* L.) CON CONCENTRADO DE  
ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA:  
EFECTO SOBRE LA RELACIÓN  $n-6/n-3$***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado  
de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e  
Inocuidad de los Alimentos por:

***JOSÉ MANUEL CEDANO ROMERO***

Director de Tesis: Alicia Rodríguez Melis, IA, MSc  
Nalda Romero Palacios, QF, MSc  
Santiago Aubourg Martínez, Q, PhD

**Santiago-CHILE**

**Junio 2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster.

**JOSÉ MANUEL CEDANO ROMERO**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar el grado de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

MSc. Alicia Rodríguez Melis

\_\_\_\_\_

**Co-Directores de Tesis:**

MSc. Nalda Romero Palacios

\_\_\_\_\_

PhD. Santiago Aubourg Martínez

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis**

Dra. María Antonieta Valenzuela Pedevila

\_\_\_\_\_

Dra. Paz Robert Canales

\_\_\_\_\_

MSc. Liliana Cristina Maier Neumann

\_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

*A mis padres,  
y a mis hermanos*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida y durante este tiempo viviendo en Chile, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Le doy gracias a mis padres Víctor y Teresa por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado desde pequeño, por llenar de alegrías y amor cuando más lo he necesitado; porque estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mis hermanos por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar. A Jose, Paola y Jair, por todo el apoyo brindado de su parte en cada momento.

Un especial agradecimiento especial a mi directora de tesis la Prof. Alicia Rodríguez Melis por su enseñanza, orientación, paciencia y apoyo incondicional brindado desde el primer momento en el que llegue a ser parte del grupo de investigación FONDECYT, así como también agradezco la valiosa colaboración del prof. Santiago Aubourg y la prof. Nalda Romero en la realización de la presente tesis.

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Lípidos.....	3
2.2 EPA y DHA.....	4
2.3 Concentrados de AGPI.....	7
2.4 Triacilglicéridos estructurados.....	7
2.5 Biocatalizadores.....	8
2.6 Fluidos supercríticos (SCF).....	11
2.7 Aceite de canola.....	12
2.8 Importancia de la relación ácido graso $n-6/n-3$ .....	15
2.9 Metodología de superficie respuesta (MSR).....	16
2.10 Nutracéuticos, alimentos funcionales y suplementos dietéticos.....	16
<b>CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>

3.1 HIPÓTESIS.....	18
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	19
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
4.1 MATERIALES.....	20
4.2 METODOLOGÍA.....	21
4.2.1 Caracterización mediante análisis físico-químicos del aceite crudo de salmón comercial y el aceite de canola ( <i>Brassica napus</i> L.).....	21
4.2.2 Obtención de un concentrado ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPICL), a partir de aceite crudo de salmón.....	21
4.2.2.1 Preparación de ácidos grasos libres mediante hidrólisis básica.....	21
4.2.2.2 Concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga por inclusión en cristales de urea.....	22
4.2.2.3 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos.....	22
4.2.3 Determinación del efecto de las variables del proceso de acidólisis enzimática sobre la relación de ácidos grasos <i>n-6/n-3</i> en los triacilglicéridos estructurados purificados, utilizando lipasa B inespecífica de <i>Candida antarctica</i> inmovilizada bajo dióxido de carbono supercrítico (SCCO <sub>2</sub> ).....	23
4.2.3.1 Diseño experimental.....	23
4.2.3.2 Acidólisis enzimática en CO <sub>2</sub> supercrítico.....	24
4.2.3.3 Purificación de los triacilglicéridos estructurados.....	25
4.2.3.4 Análisis de los productos de la reacción.....	25
4.2.3.5 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos.....	25

4.2.4 Obtención de modelos matemáticos a partir de la metodología de superficie de respuesta que permitan predecir el efecto de las variables de proceso sobre la relación de AG $n-6/n-3$ de los TAGs purificados.....	26
4.2.5 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos de los triacilglicéridos estructurados óptimos y la relación de AG $n-6/n-3$ .....	26
4.2.5.1 Purificación de los triacilglicéridos estructurados y análisis de los productos de la reacción.....	26
4.2.5.2 Composición de ácidos grasos.....	26
<b>CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
5.1 Caracterización mediante análisis físico-químicos del aceite crudo de salmón comercial y el aceite de canola ( <i>Brassica napus</i> L.).....	27
5.2 Obtención de un concentrado ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPICL), a partir de aceite crudo de salmón.....	29
5.3 Determinación del efecto de las variables del proceso de acidólisis enzimática sobre la relación de ácidos grasos $n-6/n-3$ , utilizando lipasa B inespecífica de <i>Candida antarctica</i> inmovilizada bajo SCCO <sub>2</sub> .....	34
5.4 Obtención de modelos matemáticos a partir de la metodología de superficie de respuesta que permitan predecir el efecto de las variables y minimizar la relación de ácidos grasos $n-6/n-3$ de los TAGs purificados.....	43
5.5 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos de los triacilglicéridos estructurados óptimos y la relación de AG $n-6/n-3$ .....	47
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>56</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>63</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Productos existentes en mercado.....	63
<b>ANEXO 2.</b> Rendimientos de los TAGs purificados para los ensayos de la acidólisis enzimática en dióxido de carbono supercrítico de aceite de canola y del concentrado AGPICL.....	67
<b>ANEXO 3.</b> Composición de ácidos grasos (AG) y grupos de ácidos grasos de los 30 ensayos (expresados en g/100 g AGT).....	68



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reacciones catalizadas por lipasas (Hayes, 2004).....	9
<b>Figura 2.</b> Cromatogramas de los ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a aceite de canola ( <i>Brassica napus</i> L.) (A), aceite crudo de salmón (B) y concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) (C).....	34
<b>Figura 3.</b> Análisis de Cromatografía en Capa Fina de aceite de canola y de concentrado AGPICL, considerados ambos antes del proceso de acidólisis enzimática, muestras sin purificar (SP) y purificadas (P) después del proceso de acidólisis enzimática: (A) muestras 1 a la 5, (B) muestras 6 a la 10, (C) muestras 11 a la 15 (D) muestras 16 a la 20, (E) muestras 21 a la 25, (F) muestras 26 a la 30. Fase móvil empleada: cloroformo/acetona/metanol (95:4,5:0,5, v/v/v).....	37
<b>Figura 4.</b> Gráficos de Pareto y el efecto estandarizado lineal, cuadrático y de la interacción de las variables respuestas (A) Total AG <i>n</i> -6 y (B) Total AG <i>n</i> -3.....	39
<b>Figura 5.</b> Superficies de respuesta para los principales efectos en el contenido total de AG <i>n</i> -6 (g/100 g AGT) (A) y en el contenido total de AG <i>n</i> -3 (g/100 g AGT) en el proceso de acidólisis enzimática (B).....	40
<b>Figura 6.</b> Combinación de niveles de factores que maximizan la función deseabilidad al minimizar el contenido AG <i>n</i> -6 y maximizar el contenido de AG <i>n</i> -3: (A) superficie de respuesta estimada; (B) superficie de contorno de respuesta estimada.....	42
<b>Figura 7.</b> Análisis de Cromatografía en Capa Fina (TLC Silica gel 60 – Merck Millipore) del aceite de canola, del concentrado AGPI y del triacilglicérido estructurado óptimo, sin purificar (SP) y purificado (P) después del proceso de acidólisis enzimática. Fase móvil empelada: cloroformo/acetona/metanol (95:4,5:0,5 v/v/v)...	48
<b>Figura 8.</b> Cromatogramas de los ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a aceite de canola ( <i>Brassica napus</i> L.) (A), al concentrado AGPCL (B) y al TAGs óptimo (C).....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tipos de Lipasas (Camp <i>et al.</i> , 1998).....	10
<b>Tabla 2.</b> Composición de ácidos grasos de canola (%).....	14
<b>Tabla 3.</b> Relación AG <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 en varias poblaciones.....	15
<b>Tabla 4.</b> Métodos para la caracterización físico-química de la materia prima.....	21
<b>Tabla 5.</b> Rangos experimentales y valores de las variables independientes del proceso de acidólisis enzimática.....	24
<b>Tabla 6.</b> Caracterización del aceite crudo de salmón y aceite de canola.....	27
<b>Tabla 7.</b> Composición de AG y grupos de ácidos grasos en el aceite de canola, aceite crudo de salmón y concentrado AGPI (expresado como g/100 g AGT).....	31
<b>Tabla 8.</b> Diseño compuesto central rotacional $2^{5-1}$ más estrella, de 5 factores para el proceso de acidólisis enzimática, basado en la metodología de superficie respuesta	35
<b>Tabla 9.</b> Coeficientes de regresión de modelos polinómicos predictivos de segundo orden para las variables respuestas, total AG <i>n</i> -6 ( $Y_1$ ) y total AG <i>n</i> -3 ( $Y_2$ ).....	44
<b>Tabla 10.</b> Análisis de validación. Variables óptimas del proceso y optimización de respuesta múltiple de las variables respuesta para optimizar la relación de AG <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3, en el proceso de acidólisis enzimática de aceite de canola y concentrado AGPI.....	46
<b>Tabla 11.</b> Composición de ácidos grasos (AG) del aceite de canola, concentrado AGPICK y triacilglicérido estructurado (TAGs) óptimo (expresados como g/100 g de ácido graso total).....	49

## RESUMEN

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) omega-3 ( $n-3$ ) han obtenido una creciente atención debido a su papel beneficioso en la nutrición y salud humana. Los triacilglicéridos estructurados (TAGs) son aquellos que han modificado su composición y/o distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de glicerol, mediante métodos químicos y/o enzimáticos, obteniendo de este modo una mejora de sus propiedades funcionales y/o nutricionales. En este sentido, la transesterificación enzimática proporciona varias ventajas, como el uso de temperaturas relativamente bajas y una mayor selectividad del catalizador. En los últimos años, la tecnología de fluidos supercríticos, ha demostrado proporcionar una posibilidad ventajosa en el proceso de catálisis enzimática debido a su alta versatilidad e inocuidad. El objetivo del presente estudio fue optimizar las variables del proceso de acidólisis enzimática de aceite de canola (*Brassica napus* L.) con concentrado AGPICL para obtener triacilglicéridos estructurados con una baja relación de ácidos grasos  $n-6/n-3$ . Para ello, se empleó lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* inmovilizada en condiciones CO<sub>2</sub> supercrítico. El aceite crudo de salmón obtenido a partir de los subproductos industriales se utilizó para obtener concentrados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL). Como primer paso, se caracterizó mediante análisis físico-químicos el aceite de canola y por cromatografía de gas líquido para obtener sus perfiles de ácidos grasos. Luego se obtuvo un concentrado AGPICL a partir de aceite crudo de salmón mediante hidrólisis básica y posterior complejación con urea. Posteriormente se optimizaron las variables del proceso de acidólisis enzimática mediante un diseño compuesto central rotacional  $2^{5-1}$  más estrella, de 5 factores con 30 ensayos experimentales, basado en la Metodología de Superficie Respuesta. Las condiciones óptimas que minimizaron la relación AG  $n-6/n-3$  a un valor de 1,16 para los TAGs purificados correspondieron a un relación AGPICL/Canola de 70,6%, temperatura de 57,0 °C, presión de 178,0 bar, tiempo de 19,6 h y concentración de enzima de 8,0%.

## ABSTRACT

Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have attracted an increasing attention due to their beneficial role on human health and nutrition. Structured triacylglycerols (TAGs) are molecules that have modified their composition and/or spatial distribution of fatty acids in the glycerol structure through chemical and/or enzymatic methods, thus obtaining an enhancement of their functional and nutritional properties. In this sense, enzymatic transesterification provides several advantages such as the employment of low temperatures and greater catalyst selectivity. In recent years, supercritical fluids technology has shown to provide an advantageous possibility in the enzymatic catalyzed process due to its versatility and safety. The objective of the present study was to optimize the process variables of enzymatic acidolysis of PUFA-enriched canola (*Brassica napus* L.) oil to obtain structured TAGs with a low *n-6/n-3* fatty acids ratio. In order to achieve this objective, unspecific lipase B from immobilized *Candida Antarctica* was employed under supercritical-CO<sub>2</sub> conditions. Salmon oil obtained from industrial by-products was utilized to obtain the starting PUFA source. As a first step, oils from canola and salmon were analysed by physico-chemical quality parameters (lipid hydrolysis degree and content on primary and secondary lipid oxidation compounds) and by gas-liquid chromatography to obtain their fatty acids profiles. A PUFA concentrate was obtained from salmon oil by basic hydrolysis and further urea complexation. Then, the process variables of enzymatic acidolysis were optimized by means of a composite-central design of  $2^{5-1}$  + star, with five factors and 30 experimental runs, based on the response-surface methodology (RSM). Optimal conditions that minimized the relationship AG *n-6/n-3* to a 1.16 score for the purified TAGs corresponded to a LCPUFA/canola ratio of 70.6%, temperature of 57.0 ° C, pressure of 178.0 bar, time of 19.6 h and enzyme concentration of 8.0%.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, los cambios en las dietas y los estilos de vida derivados de la industrialización, la urbanización, el desarrollo económico y la globalización del mercado han aumentado rápidamente, especialmente en los países en vías de desarrollo, donde se están produciendo grandes cambios socioeconómicos. Si bien se ha observado una mejora general del estándar de vida, ésta ha venido acompañada de hábitos alimentarios no saludables y de un nivel de actividad física insuficiente para mantener un equilibrio de energía óptimo y un peso saludable. El resultado neto ha sido el aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta en todos los grupos socioeconómicos, las cuales constituyen actualmente la principal causa de mortalidad y discapacidad a nivel mundial (FAO, 2008).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega 3 (*n*-3) han obtenido una creciente atención debido a su papel beneficioso en la nutrición y salud humana. Los AGPI *n*-3, tales como el ácido *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17-eicosapentaenoico (20:5*n*-3, EPA) y el ácido *cis*-4, *cis*-7, *cis*-10, *cis*-13, *cis*-16, *cis*-19-docosahexaenoico (C22:6*n*-3, DHA) se encuentran normalmente presentes en aceites de origen marino.

En los últimos años, la evidencia de que las poblaciones que consumen pescado tienen una baja prevalencia de la cardiopatía coronaria, enfermedades circulatorias e inflamación ha generado un gran interés en los aceites de pescado. En este sentido, la presencia de AGPI *n*-3 ha sido reconocido como especialmente responsable de este comportamiento positivo (Simopoulos, 1991); entre ellos el EPA y el DHA han sido señalados como responsables de los efectos beneficiosos sobre la salud humana relacionados con el sistema cardiovascular, sistema nervioso central, desarrollo del cerebro y de la retina (Neuringer *et al.*, 1986; Burr *et al.*, 1989; Simopoulos, 1991; Simopoulos, 1999; Uauy-Degach, y Valenzuela, 1992; Uauy, y Valenzuela, 2000; Ramírez, 2006; Araya, 2008; FAO, 2012).

Varias fuentes de información sugieren que los seres humanos evolucionaron en una dieta con una proporción de AGPI *n*-6 y ácidos grasos esenciales *n*-3 cercano a 1, mientras que en las dietas occidentales la proporción es 15/1 – 16,7/1. Las dietas occidentales son deficientes en AGPI *n*-3, y tienen una cantidad excesiva de AGPI *n*-6. Esto a su vez ha dado lugar a un desequilibrio en la relación *n*-6/*n*-3, muy diferente a la relación original 1/1 que tenían los seres humanos en el pasado. Las cantidades excesivas de AGPI *n*-6 y una alta relación de ácidos grasos (AG) *n*-6/*n*-3, encontrada en las dietas occidentales de la actualidad, promueven la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, el cáncer y enfermedades autoinmunes, mientras que los mayores niveles de AGPI *n*-3 y una baja relación de AG *n*-6/*n*-3 ejercen efectos protectores. Simopoulos (2002) concluye que la dosis óptima o relación de AG *n*-6/*n*-3 varía de 1/1 a 4/1 dependiendo de la enfermedad en consideración.

Los triacilglicéridos estructurados (TAGs) son aquellos que han modificado su composición y/o distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de glicerol, mediante métodos químicos y/o enzimáticos, obteniendo de este modo una mejora de sus propiedades funcionales y/o nutricionales (Osborn y Akoh, 2002). En este sentido, la transesterificación enzimática proporciona varias ventajas, como el uso de temperaturas relativamente bajas y una mayor selectividad del catalizador. La tecnología de fluidos supercríticos (FSC) ofrece una alternativa ventajosa como medio de catálisis enzimática debido a su alta versatilidad e inocuidad de los solventes en estado supercrítico.

En la presente tesis se pretende optimizar las variables del proceso de acidólisis enzimática de aceite de canola (*Brassica napus* L.) y concentrado AGPCL, para obtener un triacilglicérido estructurado con una baja relación de AG *n*-6/*n*-3, utilizando lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* inmovilizada en condiciones de dióxido de carbono supercrítico (SCCO<sub>2</sub>).

## **CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 LÍPIDOS**

Las materias grasas y aceites comestibles han tenido una gran importancia en la alimentación de las distintas culturas desde épocas prehistóricas. Su consumo ha evolucionado enormemente, tanto en cantidad como en calidad, desde la aparición del hombre. Se ha pasado de consumir desde un 15% a un 20% de la energía total en forma de grasa, cuando el hombre era cazador recolector, hasta más de un 40% en distintos alimentos, incluyendo alimentos procesados, en las sociedades más desarrolladas (López García *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista nutricional, se les considera, junto a las proteínas y los carbohidratos, como uno de los macronutrientes de los alimentos de importancia en la dieta del ser humano (Vega *et al.*, 2012). Su importancia radica en el elevado aporte energético que proporciona (9 kilocalorías por gramo), sin embargo, sus consecuencias sobre la salud van más allá de su papel exclusivo como fuentes de energía (FAO, 2012).

Entre otras funciones que se asocian a los lípidos dentro del organismo, se destaca la formación estructural de la bicapa lipídica, la protección de órganos en la cavidad abdominal, la actividad precursora de hormonas y así como servir de transporte de vitaminas, antioxidantes, esteroides, etc. Actualmente, se tiene un mayor conocimiento acerca de cómo los lípidos y los ácidos grasos se metabolizan, cómo son utilizados por el cuerpo humano, cómo alteran la función de la membrana celular, cómo controlan la transcripción y expresión de los genes y cómo interactúan entre ellos. Tanto las grasas como los ácidos grasos deben considerarse nutrientes claves que afectan con el tiempo al crecimiento, el desarrollo inicial y las enfermedades crónicas nutricionales (FAO, 2012). Un ejemplo de ello es que existe una evidencia convincente de que los ácidos grasos linoleico (LA) y alfa-linolénico (ALA) son esenciales para el desarrollo, ya que

éstos no pueden ser sintetizados por el ser humano (FAO, 2008; Shahidi y Kim, 2002; Masson, 2007; Valenzuela *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2012).

El equilibrio dietético en la composición de ácidos grasos es una consideración importante para el consumo de ácidos grasos diario de los seres humanos y proporciona considerables beneficios para la salud humana. Los diferentes tipos de ácidos grasos que se encuentran en los lípidos tienen funciones distintas para la salud humana, como por ejemplo los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, EPA y DHA (Jiao y Zhang, 2013).

## **2.2 EPA Y DHA**

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) son componentes dietarios de los lípidos que participan en múltiples procesos fisiológicos, donde cumplen un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares y son sustratos para la síntesis de diversos mediadores fisiológicos. En los AGPICL encontramos dos grupos principales; los ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 (AGPI *n*-3) y los ácidos grasos poliinsaturados *n*-6 (AGPI *n*-6), los cuales son nutrientes esenciales para los seres humanos dado que carecemos de la maquinaria enzimática necesaria para poder sintetizarlos desde sus precursores por los que hay que ingerirlos por la dieta (Burr, 1930; Valenzuela *et al.*, 2011; Jiao y Zhang, 2013).

Dentro de la familia de los AGPI *n*-3, existen tres tipos principales de ácidos grasos que se ingieren a través de los alimentos y que el organismo utiliza: el ácido alfa-linolénico (ALA) de origen vegetal terrestre y los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 *n*-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 *n*-3), ambos obtenidos de aceites de origen marino tanto vegetal como animal (Valenzuela y Sanhueza, 2009; Méndez *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Jiao y Zhang, 2013).



Los beneficios que poseen el EPA y DHA en la salud humana se basan en la relación inversa observada entre el aumento en su consumo y la disminución del riesgo cardiovascular, particularmente de enfermedades coronarias. Breslow (2006) asocia el beneficio del consumo de EPA principalmente con la protección de la salud cardiovascular, principal causa de muerte en el mundo occidental. El consumo diario de EPA disminuye el contenido en triglicéridos y el colesterol sanguíneo, siendo ambos un determinante de riesgo cardiovascular (Albert *et al.*, 1998). El EPA, además, baja la presión vascular y tiene efectos antitrombóticos y antiinflamatorios (Calder, 2006). Sus efectos biológicos cubren un amplio rango e involucran lipoproteínas sanguíneas, la presión sanguínea, la función cardíaca, la función endotelial, la reactividad vascular y la electrofisiología cardíaca, como también efectos antiplaquetarios y antiinflamatorios (López-Huerta, 2010).

El consumo de DHA es fundamental para la formación y función del sistema nervioso y visual de los humanos y mamíferos en general (Valenzuela y Nieto, 2001; Valenzuela y Nieto, 2003), ya que permite el trabajo neuronal, particularmente en las funciones de aprendizaje y de memorización (Salem *et al.*, 2001), con lo cual el DHA está muy vinculado con el desarrollo de la inteligencia de las personas (Haag, 2003). Se ha demostrado que el consumo de DHA en la etapa perinatal produce una serie de beneficios en las mencionadas funciones. Puede disminuir la incidencia de depresión post-parto en la madre y la diabetes gestacional, además puede aumentar hasta 4 puntos el coeficiente intelectual de los niños (Agostoni *et al.*, 1997). El DHA protege las neuronas cerebrales, previniendo su muerte prematura (apoptosis) y el desarrollo de trastornos del comportamiento y de enfermedades altamente invalidantes como Alzheimer, Parkinson, Huntington, Ataxia de Friedrich, entre otras patologías del sistema nervioso (Valenzuela, 2009).

Hay investigaciones que atribuyen al EPA y DHA beneficios tales como: mejoramiento de la agudeza visual, rendimiento de la visión y adaptación a la

luz (sólo el DHA), protección ante los efectos de algunos cánceres, incremento de los niveles de insulina, incremento de tolerancia a terapias nocivas (quimioterapias), mejora de estados emocionales, efectos beneficiosos en enfermedades autoinmunes y disminución de dolor asociado a condiciones antiinflamatorios, entre otros (Ferraro *et al.*, 2010).

