

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



*Determinación indirecta de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga EPA y DHA en posición sn-2 en triacilgliceroles mediante un método alternativo al método oficial AOCS Ch 3-91, utilizando la lipasa *Rhizomucor miehei*.*

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

CRISTIÁN RODRIGO ENCINA ACOSTA

Director de Tesis: M.S.c. Alicia Rodríguez Melis

Santiago-CHILE

Agosto 2015

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xviii
ABREVIATURAS	xx
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Lípidos	1
1.2.- Triacilgliceroles	3
1.3.- Ácidos grasos	3
1.4.- Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPCL)	5
1.5.- EPA y DHA	6
1.6.- Absorción de lípidos	7
1.7.- Problemática nutricional	8
1.8.- Lípidos a la medida	9
1.9.- Análisis posicional de TAG	11
1.10.- Biocatalizadores	16
1.11.- Lipasas	17
1.12.- Lipasa obtenida de <i>Rhizomucor miehei</i>	24
1.13.- Alcoholisis	27
1.14.- Actividad Enzimática	29
1.15.- Purificación de los TAG	30
1.16.- Cromatografía de capa fina	32
2.- HIPÓTESIS	37
3.- OBJETIVOS	37
3.1.- Objetivo general	37

3.2.- Objetivos específicos.....	37
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1.- Materiales.....	39
4.1.1.- Muestras y reactivos	39
4.1.2.- Materiales de laboratorio.....	40
4.2.- Métodos.....	41
4.2.1- Objetivo 1: Preparación de materiales y optimización de métodos para purificación de TAG.....	41
4.2.1.1.- Purificación TAG	41
4.2.1.1.1.- Preparación mezcla patrón 1.....	41
4.2.1.1.2.- Cromatografía de capa fina (CCF)	42
4.2.1.1.3.- Columnas de purificación.....	44
4.2.1.1.4.- Procedimiento de purificación de TAG	46
4.2.2- Objetivo 2: Optimización de la reacción de alcoholisis enzimática con lipasa <i>Rhizomucor miehei</i> en metanol.....	47
4.2.2.1.- Determinación de la actividad enzimática en las lipasas pancreática y <i>Rhizomucor miehei</i>	48
4.2.2.2.- Obtención de manteca de cacao.....	50
4.2.2.3.- Metilación química de los ácidos grasos.....	51
4.2.2.4.- Perfil de ácidos grasos.....	52
4.2.2.5.- Reacción de alcoholisis enzimática de la lipasa del <i>Rhizomucor miehei</i>	53
4.2.2.5.1- Diseño experimental para la optimización de la reacción de alcoholisis enzimática de la lipasa del <i>Rhizomucor miehei</i>	53
4.2.2.4.2- Procedimiento de alcoholisis enzimática empleando la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	57
4.2.2.4.3.- Reacción enzimática con lipasa pancreática (método oficial AOCS Ch3-91)	58
4.2.3.- Objetivo 3: Ensayos con las condiciones óptimas de alcoholisis enzimática en una muestra patrón 2 y lípido estructurado.....	59
4.2.3.1.- Muestra patrón 2	59
4.2.3.2.- Muestra de lípido estructurado	60
4.3.- Análisis estadístico	60
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61

