

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“OBTENCIÓN DE ACILGLICÉRIDOS FENÓLICOS CON EPA/DHA Y
ÁCIDO GÁLICO MEDIANTE ACIDÓLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIO
CO₂ SUPERCRÍTICO Y SU EFECTO SOBRE LA REVERSIÓN DE
ALTERACIONES EN PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ASOCIADOS A
RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR OBESIDAD EN
MODELO MURINO”***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctora en Nutrición y Alimentos por:**

Gretel Dovale Rosabal

**Directoras de Tesis: PhD. Alicia Rodríguez Melis
PhD. Alejandra Espinosa Escalona**

Santiago-CHILE

2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

Gretel Dovale Rosabal

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Nutrición y Alimentos, en el examen público rendido el día _____

Directora de Tesis:

Dra. Alicia Rodríguez Melis _____

Co-directora de Tesis:

Dra. Alejandra Espinosa _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Carolina Valenzuela _____

Dra. Lilian Abugoch _____

Dr. Diego García _____

Dr. Víctor Cortés _____

“ Él enjugará toda lágrima de sus ojos, y la muerte ya no existirá, ni habrá más tristeza, ni llanto, ni dolor ”

Apocalipsis 21:4

**Para ti mami,
porque esto nos cambió la vida**

AGRADECIMIENTOS

PRIMERO A DIOS, que me dio fuerzas para seguir y terminar este proyecto.

A mi esposo, sin cuyo amor y paciencia hubiese sido más difícil aún este camino, gracias por tanto. A mi familia, que siempre me acompaña.

A mis tutoras Alicia Rodríguez y Alejandra Espinosa, por su comprensión y enseñanzas durante estos 7 años. Gracias por escucharme y guiarme siempre.

A Santiago Pedro Aubourg por su apoyo y guía en todas las publicaciones.

A Juan Carlos Carmona, por ayudarme a estudiar en Chile y por ser mi amigo.

A las profesoras Dra. María Antonieta Valenzuela y Dra. Lilian Abugoch por su guía constante desde el inicio de mis estudios de doctorado.

Al profesor Dr. Andrés Barriga por su gran apoyo en todo momento para terminar esta tesis, incluso en los días feriados o de fiesta.

A Don Fernando Lara por su invaluable ayuda en el laboratorio, sobre todo en los tiempos de pandemia cuando estaba sola.

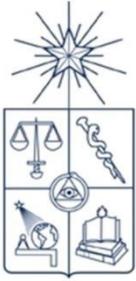
A los profesores Edward Fuentes, Nalda Romero, Paz Roberts, María Elsa Pando y Paulina Ruiz por sus acertadas respuestas a todas mis preguntas.

A mis compañeros de laboratorio que siempre me ayudaron, colaboraron en mis experimentos y compartieron conmigo conocimientos y buenos momentos: Patricia Ramírez, Marlys Muñoz, Macarena Berríos, Javiera Segovia, Francisco Pino, Rodrigo Miranda, Ernesto Uribe, Camila Sacristán, Sebastián Pozas, Tamar Toledo, Catalina Pino, Yesenia Reinoso, Dayana Apaza, Camila Sánchez, Francisca Reinoso y Daniela Gutiérrez.

Al Señor Eduardo por su ayuda y empatía, sobre todo en los meses de pandemia.

A Nádia Gavilán por su comprensión y apoyo durante las épocas difíciles.

A Francisca Moraga, Miriam Salazar, Karina Moreno e Ivonne Fuentealba por su apoyo en la escuela de Postgrado y principalmente al director Dr. Alejandro Álvarez por su gran empatía y objetividad en momentos cruciales.



UNIVERSIDAD DE CHILE
Doctorado en Nutrición y Alimentos

“OBTENCIÓN DE ACILGLICÉRIDOS FENÓLICOS CON EPA/DHA Y
ÁCIDO GÁLICO MEDIANTE ACIDÓLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIO
CO₂ SUPERCRÍTICO Y SU EFECTO SOBRE LA REVERSIÓN DE
ALTERACIONES EN PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ASOCIADOS A
RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR OBESIDAD EN
MODELO MURINO”

Tesis presentada como parte de los requisitos
para optar al Grado de

Doctor en Nutrición y Alimentos
Programa conjunto

Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de
Nutrición y Tecnología de Alimentos

Por
Gretel Dovale Rosabal

Directoras de Tesis:
PhD. Alicia Rodríguez Melis y PhD. Alejandra Espinosa Escalona