Según FAO (2012) los requerimientos mínimos de EPA + DHA para los varones y mujeres adultas se fijan en 250 mg diarios, en el caso de mujeres embarazadas o lactantes establece una ingesta mínima para una salud óptima y un desarrollo del feto y el lactante adecuados de 300 mg diarios de EPA + DHA, de los cuales al menos 200 mg diarios deben corresponder al DHA. Asimismo, las cantidades recomendadas para niños 2 a 4 años serían de 100–150 mg/día, para niños de 4 a 6 serían de 150-200 mg/día y para niños de 6 a 10, 200-300 mg/día. La American Heart Association dividió su recomendación de ingesta de EPA y DHA en 3 categorías: Personas sin enfermedad arterial coronaria (EAC), personas con EAC y aquellos con elevada concentración de triglicéridos séricos. La ingesta sugerida para los tres grupos son: 2 porciones de pescado/semana (preferentemente pescados oleosos), 1 g de EPA + DHA al día (de pescados oleosos o cápsulas) y 2 g a 4 g de EPA + DHA/día provenientes de cápsulas, respectivamente (Harris *et al.*, 2007). Para la prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares, la recomendación sería de 500 mg/día de EPA + DHA (2 raciones/semana de pescado azul (224 g total) proporcionarían 400-500 mg/día de EPA + DHA) (Kris-Etherton *et al.*, 2009).

A nivel alimentario – nutricional, las estrategias deberán orientarse a aumentar el consumo de los AGPI *n*-3 en la población, especialmente si se considera que la dieta occidental es pobre en ellos, para lo cual se deberá fomentar el consumo de alimentos ricos en EPA y DHA, principalmente pescados grasos, o desarrollar alimentos funcionales que los contengan y/o suplementos nutricionales (nutracéuticos) con AGPI *n*-3 (Valenzuela *et al.*, 2011).

### **2.3 CONCENTRADO DE AGPI**

Varios métodos han sido reportados para extraer y concentrar dichos ácidos a partir de fuentes naturales. Estos AGPI se producen como triacilglicéridos (TAG) en los aceites de pescado a niveles entre 10% y 25%. Se han reportado métodos para la concentración de AGPI en aceites marinos, con variados rendimientos. Sin embargo, los niveles más altos (65% - 80%) son alcanzables por procesos que combinan ya sea hidrólisis o esterificación con métodos tales como la extracción de fluido supercrítico, la formación de complejos de urea, y destilación molecular.

La complejación con urea se ha aplicado para concentrar los AGPI de diversas fuentes marinas (Ackman *et al.*, 1988; Ackman, 1989; Ju *et al.*, 1998; Zuta *et al.*, 2003). La urea forma complejos con moléculas que contienen cadenas de alquilo lineales, que actúan como una plantilla con las que las moléculas de urea forman estructuras formando complejos, como resultado de varias horas de enfriamiento. La separación de los complejos de urea de la fracción no complejante elimina eficazmente ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena larga y se enriquece el extracto líquido en ácidos grasos poliinsaturados. Dado que el proceso requiere sólo un uso limitado de disolventes orgánicos poco tóxicos tales como el etanol, se considera un método que es amigable con el medio ambiente (Hayes, 1988).

### **2.4 TRIACILGLICÉRIDOS ESTRUCTURADOS**

Los triacilglicéridos estructurados (TAGs) son aquellos que han modificado su composición de ácidos grasos y/o su distribución posicional en el esqueleto de glicerol mediante reacciones químicas y/o enzimáticamente catalizadas y/o mediante ingeniería genética con mejores propiedades nutricionales o funcionales. Un TAGs, es una molécula “hecha a medida”, formulada para una función nutricional y/o tecnológica específica. De esta forma, se puede decidir

el tipo de ácidos grasos, y la posición de éstos en las moléculas que se desee estructurar (Shahidi y Haman, 2006).

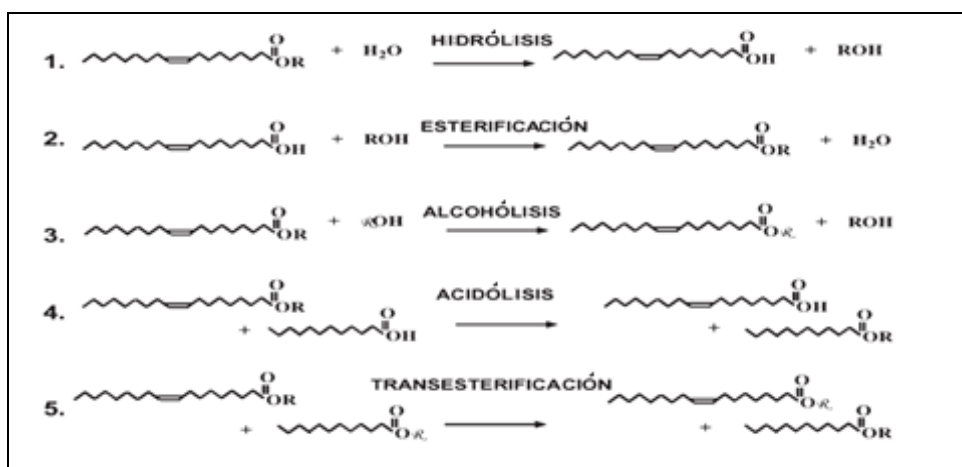
De acuerdo a los autores Valenzuela y Nieto (1994) la estructura y distribución estereoespecífica de los ácidos grasos en los TAGs afecta a la capacidad de absorción y tienen diferentes consecuencias nutricionales en función del tipo y la posición de los ácidos grasos en el esqueleto de glicerol (Bracco, 1994; Ulrich *et al.*, 1996).

Por lo tanto, la síntesis de TAGs que contienen ácidos grasos en las posiciones específicas de una determinada longitud de cadena (TAGs) es de importancia nutricional e industrial (Kennedy, 1991). Los AGPICL situados en la posición *sn-2* de los TAGs con ácidos grasos de cadena media (MCFA), mientras que los ubicados en las posiciones *sn-1* y *sn-3* son absorbidos fácil y específicamente (Kubow, 1996).

## **2.5 BIOCATALIZADORES**

El uso de la biotecnología en su versión de catálisis enzimática permite la generación de nuevas materias grasas que satisfacen las necesidades tecnológicas de los aceites y grasas y que además cumplen con los requisitos de ser saludables. La biocatálisis está en pleno desarrollo, imponiéndose sobre los métodos tradicionales químicos ya que tiene ventajas como, estereoespecificidad, regioespecificidad, selectividad, menores o ningún subproducto, reacción en condiciones suaves, mayor versatilidad y procesos ambientalmente amigables. Con esta tecnología, que comprende el uso de lipasas, se puede modificar la estructura de los TAG, formando TAGs que cumplan con diferentes funciones tecnológicas necesarias, pero especialmente que tengan beneficios para la salud y prevención de enfermedades relacionadas con los estilos de vida actuales (Xuebing, 2004, Liu *et al.*, 2007).

Las lipasas (glicerol éster hidrolasas, EC 3.1.1.3) están diseñadas específicamente por la naturaleza para la hidrólisis y la síntesis de enlaces éster que implica a los ácidos grasos, y que pueden formar y/o hidrolizar amida, carbonato, y así como enlaces de tipo tioéster. Las lipasas pueden ser utilizadas para llevar a cabo una variedad de reacciones en los sistemas tales como hidrólisis, esterificación y transesterificación. Esta última incluye reacciones de acidólisis, alcoholólisis e interesterificación (Shahidi, 2004) (Figura 1).



**Figura 1.** Reacciones catalizadas por lipasas (Shahidi, 2004).

Las lipasas son tal vez las enzimas utilizadas con mayor frecuencia para las biotransformaciones debido a su capacidad de funcionar tanto en sistemas no acuosos (síntesis), como acuosos (hidrólisis) (Hayes, 2004).

Muchos investigadores han empleado reacciones de acidólisis enzimáticas para sintetizar TAGs para la modificación de aceites vegetales tales como aceite de soja con EPA, DHA y  $\gamma$ -linolénico (Huang y Akoh, 1996), aceite de coco con ácidos grasos libres de aceite de hígado de bacalao y cártamo (Reena, Udayasankar, Samabaiah y Lokesh, 2001), ácido caprílico con aceite de atún (Hita *et al.*, 2007), aceite de girasol con una mezcla de ácidos palmítico y esteárico (Carrin y Crapiste, 2008), tripalmitina con ácido cáprico (Inan, Sevil,

Guldem y Ayse, 2008) y 1,3-dioleína con DHA para producir 1,3-oleoil-2 docosaheptaenoil glicerol (Zhang, Wijesundera y Xu, 2009).

Una de las mayores ventajas de las enzimas es su capacidad de catalizar reacciones con una alta selectividad y especificidad. En base a estas propiedades, las lipasas pueden ser subdivididas en las 5 clases diferentes que se expresan en la Tabla 1 (Camp *et al.*, 1998).

**Tabla 1.** Tipos de Lipasas (Camp *et al.*, 1998)

Clasificación	Características	Lipasas
Tipo 1	No regioespecíficas. Los ácidos grasos son hidrolizados desde triacilglicéridos independientes del tipo de ácidos grasos y la posición de éstos en el triacilglicérido.	<i>Candida cylindracea</i> , <i>Corynebacterium acnes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Chromobacterium viscosum</i> .
Tipo 2	Lipasa regioespecífica 1,3. Las lipasas catalizan reacciones en las posiciones <i>sn</i> -1 y <i>sn</i> -3 de la molécula del glicerol.	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus delemar</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> .
Tipo 3	Las lipasas presentan diferentes velocidades de hidrólisis tanto para monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triacilglicéridos.	Encontradas en tejidos de ratas y humanos.
Tipo 4	Lipasas que catalizan el intercambio de tipos de ácidos grasos específicos.	<i>Geotrichum candidum</i> , preferentemente libera ácidos grasos con insaturaciones <i>cis</i> - $\omega$ -9.
Tipo 5	Lipasas especiales que muestran una velocidad de hidrólisis más rápida para los ácidos grasos situados en la posición <i>sn</i> -1 que para los ácidos grasos posicionado en <i>sn</i> -3.	Lipasas lipoproteínas de la leche, tejido adiposo y plasma post heparina preferentemente actúan en los enlaces éster en posición <i>sn</i> -1. Lipasa lingual de ratas y humanos preferentemente reaccionan con ácidos grasos en posición <i>sn</i> -3.

## 2.6 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SCF)

En particular, el dióxido de carbono se encuentra actualmente recibiendo una gran atención como posible medio para reacciones enzimáticas. El dióxido de carbono se encuentra en su estado de fluido supercrítico cuando tanto la temperatura como la presión son iguales o superiores a las del punto crítico de 31 °C y 73 bar, respectivamente. En su estado supercrítico, el CO<sub>2</sub> tiene ambas cualidades de gas y líquido, y es esta doble característica de fluidos supercríticos la que proporciona las condiciones ideales para la extracción de compuestos con un alto grado de recuperación en un corto período de tiempo. Mediante el control o regulación de la presión y la temperatura, la densidad, o la fuerza disolvente, de fluidos supercríticos puede ser alterado para simular disolventes orgánicos que van desde el cloroformo y cloruro de metileno hasta el hexano. Este poder de disolución puede aplicarse para purificar, extraer, fraccionar, infundir, y recristalizar una amplia gama de materiales.

El dióxido de carbono supercrítico (SCCO<sub>2</sub>) es el solvente supercrítico más adecuado para la catálisis enzimática ya que exhibe propiedades similares a la de los solventes orgánicos, pero con capacidades adicionales de impulsar el fenómeno de transporte y facilitar la separación post-reacción debido a su poder solvente variable, lo cual lo hace más atractivo. Posee una serie de ventajas sobre los solventes orgánicos clásicos o agua, entre las que destacan: no ser tóxico ni inflamable, disponible a bajo costo, baja desnaturalización de la enzima, habilidad para recuperar el producto, alta transferencia de masa y alta tasa de difusión (Dumont *et al.*, 1992).

Gunnlaugsdottir y Sivik (1995) señalan que la principal ventaja del SCF sobre otros disolventes líquidos es que la alta difusividad, baja viscosidad y baja tensión superficial de SCF puede acelerar las reacciones enzimáticas limitadas en transferencia de masa.

## 2.7 ACEITE DE CANOLA

Canola es el término utilizado para variedades de raps (*Brassica napus* L.) que permiten la producción de aceites con bajos niveles de ácido erúxico y glucosinolatos en la torta o afrecho (producto que queda después de extraído el aceite de la semilla). Estas variedades se obtuvieron en Canadá, y se le dio este nombre por *Canadian oil low acid*. Según la definición oficial del Consejo Canadiense de Canola, es un aceite que debe contener menos de un 2% de ácido erúxico y la torta menos de 30 micromoles de glucosinolato por gramo.

El raps en Chile ha pasado por varias etapas desde su introducción. La primera partió a fines de los años 50 y duró hasta 1986, en ella reinaron variedades como Matador y Norin 16, y predominaban altos contenidos de ácido erúxico en su aceite y de glucosinolatos en su afrecho. En la segunda etapa, iniciada en 1987, se introducen cultivares bajos en ácido erúxico pero altos en glucosinolatos. Pero en el año 1992 comienza la etapa que marca el punto de quiebre en el cultivo del raps en Chile, ya que en la tercera etapa se introducen los cultivares tipo Canola, los que presentan menos del 2% de ácido erúxico en su aceite y menos de 30 micromoles de glucosinolatos por gramo en su afrecho.

En los últimos cinco años (2009/10 – 2013/14) la producción mundial de aceite de raps ha aumentado más de 3 millones de toneladas, pasando de 22,56 millones de toneladas a 25,63 millones de toneladas. Este incremento de la producción va de la mano con el aumento del consumo, que ha subido cerca de 2 millones de toneladas, de 22,62 millones de toneladas a 24,6 millones de toneladas, como resultado del conocimiento de las cualidades del producto (USDA.Oilseeds: World Markets and Trade, 2014).

En Chile, el raps es el cultivo que más ha crecido dentro de los industriales, pasando de 2,730 hectáreas a 40,883 hectáreas en los últimos treinta años. El desarrollo de las variedades canola (*Canadian oil low acid*), hizo que surgiera su demanda. Hoy, tanto el aceite como la torta se utilizan en la alimentación de



salmones, y el aceite ha vuelto a tener importancia en la alimentación humana, como resultado de su excelente relación omega 3-omega-6 y bajo contenido de ácidos grasos saturados, lo que ha permitido aumentar su consumo interno y su exportación.

El principal destino del aceite de raps producido en Chile en 2013 (85%) fue Colombia (6,751 toneladas). El segundo lugar lo ocupó Argentina, con 719,1 toneladas de aceite (9%). El 6% restante se repartió entre Ecuador, México y Perú, de los cuales el más importante fue Ecuador. El mayor importador de aceite de raps nacional desde 2010 hasta hoy ha sido siempre Colombia, cuya participación varía entre 95% y 85% en este período. Desde 2012 apareció Argentina como receptor de aceite chileno, pero siempre con menor importancia que Colombia. En enero de 2014 se importaron 2,507.4 toneladas, provenientes de Canadá. En el año 2013 el principal origen de las importaciones de aceite fue Canadá, con algo menos de 90% (ODEPA, 2014).

Además, hay un creciente interés por el uso de semillas oleaginosas para usos nutricionales, industriales y farmacéuticos (Carvalho *et al.*, 2006). La producción mundial de aceite de canola es más alta que el de la soja y girasol (Flagella *et al.*, 2000).

### **Composición química del aceite de canola**

Aunque los factores tales como la variedad de semilla de colza, las condiciones ambientales y el método de extracción (extracción con solvente vs prensado en frío) tienen algunos efectos en la composición de ácidos grasos de aceite de canola, en general, el aceite de canola contiene 6-14% de ácido  $\alpha$ -linolénico, 50-66% de ácido oleico y la cantidad más baja (<7%) de ácidos grasos saturados.

Ácido alfa linolénico es un ácido graso esencial que tiene muchos beneficios para la salud tales como la inhibición de la producción de eicosanoides, alteración en la producción de varios prostanoides, la reducción de la presión arterial, reducción de los triacilglicéridos séricos y los niveles de colesterol y retraso del

desarrollo de tumores (Chapkin, 2000). La investigación muestra que los ácidos grasos saturados pueden causar un aumento en el nivel de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) (Bendsen *et al.*, 2011). En cambio, el ácido oleico es eficaz en la reducción de los niveles de colesterol sérico total y el LDL-C. Se encontró que las partículas de colesterol LDL son más estables a la oxidación cuando los sujetos se alimentaron con dietas ricas en ácido oleico que cuando los sujetos fueron alimentados con dietas enriquecidas en ácido linoleico (Canola Council of Canada, 2013). La modificación genética de colza conduce a la producción de aceites de canola con composiciones de ácidos grasos variables que pueden afectar a la calidad, funcionalidad y la estabilidad oxidativa del aceite. La Tabla 2 presenta la composición de ácidos grasos de aceite de canola (% de ésteres metílicos) adaptado de Masson y Mella (1985) y Gordon y Miller (1997).

**Tabla 2.** Composición de ácidos grasos de canola (%)

Ácidos grasos	Canola <sup>1</sup>	Canola <sup>2</sup>
C14:0 Ac. Mirístico	Trazas	Trazas
C16:0 Ac. Palmítico	4,5	4,5
C18:0 Ac. Esteárico	2,4	2,1
C20:0 Ac. Eicosanoico	0,8	0,8
C22:0 Ac. Docosanoico	0,1	---
<b>Total saturados</b>	<b>7,8</b>	<b>7,4</b>
C16:1 Ac. Palmitoleico	0,2	0,4
C18:1 Ac. Oleico	64,5	6,5
C20:1 Ac. Eicosaenoico	0,6	2,5
C22:1 Ac. Erúcico	0,5	1,4
<b>Total monoinsaturados</b>	<b>65,8</b>	<b>65,8</b>
C18:2 n-6 Ac. Linoleico	17,7	19,4
C18:3 n-3 Ac. Linolénico	8,6	7,3
<b>Total poliinsaturados</b>	<b>26,3</b>	<b>26,7</b>

Adaptado de Gordon y Miller<sup>1</sup>; Masson y Mella<sup>2</sup>

## 2.8 IMPORTANCIA DE LA RELACIÓN ÁCIDO GRASO $n-6/n-3$

Las dietas occidentales son deficientes en AGPI  $n-3$ , y tienen una cantidad excesiva de AGPI  $n-6$  en comparación con la dieta en la que los seres humanos evolucionaron y sus patrones genéticos fueron establecidos. Mayores niveles de AGPI  $n-3$  y una baja relación de AG  $n-6/n-3$  ejercen efectos protectores. En la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular, una proporción de 4/1 fue asociada con una disminución del 70% en la mortalidad total (De Loregeril *et al.*, 1994). Una proporción de 2,5/1 redujo la proliferación de células del recto en pacientes con cáncer colorrectal, mientras que una proporción de 4/1 con la misma cantidad de AGPI  $n-3$  no tuvo ningún efecto (Bartram *et al.*, 1995). La baja proporción de AG  $n-6/n-3$  en mujeres fue asociada con una disminución en el riesgo de desarrollar cáncer de mama (Maillard *et al.*, 2002). Una proporción de 2-3/1 suprimió la inflamación en pacientes con artritis reumatoide, y una relación de 5/1 tuvo un efecto beneficioso en pacientes con asma, mientras que una proporción de 10/1 tuvo consecuencias adversas (Broughton *et al.*, 1997). Estos estudios indican que la relación óptima puede variar dependiendo de la enfermedad considerada, pero en todos los casos una menor relación mostró mejores resultados. Esto es consistente con el hecho de que las enfermedades crónicas son multigénicas y multifactoriales. Simopoulos (2002) concluye que la dosis óptima o relación de AG  $n-6/n-3$  varía de 1/1 a 4/1 dependiendo de la enfermedad en consideración (Tabla 3).

**Tabla 3.** Relación AG  $n-6/n-3$  en varias poblaciones

<b>Población</b>	<b><math>n-6/n-3</math></b>	<b>Referencias</b>
Paleolítico	0,79	Eaton <i>et al.</i> , 1988
Grecia antes de 1960	1,00 – 2,00	Simopoulos, 1998
Estados Unidos	16,74	Eaton <i>et al.</i> , 1998
Reino Unido y Norte de Europa	15,00	Sander, 2000
Japón	4,00	Sugano, 2000

## **2.9 METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (MSR)**

La Metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para el desarrollo, la mejora y la optimización de los procesos. También tiene importantes aplicaciones en el diseño, desarrollo, y la formulación de nuevos productos, así como en la mejora de los diseños de productos ya existentes.

La optimización de un proceso mediante la MSR es un método rápido y económico para la recopilación de los resultados de investigación de una variable o un experimento factorial (Wanasundara y Shahidi, 1999; Liu *et al.*, 2007; Alim *et al.*, 2008).

## **2.10 NUTRACÉUTICOS, ALIMENTOS FUNCIONALES Y SUPLEMENTOS DIETÉTICOS**

Los nutraceuticos son productos de origen natural con propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud y con capacidad preventiva y/o terapéutica definida. Deben cumplir los siguientes criterios: ser productos de origen natural, aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes, con análisis de estabilidad y toxicología, estudios en animales de experimentación y en humanos, criterios FDA, que aporten reproducibilidad, calidad, seguridad y eficacia de sus propiedades bioactivas (Sociedad Española de Nutracéutica Médica, 2015).

Alimentos funcionales o alimentos enriquecidos son aquellos que aportan al organismo determinadas cantidades de vitaminas, grasas, proteínas, hidratos de carbono y otros elementos necesarios para el organismo. Cuando un alimento funcional ayuda a la calidad de vida, al mantenimiento de la salud o a la prevención de enfermedades, entonces podemos llamarlo nutraceutico. Los alimentos funcionales suelen presentarse en forma de alimentos para uso diario enriquecidos en determinados nutrientes o sustancias beneficiosas para la salud.

Sin embargo, los alimentos funcionales o nutraceuticos: no tienen definiciones reglamentarias específicas. Según la Asociación Dietética Norteamericana (American Dietetic Association, ADA) la palabra “funcional” actualmente es netamente un término de mercadeo, puesto que no tiene un significado regulatorio ni idiomático (Sociedad Española de Nutraceutica Médica, 2015).