5.1.- Selección de las condiciones para el proceso de separación de productos.....	61
5.2.- Purificación de TAGs.....	63
5.3.-Actividad enzimática	66
5.4.- Perfil de ácidos grasos de manteca de cacao	68
5.5.- Determinación de la composición del ácido graso en la posición <i>sn</i> -2 del TAG mediante método oficial AOCS Ch3-91	70
5.6.- Optimización reacción enzimática de la lipasa <i>Rhizomucor miehei</i>	73
5.7.- Reacciones químicas y enzimáticas en muestra patrón 2.....	85
5.8.- Reacción enzimática lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> en muestra de un lípido estructurado.....	94
6.- CONCLUSIONES.....	100
7.- REFERENCIAS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un triacilglicerol, constituida por una molécula de glicerol esterificada con 3 ácidos grasos.....	3
Figura 2. Estructura de AGS, AGM, AGP en los que la diferencia está dada por el número de dobles enlaces presentes en la cadena hidrocarbonada.	4
Figura 3. Esquema de las rutas metabólicas para la síntesis de AGPCL a partir de los ácidos grasos esenciales ácido linoleico y ácido α linolénico en el ser humano	6
Figura 4. Función biológica lipasas. Las enzimas hidrolizan el TAG en medio acuoso para formar glicerol y AG libres cuando la reacción es completa	18
Figura 5. Reacciones de hidrólisis, esterificación, alcoholólisis, acidólisis y transesterificación catalizadas por lipasas.....	19
Figura 6. Mecanismo de acción de las lipasas.....	23
Figura 7. Estructura 3D cerrada y abierta de la lipasa Rhizomucor miehei.....	26
Figura 8. Esquema de la reacción de alcoholólisis entre un TAG y un alcohol intermediada por una lipasa.....	28
Figura 9. Principio de la reacción enzimática para determinar la actividad enzimática de lipasas sobre triacetina.....	30
Figura 10. Esquema de purificación de compuestos mediante cromatografía en columna.....	32
Figura 11. Esquema de separación por CCF de lípidos simples en sílica gel. Solventes de desarrollo: hexano-éter dietílico-ácido fórmico (80:20:2 v/v).....	35
Figura 12. Diagrama de flujo de los métodos utilizados para la preparación y optimización de la purificación de TAG.....	41

Figura 13. Diagrama de flujo de los métodos utilizados en el desarrollo de la optimización de la alcoholisis enzimática con lipasa <i>R. miehei</i> en metanol.....	47
Figura 14. Diagrama de flujo de los métodos realizados en el desarrollo de los ensayos con las condiciones óptimas de alcoholisis enzimática en una muestra patrón 2 y lípido estructurado.....	59
Figura 15. CCF de la muestra patrón 1 correspondiente a una mezcla de AG, MAG, DAG y TAG utilizando las mezclas de solventes estudiadas, (A) Hexano: Dietil Éter: Ác. Acético (80:20:1) y (B) Éter de Petróleo: Dietil Éter: Ác. Fórmico (70:30:1).	63
Figura 16. CCF de la muestra patrón 1 sin purificar (fila 1), de la muestra patrón 1 purificada mediante columnas de cromatografía de sílica gel (fila 2), columna de óxido de aluminio 90 (fila 3) y columna de mezcla de sílica gel y óxido de aluminio 50/50 (fila 4), muestra de aceite de girasol sin purificar (fila 5) y aceite de girasol purificado mediante columna de óxido de aluminio (fila 6).....	65
Figura 17. Cromatograma del perfil de ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en manteca de cacao purificada, obtenido mediante la metilación química con BF_3 como catalizador.	69
Figura 18. Cromatograma del perfil de ésteres metílicos obtenido de los MAG de manteca de cacao purificada y luego de aplicar método oficial AOCS Ch3-91.	71
Figura 19. Gráfico de residuos para porcentaje de corte.	76
Figura 20. Evaluación de factores para porcentaje de corte. A) Diagrama de Pareto Original; B) Diagrama de Pareto Factores Significativos; C) Superficie de Respuesta Enzima-Temperatura; D) Superficie de Respuesta Enzima-Tiempo; E) Superficie de Respuesta Tiempo-Temperatura.	79