Santiago, 2023

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructuras lipídicas	2
1.1.1. Ácidos grasos	2
1.1.2. Triacilglicéridos	3
1.1.3. Digestión y absorción de TG	4
1.1.4. Ácidos grasos poliinsaturados	6
1.1.5. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga: EPA y DHA	8
1.2. Enfermedades no transmisibles y obesidad.....	10
1.2.1. Obesidad y resistencia a la insulina	11
1.2.2. Resistencia a la insulina y AGPICLn-3	14
1.3. Aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD) como fuente de obtención de EPA y DHA.....	17
1.3.1. Concentración de AGPICLn-3, a partir de ASCRD, mediante el proceso de complejación con urea.	19
1.3.2. Biodisponibilidad.....	20
1.4. Triacilglicéridos estructurados	22

1.4.1.	Lipasas en la estructuración de TEs.....	22
1.4.2.	Fluidos supercríticos como medio para la obtención de TEs mediante reacciones enzimáticas.....	24
1.4.3.	Uso de antioxidantes en aceites	26
1.4.4.	Compuestos fenólicos como antioxidantes.....	27
1.4.5.	Síntesis de lípidos fenólicos.....	29
1.5.	HIPÓTESIS	32
1.6.	OBJETIVOS.....	32
1.6.1.	Objetivo General.....	32
1.6.2.	Objetivos específicos	32
	MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1.	Materiales	33
2.1.1.	Materias primas.....	33
2.1.2.	Reactivos.....	33
2.2.	Métodos	33
2.2.1.	Análisis de calidad	33
2.2.2.	Análisis de las materias primas lipídicas y los productos de la estructuración mediante cromatografía gas líquido (CGL)	35
2.2.3.	Identificación por cromatografía de capa fina (CCF).....	36
2.2.4.	Calorimetría Diferencial de Barrido	36
2.2.5.	Purificación de las muestras	37
2.3.	Obtención del concentrado de AGPICLn-3 con EPA+DHA a partir de ASCRD, mediante la optimización de las variables del proceso de complejación con urea.	37
2.3.1.	Hidrólisis básica del ASCRD para obtener ácidos grasos libres (AGL) ...	37
2.3.2.	Preparación de concentrados de AGPICLn-3 por inclusión con urea	38

2.3.3. Optimización y validación de las condiciones de obtención del concentrado AGPICLn-3 mediante metodología de superficie respuesta (MSR).	40
2.4. Síntesis de acilglicéridos estructurados con EPA/DHA en <i>sn</i> -2 (AEs) a partir del concentrado óptimo AGPICLn-3 con contenido máximo EPA+DHA obtenido en el Objetivo 1 y del ASCRD, mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (<i>Candida antarctica</i>) bajo CO ₂ SC.....	41
2.4.1. Síntesis de AEs con EPA y DHA en medio CO ₂ SC.....	41
2.4.2. Análisis posicional del AEs mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry).....	43
2.4.3. Optimización de las condiciones de obtención del AEs mediante Metodología de Superficie respuesta (MSR).....	45
2.5. Obtención de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA, a través de la incorporación de ácido gálico en el AEs con EPA/DHA en <i>sn</i> -2 del objetivo anterior, mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) bajo CO ₂ SC.....	45
2.5.1. Obtención de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico (AFEs).....	45
2.5.2. Análisis de la síntesis de AFEs con ácido gálico mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV	46
2.5.3. Análisis de la síntesis de AFEs con ácido gálico mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas.....	47
2.5.4. Optimización de las condiciones de obtención de AFEs mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR)	49
2.5.5. Actividad antioxidante del AFEs óptimo validado mediante determinación de la capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC)	50

2.5.6. Determinación de polifenoles totales en el AFEs óptimo validado.....	51
2.6. Análisis estadístico de las propiedades físicas y químicas de los aceites	52
2.7. Modelos matemáticos obtenidos mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR).....	52
2.8. Evaluación del efecto de la suplementación con los acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico (AFEs) en la reversión de alteraciones de los parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina, inducida por obesidad en un modelo murino.	53
2.8.1. Modelo animal	53
2.8.2. Pruebas biológicas	56
2.8.3. Análisis estadístico de los datos biológicos.....	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
3.1. Objetivo 1. Obtención de un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) con máximo contenido de EPA+DHA, a partir de aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de complejación con urea.	59
3.1.1. Ensayos preliminares	59
3.1.2. Obtención del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) con máximo contenido de EPA+DHA, a partir de aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de complejación con urea.....	68
3.1.3. Optimización del proceso de complejación con urea:	72
3.1.4. Validación del concentrado AGPICLn-3 óptimo:	73
3.1.5. Cromatografía en capa fina del concentrado AGPICLn-3 optimizado.....	75
3.1.6. Calorimetría diferencial de barrido del concentrado AGPICLn-3.....	76