De acuerdo a la Food and Drug Administration (FDA) la clasificación de suplemento dietético cubre los productos que se consumen por vía oral y que contienen un “ingrediente dietético” que complementa la dieta como vitaminas, minerales, hierbas u otros productos botánicos, amino ácidos, enzimas, etc. Estos productos: se presentan generalmente en forma de píldora, cápsula, comprimido o líquido, no en forma de alimento convencional ni como el producto exclusivo a ingerir como comida o alimento. Los complementos alimenticios pueden ser considerados nutraceuticos, en tanto que las sustancias que aporten sean de origen natural y cumplan los requisitos anteriores para ser considerados nutraceuticos (ProChile, 2012).

Existen varias estrategias desarrolladas en el mercado para el logro de las recomendaciones de EPA y DHA que incluyen: alimentos (pescado específicamente graso), los alimentos enriquecidos (con aceite de pescado, aceites con alto contenido de EPA y/o DHA) o suplementos (aceite de pescado, algas) (Kris-Etherton *et al.* 2002) (Anexo 1). Estos se encuentran en forma de triacilglicéridos (TAG), ésteres etílicos (EE) y/o ácidos grasos libres (AGL). El presente estudio podría ofrecer al mercado un triacilglicérido estructurado (TAGs) con una baja relación de AG  $n-6/n-3$  y con contenido en EPA y DHA.

## **CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1 HIPÓTESIS**

Es posible obtener un triacilglicérido estructurado a partir de aceite de canola (*Brassica napus* L.) y concentrado AGPICL a partir de aceite crudo de salmón, que mediante una combinación de las variables del proceso de acidólisis enzimática (lipasa B inespecífica de *Candida antarctica*) en dióxido de carbono supercrítico, minimice la relación de ácidos grasos  $n-6/n-3$  del triacilglicérido estructurado resultante.

### **3.2 OBJETIVO GENERAL**

Optimizar las variables del proceso de acidólisis enzimática de aceite de canola (*Brassica napus* L.) y concentrado de AGPICL, para obtener un triacilglicérido estructurado con una baja relación de ácidos grasos  $n-6/n-3$ , utilizando lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* inmovilizada en condiciones de dióxido de carbono supercrítico (SCCO<sub>2</sub>).

### **3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 3.3.1** Caracterizar mediante análisis físico-químicos el aceite crudo de salmón comercial y el aceite de canola (*Brassica napus* L.).
- 3.3.2** Obtener un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), a partir de aceite crudo de salmón.
- 3.3.3** Determinar el efecto de las variables del proceso de acidólisis enzimática sobre la relación de ácidos grasos  $n-6/n-3$  en los triacilglicéridos estructurados purificados.
- 3.3.4** Obtener modelos matemáticos a partir de la metodología de superficie de respuesta (MSR) que permitan predecir el efecto de las variables y sobre la relación de ácidos grasos  $n-6/n-3$  de los triacilglicéridos estructurados purificados.
- 3.3.5** Caracterizar los perfiles de ácidos grasos de los triacilglicéridos estructurados óptimos y la relación AG  $n-6/n-3$ .

## **CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 MATERIALES**

#### **4.1.1 Materias primas**

Aceite crudo de salmón proporcionado por la empresa Salmonoil S.A. (Puerto Montt, Chile) que se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis de calidad. El aceite Mazola 100% canola (Superior Quality, E. 12.06.14/16) adquirido de Watt's (Santiago, Chile). El estándar interno utilizado fue el metil tricosanoato (23:0) (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA). Éstándar de referencia GLC-463 (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA). Urea, etanol, n-hexano, metanol y  $\alpha$ -tocoferol fueron obtenidos de Merck (Santiago, Chile).

#### **4.1.2 Equipos**

- Balanza analítica AE ADAM, modelo AFA-120LC (USA).
- Cromatógrafo de gas HP 5890 serie II (Palo Alto, California, USA), con detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector), sistema de inyección Split y columna capilar de sílica fundida SP<sup>TM</sup> – 2560 de 100 m x 0,25 mm x 0,2  $\mu$ m grosor de película (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Equipo de CO<sub>2</sub> supercrítico Spe-ed<sup>TM</sup> SFE system model 7071 (Applied Separation).
- Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis Spectrometer, modelo UV3 (Cambridge, UK)
- pH-metro, modelo PHS-3E
- Rotavapor Heidolph OB 2001 VV 2011 (Alemania).
- Ultracongelador a -80 °C.



## 4.2 METODOLOGÍA

### 4.2.1 Caracterización mediante análisis físico-químicos del aceite crudo de salmón comercial y el aceite de canola (*Brassica napus* L.)

La Tabla 4 presenta los métodos para la caracterización físico-química que se realizó al aceite crudo de salmón y al aceite de canola (*Brassica napus* L.).

**Tabla 4.** Métodos para la caracterización físico-química de la materia prima

Parámetro de calidad	Método
Acidez libre	AOCS Official Method Ca 5a-40, 1993
Valor de peróxidos	AOCS Official Method Cd 8b-90, 1993
Valor de <i>p</i> -anisidina	AOCS Official Method Cd 18-19, 1993
Valor de TOTOX	Wanasundara y Shahidi, 1995

### 4.2.2 Obtención de un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), a partir de aceite crudo de salmón

La preparación del concentrado AGPICL a partir de aceite crudo de salmón se realizó mediante una hidrólisis básica y posterior inclusión en cristales de urea. Luego se caracterizaron los ácidos grasos de las muestras, para lo cual se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y se analizaron posteriormente por cromatografía de gas-líquido (GLC). La metodología que se empleó fue la siguiente:

#### 4.2.2.1 Preparación de ácidos grasos libres mediante hidrólisis básica

Se pesaron 500 g de aceite crudo de salmón y se mezclaron con una solución de KOH. Se sometió la mezcla a 60 °C bajo reflujo por 90 minutos, con agitación constante bajo atmósfera de nitrógeno. Después de la saponificación, se realizaron dos extracciones con hexano; la combinación de

ambas se filtró a través de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para remover humedad. Finalmente, el solvente se evaporó al vacío y se eliminó el solvente remanente con una corriente de gas nitrógeno. Los ácidos grasos (AG) obtenidos después de la hidrólisis básica fueron almacenados a -80 °C hasta su uso (Wanasundara y Shahidi, 1999).

#### **4.2.2.2 Concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga por inclusión en cristales de urea**

Los ácidos grasos se mezclaron con una solución de urea en etanol al 95% en un matraz Erlenmeyer. La solución se dispuso en un sistema con varilla de reflujo y se calentó a 60 °C. A continuación, se llevó a una temperatura de -23 °C por 22 horas con agitación constante. Los cristales formados se separaron del líquido bajo filtración por gravedad con papel filtro tipo Whatman N° 1 y se recibió en un matraz. El filtrado se diluyó con 900 ml de agua destilada y se acidificó a pH 4,5. Se realizaron extracciones hexánicas, se separaron las fases y se eliminó la fase acuosa. El disolvente se eliminó a 40 °C usando un evaporador rotatorio y con una corriente de gas nitrógeno se eliminó el solvente remanente. El concentrado de AGPACL se almacenó a -80 °C con 100 ppm de  $\alpha$ -tocoferol hasta su posterior análisis (Pando *et al.*, 2014).

#### **4.2.2.3 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos**

##### **Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)**

Los ácidos grasos del aceite de canola (*Brassica napus* L.), aceite crudo de salmón comercial, y concentrado de AGPACL se convirtieron en FAME mediante metilación en caliente empleando metilato de sodio seguido por medio ácido (IUPAC 1987 método estándar 2.301).

## **Análisis de los FAME por cromatografía de gas-líquido (GLC)**

Los FAME fueron analizados empleando un cromatógrafo de gas HP 5890 serie II (Palo Alto, California, USA), con detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector), sistema de inyección Split y columna capilar de sílica fundida SP<sup>TM</sup> – 2560 de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm grosor de película (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El programa utilizado fue el siguiente: Temperatura del inyector y del detector 250 °C, temperatura inicial del horno 100 °C, a razón de 3 °C/min hasta 140 °C, luego se incrementó la temperatura a 170 °C a razón de 0,5 °C/min, finalmente se incrementó a 220 °C a razón de 4 °C/min y se mantuvo a 220 °C durante 30 min (tiempo total 115,83 min.). Gas transportador hidrogeno de alta pureza (Linde, Chile), volumen de inyección 1 µl. Los FAME fueron identificados por comparación con el estándar de referencia GLC-463 (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA) y la cuantificación, se realizó de acuerdo a la norma AOCS Official Method (AOCS 2009, Ce 1j-7). El software que se utilizó para el análisis de los cromatogramas fue DataApex Clarity <sup>TM</sup> (DataApex Ltd., Prague, Czech Republic).

### **4.2.3 Determinación del efecto de las variables del proceso de acidólisis enzimática sobre la relación de AG $n-6/n-3$ en los TAGs purificados, utilizando lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* inmovilizada bajo dióxido de carbono supercrítico (SCCO<sub>2</sub>)**

#### **4.2.3.1 Diseño experimental**

Un diseño compuesto central rotacional 2<sup>5-1</sup> más estrella de 5 factores basado en la metodología de superficie de respuesta fue utilizado para estudiar el efecto de las variables y minimizar la relación de ácidos grasos  $n-6/n-3$  mediante la acidólisis enzimática del aceite de canola con concentrados AGPICKL. Las variables independientes fueron: relación

AGPICL/Canola ( $X_1$ ), temperatura de reacción ( $X_2$ ), presión de reacción ( $X_3$ ), tiempo de reacción ( $X_4$ ) y concentración de enzima ( $X_5$ ) respecto al sustrato. Asimismo, las variables dependientes estudiadas fueron la cantidad total de AG  $n-6$  ( $Y_1$ ) y cantidad total de AG  $n-3$  ( $Y_2$ ).

La Tabla 5 presenta los rangos experimentales y valores de las variables independientes del proceso de acidólisis enzimática.

**Tabla 5.** Rangos experimentales y valores de las variables independientes del proceso de acidólisis enzimática

Variables	Niveles				
	-2	-1	0	1	2
$X_1$ (AGPICL/Canola, %)	10	30	50	70	90
$X_2$ (Temperatura, °C)	40	45	50	55	60
$X_3$ (Presión, bar)	100	125	150	175	200
$X_4$ (Tiempo, horas)	0	6	12	18	24
$X_5$ (Enzima, %)	0	2,5	5	7,5	10

Se realizaron 30 ensayos con 5 niveles (-2, -1, 0, 1, 2) que incluyeron 4 repeticiones en el punto central (0, 0, 0, 0, 0), con el fin de estimar el error experimental. Todos los experimentos se llevaron a cabo en un orden aleatorio.

#### 4.2.3.2 Acidólisis enzimática en CO<sub>2</sub> supercrítico

Los 30 experimentos de acidólisis enzimática fueron realizados en un equipo Spe-ed™ SFE Applied Separation con fluido de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en condiciones supercríticas. En la columna reactor se depositaron 10 g de muestra (mezcla concentrado AGPICL, aceite de canola y enzima, las proporciones variaron según el diseño). Posteriormente, se procedió a programar la reacción de acuerdo a la temperatura, presión y tiempo establecidos según el diseño. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80 °C para su posterior análisis.

#### **4.2.3.3 Purificación de los triacilglicéridos estructurados**

Los productos de la reacción de la acidólisis enzimática (principalmente triacilglicéridos estructurados y ácidos grasos libres) se purificaron mediante neutralización de ácidos grasos libres con NaOH 1N en solución hidroetanólica (relación etanol/agua 50/50 v/v), y la posterior extracción de triacilglicéridos estructurados en la fase hexánica (Jimenez *et al.*, 2010).

#### **4.2.3.4 Análisis de los productos de la reacción**

La identificación de los productos de la reacción de acidólisis enzimática (triacilglicéridos estructurados, ácidos grasos libres), se realizó mediante el uso de cromatografía en capa fina (Thin –Layer Chromatography, TLC). Cada uno de estos componentes lipídicos fue identificado por TLC en placas de sílica gel (TLC Silica gel 60 - Merck Millipore). La fase móvil que se usó fue cloroformo/acetona/metanol (95:4,5:0,5 v/v/v) (Robles *et al.*, 2011). Se sembraron 4 µl de muestra (previamente se diluyó la muestra 1:25 en hexano) y se dejó eluir el solvente junto con los analitos. Se secó la placa y se dejó en una cámara cerrada con solución de yodo para que los vapores tomaran contacto con la placa y tiñeran los distintos componentes lipídicos (Robles *et al.*, 1999).

#### **4.2.3.5 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos**

Se determinó el perfil de ácidos grasos para los 30 ensayos de acuerdo al punto 4.2.2.3. Los resultados fueron expresados en g/100 g AGT.

#### **4.2.4 Obtención de modelos matemáticos a partir de la metodología de superficie de respuesta que permitan predecir el efecto de las variables de proceso sobre la relación de AG $n-6/n-3$ de los TAGs purificados**

Un modelo de regresión polinómico cuadrático fue asumido para predecir la variable respuesta ( $Y_{1,2}$ ). El modelo propuesto para cada variable respuesta ( $Y$ ), fue:  $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$ ; donde  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{ij}$  representarán los coeficientes de regresión de intercepto, lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente, y  $X_i$  y  $X_j$  representan todas las variables independientes y la interacción entre ellas. Los coeficientes de regresión se obtuvieron mediante análisis de regresión múltiple considerando un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Se realizó un ANOVA de los parámetros de regresión y del modelo ajustado con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Para minimizar el contenido total de AG  $n-6$  y maximizar el contenido total de AG  $n-3$ , se realizó un análisis canónico sobre un modelo polinómico para localizar el punto estacionario. Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHIC Centurion XVI Versión 16.1.11.

#### **4.2.5 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos de los triacilglicéridos estructurados óptimos y la relación de AG $n-6/n-3$**

##### **4.2.5.1 Purificación de los triacilglicéridos estructurados y análisis de los productos de la reacción**

Se realizaron de acuerdo a los puntos 4.2.3.3 y 4.2.3.4, respectivamente.

##### **4.2.5.2 Composición de ácidos grasos**

La preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y el análisis de los FAME por cromatografía de gas (GC) se realizaron de acuerdo al punto 4.2.2.3.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización mediante análisis físico-químicos del aceite crudo de salmón comercial y el aceite de canola (*Brassica napus* L.)

La Tabla 6 presenta los valores de la acidez libre (g/100g de ácido oleico), valor de peróxidos (mEq de oxígeno activo/kg materia grasa), valor de *p*-anisidina y valor TOTOX para el aceite crudo de salmón y el aceite de canola.

**Tabla 6.** Caracterización del aceite crudo de salmón y aceite de canola

Parámetro de calidad	Aceite crudo salmón	Aceite de canola
Acidez libre <sup>a</sup> (g/100g)	2,22 ± 0,26	0,13 ± 0,01
Valor peróxidos <sup>b</sup> (mEq O <sub>2</sub> activo/kg)	2,28 ± 0,42	0,48 ± 0,08
Valor <i>p</i> -anisidina (unidades)	5,15 ± 0,29	6,79 ± 0,33
TOTOX 2 IP + VA	9,72 ± 0,63	7,74 ± 0,44

<sup>a</sup> Porcentaje de acidez libre: g de ácido oleico/100 g de aceite

<sup>b</sup> Valor de peróxidos: miliequivalentes de oxígeno activo/kg de materia grasa (m.g.).

Los resultados se expresan como la media aritmética ± desviación estándar (n=3)

El valor de acidez libre para el aceite de canola presenta un valor de 0,13 g ácido oleico/100 g de aceite, en cuanto al valor de peróxidos, presenta un valor de 0,48 mEq oxígeno activo/kg materia grasa. Estos resultados se encuentran dentro de los valores establecidos por la legislación chilena en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA, 2014) que permite hasta 0,25% (0,25 g/100 g) de acidez libre expresada como ácido oleico; para el valor de peróxidos, indica que en su periodo de vida útil los aceites comestibles pueden presentar hasta 10 mEq oxígeno activo/kg materia grasa.

El aumento en el valor acidez (porcentaje de ácidos grasos libres (AGL)) indica el grado de deterioro hidrolítico que ha sufrido la materia grasa el que constituye la medida de rancidez hidrolítica. Para el caso de AGL los valores habituales de materia cruda se encuentra entre 0,5% – 5% y para materia grasa deteriorada 0,5% - 1,5%. (Masson, 1994; FAO, 1994)

Para el aceite crudo de salmón el valor de acidez libre presenta un valor de 2,22 g ácido oleico/100 g de aceite; en cuanto al valor de peróxidos, presenta un valor de 2,28 mEq oxígeno activo/kg materia grasa. Méndez, Masson y Jiménez (2010) presentan valores de acidez libre y valores de peróxidos para tres aceites de origen marino, cuyos valores máximos están en el orden de 3,04 g/100 g de aceite y 5,27 mEq oxígeno activo/kg materia grasa, respectivamente. Estos resultados correspondieron a valores habituales de acidez libre y valores de peróxido para aceites crudos de pescado.

La rancidez oxidativa es una medida de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados constituyentes del TAG. El valor de peróxido (VP) mide los hidroperóxidos acumulados correspondientes al primer indicio de rancidez oxidativa, es decir la oxidación primaria (Masson, 1994; FAO, 1994). La Global Organization for EPA and DHA (2010) establece 5 meq/mg max para el valor de peróxido (Hernandez, 2011).

Se puede señalar que, con respecto al valor de *p*-anisidina y TOTOX, en algunos países se establecen valores máximos para estos dos parámetros. La “International Fish Oil Standards” (IFOS, 2009) con sede en Canadá, indica para aceite de consumo humano un valor máximo de *p*-anisidina y TOTOX de 15 y 19,5, respectivamente. El “Council for Responsible Nutrition” (CRN, 2009), con sede en Estados Unidos, señala un valor máximo de *p*-anisidina y TOTOX de 20 y 26, respectivamente. El aceite crudo de salmón presenta un valor de *p*-anisidina de 5,15 y un valor de TOTOX de 9,71, bajo los límites de las regulaciones señaladas, indicando valores aceptables para este tipo de aceite.

Pando *et al.* (2014) encontraron valores de *p*-anisidina, para el aceite crudo y refinado de salmon comercial de  $5,33 \pm 0,03$  y  $5,14 \pm 1,02$ , respectivamente. El valor de *p*-anisidina (VA) es una medida de la formación de compuestos secundarios de oxidación altamente reactivos con predominio de estructuras carbonílicas, como aldehídos y cetonas (Masson, 1994; FAO, 1994).



## 5.2 Obtención de un concentrado de ácido graso poliinsaturado de cadena larga (AGPICL), a partir de aceite crudo de salmón

La preparación del concentrado de AGPI a partir de aceite crudo de salmón se realizó mediante una hidrólisis básica y posterior inclusión en cristales de urea. Posteriormente, se caracterizaron los ácidos grasos de las muestras, por cromatografía de gas-líquido (GLC). El rendimiento de AGL obtenido fue del  $94,2 \pm 1,9\%$  con respecto a aceite crudo de salmón y el rendimiento obtenido de AGPI obtenido fue del  $6,8 \pm 0,9\%$  con respecto a los AGL después de la hidrólisis básica.

### Composición de ácidos grasos

El principal ácido graso (AG) en g/100 de ácidos grasos totales (AGT) y en porcentaje de ésteres metílicos presente en el aceite de canola fue el ácido oleico (56,27 g/100 g AGT y 56,22%, respectivamente). Otros AG presentes en el aceite de canola fueron: ácido linoleico (25,24) (25,12), ácido linolénico (7,23) (7,42) y ácido palmítico (4,51) (4,52). El contenido en AG saturados presentó un valor de 7,58 (7,60), en AG monoinsaturados fue de 59,94 (59,87) y en AG poliinsaturados de 32,47 (32,54) expresados en g/100 g AGT y porcentaje de ésteres metílicos, respectivamente. Masson y Mella (1985) determinaron para el aceite de canola (*Brassica sp.*), que el contenido de AG saturados, expresado como porcentaje de ésteres metílicos, presenta un valor de 7,4%, siendo el contenido de AG monoinsaturados y AG poliinsaturados de 65,8% y 26,7%, respectivamente. La relación entre la suma de los AG *n*-6 y AG *n*-3 (relación AG *n*-6/*n*-3) en el aceite de canola fue de 3,49/1 (Tabla 7).

Ghazani y Marangoni (2013) describen que en general el aceite de canola contiene entre 6% y 14% de ácido  $\alpha$ -linolénico, entre 50% y 66% de ácido oleico y una menor cantidad ácidos grasos saturados (< 7%).

Los ácidos grasos más abundantes que se encontraron en el aceite crudo de salmón fueron (g/100 g AGT): C 14:0 (3,35), C 16:0 (14,20), C 16:1 9c (4,59),

C 18:0 (3,70), C 18:1 9c (31,70), C 18:1 11c (3,46), C 18:2 *n*-6 (16,68), C 18:3 *n*-3 (3,43), C 20:5 *n*-3 (5,17), C 22:5 *n*-3 (2,34), C 22:6 *n*-3 (4,81). Con respecto a la composición en g/100 g AGT de AG saturados presentaron un valor de 21,96, los AG monoinsaturados un valor de 42,29 y para AG poliinsaturados un contenido de 35,75 (Tabla 7).

En la presente investigación, la composición de ácidos grasos en el concentrado AGPICL fue (g/100 g AGT): C 14:0 (0,42), C 16:1 9c (0,27), C 18:1 9c (0,55), C 18:2 *n*-6 (4,25), C 18:3 *n*-3 (1,45), C 20:5 *n*-3 (19,32), C 22:4 *n*-6 (2,85), C 22:5 *n*-3 (1,63), C 22:6 *n*-3 (53,23). Con respecto a la composición en g/100 g AGT, se obtuvieron los valores de 0,76, 2,16 y 97,62 para los AG saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente.

El contenido en ácidos grasos saturados disminuyó después de la inclusión por cristales con urea (de 21,96 a 0,76 g/100 AGT), mientras que el contenido de ácidos grasos insaturados aumentó, principalmente en el caso de los AGPI *n*-3. Los ácidos grasos saturados del aceite crudo como C 12:0, C 14:0, C 16:0, C 18:0, C 20:0 y C 22:0, así como los ácidos grasos monoinsaturados, tales como C 16:1 9c, C 18:1 9c, C 18:1 11c, C 20:1 11c, C 22:1 13c, formaron aductos debido a la inclusión de la urea y quedaron retenidos en la fase descartable.