Figura 21. Cromatograma del perfil de ácidos grasos de manteca de cacao purificada obtenido al aplicar las condiciones del ensayo N°5 del diseño de experimentos con lipasa <i>Rhizomucor miehei</i>	81
Figura 22. Cromatograma del perfil de ácidos de la muestra patrón 2 correspondiente a aceite de girasol purificado enriquecido con EPA y DHA obtenido mediante metilación química con BF_3	86
Figura 23. Cromatograma del perfil de ácidos en la posición sn-2 de la muestra patrón de aceite de girasol enriquecido con EPA y DHA de acuerdo al método oficial AOCS Ch3-91.....	88
Figura 24. Cromatograma del perfil de ácidos en las posiciones sn-1 y sn-3 de la muestra patrón de aceite de girasol enriquecido con EPA y DHA analizado por el método optimizado con lipasa <i>Rhizomucor miehei</i>	90
Figura 25. Cromatograma del perfil de ácidos de una muestra de TAG estructurado con AGPI y C8:0 de acuerdo al método químico catalizado con BF_3	95
Figura 26. Perfil de ácidos de las posiciones sn-1 y sn-3 de una muestra de TAGs estructurado con AGPI y C8:0 de acuerdo al método enzimático optimizado con lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación, características y nombre de algunas lipasas utilizadas en la industria.....	20
Tabla 2.- Matriz de ensayos para la optimización de la reacción enzimática utilizando lipasa Rhizomucor miehei.	56
Tabla 3. Recuperación (%) de TAG en las diferentes columnas de purificación. Promedio±DS ..	66
Tabla 4. Contenido de ácidos grasos de manteca de cacao obtenida mediante metilación química con BF ₃ , Promedio ± DS, n=2.....	70
Tabla 5. Contenido de ácidos grasos de manteca de cacao obtenido de los sn-2 MAG luego de aplicar el método AOCS Ch3-91 y separar por CCF. Promedio ± DS. n = 2	71
Tabla 6. Matriz diseño experimental con variables independientes (A: Temperatura, B: tiempo y C: cantidad de enzima) y dependiente (Porcentaje de corte) obtenido de los ensayos realizados en manteca de cacao purificada con lipasa Rhizomucor miehei.	74
Tabla 7. Coeficientes de regresión de modelos polinómicos predictivos de segundo orden para las variables respuesta %Corte.	75
Tabla 8. Resumen ANOVA del modelo de regresión para porcentaje de corte de la optimización de la reación de alcoholisis enzimática.	76
Tabla 9. Composición de ácidos grasos en posiciones sn-1 y sn-3 obtenidas luego de aplicar las condiciones del ensayo N ° 5 del diseño de experimentos con la lipasa Rhizomucor miehei. Promedio ± DS. n=2.....	82
Tabla 10. Resultados del cálculo de los ácidos grasos en posición sn-2 de la manteca de cacao purificada a partir de los ácidos grasos totales (Tabla 4) y los determinados en la posición sn-1 y	

sn-3 (Tabla 9) mediante método enzimático con lipasa <i>Rhizomucor miehei</i> (g/100g) con la ecuación de Moreno y Perea ($AG (sn-2) = 3*AG (sn-1, 2, 3)-2*AG (sn-1,3)$).	83
Tabla 11. Resultados de la composición de AG calculados aplicando los factores de representación dentro del TAG de las posiciones sn-+3 y sn-2.	83
Tabla 12. Resultados de la suma de los AG obtenidos por cálculos a partir de la alcoholisis enzimática con <i>R. miehei</i> y los AG determinados con la metilación química.	84
Tabla 13. Contenido de ácidos grasos de la muestra patrón 2 de aceite de girasol purificado enriquecido con EPA y DHA, obtenido mediante metilación química con BF_3 . Promedio \pm DS, n=2	87
Tabla 14. Composición de los ácidos grasos en la posición sn-2 de la muestra patrón de aceite de girasol enriquecido con EPA y DHA de acuerdo al método AOCS Ch2-91. Promedio \pm DS.	89
Tabla 15. Composición de ácidos grasos de la muestra patrón de aceite de girasol enriquecido con EPA y DHA en las posiciones sn-1+ sn-3 mediante método optimizado utilizando lipasa <i>R. miehei</i> . Promedio \pm DS.	92
Tabla 16. Composición de ácidos grasos de la muestra de lípidos estructurados con AGPI y C8:0 mediante método químico con BF_3 como catalizador. Promedio \pm DS.	95
Tabla 17. Composición de ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-3 de una muestra de lípidos estructurados con AGPI y C8:0 mediante método enzimático con lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> . Promedio \pm DS.	97
Tabla 18. Cálculo de los ácidos grasos en posición sn-2 de un TAG estructurado a partir de los ácidos grasos totales (Tabla 16) y los determinados en la posición sn-1 y sn-3 (Tabla 17) mediante método enzimático con lipasa <i>Rhizomucor miehei</i> (g/100gAG).	98
Tabla 19. Comparación de las operaciones realizadas en los métodos enzimáticos estudiados	99