3.2. Estructuración de acilglicéridos con EPA/DHA, a partir del concentrado óptimo de AGPICLn-3 obtenido en el objetivo 1 y del aceite de salmón refinado comercial (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (<i>Candida antarctica</i>) bajo CO ₂ SC.....	78
3.2.1. Optimización del proceso:	84
3.2.2. Validación del acilglicérido estructurado con EPA/DHA en <i>sn</i> -2 óptimo:85	
3.2.3. Análisis posicional del EPA y DHA en AEs, identificado en la matriz CHCA1 mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	87
3.2.4. Cromatografía en capa fina del AEs optimizado	90
3.2.5. Calorimetría diferencial de barrido del AEs optimizado	91
3.3. Obtención de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA a través de la incorporación de ácido gálico en el acilglicérido estructurado (AEs) obtenido en el objetivo anterior, mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis fenólica enzimática (<i>Thermomyces lanuginosus</i>) bajo CO ₂ SC.....	93
3.3.1. Optimización del proceso	98
3.3.2. Validación del triacilglicérido estructurado con EPA/DHA óptimo	100
3.3.3. Validación de la síntesis del acilglicérido fenólico estructurado (AFEs) óptimo, mediante cromatografía en capa fina (CCF)	102
3.3.4. Validación de la síntesis del acilglicérido fenólico estructurado (AFEs) mediante análisis estructural por HPLC-UV.	103
3.3.5. Validación estructural del AFEs óptimo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS).....	104
3.3.6. Validación de la síntesis de AFEs mediante la determinación de polifenoles totales.	108
3.3.7. Capacidad antioxidante del AFEs óptimo validado mediante ORAC.....	109
3.3.8. Calorimetría diferencial de barrido en AFEs	110

3.4. Objetivo 4. Evaluación del efecto del tratamiento con los acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA (AFEs) en la reversión de alteraciones de parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina inducida por obesidad en modelo murino.	112
3.4.1. Efecto del tratamiento con AFEs en la homeostasis de la glucosa:.....	112
3.4.2. Efecto del tratamiento con AFEs en marcadores de daño hepático.....	115
3.4.3. Perfil lipídico	117
CONCLUSIONES	121
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	122
ANEXOS	158

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Acciones fisiológicas de los eicosanoides y docosanoides derivados de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA).	8
Tabla 2. Diseño experimental de Box-Behnken por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de complejación para obtener concentrados AGPICLn-3.....	40
Tabla 3. Diseño compuesto de Draper-Lin por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención del acilglicérido estructurado (AEs).....	42
Tabla 4. Preparación de las matrices de α -ciano-4-hidroxicinámico, 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol y ácido 2,5-dihidroxibenzoico	44
Tabla 5. Diseño factorial de cribado 2^2 , de 2 factores y 7 experimentos (MSR). Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención de acilglicéridos fenólicos estructurados (AFEs).....	46
Tabla 6. Descripción de los productos lipídicos empleados en la suplementación del modelo murino.	55
Tabla 7. Caracterización física y química del ASCRD	59
Tabla 8. Caracterización química del aceite de pescado refinado y aceite de vegetal de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente.....	60
Tabla 9. Composición y cuantificación de ácidos grasos del aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD, expresados en (g/100g AGT)).....	62
Tabla 10. Resultados de la posición de EPA y DHA en el glicerol obtenidos mediante espectrometría de masas Maldi-TOF. Resumen de la presencia de EPA/DHA en el DG/TG de ASCRD identificados en las diferentes matrices.....	64
Tabla 11. Comportamiento térmico del ASCRD	67
Tabla 12. Diseño experimental de Box-Behnken mediante MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de complejación con urea para la obtención de concentrado AGPICLn-3 con un máximo contenido de EPA y/o DHA.....	68