La Tabla 7 presenta la composición de ácidos grasos (AG) en el aceite de canola, aceite crudo de salmón y concentrado AGPICL (expresado como g/100 g de ácido graso total (AGT)).

**Tabla 7.** Composición de AG y grupos de ácidos grasos en el aceite de canola, aceite crudo de salmón y concentrado AGPI (expresado como g/100 g AGT)

<sup>a</sup> No.	AG o grupo de AG	Aceite de Canola	Aceite crudo de salmón	Concentrado AGPICKL
1	Láurico C 12:0	<sup>b</sup> N.D.	0,07 ± 0,01	N.D.
2	Mirístico C 14:0	0,04 ± 0,01	3,35 ± 0,17	0,42 ± 0,07
3	Palmítico C 16:0	4,51 ± 0,37	14,20 ± 0,25	N.D.
4	Palmitoleico C 16:1 9c	0,14 ± 0,01	4,59 ± 0,08	0,27 ± 0,05
5	Heptadecanoico C 17:0	N.D.	0,29 ± 0,06	0,34 ± 0,06
6	Heptadecenoico C 17:1 10c	N.D.	0,46 ± 0,07	0,79 ± 0,11
7	Esteárico C 18:0	1,91 ± 0,27	3,70 ± 0,40	N.D.
8	Oleico C 18:1 9c	56,27 ± 0,58	31,70 ± 0,16	0,55 ± 0,04
9	<i>Cis</i> -Vaccénico C 18:1 11c	2,57 ± 0,95	3,46 ± 0,79	N.D.
10	Linoelaídico C 18:2 9t,12t	N.D.	0,61 ± 0,09	N.D.
11	Linoleico C 18:2 9c,12c; n-6	25,24 ± 0,24	16,68 ± 0,27	4,25 ± 0,33
12	γ-linolénico C 18:3 6c,9c,12c; n-6	N.D.	0,11 ± 0,07	1,62 ± 0,16
13	Eicosanoico C 20:0	0,75 ± 0,05	0,21 ± 0,08	N.D.
14	α-linolénico C 18:3 9c,12c,15c; n-3	7,23 ± 0,07	3,43 ± 0,06	1,45 ± 0,16
15	11-Eicosenoico C 20:1 11c	0,96 ± 0,03	1,91 ± 0,24	N.D.
16	Octadecatetraenoico C 18:4; n-3	N.D.	0,75 ± 0,03	7,49 ± 0,58
17	Eicosadienoico C 20:2 11c,14c; n-6	N.D.	0,66 ± 0,09	3,93 ± 0,28
18	Dihomo γ-linolénico C 20:3 8c,11c,14c; n-6	N.D.	0,29 ± 0,01	0,74 ± 0,03
19	Behénico C 22:0	0,37 ± 0,04	0,14 ± 0,06	N.D.
20	Eicosatrienoico C 20:3 11c,14c,17c; n-3	N.D.	0,19 ± 0,03	N.D.
21	Araquidónico C 20:4 5c, 8c, 11c, 14c;n-6	N.D.	0,40 ± 0,09	1,11 ± 0,15
22	Docosenoico C 22:1 13c	N.D.	0,17 ± 0,03	N.D.
23	Eicosapentaenoico C 20:5 5c,8c,11c,14c,17c; n-3	N.D.	5,17 ± 0,08	19,32 ± 0,47
24	Docosatetraenoico C 22:4 7c,10c,13c,16c; n-6	N.D.	0,31 ± 0,00	2,85 ± 0,04
25	Docosapentaenoico C 22:5 7c,10c,13c,16c,19c; n-3	N.D.	2,34 ± 0,15	1,63 ± 0,07
26	Docosahexaenoico C 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c; n-3	N.D.	4,81 ± 0,10	53,23 ± 2,29
<b>Total AG saturados</b>		<b>7,58</b>	<b>21,96</b>	<b>0,76</b>
<b>Total AG monoinsaturados</b>		<b>59,94</b>	<b>42,29</b>	<b>2,16</b>
<b>Total AG poliinsaturados</b>		<b>32,47</b>	<b>35,75</b>	<b>97,62</b>
<b>Total AG n-3</b>		<b>7,23</b>	<b>16,70</b>	<b>83,12</b>
<b>Total AG n-6</b>		<b>25,24</b>	<b>18,44</b>	<b>14,52</b>
<b>EPA+DHA</b>		<b>0,00</b>	<b>9,98</b>	<b>72,56</b>
<b>Relación AG n-6/n-3</b>		<b>3,49</b>	<b>1,10</b>	<b>0,17</b>

<sup>a</sup> Número de ácido graso o peak cromatográfico

<sup>b</sup> N.D. No detectado

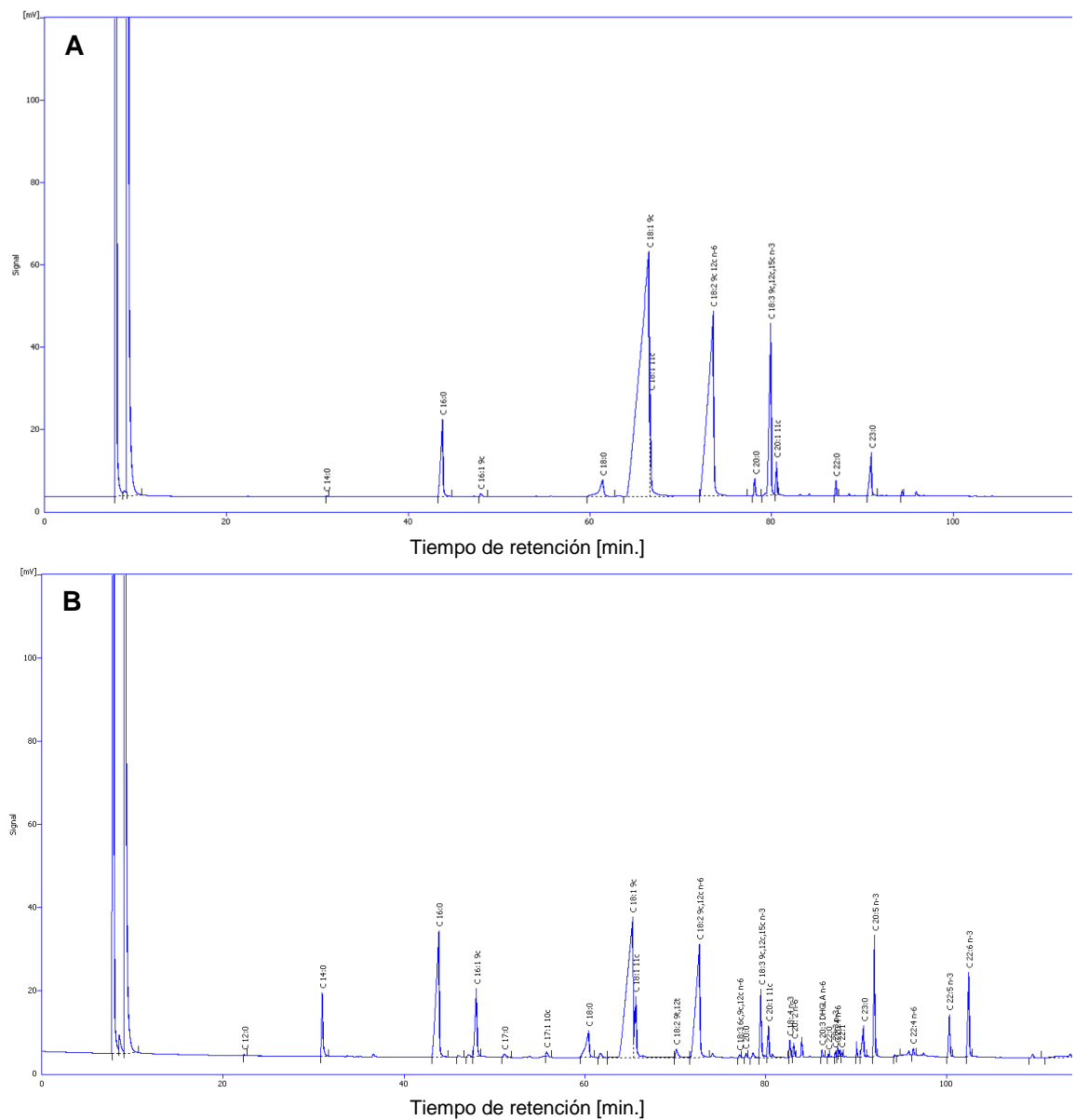
Los resultados se expresan como la media aritmética ± desviación estándar (n=3)

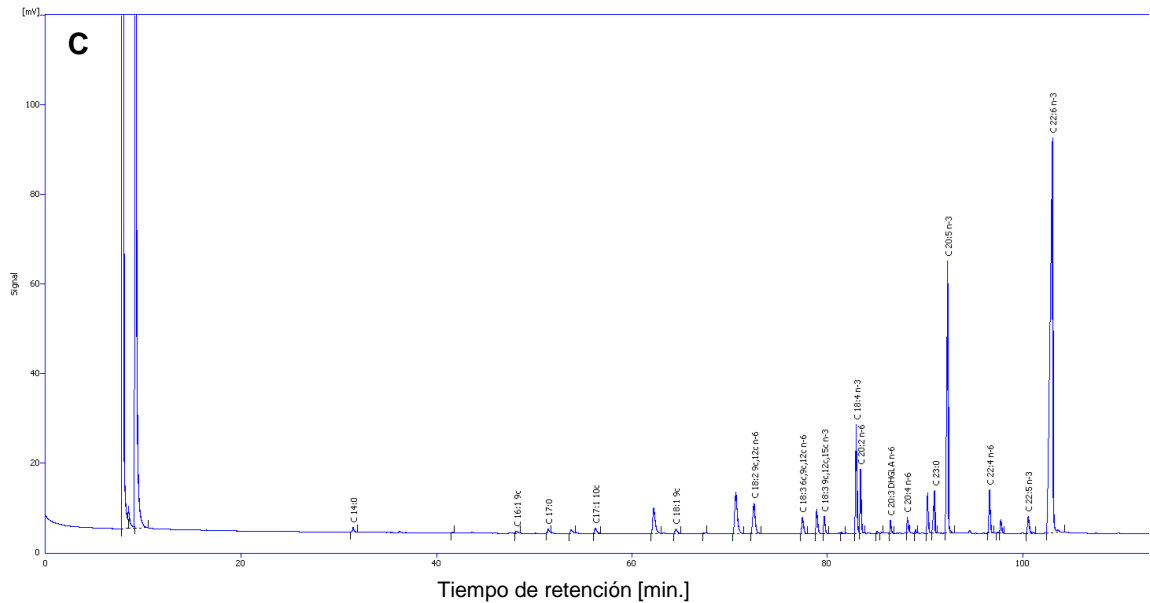
El contenido de AGPI *n*-3 (g/100g AGT) del aceite crudo de salmón y el concentrado AGPICL fue de 16,70 y 83,12, respectivamente (Tabla 7). Así, el contenido de AGPI-*n*-3 aumentó en el concentrado de AGPICL debido a que éstos permanecieron en la fracción no acomplejada con urea mientras que el contenido en los ácidos grasos saturados y los ácidos grasos monoinsaturados disminuyó debido a que formaron aductos con urea (Tabla 7, Figura 2). Este método preferentemente usado por investigadores porque la formación de complejos depende de la configuración de los ácidos grasos debido a la presencia de múltiples dobles enlaces, en lugar de depender de las propiedades físicas puras, tales como punto de fusión o solubilidad (Wanasundara, 1996). El fraccionamiento de los ácidos grasos con urea se basa principalmente en el grado de insaturación; por lo tanto, cuanto más insaturado, menos se incluye en los cristales de urea (Haagsma *et al.*, 1982). Esta es una técnica bien establecida para la eliminación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Iverson y Weik, 1967; Strocchi y Bonaga, 1975). Para el caso de los ácidos grasos C 20:5 *n*-3 (EPA) y C 22:6 *n*-3 (DHA) para el aceite crudo de salmón, su contenido fue de 5,17 y 4,81 g/100 g AGT, respectivamente. El contenido en dichos ácidos grasos (EPA y DHA) aumentó después del proceso de complejación con urea presentando un valor de 19,32 y 53,23 g/100 g AGT, respectivamente, en el concentrado AGPICL (Tabla 7). Por lo tanto, estos resultados demuestran que el EPA tiene más tendencia a formar aductos de urea que el DHA bajo las condiciones de trabajo empleadas (Wanasundara y Shahidi, 1999) (Figura 2). Haagsma *et al.* (1982) y Ratnayake *et al.* (1988) han reportado resultados similares para los experimentos de complejación urea llevados a cabo por los aceites de hígado de bacalao y sardina, respectivamente. De la misma manera que Liu *et al.* (2006), quienes realizaron una optimización de concentración de AGPI *n*-3 de aceite de atún mediante complejación con urea. La complejación con urea bajo estas condiciones ha demostrado en el presente estudio una alta eficiencia ya que

aumentó el contenido en los AGPI totales desde 35,75 a 97,62 (g/100 g AGT) (Tabla 7).

### Cromatogramas FAME

Los cromatogramas correspondientes a los ésteres metílicos del aceite de canola (*Brassica napus* L.), aceite crudo de salmón y concentrado de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) se muestran en la Figura 2.





**Figura 2.** Cromatogramas de los ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a aceite de canola (*Brassica napus* L.) (A), aceite crudo de salmón (B) y concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) (C).

### 5.3 Determinación del efecto de las variables del proceso de acidólisis enzimática sobre la relación de AG $n-6/n-3$ , utilizando lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* inmovilizada bajo $\text{SCCO}_2$

La Tabla 8 presenta las distintas combinaciones de las variables independientes con sus respectivos valores de variables dependientes.

**Tabla 8.** Diseño compuesto central rotacional  $2^{5-1}$  más estrella, de 5 factores para el proceso de acidólisis enzimática, basado en la metodología de superficie de respuesta

Ensayo	Variables independientes					Variables dependientes	
	AGPI/Canola <sup>a</sup> (X <sub>1</sub> )	Temperatura <sup>b</sup> (X <sub>2</sub> )	Presión <sup>c</sup> (X <sub>3</sub> )	Tiempo <sup>d</sup> (X <sub>4</sub> )	Enzima <sup>e</sup> (X <sub>5</sub> )	Total n-6 (Y <sub>1</sub> )	Total n-3 (Y <sub>2</sub> )
1	30	45	125	6	7,5	10,88	25,50
2	70	45	125	6	2,5	15,79	24,11
3	30	55	125	6	2,5	9,52	25,81
4	70	55	125	6	7,5	14,45	24,87
5	30	45	175	6	2,5	10,11	25,31
6	70	45	175	6	7,5	11,67	25,14
7	30	55	175	6	7,5	10,39	24,84
8	70	55	175	6	2,5	9,28	25,19
9	30	45	125	18	2,5	14,16	24,60
10	70	45	125	18	7,5	13,37	24,83
11	30	55	125	18	7,5	12,04	25,46
12	70	55	125	18	2,5	13,88	24,36
13	30	45	175	18	7,5	12,84	25,74
14	70	45	175	18	2,5	15,67	27,87
15	30	55	175	18	2,5	11,67	25,64
16	70	55	175	18	7,5	19,64	23,98
17	10	50	150	12	5	7,86	25,18
18	90	50	150	12	5	11,67	24,42
19	50	40	150	12	5	8,07	25,01
20	50	60	150	12	5	12,30	24,48
21	50	50	100	12	5	11,78	24,58
22	50	50	200	12	5	11,51	24,51
23	50	50	150	0	5	8,63	25,04
24	50	50	150	24	5	13,75	24,65
25	50	50	150	12	0	7,46	25,16
26	50	50	150	12	10	9,15	25,19
27	50	50	150	12	5	12,68	24,66
28	50	50	150	12	5	13,12	24,81
29	50	50	150	12	5	12,46	24,73
30	50	50	150	12	5	11,94	24,67

<sup>a</sup> Variables de proceso: A (AGPI/Canola, %), B (Temperatura, °C) C (Presión, bar), D (Tiempo, h), E (Concentración de enzima, %).

<sup>b</sup> Variables respuestas: Y<sub>1</sub> (Total AG n-6, g/100 g AGT) y Y<sub>2</sub> (Total de AG n-3, g/100g de AGT).

### **Purificación de los triacilglicéridos estructurados y análisis de los productos de la reacción**

La identificación por cromatografía en capa fina (TLC Silica gel 60 – Merck Millipore) de los triacilglicéridos estructurados y los ácidos grasos libres

después de la acidólisis enzimática demostró que los ácidos grasos se separaron efectivamente después del proceso de purificación empleado (Anexo 2).

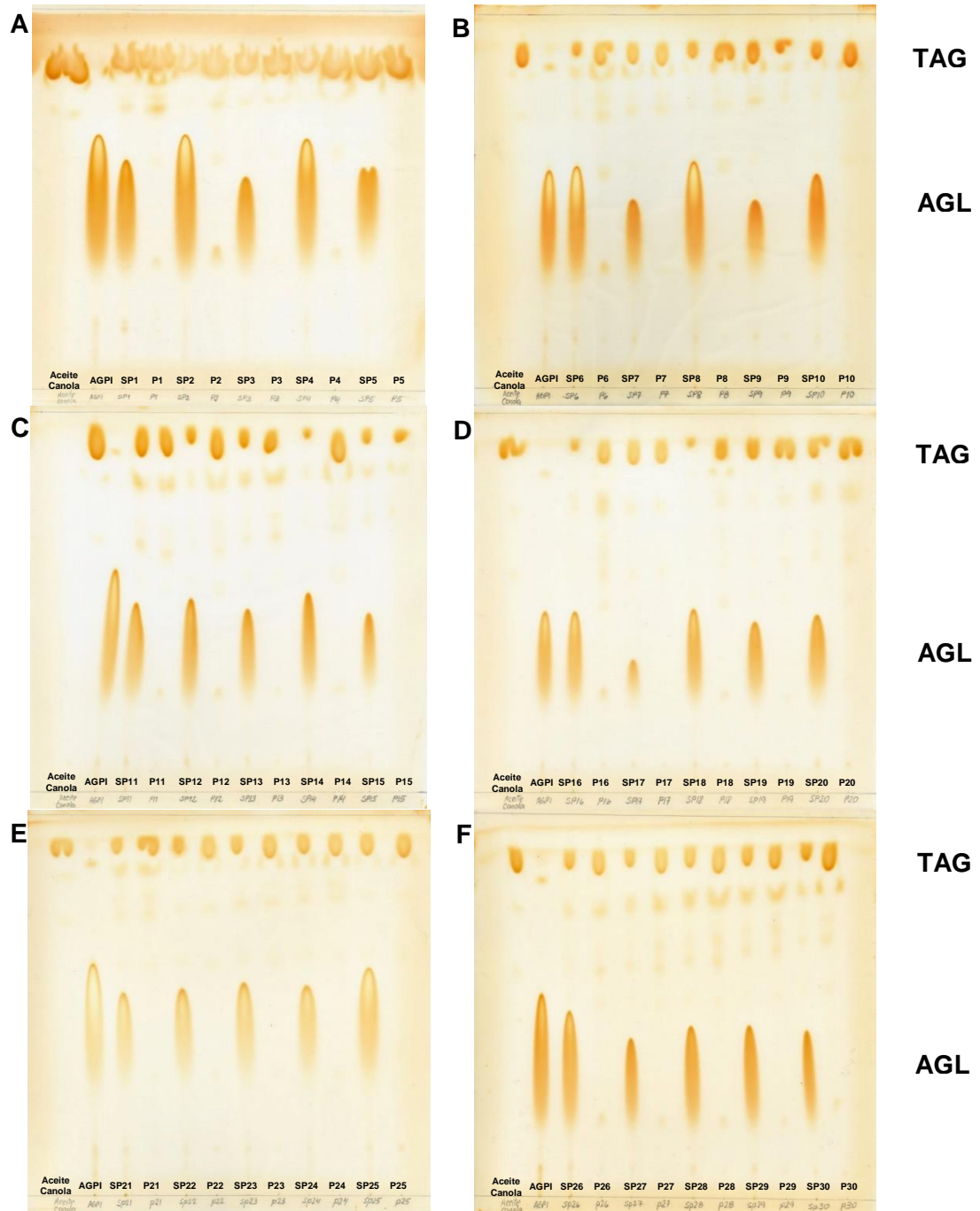
En la Figura 3 se muestran los TLC del aceite de canola y del concentrado AGPICL ambos considerados antes del proceso de acidólisis enzimática, así como las muestras sin purificar (SP) y purificadas (P) obtenidas después de la acidólisis enzimática en CO<sub>2</sub> supercrítico según el diseño. La fase móvil usada fue cloroformo/acetona/metanol (95:4,5:0,5 v/v/v).

En el carril 1 del análisis TLC de las Figura 3 se observa que el aceite de canola sólo contiene TAG a diferencia del concentrado de AGPICL en el carril 2 el cual presenta sólo AGL. Para los demás ensayos del diseño se observa para las muestras sin purificar la presencia tanto de TAG como de AGL a diferencia de las muestras purificadas que sólo evidencian TAG que corresponden a los triacilglicéridos estructurados.

### **Caracterización de los perfiles de ácidos grasos**

Se determinó el perfil de ácidos grasos para los 30 ensayos de acuerdo al punto 4.2.2.3. Los resultados fueron expresados en g/100 g AGT (Anexo 3).