Tabla 13. Análisis de varianza para cada variable respuesta en la optimización del proceso de obtención del concentrado AGPICL n-3.....	69
Tabla 14. Valores óptimos de las variables independientes para maximizar las respuestas EPA, DHA y EPA+DHA y su optimización conjunta.....	72
Tabla 15. Composición y cuantificación de ácidos grasos de ASCRD), Concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3)	74
Tabla 16. Comportamiento térmico de ASCRD y del concentrado AGPICLn-3	77
Tabla 17. Diseño compuesto de Draper-Lin por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención del acilglicérido estructurado (AEs).....	79
Tabla 18. Análisis de varianza para cada variable respuesta en la optimización del proceso de síntesis del AEs.	80
Tabla 19. Valores óptimos de las variables independientes para maximizar EPA, DHA, AP, EPA+DHA y EPA/DHA en <i>sn</i> -2 y su optimización conjunta.	84
Tabla 20. Composición y cuantificación de ácidos grasos de ASCRD, AGPICLn-3 y AEs mediante cromatografía gas-líquido (GCL).	86
Tabla 21. Estructuras probables con EPA/DHA en posición <i>sn</i> -2 del MG y TG de AEs identificada en la matriz previamente seleccionada CHCA1*	87
Tabla 22. Resumen de la presencia de EPA/DHA identificada en el acilglicérido estructurado con EPA/DHA en <i>sn</i> -2 (AEs), con respecto al ASCRD, en la matriz CHCA1.....	90
Tabla 23. Comportamiento térmico de ASCRD, concentrado AGPICLn-3 y AEs.	92
Tabla 24. Diseño factorial de cribado 2 ² , de 2 factores por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención AFEs.	93
Tabla 25. Análisis de varianza para cada variable respuesta en la optimización del proceso de acidólisis fenólica para sintetizar AFEs.	94

Tabla 26. Valores óptimos de las variables independientes presión y temperatura supercríticas para maximizar las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis fenólica de AFEs, así como su optimización conjunta.	98
Tabla 27. Composición y cuantificación de ácidos grasos de a) ASCRD, b) AGPICLn-3, c) AEs y d) Acilglicéridos fenólicos estructurados (AFEs)	101
Tabla 28. Comportamiento térmico de ASCRD, AGPICLn-3, AEs y AFEs.	110
Tabla 29. Resumen de análisis y resultados que permitieron comprobar la estructuración efectiva de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico (AFEs)	111
Tabla 30. Resumen de los efectos significativos de la suplementación con AFEs en este estudio.	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de un triacilglicérido. Numeración (<i>sn</i>) estereoespecífica <i>sn</i> -1, <i>sn</i> -2 y <i>sn</i> -3 en la que pueden unirse los ácidos grasos mediante enlaces éster	3
Figura 2. Digestión y absorción de triacilglicéridos.	5
Figura 3. Transformación metabólica de los ácidos grasos n-6 y n-3.....	7
Figura 4. Vías metabólicas para la producción de mediadores lipídicos derivados de AGPCLn-6 y AGPICL n-3.....	9
Figura 5. Diagrama general del proceso de captación de glucosa (músculo).	12
Figura 6. Estructura de los compuestos de inclusión con urea.....	19
Figura 7. Reacciones de hidrólisis, síntesis y de transferencia de grupos catalizadas por las lipasas.....	23
Figura 8. Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia, correspondiente a una sustancia pura..	25
Figura 9. Estructura química del ácido gálico y de algunos de sus derivados, incluyendo galato de epigalocatequina, metil galato, etil galato y propil galato.	28
Figura 10. Diagrama de bloques del proceso de complejación con urea a temperatura ambiente para obtener concentrados.	39
Figura 11. Esquema del equipo de CO ₂ supercrítico	41
Figura 12. Diagrama general del análisis de muestras mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.....	44
Figura 13. Diagrama de trabajo para la suplementación del modelo murino	55
Figura 14. Cromatografía en capa fina del ASCRD purificado y no purificado.	66
Figura 15. Termograma de fusión del ASCRD.....	66
Figura 16. Diagramas de Pareto estandarizados de los efectos de las variables independientes relación U/AGL y temperatura de cristalización, sobre las variables respuestas EPA, DHA y EPA+DHA	70