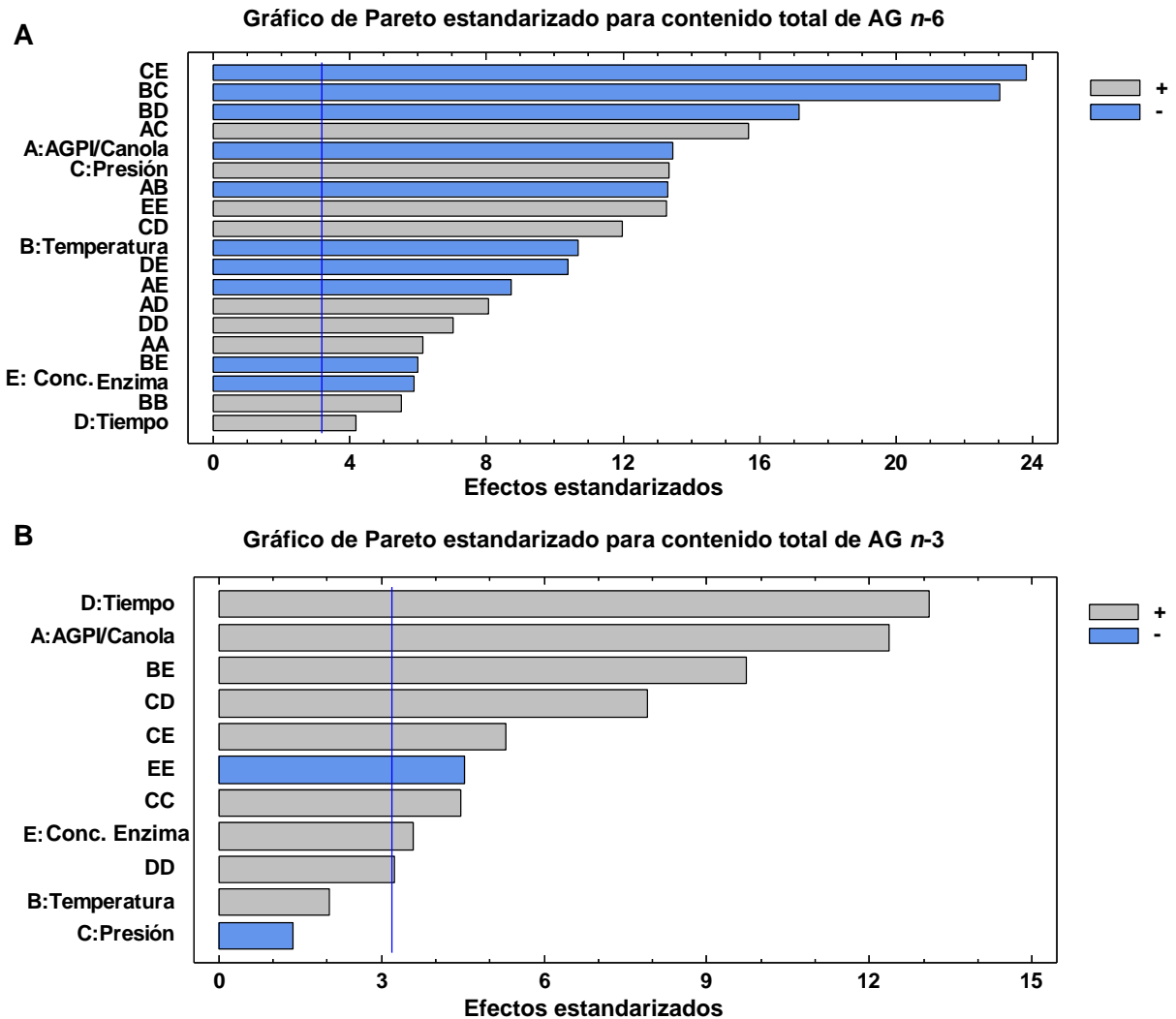
**Figura 3.** Análisis de Cromatografía en Capa Fina de aceite de canola y de concentrado AGPICL, considerados ambos antes del proceso de acidólisis enzimática, así como muestras sin purificar (SP) y purificadas (P) después del proceso de acidólisis enzimática: (A) muestra 1 a la 5, (B) muestras 6 a la 10, (C) muestra 11 a la 15 (D) muestra 16 a la 20, (E) muestra 21 a la 25, (F) muestra 26 a la 30. Fase móvil empleada: cloroformo/acetona/metanol (95:4,5:0,5, v/v/v).

## Carta Pareto

Las Figuras 4A y 4B muestran los gráficos de Pareto estandarizados para las diferentes variables dependientes (respuesta) como una función de las variables independientes del proceso de acidólisis enzimática de aceite de canola y concentrados AGPICL. De acuerdo a la Figura 4A, distintas variables independientes o combinaciones suyas afectaron significativamente ( $p < 0,05$ ) sobre el contenido total de AG *n*-6 ( $p < 0,05$ ). Entre ellas se pueden citar los términos lineales relación AGPICL/canola (A), temperatura (B), presión (C), tiempo (D) y concentración de enzima (E). También afectaron significativamente los términos cuadráticos relación AGPICL/canola (AA), temperatura (BB), tiempo (DD) concentración de enzima (EE). Finalmente, los siguientes términos correspondientes a interacciones entre variables independientes también afectaron de forma significativa: relación AGPICL/canola y temperatura (AB), presión (AC), tiempo (AD), concentración de enzima (AE), temperatura y presión (BC), tiempo (BD), concentración de enzima (BE), presión y tiempo (CD), concentración de enzima (CE) y la relación tiempo y concentración de enzima (DE).

En el caso del contenido total de AG *n*-3, los términos lineales relación AGPICL/canola (A), tiempo (D) y concentración de enzima (E), los términos cuadráticos presión (CC), tiempo (DD) y concentración de enzima (EE), así como las interacciones temperatura y concentración de enzima (BE), presión y tiempo (CD), y presión y concentración de enzima (CE) afectaron significativamente ( $p < 0,05$ ) (Figura 4B).

En la Figura 4 se observan que los factores que afectaron significativamente las variables respuesta, contenido total de AG *n*-6 y *n*-3 (g/100 g AGT), respectivamente, fueron el efecto estandarizado lineal, cuadrático y de la interacción de la variables respuestas en un orden decreciente de significancia (la línea vertical marca un  $p < 0,05$ ).



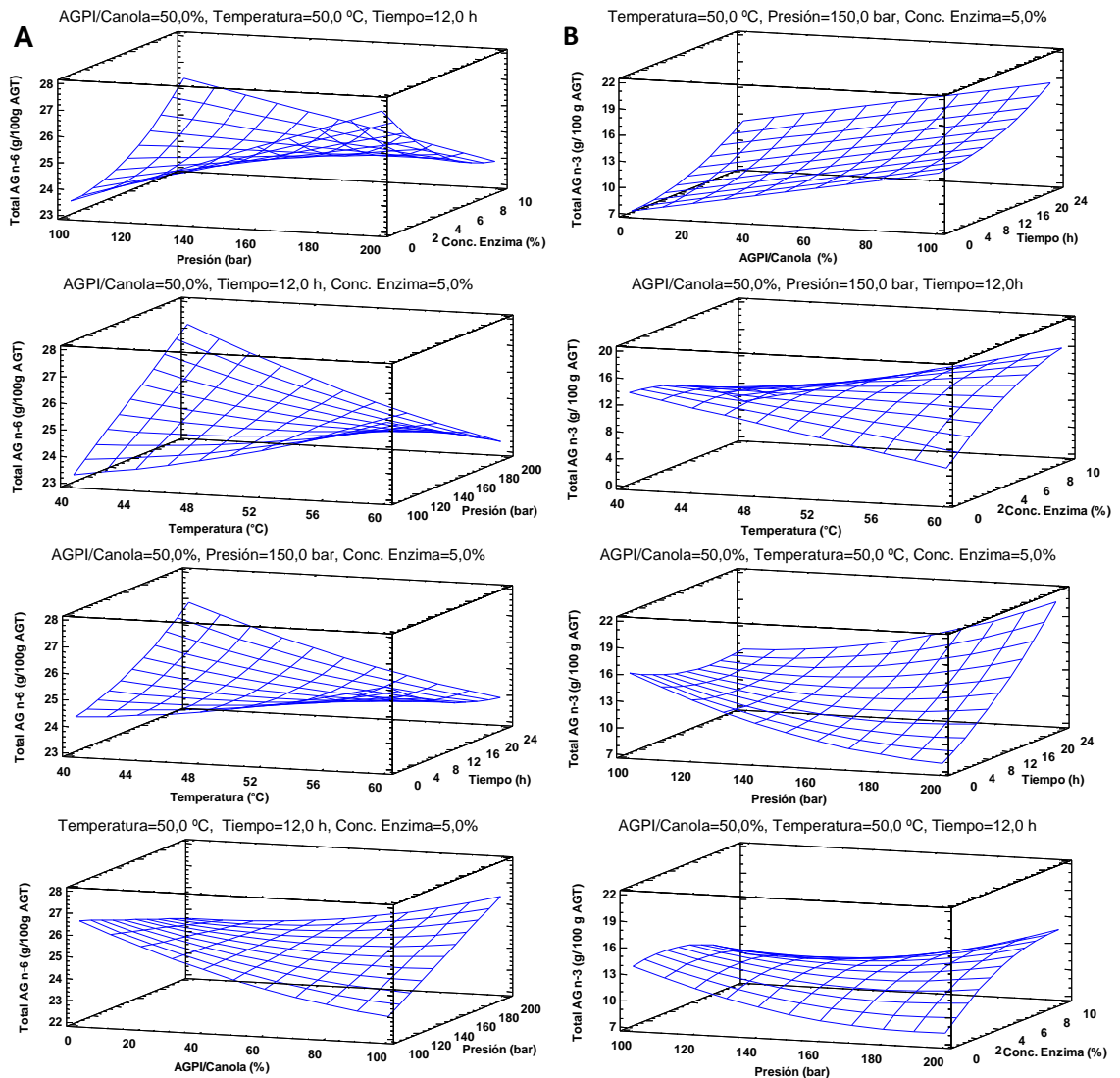
**Figura 4.** Gráficos de Pareto del efecto estandarizado lineal, cuadrático y de la interacción de las variables respuestas (A) Total AG *n*-6 y (B) Total AG *n*-3

### Superficie de respuesta

La superficie de respuesta permitió determinar cuáles fueron los valores de interés para obtener una respuesta deseada y de forma gráfica muestra la naturaleza de la superficie ajustada como un mínimo, máximo o punto silla. La relación entre las variables independientes y las variables dependientes (contenido total AG *n*-6 y *n*-3, expresado como g/100 g AGT) se observan en representaciones tridimensionales como las superficies de respuesta, en las

que las variables independientes relación AGPI/Canola (%) y temperatura (°C), presión (bar), tiempo (h) y concentración de enzima (%) se alternan en los ejes para observar cómo influyen sobre las variables dependientes: contenido total de AG *n*-6 y *n*-3.

La Figura 5 presenta las superficies de respuesta con la combinación de las variables que más influyen en el proceso.



**Figura 5.** Superficies de respuesta para los principales efectos en el contenido total de AG *n*-6 (g/100 g AGT) (A) y en el contenido total de AG *n*-3 (g/100 g AGT) (B) en el proceso de acidólisis enzimática en dióxido de carbono supercrítico.

El perfil de ácidos grasos del aceite de canola indica que el contenido de AGPICL  $n-3$  fue de 7,23 g/100 g AGT y el contenido de AG  $n-6$  fue de 25,24 g/100 g AGT (Tabla 7). Simultáneamente, el contenido de AG del concentrado AGPICL (en g/100 g AGT) contiene los valores 83,12 y 14,52 de AG  $n-3$  y AG  $n-6$ , respectivamente (Tabla 7). En tanto, la acidólisis enzimática del aceite de canola con el concentrado de AGPICL a partir de aceite crudo de salmón resultó en la incorporación de AG  $n-3$ , lo que condujo a un aumento en 20,14 (g/100 g AGT), obteniéndose una relación AG  $n-6/n-3$  de 1,16 (Tabla 10).

Los resultados obtenidos de la proporción de AG  $n-6/n-3$  de 1,16 que se utiliza para evaluar el equilibrio entre los ácidos grasos esenciales se encuentra dentro de la dosis de ingesta óptima recomendada en la dieta para la prevención de diversas enfermedades.

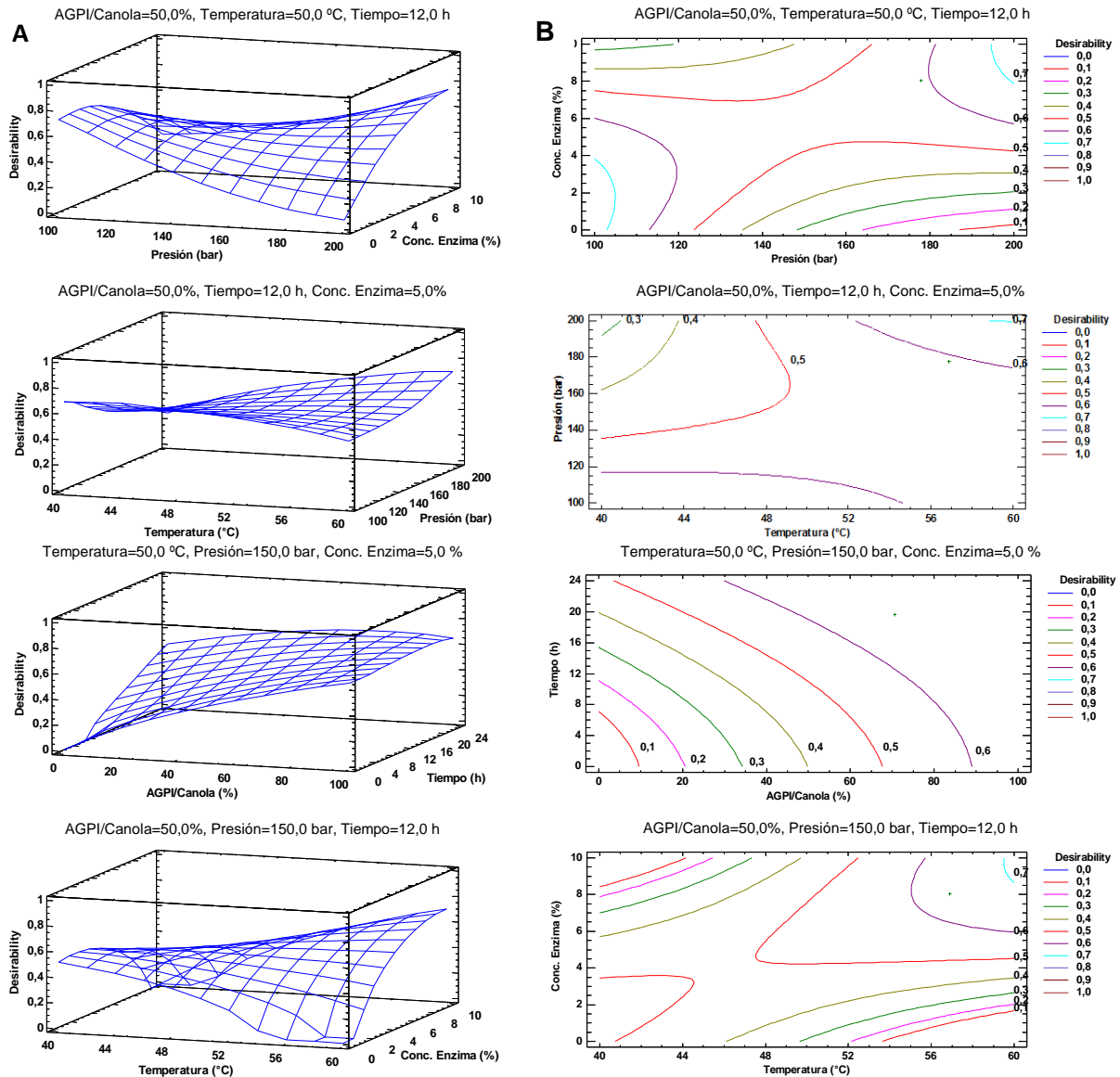
De acuerdo al National Institutes of Health (USA) para una ingesta adecuada en la dieta, sugirió que la proporción de AG  $n-6/AG n-3$  que se mantenga en el orden de 0,66/1 a 3/1 (Simopoulos, 2002; Ward y Sing, 2005).

Simopoulos (2002) concluyó que dependiendo de la enfermedad en consideración la dosis óptima o relación de AG  $n-6/n-3$  varía de 1/1 a 4/1.

De Loregeril *et al.* (1994) encontraron que en la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular, una proporción de 4/1 estaba asociada con una disminución del 70% en la mortalidad total.

Bartram *et al.* (1995) indicaron que una proporción de 2,5/1 reduciría la proliferación de células del recto en pacientes con cáncer colorrectal, mientras que una proporción de 4/1 con la misma cantidad de AGPI  $n-3$  no tuvo ningún efecto.

La máxima deseabilidad (1,00) considera un contenido mínimo del total de AG  $n-6$  y máximo total de AG  $n-3$  en el triacilglicérido estructurado. La Figura 6 muestra la combinación de niveles de factores que maximizan la función deseabilidad al minimizar el contenido AG  $n-6$  y maximizar el contenido de AG  $n-3$ .



**Figura 6.** Combinación de niveles de factores que maximizan la función deseabilidad al minimizar el contenido AG  $n-6$  y maximizar el contenido de AG  $n-3$ : (A) superficie de respuesta estimada; (B) superficie de contorno de respuesta estimada.

Investigaciones realizadas por Maillard *et al.* (2002) señalaron que la baja proporción de AG  $n-6/n-3$  en mujeres estaba asociada con una disminución en el riesgo de desarrollar cáncer de mama. Broughton *et al.* (1997) señalaron que una proporción de 2-3/1 suprimió la inflamación en pacientes con artritis reumatoide, y una relación de 5/1 tuvo un efecto beneficioso en pacientes con

asma, mientras que una proporción de 10/1 tuvo consecuencias adversas. Estos estudios indican que la relación óptima puede variar dependiendo de enfermedad considerada, pero en todos los casos una menor relación mostraba mejores resultados. Esto es consistente con el hecho de que las enfermedades crónicas son multigénicas y multifactoriales. En consecuencia, es muy posible que la dosis terapéutica de los AGPI *n*-3 dependerá del grado de severidad de la enfermedad que resulta de la predisposición genética asociada. Al menos siempre será más deseable una menor relación AG *n*-6/*n*-3 para reducir el riesgo de muchas de las enfermedades crónicas de alta prevalencia en la sociedad occidental (Simopoulos, 2002).

#### **5.4 Obtención de modelos matemáticos a partir de la metodología de superficie de respuesta que permitan predecir el efecto de las variables y minimizar la relación de ácidos grasos *n*-6/*n*-3 de los TAGs purificados**

Con los valores del total AG *n*-6 y total AG *n*-3 (g/100 g AGT) obtenidos a partir de los 30 ensayos realizados utilizando el diseño compuesto central  $2^{5-1}$  más estrella (Tabla 9) se construyeron los modelos polinómicos cuadráticos ajustados de las variables respuesta, total AG *n*-6 ( $Y_1$ ) y total AG *n*-3 ( $Y_2$ ).

Las ecuaciones de los modelos polinómicos cuadráticos ajustados de las variables respuestas  $Y_1$ : cantidad total de AG *n*-6 (g/100 g AGT) y  $Y_2$ : cantidad total de AG *n*-3 (g/100 g AGT) en términos de sus coeficientes para las variables independientes  $X_1$ : relación AGP/Canola (%),  $X_2$ : temperatura de reacción (°C),  $X_3$ : presión de reacción (bar),  $X_4$ : tiempo de reacción (h) y  $X_5$ : concentración de enzima respecto al sustrato (%) fueron:

$$Y_1 = -2,3064 + 0,0049 X_1 + 0,4308 X_2 + 0,1555 X_3 + 0,2357 X_4 + 1,3791 X_5 + 0,0002 X_1^2 + 0,0029 X_2^2 + 0,0026 X_4^2 + 0,0279 X_5^2 - 0,0023 X_1 X_2 + 0,0005 X_1 X_3 + 0,0012 X_1 X_4 - 0,0030 X_1 X_5 - 0,0032 X_2 X_3 - 0,0099 X_2 X_4 - 0,0083 X_2 X_5 + 0,0014 X_3 X_4 - 0,0066 X_3 X_5 - 0,0119 X_4 X_5$$

$$Y_2 = 61,7449 + 0,0619 X_1 - 0,4367 X_2 - 0,3336 X_3 - 0,9510 X_4 - 5,5106 X_5 + 0,0007 X_3^2 + 0,0083 X_4^2 - 0,0674 X_5^2 + 0,0955 X_2 X_5 + 0,0065 X_3 X_4 + 0,0104 X_3 X_5$$

La Tabla 9 presenta los modelos en términos de sus coeficientes de regresión para las variables independientes.

**Tabla 9.** Coeficientes de regresión de modelos polinómicos predictivos de segundo orden para las variables respuestas, total AG *n*-6 ( $Y_1$ ) y total AG *n*-3 ( $Y_2$ ).

<sup>a</sup> Parámetros del proceso	<sup>b</sup> Total AG <i>n</i> -6 ( $Y_1$ )		Total AG <i>n</i> -3 ( $Y_2$ )	
	Coefficiente	Valor- <i>p</i>	Coefficiente	Valor- <i>p</i>
<b>Constante</b>	-2,3064		61,7449	
<b>Lineal</b>				
A	0,0049	0,0009	0,0619	0,0011
B	0,4308	0,0018	-0,4367	0,1358
C	0,1555	0,0009	-0,3336	0,2622
D	0,2357	0,0251	-0,9510	0,0010
E	1,3791	0,0098	-5,5106	0,0370
<b>Cuadrático</b>				
AxA	0,0002	0,0086		
BxB	0,0029	0,0119		
CxC			0,0007	0,0209
DxD	0,0026	0,0059	0,0083	0,0479
ExE	0,0279	0,0009	-0,0674	0,0200
<b>Interacción</b>				
AxB	-0,0023	0,0009		
AxC	0,0005	0,0006		
AxD	0,0012	0,0040		
AxE	-0,0030	0,0032		
BxC	-0,0032	0,0002		
BxD	-0,0099	0,0004		
BxE	-0,0083	0,0094	0,0955	0,0023
CxD	0,0014	0,0012	0,0065	0,0042
CxE	-0,0066	0,0002	0,0104	0,0132
DxE	-0,0119	0,0019		
<b>Prueba de ajuste</b>		0,0057		0,0200
<sup>c</sup> R <sup>2</sup>	91,2753		69,8514	
R <sup>2</sup> ajustado	74,6982		51,4272	
SE	0,0689		0,4906	
MAE	0,1656		1,2132	
DW	1,6398		0,8631	

<sup>a</sup> Variables de proceso: A (AGPI/Canola, %), B (Temperatura, °C) C (Presión, bar), D (Tiempo, h), E (Concentración de enzima, %). <sup>b</sup> Variables respuestas:  $Y_1$  (Total AG *n*-6, g/100 g AGT) y  $Y_2$  (Total de AG *n*-3, g/100g de AGT).

<sup>c</sup> R<sup>2</sup> (coeficiente de determinación), SE (error estándar), MAE (error absoluto medio), DW (parámetros Durbin-

Watson). <sup>d</sup>  $p < 0,05$



La optimización de las variables de proceso en el presente estudio indicaron que una proporción de 86,46 para la relación de AGPICL/aceite de canola, una temperatura de reacción de 40,52 °C y una presión de reacción de 100 bar fue la combinación que minimizó el contenido total de AG *n*-6, para obtener un valor óptimo de 21,17 (g/100 g AGT). Mientras que, para maximizar el contenido total de AG *n*-3, la combinación de 56,35 (relación AGPICL/aceite de canola), 59,99 °C, 199,48 bar, 23,99 horas y 10% concentración de enzima llevó a un valor máximo óptimo de 27,86 (g/100 g AGT) (Tabla 10).

La optimización conjunta del contenido mínimo de AG *n*-6 y contenido máximo total, de AG *n*-3 expresadas en g/100 g AGT de tal manera que la relación AG *n*-6/*n*-3 sea mínima conllevó a un valor de 1,17 (Tabla 10). La combinación óptima de variables de proceso, que satisface el requisito anterior fueron: proporción de AGPICL/Canola de 70,60%, temperatura de reacción de 57,0 °C, presión de reacción de 178,0 bar, tiempo de reacción de 19,6 h y concentración de enzima de 8,0%.

Las variables del proceso que minimizaron el contenido AG *n*-6 y maximizaron el contenido de AG *n*-3 de triacilglicéridos estructurados correspondieron a una relación de AGPICL/Canola de 70,6%, temperatura de reacción de 57 °C, presión de reacción de, 178 bar, tiempo de reacción de, 19,6 h y concentración de enzima de 8,0%. En el análisis de validación, el contenido de AG *n*-6 y *n*-3 fue de 23,47 y 20,14 (g/100 g AGT), respectivamente logrando una relación de AG *n*-6/*n*-3 de 1,16, siendo éste valor similar al obtenido en la optimización conjunta (Tabla 10).

### **Análisis de validación**

La Tabla 10 presenta el análisis de validación, el cual incluye las variables óptimas de proceso, la optimización de respuesta múltiple de las variables respuesta que minimizan el valor total de AG *n*-6 y maximizan el valor de AG *n*-3.

**Tabla 10.** Análisis de validación. Variables óptimas del proceso y optimización de respuesta múltiple de las variables respuesta para optimizar la relación de AG  $n-6/n-3$ , en el proceso de acidólisis enzimática de aceite de canola y concentrado AGPI.

<b>Optimización de las variables respuestas</b>							
<b>Variables respuestas</b>	<b><sup>a</sup> Variables independientes</b>					<b>Punto estacionario</b>	<b><sup>b</sup> Valor óptimo</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>		
Total AG $n-6$	86,46	40,52	100,00	0,00	0,00	Mínimo	21,17
Total AG $n-3$	56,35	59,99	199,48	23,99	10,00	Máximo	27,86

<b>Optimización de respuesta múltiple de las variables respuestas</b>							
<b>Variables respuestas</b>	<b><sup>a</sup> Variables independientes</b>					<b>Punto estacionario</b>	<b>Valor predicho</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>		
Total AG $n-6$	70,59	56,87	177,78	19,63	8,04	Mínimo	23,22
Total AG $n-3$						Máximo	19,81
Deseabilidad máxima							1,00
Relación AG $n-6/n-3$							1,17

<b>Validación experimental de la optimización de respuesta múltiple</b>							
<b>Variables respuestas</b>	<b>Variables independientes</b>					<b>Punto estacionario</b>	<b><sup>c</sup> Valor experimental</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>		
Total AG $n-6$	70,60	57,00	178,00	19,60	8,00	Mínimo	23,47
Total AG $n-3$						Máximo	20,14
Relación AG $n-6/n-3$							1,16

<sup>a</sup> Variables de proceso: A (AGPI/Canola, %), B (Temperatura, °C) C (Presión, bar), D (Tiempo, h), E (Concentración de enzima, %).

<sup>b</sup> Expresado como g /100g total AGT.

<sup>c</sup> Los resultados se expresan como la media aritmética (n=2)

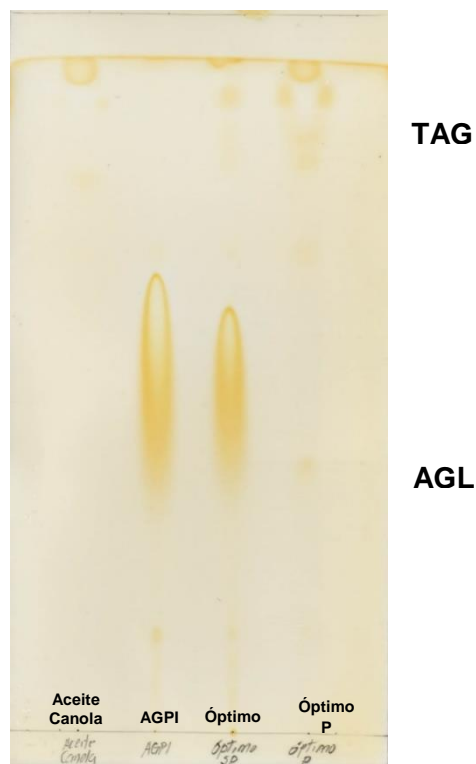
Sharma, Rastogi y Lokesh (2009) llevaron a cabo la producción de lípidos estructurados que contenían una proporción de AG *n*-3 y *n*-6 de 1/1 con la incorporación de AG *n*-3 (ácido  $\alpha$ -linolénico) de aceite de linaza en aceite de maní utilizando Lipozyme IM de *Rhizomucor miehei* catalizada por una reacción de acidólisis en hexano. Las condiciones óptimas para la obtención de lípidos estructurado fueron: concentración de enzima de 3,75% (w/w), temperatura de 37,5 °C, tiempo de incubación de 30,81 h y la relación concentrado AGL de aceite de linaza/aceite de maní 1,16 (w/w).

### **5.5 Caracterización de los perfiles de ácidos grasos de los triacilglicéridos estructurados óptimos y la relación de AG *n*-6/*n*-3.**

#### **Purificación de los triacilglicéridos estructurados y análisis de los productos de la reacción**

En la Figura 7 se muestran los análisis por TLC del aceite de canola, concentrado AGPICL y el triacilglicérido estructurado óptimo, sin purificar (SP) y purificado (P) después del proceso de acidólisis enzimática.

En el carril 1 del TLC de la Figura 7 se observa que el aceite de canola sólo contiene TAG a diferencia del concentrado de AGPICL en el carril 2, el cual presenta solo AGL. En los carriles 3 – 4 se observa que para la muestra sin purificar la presencia tanto de TAG como de AGL a diferencia de las muestra purificada que solo evidencian TAG que corresponden a los triacilglicéridos estructurados.



**Figura 7.** Análisis de Cromatografía en Capa Fina (TLC Silica gel 60 – Merck Millipore) del aceite de canola, del concentrado AGPI y del triacilglicérido estructurado óptimo, sin purificar (SP) y purificado (P) después del proceso de acidólisis enzimática. Fase móvil empleada: cloroformo/acetona/metanol (95:4,5:0,5 v/v/v).

### Composición de ácidos grasos

Las condiciones óptimas en la validación de los TAGs obtenidos del proceso de acidólisis enzimática de aceite de canola y concentrados AGPICKL correspondieron a una relación de AGPICKL/canola de 70,6%, temperatura de reacción de 57,0 °C, presión de reacción de 178 bar, tiempo de reacción de 19,6 h y concentración de enzima de 8,0% con una relación AG *n*-6/*n*-3 de 1,16.

La Tabla 11 presenta la composición del AG del aceite de canola, del concentrado AGPICKL y de los triacilglicéridos estructurados (TAGs) optimizados (expresados como g/100 g de ácido graso total).

**Tabla 11.** Composición de ácidos grasos (AG) del aceite de canola, concentrado AGPICL y triacilglicéridos estructurado (TAGs) optimizados (expresados como g/100 g de ácido graso total)

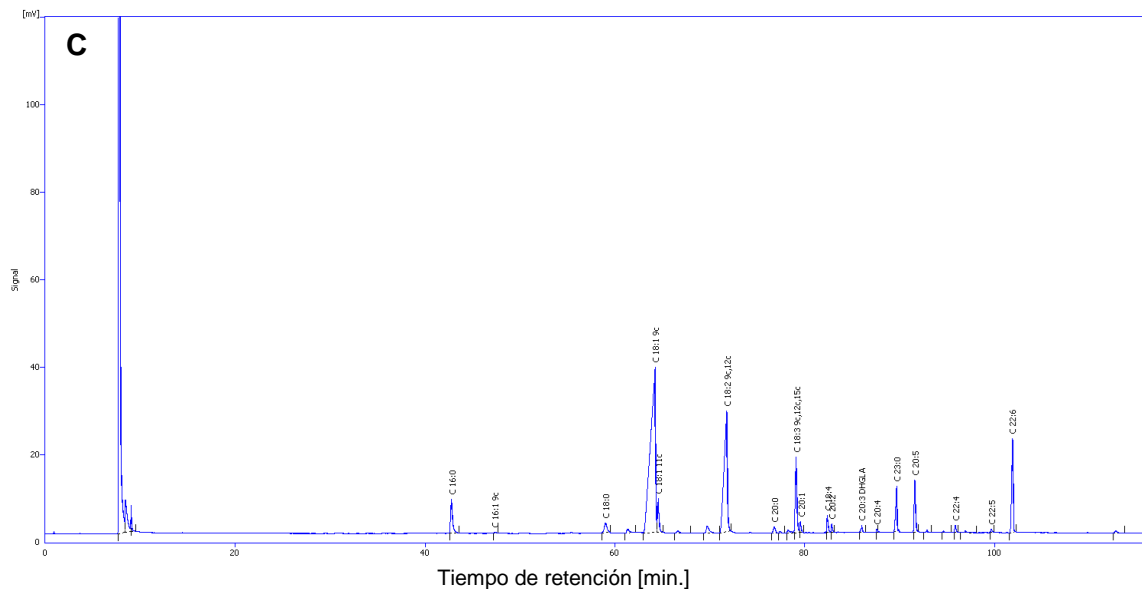
<sup>a</sup> No.	AG o grupo de AG		Aceite de Canola	Concentrado AGPICL	TAGs purif. óptimo
1	Mirístico	C 14:0	0,04 ± 0,01	0,42 ± 0,07	N.D.
2	Palmítico	C 16:0	4,51 ± 0,37	N.D.	3,66
3	Palmitoleico	C 16:1 9c	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,05	0,13
4	Heptadecanoico	C 17:0	N.D.	0,34 ± 0,06	N.D.
5	Heptadecenoico	C 17:1 10c	N.D.	0,79 ± 0,11	N.D.
6	Esteárico	C 18:0	1,91 ± 0,27	N.D.	1,69
7	Oleico	C 18:1 9c	56,27 ± 0,58	0,55 ± 0,04	46,51
8	<i>Cis</i> -Vaccénico	C 18:1 11c	2,57 ± 0,95	N.D.	2,80
9	Linoleico	C 18:2 9c,12c; n-6	25,24 ± 0,24	4,25 ± 0,33	21,73
10	$\gamma$ -linolénico	C 18:3 6c,9c,12c; n-6	N.D.	1,62 ± 0,16	N.D.
11	Eicosanoico	C 20:0	0,75 ± 0,05	N.D.	0,73
12	$\alpha$ -linolénico	C 18:3 9c,12c,15c; n-3	7,23 ± 0,07	1,45 ± 0,16	6,39
13	11-Eicosenoico	C 20:1 11c	0,96 ± 0,03	N.D.	0,87
14	Octadecatetraenoico	C 18:4; n-3	N.D.	7,49 ± 0,58	1,30
15	Eicosadienoico	C 20:2 11c,14c; n-6	N.D.	3,93 ± 0,28	0,58
16	Dihomo $\gamma$ -linolénico	C 20:3 8c,11c,14c; n-6	N.D.	0,74 ± 0,03	0,46
17	Behénico	C 22:0	0,37 ± 0,04	N.D.	N.D.
18	Araquidónico	C 20:4 5c, 8c, 11c, 14c;n-6	N.D.	1,11 ± 0,15	0,20
19	Eicosapentaenoico	C 20:5 5c,8c,11c,14c,17c; n-3	N.D.	19,32 ± 0,47	3,75
20	Docosatetraenoico	C 22:4 7c,10c,13c,16c; n-6	N.D.	2,85 ± 0,04	0,50
21	Docosapentaenoico	C 22:5 7c,10c,13c,16c,19c; n-3	N.D.	1,63 ± 0,07	0,24
22	Docosahexaenoico	C 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c; n-3	N.D.	53,23 ± 2,29	8,46
<b>Total AG saturados</b>			<b>7,58</b>	<b>0,76</b>	<b>6,08</b>
<b>Total AG monoinsaturados</b>			<b>59,94</b>	<b>2,16</b>	<b>50,31</b>
<b>Total AG poliinsaturados</b>			<b>32,47</b>	<b>97,62</b>	<b>43,61</b>
<b>Total AG n-3</b>			<b>7,23</b>	<b>83,12</b>	<b>20,14</b>
<b>Total AG n-6</b>			<b>25,24</b>	<b>14,52</b>	<b>23,47</b>
<b>EPA+DHA</b>			<b>0,00</b>	<b>72,56</b>	<b>12,21</b>
<b>Relación AG n-6/n-3</b>			<b>3,49</b>	<b>0,17</b>	<b>1,16</b>

<sup>a</sup> Número de ácido graso o peak cromatográfico

<sup>b</sup> N.D. No detectado

Los resultados se expresan como la media aritmética ± desviación estándar (n=2)





**Figura 8.** Cromatogramas de los ésteres metílicos de ácidos grasos, correspondientes a aceite de canola (*Brassica napus* L.) (A), al concentrado AGPICL (B) y al TGAs óptimo (C).

La Tabla 11 y Figura 8 muestra que el aceite de canola presenta una relación AG  $n-6/n-3$  de 3,49. Una vez realizada la acidólisis enzimática en dióxido de carbono supercrítico de aceite de canola y concentrado AGPICL, la relación de AG  $n-6/n-3$  disminuyó en 1,16. Mientras que otros aceites, como el aceite de girasol y aceite de soja presentan una relación de AG  $n-6/n-3$  de 632 y 7,05, respectivamente (INNOVA CHILE, 2009).

Gómez, Bermejo y Loria (2011) señalaron que la modificación de los hábitos alimentarios ha llevado a un cambio en el consumo de ácidos grasos, con un aumento de los AG  $n-6$  y una marcada reducción en el consumo de AG  $n-3$ . Esto a su vez ha dado lugar a un desequilibrio en la relación AG  $n-6/n-3$ , muy diferente de la proporción original 1/1 que constituye el óptimo o recomendado. La proporción dietética  $n-6/n-3$  afecta la inflamación y la expresión de los genes, y en consecuencia influye en el desarrollo de enfermedades crónicas (Simopoulos, 2006). Harris, Assaad y Poston (2006) señalaron que una consecuencia del desequilibrio dietético entre los ácidos

grasos esenciales  $n-6$  y  $n-3$  es una proporción alta de ácidos grasos  $n-6$  a ácidos grasos  $n-3$  en las membranas de las células.

De acuerdo a Cordain, Eaton y Sebastian (2005), Calder (2006), Hotamisligil, (2006), Kornman (2006) señalan que un desequilibrio en la proporción  $n-6/n-3$  en los tejidos y la sangre puede tener efectos adversos, incluyendo la sobreproducción de eicosanoides pro-inflamatorios, muchos de los cuales se derivan del ácido araquidónico, el cual es un ácido graso  $n-6$ . Por su parte, los eicosanoides en exceso estimulan la liberación de citoquinas inflamatorias y proteínas de fase aguda. El resultado final es una inflamación crónica de bajo grado que contribuye a problemas de la salud como la arterioesclerosis, la enfermedad de Alzheimer, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, el síndrome metabólico, la obesidad, la osteoporosis, la diabetes tipo 2 y la periodontitis

La relación AG  $n-6/n-3$  para el TAGs purificados optimizados de aceite canola (1,16) obtenido en este estudio se encuentra dentro de lo que sugiere la Organización Mundial Salud (OMS) que recomienda una relación de AG  $n-6/n-3$  no superior a 7/1. El Instituto Nacional de Salud (EE.UU) establece que se mantenga en el orden entre 0,66/1 a 3/1. La relación aconsejada por Japón está en el orden de 4/1 a 2/1.

Además, se puede observar (Tabla 11) que el aceite de canola no presenta en su composición ácidos grasos EPA y/o DHA. El concentrado AGPICL presenta un contenido de EPA + DHA de 72,56 (g/100 g AGT). Luego de la acidólisis enzimática en dióxido de carbono supercrítico de aceite de canola y concentrado AGPICL, la incorporación de EPA y DHA en el TAGs purificado presentó un contenido de EPA + DHA de 12,21 (g/100 g AGT).

Los TAGs purificados contienen 12,21 g/100 g AGT de EPA + DHA, lo que significa que contiene 12000 mg de EPA + DHA por cada 100 g de aceite o también lo podemos interpretar como 120 mg por cada gramo de aceite. Para



cubrir los requerimientos según FAO (2012) de EPA + DHA para los varones y mujeres adultas se necesitarían 2 g del TAGs para cubrir los 250 mg que recomienda. En el caso de mujeres embarazadas o lactantes 2,5 g del TAGs cubriría los 300 mg que recomienda. Para niños de 2 a 4 años 0,8 a 1,3 g del TAGs cubriría los 100 – 150 mg/día, para niños de 4 a 6 años 1,3 g a 1,7 g del TAGs cubriría los 150 – 200 mg/día y para niños de 6 a 10 años 1,3 g a 2,5 g del TAGs cubriría los 200 – 200 mg/día.

La ventaja de obtener TAGs frente a triacilglicéridos (TAG), ésteres etílicos (EE) y ácidos grasos libres (AGL), es que los TAGs presentan mayor biodisponibilidad, entendiéndose por biodisponibilidad como la eficacia con que el organismo humano, o animal, puede utilizar nutricionalmente los AG *n*-3 de los aceites marinos y obtener un beneficio a partir de ellos (Valenzuela y Sanhueza, 2009). Dyerberg *et al.* (2010) compararon tres preparaciones concentradas: TAGs, EE y AGL. La biodisponibilidad de EPA + DHA de TAGs fue superior (124%) en comparación con el aceite de pescado natural (TAG), mientras que la biodisponibilidad de los EE fue inferior (73%). La biodisponibilidad de AGL (91%) no difirió de manera significativa y presentaron una biodisponibilidad media en comparación con los TAG naturales del aceite de pescado. Neubronner *et al.* (2011) realizaron una suplementación de seis meses de dosis idénticas de EPA + DHA dando lugar a un aumento más rápido y más alto en el índice de *n*-3 cuando se consume como TAGs que cuando se consume en forma de EE.

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Los parámetros de acidez libre, índice de peróxidos, valor de *p*-anisidina y valor TOTOX realizados sobre el aceite crudo de salmón comercial y al aceite de canola presentaron valores dentro de los rangos establecidos por el RSA (2014), IFOS (2009) y CRN (2009).

Se lograron obtener concentrados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL), a partir de aceite crudo de salmón. Los AGPICL representaron un 82,81% de los ácidos grasos totales del concentrado. El contenido de EPA (C 20:5 *n*-3) y DHA (C 22:6 *n*-3) fue de 19,32 y 53,23 g/100 g AGT, respectivamente. Estos resultados demuestran que el EPA tiene más tendencia a formar aductos de urea que el DHA bajo las condiciones de trabajo empleadas.

La optimización de las variables de proceso en el presente estudio indicaron que una proporción de 86,46 para la relación de AGPICL/aceite de canola, una temperatura de 40,52 °C y una presión de 100 bar fue la combinación que minimizó el contenido total de AG *n*-6, para obtener un valor óptimo de 21,17 (g/100 g AGT). Simultáneamente, para maximizar el contenido total de AG *n*-3, la combinación de 56,35 (relación AGPICL/aceite de canola), 59,99 °C, 199,48 bar, 23,99 horas y 10% de enzima) llevó a un valor máximo óptimo de 27,86 (g/100 g AGT).

Se logró obtener un triacilglicérido estructurado a partir de aceite de canola (*Brassica napus* L.) y concentrado AGPICL obtenido de aceite crudo de salmón que mediante una combinación de las variables del proceso de acidólisis enzimática: relación concentrado AGPICL/aceite de canola, temperatura de reacción, presión de reacción, tiempo de reacción y concentración de enzima respecto al sustrato, minimizó la relación de ácidos grasos *n*-6/*n*-3 del triacilglicérido estructurado, utilizando lipasa B inespecífica

de *Candida antarctica* inmovilizada bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico.

Las variables del proceso que minimizaron el contenido de AG *n*-6 y maximizaron el contenido de AG *n*-3 de triacilglicéridos estructurados correspondieron a una relación de AGPICL/Canola de 70,6%, temperatura de 57 °C, presión de 178 bar, tiempo de 19,6 h y porcentaje de enzima de 8,0%. El TAGs óptimo en comparación con el aceite de canola presentó una disminución en la relación de AG *n*-6/*n*-3 de 1,16, en tanto los AGS disminuyeron en 6,08 g/100 g AGT y el EPA y DHA se incorporó desde 0% en el aceite de canola a un 12,21% en el TAGs purificado.

## CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- ACKMAN, R. 1989. Fatty acids. En: Ackman R (Ed.). Marine biogenic lipids, fats and oils. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Vol. 1, pp. 103-137.
- ACKMAN, R. G., RATNAYAKE, W.M.N., Y OLSON, B. 1988. The basic fatty acids composition of atlantic fish oils: Potencial similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation. J. Am. Oil Chem. Soc., 65:136-138.
- AGOSTONI, C., TROJAN, S., BELLU, R., RIVA, E., BRUZZESE, M.G., GIOVANNINI, M. 1997. Developmental quotient at 24 months and fatty acid composition of diet in early infancy: follow up study. Arch Dis Chil; 76: 421-424.
- ALBERT, C.M., HENNEKENS, C. H., O'DONNELL, C. J. AJANI, U. A., CAREY, V. J., WILLET, W. C., RUSKIN, J. N. Y MANSON, J. E. 1998. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. JAMA; 279: 23-28.
- ALIM, M., LEE, J., AKOH, C., CHOI, M., JEON, M., SHIN, J. Y LEE, K. 2008. Enzymatic transesterification of fractionated rice bran oil with conjugated linoleic acid: Optimization by response surface methodology. LWT-Food Science and Technology 41:764-770.
- AOCS. 1993. Official Methods and Recommended Practices of American Oil Chemists' Society. 4th Ed. AOCS Press, Champaign: Ca 5a-40:1, Cd 8b-90: 1 – 2, Cd 18-19: 1 – 2.
- AOCS. 2009. Determination of cis-, trans-, saturated, mono-unsaturated, and polyunsaturated fatty acids in extracted fats by capillary GLC. AOCS Official Method Ce 1j-7. Sampling and analysis of commercial fats and oils.
- BARTRAM, H.P., GOSTNER, A., REDDY, B.S., RAO, C.V., SCHEPPACH, W., DUSAL, G., RICHTER, A., RICHTER, F., KASPER, H. 1995. Missing anti-proliferative effect of fish oil on rectal epithelium in healthy volunteers consuming a high-fat diet: potential role of the n-3:n-6 fatty acid ratio. Eur J Cancer Prev; 4:231-7.
- BENDSEN, N.T., CHABANOVA, E., THOMSEN, H.S., LARSEN, T.M., NEWMAN, J.W., STENDER, S., DYERBERG, J., HAUGAARD, S.B., AUSTRUP, A. 2011. Effect of trans fatty acid intake on abdominal and liver fat deposition and blood lipids: a randomized trial in overweight postmenopausal women. Nutrition and Diabetes 1:1-11.
- BRACCO, U. 1994. Effect of triglyceride structure on fat absorption. Am. J. Clin. Nutr., 60, 1028-1009.
- BRESLOW, J. 2006. N-3 fatty acids and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr; 83: 1477-1482.
- BROUGHTON, K.S., JOHNSON, C.S., PACE, B.K., LIEBMAN, M., KLEPPINGER, K.M. 1997. Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. Am J Clin Nutr; 65: 1011-7.

- BURR, G.O., BURR, M.M. 1930. On the nature and role of fatty acids essential in nutrition. *J Biol Chem* ; 86:587– 621.
- CALDER, C.C. 2006. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*; 83: 1505-1519.
- CAMP, J., HUYGHEBAERT, A., Y GOEMAN, P. 1998. Chapter 2: Enzymatic synthesis of structured modified fats. En: Christophe, A. *Structural modified food fats: synthesis, biochemistry, and use*. USA. AOCS Press. pp 20-45.
- CANOLA COUNCIL OF CANADA (accessed May 2013) Canola oil nutritional properties. [en línea] <[http://www.canolacouncil.org/health\\_nutritional.aspx](http://www.canolacouncil.org/health_nutritional.aspx)> [consulta: Mayo 2013].
- CARVALHO, I.S., MIRANDA, I., PEREIRA, H. 2006. Evaluation of oil composition of some crops suitable for human nutrition, *Ind. Crop. Prod.* 24 75–78.
- CHAPKIN, R.S. 2000. Reappraisal of the essential fatty acids. In: Chow CK (ed) *Fatty acids in foods and their health implications*. Marcel Dekker, New York, pp 557-568.
- CRN (COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION): [Consulta en línea] <<http://www.crnusa.org/>> [Junio 2014].
- DE LOREGERIL, M., RENAULD, S., MAMELLE, N., SALEN, P., MARTIN, J.L., MONJAUD, I., GUIDOLLET, J., TOUBOUL, P., DELAYE, J. 1994. Mediterranean alphalinolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*; 343:1454-9.
- DUMONT, T., BARTH, D., CORBIER, C., BRANLANT, G., PERRUT, M. 1991. Enzymatic reaction kinetic: comparison in inorganic solvent and in supercritical carbon dioxide. *Biotechnology and bioengineering* 39: 329-333.
- DYERBERG, J., MADSEN, P., MØLLER, J.M., AARDESTRUP, I., SCHMIDT, E.B. 2010. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 83: 137-141.
- EATON, S.B., EATON III SB, SINCLAIR, A.J., CORDAIN, L., MANN, N.J. Dietary intake of long-chain polyunsaturated fatty acids during the Paleolithic. In: Simopoulos AP, editor. *The return of  $\omega$ 3 fatty acids into the food supply*. I. Land-based animal food products and their health effects. *World Rev Nutr Diet*, vol. 83. Basel: Karger; 1998. p. 12–23.
- FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA). 2012. *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: Consulta de Experto*. Estudio FAO alimentación y nutrición 91. Edición española. Granada, España. Publicado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT).
- FAO (ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA). 2008. *Dietary fats and oils in human nutrition; a joint FAO/WHO report*. FAO Food and Nutrition, FAO. Rome. SSN 1014-2916. FAO ISBN 978-92-5-3067336.

- FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION): [Consulta en línea] < <http://www.fda.gov/>> [Junio 2013].
- FERRARO, V., CRUZ, I., FERREIRA, R., MALCATA, X., PINTADO, M., CASTRO, P. 2010. Valorisation of natural extracts from source focused on marine by-products: A review. *Food Research International* 43: 2221-2233.
- FLAGELLA, Z., ROTUNNO, T., DI CATERINA, R., DE SIMONE, G., DE CARO, A. 2000. Effect of supplementary irrigation on seed yield and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown in a sub-arid environment, in: *Proceedings of XV International Sunflower Conference, Toulouse I*, pp. C139–C144.
- GHAZANI, S. M., MARANGONI, A. G. 2013. Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90: 923 – 932.
- GORDON, M.H., MILLER, L.A.D. 1997. Development of steryl ester analysis for the detection of admixtures of vegetables oils. *J Am Oil Chem Soc* 74:505 – 510.
- GUNNLAUGSDOTTIR, H Y SIVIK, B. 1995. Lipase-catalized alcoholysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil chem. Soc.*, 72, 399-405.
- HAAG, M. 2003. Essential fatty acids and the brain. *Can J Psychiatry*; 48: 195-203.
- HAGGSMA, N., VAN GENT, C. M., LUTEN, J. B., DE JONG, R. W., VAN DOORN, E. 1982. Preparation of an  $\omega$ -3 fatty acid concentrate from cod liver oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59(3): 117 – 118.
- HARRIS, W. S., POTTALA, J. V., SANDS, S. A., Jones, P. G. 2007. Comparison of the effects of fish and fish-oil capsules on the n-3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids. *Am J Clin Nutr.* 86:1621–1625.
- HAYES, D. 2004. Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products. *Review. JAOCS*, 81 (12): 1077 – 1103.
- HAYES, D.G., BENGTSSON, Y.C., VAN ALSTINE, J.M. Y SETTERWALL 1988. Urea complexation for the rapid, ecologically and responsible fraction of FA from seed oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75:1403-1409.
- HERNANDEZ, E., HOSOKAWA, M. 2011. *Omega-3. Applications in functional foods.* AOCS Press, Urbana IL61802, Illinois.
- HITA, E., ROBLES, A., CAMACHO, B., RAMÍREZ, A., ESTEBAN, L., JIMÉNEZ, M. J., MUÑO, M. M., GONZÁLES, P. A. Y MOLINA, E. 2007. Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. *Process Biochemistry* 42: 415-422.
- IFOS (INTERNATIONAL FISH OIL STANDARDS): [Consulta en línea] < <http://www.nutrasource.ca/ifos/>> [Junio 2014].
- INNOVA CHILE. 2009. Aprovechamiento de un subproducto de la industria acuícola: Desarrollo de una empresa productora de aceite de salmón modificado para aumentar sustancialmente el aporte nutricional de ácidos grasos Omega 3 de cadena larga en Alimentos. [en línea] <

- [http://repositoriodigital.corfo.cl/bitstream/handle/11373/3179/05LE1-4778\\_IF.pdf?sequence=5](http://repositoriodigital.corfo.cl/bitstream/handle/11373/3179/05LE1-4778_IF.pdf?sequence=5) [Consulta: 04 marzo 2015].
- IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). 1987. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Standard method 2.301. Preparation of fatty acid methyl ester, in 7<sup>th</sup> 1987. Oxford, Blackwell.
- IVERSON, J. L., Y WEIK, R. W. 1967. Correlation of fatty acid structure with preferential order of urea complex formation. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists'*, 50, 1111 – 118.
- JIAO, J., Y ZHANG, Y. 2013. Transgenic biosynthesis of polyunsaturated fatty acids: A sustainable biochemical engineering approach for making essential fatty acids in plants and animals. *Chemical Reviews*, DOI: 10.1021/cr300007p.
- JIMÉNEZ, M. J., ESTEBAN, L., ROBLES, A, HITA, E., GONZÁLES, P. A., MUÑOIO, M. M., MOLINA, E. 2010. Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at position 2 as intermediates for the synthesis of human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis. *Process Biochemistry*, 45: 407-414.
- JU, Y.H., HUANG, F.C., Y FANG, C.H. 1998. The incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into acylglycerols of borage oil via lipase-catalized reaction. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75:961-965.
- KENNEDY, J. 1991. Structured lipids: fats for the future. *Food Technol.*, 45, 76-83.
- KRIS-ETHERTON, P., GRIEGER, J., ETHERTON, T. 2009. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, LeukotEssent Fatty Acids*, 81, 2-3, 99-104.
- KUBOW, S. 1996. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structurespecific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Nut. Biochem.* 7, 530-541.
- LIU, S., ZHANG, C., HONG, P., JI, H. 2006. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 73: 203 – 209.
- LIU, S., ZHANG, C., HONG, P., Y JI, H. 2007. Lipase-catalysed acylglycerol synthesis of glycerol and n-3 PUFA from tuna oil: Optimisation of process parameters. *Food Chemistry*, 103, 1009-1015.
- LÓPEZ GARCÍA, H., RUIZ, M. Y CABRERA, C. 2010. Capítulo 10: Grasas y aceites. En: Gil H., A. *Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos.* Tomo II. 2a Edición. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana. pp 249-280.
- LÓPEZ-HUERTA, E. 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Review pharmacological research* 61: 200-2007.
- MAILLARD, V., BOUGNOUX, P., FERRARI, P., JOURDAN, M.L., PINAULT, M., LAVILLONNIEREE F.F., BODY, G., LE FLOCH, O., CHAJES, V. 2002. N-3 and n-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in tours, France. *Int J Cancer*; 98:78-83.

- MASSON, L. 1994. Criterio de calidad para materias grasas utilizadas frecuentemente en la nutrición animal y de peces. [en línea] <<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/ab482s10.htm>> [consulta: 08 junio 2015].
- MASSON, L. 2007. Importancia nutricional de las grasas y aceites. Diplomado en tecnología aplicada en materias grasas y aceite. [Diapositivas] Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- MASSON, L. Y MELLA, M. 1985. Materias grasas de consumo habitual y potencial en Chile: Composición en ácidos grasos. 1ª ed, Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 30 p.
- MÉNDEZ, C., MASSON, L. Y JIMÉNEZ, P. 2010. Estabilización de aceite de pescado por medio de antioxidantes naturales. *A&G*, 30(3): 270 – 278.
- MYERS, R.H. Y MONTGOMERY, D.C. 1995. Response surface methodology. 1a ed. USA, John Wiley & Sons Inc. 15p.
- NEUBRONNER, J., SCHUCHARDT, J.P., KRESSEL, G., MERKEL, M., VON, SCHACKY C., HAHN, A. 2011. Enhanced increase of omega-3 index in response to long-term n-3 fatty acid supplementation from triacylglycerides versus ethyl esters. *European Journal of Clinical Nutrition* 65, 247-254.
- ODEPA (OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS. MINISTERIO DE AGRICULTURA). 2014. Gobierno de Chile. [en línea] <<http://www.odepa.gob.cl>> [consulta: Mayo 2014].
- OSBORN, H. T., Y AKOH, C. C. 2002. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 45, 110-120.
- PANDO, M. E., BRAVO, B., BERRIOS, M., GALDAMES, A., ROJAS, C., ROMERO, N., CAMILO, C., ENCINA, C., RIVERA, M. RODRIGUEZ, A. Y AUBOURG, S. 2014. Concentrating n-3 fatty acids from crude and refined commercial salmon oil. *Czech J. Food Sci*, 32(2): 169 – 176.
- PROCHILE. 2012. Estudio de Mercado alimentos naturales saludables en EE:UU. [en línea] <[http://www.prochile.gob.cl/wp-content/blogs.dir/1/files\\_mf/documento\\_01\\_18\\_13151654.pdf](http://www.prochile.gob.cl/wp-content/blogs.dir/1/files_mf/documento_01_18_13151654.pdf)> [consulta: 08 junio 2015].
- RATNAYAKE, W. M. N., OLSSON, B., MATTHEWS, D., Y ACKMAN, R. G. 1988. Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea complexation. *Fat Science and Technology*, 90, 381 – 386.
- REGLAMENTO SANITARIO DE ALIMENTOS. 2014. Decreto N° 977/96 (D.OF. 13.05.97) última versión: 06.05.08. Ministerio de Salud. República de Chile.
- ROBLES, A., ESTEBAN, L., GIMÉNEZ, A., CAMACHO, B., IBAÑEZ, M. J., MOLINA, E. 1999. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *Journal of Biotechnology*, 70: 379 – 391.



- ROBLES, A., JIMÉNEZ, M. J., ESTEBAN, L., GONZÁLES, P. A., MARTÍN, L., RODRÍGUEZ, A., MOLINA, E. 2011. Enzymatic production of human milk fat substitutes containing palmitic and docosahexaenoic acids at sn-2 position and oleic acid at sn-1,3 positions. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 1986-1992.
- SALEM, N., LITMAN, B., KIM, H.Y., GAWRISH, K. 2001. Mechanism of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 2001; 36: 945-959.
- SANDERS, T.A.B. 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(Suppl):S176-8.
- SHAHIDI, F. Y HAMAN, F. 2006. Improving life and health with structured lipids. *Inform* 17: 178-180.
- SHAHIDI, F. Y KIM, S. 2002. Chapter 1: Marine lipids as affected by processing and their quality preservation by Natural Antioxidants. En: Lee, T. y Ho, Ch. *Bioactive Compounds in food. effects of processing and storage. ACS Symposium series*; 816; pp 1-14.
- SIMOPOULOS, A.P. 1998. Overview of evolutionary aspects of w3 fatty acids in the diet. In: Simopoulos, A.P., editor. *The return of w3 fatty acids into the food supply. I. land-based animal food products and their health effects. World Rev Nutr Diet*, vol. 83. Basel: Karger, 1998. P. 1-11.
- Sociedad Española de nutracéutica medica. 2015. [en línea] <<http://www.nutraceuticamedica.org/definicion.htm>> [consulta: Junio 2015].
- STROCCHI, A., Y BONAGA, G. 1975. Correlation between urea inclusion compounds and conformational structure of unsaturated C-18 fatty acid methyl esters. *Chemical Physical Lipids*, 15, 87 – 94.
- SUGANO, M., HIRAHARA, F. 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Japan. *Am J Clin Nutr*; 71 (Suppl): 189S-96S.
- ULRICH, H., MCCARTHY, S., KATZ, D. Y KVETAN, V. 1996. Parenteral use of medium-chain triglycerides: A Reappraisal. *J. Nutrition*, 12, 231-238.
- USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE) Oilseeds: World Markets and Trade. (2014). [en línea] <<http://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>> [consulta: Mayo 2014].
- VALENZUELA, A. 2009. Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid for the proper development of the brain and visual function. *Grasas y Aceites*; 60: 203-212.
- VALENZUELA, A., NIETO, S. 2001. El ácido docosahexaenoico en el desarrollo fetal y en la nutrición infantil. *Rev Med Chile*; 129: 1203-1211.
- 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: 149-159.
- VALENZUELA, A., Y NIETO, S. 1994. Technological innovation applicable to marine oils rich in n-3 fatty acids to allow its nutritional and pharmacological use: a challenger for the current decade. *Arch. Latinoam Nutr.* 44, 4, 223-231.

- VALENZUELA, A., Y SANHUEZA, J. 2009. Aceites de origen marino; Su importancia en la nutrición y en la ciencia de los alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*, 36 (3): 246 – 257.
- VALENZUELA, R., TAPIA, G., GONZÁLEZ, M., Y VALENZUELA, A. 2011. Ácidos grasos omega -3 (EPA y DHA) y sus aplicaciones en diversas situaciones clínicas. *Revista Chilena de Nutrición*, 38 (3): 356 – 367.
- VEGA, S., GUTIÉRREZ, R., RADILLA, C., RADILLA, M., RAMÍREZ, A., PÉREZ, J.J., SCHETTINO, B., RAMÍREZ, M.L., ORTIZ, R. Y FONTECHA, J. 2012. La importancia de los ácidos grasos en la leche materna y en las fórmulas lácteas. *Revista Grasas y Aceites*, 63 (2): 131-142.
- WANASUNDARA, U. A., SHAHIDI, F. 1995. Storage stability of microencapsulated seal blubber oil. *J. Food Lipids*, 2: 73 – 86.
- WANASUNDARA, U. N. 1996. Marine oils: stabilization, structural characterization and omega-3 fatty acid concentration. Ph.D. thesis, Memorial University of Newfoundland, Canada.
- WANASUNDARA, U. Y SHAHIDI, F. 1999. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Food Chemistry* 65:41-49.
- WANG, W., LI, T., NING, Z., WANG, Y., YANG, B., Y MA, Y. 2012. A process for the synthesis of PUFA- enriched triglycerides from high- acid crude fish oil. *Journal of Food Engineering*, 109 (2012): 366-371.
- XUEBING, X. 2004. Chapter 14: Biocatalysis for lipid modifications. En: Durford, N., y Dunford H. *Nutritionally Enhanced Edible Oil and Oilseed Processing*, AOCS Press, Champaign, Illinois, pp239-263.
- ZUTA, C. P., SIMPSON, B. K., CHAN, H. M. Y PHILLIPS, L. 2003. Concentrating PUFA from Mackerel Processing Waste. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80:933-936.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Productos existentes en el mercado.

Laboratorio	Nombre	Tipo de contenido	Cantidad por porción	Presentación	Objetivo	Origen
<b>KNOP</b>	Omega 3	Aceite de sardina	300mg ácidos grasos omega-3	60 Cápsulas	Cardiovascular	Chile
	DHA MATHERN.	Aceite de pescado	250mg DHA y 25mg EPA	30 Cápsulas	Periodo gestación y lactancia (desarrollo nervioso y neurológico)	
	DHA Kids	Aceite de pescado	100mg DHA y 25mg EPA	30 Cápsulas	Niños (función cerebral e inteligencia)	
	DHA MENTAL.	Aceite de pescado	250mg DHA y 100mg EPA	30 Cápsulas	Jóvenes y adultos (capacidad intelectual)	
	EYKOSACOL.	Aceite de pescado y excipientes	300mg EPA, 300mg DHA, 1 mg D-alfatocoferol	60 Cápsulas	Tratamiento de dislipidemia y arteriosclerosis	
	DHA SENIOR.	Aceite de pescado	250mg DHA y 100mg EPA	30 Cápsulas	Adulto mayor (prevenir deterioro cognitivo y Alzheimer)	
<b>RECALCINE (GYNOPHARM)</b>	PRENAMIN NATAL.	Microalgas Y vitaminas	200mg DHA y 500mcg ácido fólico	30 Cápsulas	Embarazo y lactancia (desarrollo sistema nervioso y visual)	Chile
<b>MAVER</b>	EPASAN FORTE 85% OMEGA 3.	Aceite marino y vitaminas	400mg EPA, 400mg DHA, 50mg ácido Omega-3	30 Cápsulas	Prevención vasculopatías	Chile
<b>SUPLALIM</b>	OMEGALERT KIDS.	Aceite de pescado	34mg EPA y 100mg DHA	150 ml, Jarabe	Niños (Déficit atencional y agotamiento mental)	Chile
	OMEGALERT WOMAN.	Aceite de pescado	102mg EPA 300mg DHA	300 ml, Jarabe	Embarazo (desarrollo cerebral)	
	OMEGALERT FAMILY.	Aceite de pescado	100mg EPA+DHA	30 Masticables	Salud óptima	
<b>GNC</b>	SALMON OIL 1000.	Aceite de salmón + Vitamina E	540mg EPA y 360mg DHA	180 Cápsulas	Cardiovascular, antiagregante plaquetario	Estados Unidos (Comercializado en Chile)
	FISH BODY OILS 1000.	Aceite de salmón + Vitamina E	300mg ácidos grasos omega-3	90 Cápsulas	Cardiovascular, antiagregante plaquetario	

	TRIPLE STRENGTH FISH OIL.	Aceite de salmón + Vitamina E	900mg de ácido grasos omega-3	60 Cápsulas	Triglicéridos elevados, alto riesgo cardiovascular, antiagregante plaquetario.	
	DOUBLE STRENGTH FISH BODY OIL.	Aceite de salmón + Vitamina E	600mg ácidos grasos omega-3	60 Cápsulas	Cardiovascular, triglicéridos plasmáticos, antiagregante plaquetario	
	OMEGA-3 SOFT CHEW.	Aceite de salmón + Vitamina E	105mg EPA+DHA	60 Masticables	Déficit atencional, desarrollo cerebral fetal, protector cardiovascular, antiagregante plaquetario	
<b>RECALCINE (HEALTH &amp; WELLNESS)</b>	A.COLEST TG	Aceite de pescado	390mg EPA y 330mg DHA	30 Cápsulas	Cardiovascular y alto nivel de triglicéridos	Estados Unidos
<b>FERRER HEALTH CARE</b>	Om3gafort	Aceite de anchoveta	500mg EPA+DHA	60 Cápsulas	Factores riesgo cardiovascular, fortalecer visión, mejorar equilibrio mental	España
<b>DR. SEARS ZONE</b>	OMEGA RX	Aceite de pescado	400 mg EPA + 200 mg DHA por cápsula	60 y 120 cápsulas	Hipertensión arterial, Sobrepeso, Diabetes Tipo 2, cardiopatías, colesterol y triglicéridos altos, enfermedades autoinmunes. Se puede emplear en embarazadas, niños con déficit atencional y deportistas.	México, comercializada por New Science Chile
	OMEGA RX (ACEITE)	Aceite de pescado	1800 mg de EPA + 900 mg DHA (5 mL)	225 mL, jarabe		
	OMEGA RX (MICROCÁPSULAS)	Aceite de pescado	400 mg EPA + 200 mg DHA por cápsula	240 cápsulas		
<b>NEW SCIENCE</b>	UP OMEGA3	Aceite de pescado por destilación molecular	400 mg EPA + 200 mg DHA por cápsula	120 cápsulas	Hipertensión arterial colesterol y triglicéridos altos	Chile
<b>WOO HOO NATURAL</b>	OMEGA3, PurifiedFishOil	Aceite de pescado + Vitamina E	Cada dos cápsulas (1 porción) contienen 360 mg de EPA + 240 mg de DHA	90 cápsulas	Previene síndrome menopausia, promueve circulación, reduce colesterol.	EEUU, comercializada en Chile
<b>NORDIC NATURAL</b>	ULTIMATE OMEGA XTRA	Aceite de pescado (anchovetas y sardinas) y vitamina D3	800mg EPA y 400mg DHA, 200mg omega-3 (2 cápsulas)	60 cápsulas	Cardiovascular, mantener cerebro y huesos sanos	EEUU, comercializada en Chile

	ULTIMATE OMEGA LIQUID	Aceite de pescado (anchoveta y sardinas)	1450mg EPA y 1600mg DHA, 450mg omega-3 (5ml)	227ml, jarabe	Atletas profesionales, salud bronquial y capacidad del cuerpo para responder a estrés en una manera saludable.	
	ULTIMATE OMEGA FISH GELATINE	Aceite de pescado (anchoveta y sardinas)	650mg EPA, 450mg DHA y 180mg omega3	60 cápsulas	Tratamiento terapéutico intenso para el cuerpo y la mente.	
	OMEGA3 FISHIES	Aceite de pescado (anchoveta y sardinas)	150mg EPA, 100mg DHA y 50mg omega3	36 masticables	Niños (Ayuda salud mental, visión y sistema inmunológico)	
	ULTIMATE OMEGA D3 SPORT	Aceite de pescado (anchovetas y sardinas) y vitamina D3 y E	800mg EPA, 400mg DHA, 200mg omega3.	60 Cápsulas	Atletas profesionales (salud bronquial y capacidad del cuerpo para responder a estrés en una manera saludable)	
	ULTIMATE OMEGA MINIS	Aceite de pescado (anchoveta y sardinas)	325mg EPA, 225mg DHA y 90mg omega3	90 Cápsulas	Niños y ancianos. (Salud cardiaca y mental)	
	PRENATAL DHA	Aceite de pescado (anchovetas y sardinas) y vitamina D3 y alfa tocoferol	90mg EPA, 450mg DHA y 40mg omega3	90 Cápsulas	Embarazadas (Salud de huesos y mejor estado de ánimo)	
	EPA ELITE	Aceite de pescado (anchoveta)	1600mg EPA, 60mg omega3	60 Cápsulas	Altos niveles de triglicéridos y salud cardiaca	
<b>SPES</b>	NUTRA OMEGA PLUS	Aceite de pescado extra refinado + aceite vegetal + vit E	Porción de 10 mL con 700 mg de omega 3 con 442 mg de EPA + DHA	Envase 500 mL		Chile
	NUTRA OMEGA 3 BEBÉS Y NIÑOS		Porción de 5 mL equivale a 220 mg omega 3 con 160 mg de EPA+DHA	Envase 240 y 250 mL		
	NUTRA OMEGA MUJER Y MAMÁ		Porción de 10 mL con 800 mg omega 3 con 500 mg EPA + DHA	Envase 500 mL		

FISH OIL CAPSULAS BLANDAS 1000 MG		No especificado	150 y 240 caps.		
NUTRA OMEGA 3 KIDS	Aceite de pescado extra refinado + gelatina + agua + vit E	Porción de 3 mL equivale a 400 mg de omega 3 con 327 mg de EPA+DHA	Env. 200 MI		
FISH OIL CAPSULAS MASTICABLES	Aceite de pescado extra refinado, gelatina, aceite vegetal rico en ácidos grasos Omega - 6, saborizante natural, sucralosa, ácido cítrico y Vitamina E.	Porción diaria (4 caps.) con 340 mg de omega 3 con 300 mg de EPA+DHA.	240 cáps. Masticables de 500 mg sabor menta		
FISH OIL LÍQUIDO	Aceite de pescado extra refinado, saborizante y colorante natural, neotame y Vitamina E.	3 mL al día 830 mg de omega 3 con 785 mg de EPA+DHA	250 mL		
OMEGA 3 PARA ALIMENTOS FUNCIONALES	Aceite de pescado extra refinado y vit E.	Estándar con 150 mg de EPA+DHA cada 100 g y forte con 250 mg de EPA+DHA cada 100 g	Bidones 20 y 200 kg		

Fuentes: <http://www.knoplabs.com/productos.htm>; <http://www.recalcine.cl/> [http://www.nordicnaturals.com/en/General\\_Public/Omega-3\\_conc](http://www.nordicnaturals.com/en/General_Public/Omega-3_conc) ;  
<http://www.maver.cl/> ; <http://www.suplaim.cl/> ; <http://www.gnc.cl/gnconline-rc/subcategory/10,54-Colesterol-elevado,-arterioesclerosis,-triglic%C3%A9ridos-altos,-infartos-cardiacos.html> ; [http://www.ferrer.com/Productos\\_Productos-Consumer-Healthcare](http://www.ferrer.com/Productos_Productos-Consumer-Healthcare) ;  
<http://newscience.cl/productos/> ;

**ANEXO 2.** Rendimientos de los TAGs purificados para los ensayos de la acidólisis enzimática en dióxido de carbono supercrítico de aceite de canola y del concentrado AGPICL.

Ensayo	AGPI/Canola (X <sub>1</sub> )	Temperatura (X <sub>2</sub> )	Presión (X <sub>3</sub> )	Tiempo (X <sub>4</sub> )	Enzima (X <sub>5</sub> )	TAGs Sin Purif. (g)	TAGs Purif. (g)	Rendimiento Purif. (%)
1	30	45	125	6	7,5	1,0071	0,2836	28,2
2	70	45	125	6	2,5	1,0013	0,0913	9,1
3	30	55	125	6	2,5	1,0308	0,3346	32,5
4	70	55	125	6	7,5	1,0047	0,1308	13,0
5	30	45	175	6	2,5	1,0419	0,3510	33,7
6	70	45	175	6	7,5	1,0085	0,1807	17,9
7	30	55	175	6	7,5	1,0218	0,3473	34,0
8	70	55	175	6	2,5	1,0802	0,2200	20,4
9	30	45	125	18	2,5	1,0191	0,2365	23,2
10	70	45	125	18	7,5	1,0284	0,1428	13,9
11	30	55	125	18	7,5	1,0176	0,6512	64,0
12	70	55	125	18	2,5	1,0246	0,2161	21,1
13	30	45	175	18	7,5	1,0031	0,3785	37,7
14	70	45	175	18	2,5	1,0056	0,1321	13,1
15	30	55	175	18	2,5	1,0026	0,3102	30,9
16	70	55	175	18	7,5	1,0309	0,1133	11,0
17	10	50	150	12	5	1,0202	0,8056	79,0
18	90	50	150	12	5	1,0388	0,1027	9,9
19	50	40	150	12	5	1,0092	0,3470	34,4
20	50	60	150	12	5	1,0133	0,4273	42,2
21	50	50	100	12	5	1,004	0,3248	32,4
22	50	50	200	12	5	1,0145	0,2686	26,5
23	50	50	150	0	5	1,0248	0,4263	41,6
24	50	50	150	24	5	1,0198	0,3123	30,6
25	50	50	150	12	0	1,0104	0,4112	40,7
26	50	50	150	12	10	1,0128	0,2911	28,7
27	50	50	150	12	5	1,0296	0,3918	38,1
28	50	50	150	12	5	1,0189	0,3292	32,3
29	50	50	150	12	5	1,0158	0,3672	36,1
30	50	50	150	12	5	1,0462	0,3973	38,0

**ANEXO 3. Composición de ácidos grasos (AG) y grupos de ácidos grasos de los 30 ensayos (expresados en g/100 g AGT)**

AG o grupo de AG		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Láurico	C 12:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mirístico	C 14:0	0,11	0,09	0,06	0,06	0,04	0,09	0,07	0,04	0,07	0,04
Palmítico	C 16:0	4,99	5,22	4,94	4,68	4,47	4,80	4,56	4,37	4,11	4,14
Palmitoleico	C 16:1 9c	0,34	0,24	0,21	0,20	0,20	0,19	0,16	0,14	0,17	0,22
Heptadecanoico	C 17:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Heptadecenoico	C 17:1 10c	0,13	0,13	0,08	0,16	0,08	0,09	0,07	N.D.	0,12	0,06
Estearico	C 18:0	1,97	1,85	1,93	1,80	2,00	1,91	2,04	1,94	1,94	1,93
Oleico	C 18:1 9c	51,95	48,67	53,53	49,70	53,73	51,83	53,43	54,08	50,43	50,99
Cis-Vaccénico	C 18:1 11c	2,64	2,63	2,57	2,64	2,18	2,62	2,52	3,06	2,53	2,57
Linoeláidico	C 18:2 9t,12f	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Linoleico	C 18:2 9c,12c; n-6	25,01	23,05	25,50	23,91	24,87	24,58	24,40	24,94	23,77	24,09
γ-linolénico	C 18:3 6c,9c,12c; n-6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosanoico	C 20:0	0,57	0,44	0,60	0,53	0,69	0,62	0,70	0,69	0,66	0,66
α-linolénico	C 18:3 9c,12c,15c; n-3	6,99	6,62	7,49	6,82	7,19	7,15	7,20	7,20	7,01	6,64
11-Eicosenoico	C 20:1 11c	0,71	0,63	0,74	0,70	0,86	0,79	0,90	0,89	0,88	0,89
Octadecatetraenoico	C 18:4; n-3	0,48	1,09	0,27	0,93	0,34	0,52	0,40	0,25	0,72	0,56
Eicosadienoico	C 20:2 11c,14c; n-6	0,24	0,48	0,19	0,43	0,19	0,25	0,24	0,15	0,38	0,27
Dihomo γ-linolénico	C 20:3 8c,11c,14c; n-6	0,05	0,09	0,03	0,08	0,08	0,05	0,03	N.D.	0,07	0,05
Behénico	C 22:0	0,22	0,22	N.D.	0,19	0,34	0,26	0,32	0,31	0,33	0,32
Eicosatrienoico	C 20:3 11c,14c,17c; n-3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	C 20:4 5c, 8c, 11c, 14c;n-6	0,05	0,12	0,02	0,14	0,05	0,08	0,05	N.D.	0,11	0,10
Docosenoico	C 22:1 13c	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosapentaenoico	C 20:5 5c,8c,11c,14c,17c; n-3	1,16	2,56	0,59	2,28	1,00	1,28	0,91	0,67	1,96	2,04
Docosatetraenoico	C 22:4 7c,10c,13c,16c; n-6	0,14	0,37	0,08	0,32	0,13	0,18	0,12	0,10	0,27	0,31
Docosapentaenoico	C 22:5 7c,10c,13c,16c,19c; n-3	0,11	0,17	0,03	0,13	0,06	0,08	0,05	N.D.	0,13	0,15
Docosahexaenoico	C 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c; n-3	2,14	5,34	1,14	4,29	1,51	2,63	1,81	1,15	4,35	3,98
<b>Total AG saturados</b>		<b>7,86</b>	<b>7,80</b>	<b>7,53</b>	<b>7,28</b>	<b>7,53</b>	<b>7,68</b>	<b>7,69</b>	<b>7,35</b>	<b>7,12</b>	<b>7,07</b>
<b>Total AG monoinsaturados</b>		<b>55,76</b>	<b>52,30</b>	<b>57,14</b>	<b>53,40</b>	<b>57,05</b>	<b>55,52</b>	<b>57,08</b>	<b>58,18</b>	<b>54,13</b>	<b>54,73</b>
<b>Total AG poliinsaturados</b>		<b>36,38</b>	<b>39,89</b>	<b>35,33</b>	<b>39,33</b>	<b>35,42</b>	<b>36,80</b>	<b>35,23</b>	<b>34,47</b>	<b>38,76</b>	<b>38,20</b>
<b>Total AG n-3</b>		<b>10,88</b>	<b>15,79</b>	<b>9,52</b>	<b>14,45</b>	<b>10,11</b>	<b>11,67</b>	<b>10,39</b>	<b>9,28</b>	<b>14,16</b>	<b>13,37</b>
<b>Total AG n-6</b>		<b>25,50</b>	<b>24,11</b>	<b>25,81</b>	<b>24,87</b>	<b>25,31</b>	<b>25,14</b>	<b>24,84</b>	<b>25,19</b>	<b>24,60</b>	<b>24,83</b>
<b>EPA+DHA</b>		<b>3,30</b>	<b>7,90</b>	<b>1,73</b>	<b>6,57</b>	<b>2,52</b>	<b>3,91</b>	<b>2,73</b>	<b>1,82</b>	<b>6,30</b>	<b>6,02</b>
<b>Relación AG n-6/n-3</b>		<b>2,34</b>	<b>1,53</b>	<b>2,71</b>	<b>1,72</b>	<b>2,50</b>	<b>2,15</b>	<b>2,39</b>	<b>2,72</b>	<b>1,74</b>	<b>1,86</b>

<sup>b</sup> N.D. No detectado



**ANEXO 2.** Composición de ácidos grasos (AG) y grupos de ácidos grasos de los 30 ensayos (expresados en g/100 g AGT) (*Continuación*).

AG o grupo de AG		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Láurico	C 12:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mirístico	C 14:0	0,07	0,08	0,06	0,04	0,06	0,06	0,04	0,07	0,04	0,07
Palmítico	C 16:0	4,36	4,17	4,74	4,34	4,92	4,33	4,73	4,50	4,70	4,36
Palmitoleico	C 16:1 9c	0,20	0,18	0,25	0,30	0,23	0,27	0,19	0,19	0,18	0,19
Heptadecanoico	C 17:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Heptadecenoico	C 17:1 10c	N.D.	0,12	0,14	0,11	0,12	0,20	0,06	N.D.	0,07	0,09
Estearico	C 18:0	1,81	1,98	1,82	1,91	1,86	1,71	2,27	2,09	2,29	2,07
Oleico	C 18:1 9c	52,46	50,57	50,37	54,30	51,29	45,50	55,08	52,27	54,96	51,68
Cis-Vaccénico	C 18:1 11c	2,78	2,72	2,51	2,70	2,75	2,81	2,58	2,88	2,71	2,87
Linoeláidico	C 18:2 9t,12f	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Linoleico	C 18:2 9c,12c; n-6	24,86	23,57	25,00	26,89	25,04	22,45	25,09	23,85	24,92	23,88
γ-linolénico	C 18:3 6c,9c,12c; n-6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosanoico	C 20:0	0,56	0,68	0,55	0,57	0,55	0,53	0,71	0,67	0,68	0,70
α-linolénico	C 18:3 9c,12c,15c; n-3	6,95	6,82	7,00	7,66	7,30	6,39	7,32	6,88	7,24	6,73
11-Eicosenoico	C 20:1 11c	N.D.	0,90	0,78	0,69	0,72	0,79	0,92	0,92	0,90	0,84
Octadecatetraenoico	C 18:4; n-3	0,64	0,69	0,79	1,01	0,66	1,58	0,05	0,43	0,08	0,53
Eicosadienoico	C 20:2 11c,14c; n-6	0,30	0,35	0,37	0,45	0,34	0,77	0,08	0,25	0,09	0,28
Dihomo γ-linolénico	C 20:3 8c,11c,14c; n-6	0,05	0,06	0,06	0,07	0,04	0,12	0,02	0,05	N.D.	0,05
Behénico	C 22:0	0,25	0,35	0,20	0,18	0,19	0,19	0,39	0,31	0,38	0,35
Eicosatrienoico	C 20:3 11c,14c,17c; n-3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	C 20:4 5c, 8c, 11c, 14c;n-6	0,06	0,09	0,08	0,14	0,06	0,20	N.D.	0,08	N.D.	0,07
Docosenoico	C 22:1 13c	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosapentaenoico	C 20:5 5c,8c,11c,14c,17c; n-3	1,58	2,02	2,00	2,47	1,34	3,89	0,17	1,24	0,25	1,49
Docosatetraenoico	C 22:4 7c,10c,13c,16c; n-6	0,20	0,29	0,23	0,32	0,16	0,43	N.D.	0,19	N.D.	0,21
Docosapentaenoico	C 22:5 7c,10c,13c,16c,19c; n-3	0,11	0,15	0,12	0,15	0,06	0,25	N.D.	0,09	0,02	0,13
Docosahexaenoico	C 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c; n-3	2,76	4,20	2,93	4,40	2,30	7,52	0,32	3,02	0,47	3,43
<b>Total AG saturados</b>		7,06	7,26	7,37	7,05	7,58	6,81	8,14	7,65	8,10	7,54
<b>Total AG monoinsaturados</b>		55,44	54,49	54,05	58,10	55,12	49,57	58,82	56,27	58,82	55,67
<b>Total AG poliinsaturados</b>		37,50	38,25	38,58	43,55	37,31	43,61	33,04	36,09	33,08	36,79
<b>Total AG n-3</b>		12,04	13,88	12,84	15,67	11,67	19,64	7,86	11,67	8,07	12,30
<b>Total AG n-6</b>		25,46	24,36	25,74	27,87	25,64	23,98	25,18	24,42	25,01	24,48
<b>EPA+DHA</b>		4,34	6,22	4,93	6,86	3,64	11,41	0,49	4,26	0,72	4,91
<b>Relación AG n-6/n-3</b>		2,11	1,75	2,00	1,78	2,20	1,22	3,20	2,09	3,10	1,99

<sup>b</sup> N.D. No detectado

**ANEXO 2. Composición de ácidos grasos (AG) y grupos de ácidos grasos de los 30 ensayos (expresados en g/100 g AGT) (Continuación).**

AG o grupo de AG		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Láurico	C 12:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mirístico	C 14:0	0,08	0,08	0,04	0,07	0,05	0,04	0,07	0,07	0,07	0,06
Palmítico	C 16:0	4,58	4,55	4,79	4,44	4,89	4,92	4,30	4,29	4,38	4,27
Palmitoleico	C 16:1 9c	0,20	0,19	0,20	0,18	0,17	0,19	0,20	0,17	0,19	0,16
Heptadecanoico	C 17:0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Heptadecenoico	C 17:1 10c	N.D.	0,10	0,07	0,08	0,05	0,09	0,10	0,12	0,13	0,06
Estearico	C 18:0	2,10	2,14	2,22	1,88	2,26	2,14	2,01	1,91	2,01	2,04
Oleico	C 18:1 9c	51,97	52,44	54,14	50,70	55,36	53,72	51,60	51,02	51,61	52,38
Cis-Vaccénico	C 18:1 11c	2,73	2,64	2,96	2,71	2,60	2,71	2,54	2,71	2,61	2,48
Linoeláidico	C 18:2 9t,12f	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Linoleico	C 18:2 9c,12c; n-6	24,01	23,95	24,83	23,86	25,16	24,95	23,92	24,08	24,12	24,08
γ-linolénico	C 18:3 6c,9c,12c; n-6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosanoico	C 20:0	0,70	0,65	0,68	0,57	0,74	0,68	0,67	0,65	0,67	0,71
α-linolénico	C 18:3 9c,12c,15c; n-3	7,05	6,91	7,29	6,97	7,27	7,38	6,73	7,01	7,08	7,11
11-Eicosenoico	C 20:1 11c	0,92	0,85	0,92	0,76	0,92	0,86	0,87	0,85	0,83	0,88
Octadecatetraenoico	C 18:4; n-3	0,48	0,46	0,13	0,73	N.D.	0,20	0,57	0,64	0,59	0,46
Eicosadienoico	C 20:2 11c,14c; n-6	0,30	0,29	0,12	0,37	N.D.	0,14	0,33	0,35	0,33	0,28
Dihomo γ-linolénico	C 20:3 8c,11c,14c; n-6	0,05	0,05	0,02	0,06	N.D.	0,02	0,07	0,05	0,06	0,06
Behénico	C 22:0	0,34	0,35	0,30	0,21	0,34	0,31	0,31	0,29	0,32	0,35
Eicosatrienoico	C 20:3 11c,14c,17c; n-3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	C 20:4 5c, 8c, 11c, 14c;n-6	0,07	0,06	0,02	0,10	N.D.	0,02	0,11	0,09	N.D.	0,06
Docosenoico	C 22:1 13c	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosapentaenoico	C 20:5 5c,8c,11c,14c,17c; n-3	1,25	1,14	0,42	2,08	0,04	0,59	2,01	2,05	1,90	1,54
Docosatetraenoico	C 22:4 7c,10c,13c,16c; n-6	0,16	0,16	0,06	0,26	N.D.	0,06	0,23	0,24	0,21	0,18
Docosapentaenoico	C 22:5 7c,10c,13c,16c,19c; n-3	0,09	0,08	0,02	0,15	N.D.	0,03	0,13	0,13	0,10	0,11
Docosahexaenoico	C 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c; n-3	2,91	2,92	0,76	3,81	0,14	0,96	3,24	3,30	2,79	2,72
<b>Total AG saturados</b>		<b>7,81</b>	<b>7,76</b>	<b>8,05</b>	<b>7,18</b>	<b>8,29</b>	<b>8,10</b>	<b>7,36</b>	<b>7,21</b>	<b>7,45</b>	<b>7,44</b>
<b>Total AG monoinsaturados</b>		<b>55,83</b>	<b>56,22</b>	<b>58,29</b>	<b>54,43</b>	<b>59,10</b>	<b>57,56</b>	<b>55,30</b>	<b>54,87</b>	<b>55,37</b>	<b>55,95</b>
<b>Total AG poliinsaturados</b>		<b>36,36</b>	<b>36,02</b>	<b>33,67</b>	<b>38,39</b>	<b>32,62</b>	<b>34,34</b>	<b>37,34</b>	<b>37,92</b>	<b>37,19</b>	<b>36,60</b>
<b>Total AG n-3</b>		<b>11,78</b>	<b>11,51</b>	<b>8,63</b>	<b>13,75</b>	<b>7,46</b>	<b>9,15</b>	<b>12,68</b>	<b>13,12</b>	<b>12,46</b>	<b>11,94</b>
<b>Total AG n-6</b>		<b>24,58</b>	<b>24,51</b>	<b>25,04</b>	<b>24,65</b>	<b>25,16</b>	<b>25,19</b>	<b>24,66</b>	<b>24,81</b>	<b>24,73</b>	<b>24,67</b>
<b>EPA+DHA</b>		<b>4,16</b>	<b>4,05</b>	<b>1,18</b>	<b>5,89</b>	<b>0,19</b>	<b>1,54</b>	<b>5,26</b>	<b>5,35</b>	<b>4,69</b>	<b>4,26</b>
<b>Relación AG n-6/n-3</b>		<b>2,09</b>	<b>2,13</b>	<b>2,90</b>	<b>1,79</b>	<b>3,37</b>	<b>2,75</b>	<b>1,94</b>	<b>1,89</b>	<b>1,99</b>	<b>2,07</b>

<sup>b</sup> N.D. No detectado