Figura 17. Gráficos de superficie respuesta y contorno de la combinación de las variables relación U/AGL y temperatura de cristalización sobre las variables respuestas EPA, DHA y EPA+DHA.....	71
Figura 18. a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA, DHA y EPA+DHA. b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.....	73
Figura 19. Separación cromatográfica en capa fina del concentrado AGPICLn-3.....	76
Figura 20. Termograma de fusión del concentrado AGPICLn-3.....	76
Figura 21. Comparación entre los termogramas de fusión del concentrado AGPICLn-3 y el ASCRD.....	78
Figura 22. Diagramas de Pareto estandarizados de los efectos de las variables independientes temperatura y presión supercríticas sobre las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en posición <i>sn-2</i>	82
Figura 23. Gráficos de superficie respuesta y gráficos de contorno de la combinación de las variables independientes temperatura y presión supercríticas sobre las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en <i>sn-2</i>	83
Figura 24. a) Gráfico de superficie respuesta de la optimización conjunta de las variables respuestas EPA, DHA, AP, EPA+DHA y EPA/DHA en posición <i>sn-2</i> . b) Gráfico de contorno de los niveles que maximizan la función deseabilidad..	85
Figura 25. Reporte de espectros resultantes del análisis de AEs, obtenido entre los valores de relación masa/carga 100 y 900 m/z.....	89
Figura 26. Separación cromatográfica en capa fina de AEs	90
Figura 27. Termograma de fusión de AEs respecto al ASCRD.....	91
Figura 28. Diagramas de Pareto estandarizados de los efectos de las variables independientes temperatura y presión supercríticas sobre las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis de AFEs.....	96

Figura 29. Gráficos de superficie respuesta y contorno de la combinación de las variables independientes temperatura y presión supercríticas sobre las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis fenólica de AFEs.	97
Figura 30. a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis de AFEs. b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.	99
Figura 31. Separación cromatográfica en capa fina de AFEs.	102
Figura 32. Cromatogramas (HPLC) a 280 y 215 nm del AFEs óptimo validado.	103
Figura 33. Esquema general de las reacciones de acidólisis enzimática (<i>T. Lanuginosus</i>) entre los acilglicéridos estructurados con EPA/DHA en <i>sn</i> -2 (AEs) obtenidos en el Objetivo 2 y el ácido gálico, para la obtención de acilglicéridos fenólicos (AFEs).	104
Figura 34. Espectro de fragmentación de una de las moléculas identificadas en AFEs, con señal m/z de 655.	105
Figura 35. Estructura determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas(LC-MS) para una de las moléculas lipídicas/fenólicas identificadas en AFEs.	106
Figura 36. Curva de calibración con ácido gálico.	108
Figura 37. Comparación de los termogramas de fusión del ASCRD y del AFEs	111
Figura 38. Efectos de la suplementación con AFEs en el control de la glicemia y de la insulina en ratones obesos (*p < 0,05, **p < 0,01).	113
Figura 39. Efectos de la suplementación con AFEs sobre marcadores hepáticos en ratones obesos (*p < 0,05).	115
Figura 40. Histología hepática de los ratones alimentados con una dieta alta en grasas (DAG) complementada con los diferentes suplementos.	117
Figura 41. Perfil lipídico del suero, peso del tejido adiposo y peso de los ratones obesos en estudio (*p < 0,05).	118

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado del Comité Institucional de cuidado y uso de animales	158
Anexo 2. Certificado de la Unidad de prevención de Riesgos & Bioseguridad	159
Anexo 3. Publicaciones de la estudiante.....	160
Anexo 4. Asistencia a congresos nacionales e internacionales.....	161
Anexo 5. Premios.....	163

ABREVIATURAS

2-MAG: 2-monoacilglicerol

AA: Ácido araquidónico

AAPH: 2,2-azo-bis (2-amidino-propano)

AEs: Acilglicéridos estructurados con EPA/DHA en posición *sn-2*

AFEs: Acilglicéridos fenólicos estructurados con EPA/DHA en *sn-2* y ácido gálico

AG: Ácido gálico

AGL: Ácidos grasos libres

AGM: Ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

AGPICL: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

AGPICL $n-3$: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3

AGS: Ácidos grasos saturados

AGT: Ácidos grasos totales (g/100g)

AL: Ácido linoleico

ALA: Ácido α -linolénico

ALP: Fosfatasa alcalina

AM: Aceite de maravilla

AM+AG: Aceite de maravilla + ácido gálico

AOCS: American Oil Chemists' Society (por sus siglas en inglés)

AP: Ácido palmítico

AS+AG: Aceite de salmón (ASCRD) + ácido gálico

ASCRD: Aceite de salmón comercial refinado desodorizado

AUC: Área bajo la curva de glucosa

CCF: Cromatografía en capa fina

CGL: Cromatografía de gas-líquido

CHCA1: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

CMBT1: 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol

CO₂SC: CO₂ en medio supercrítico

CODEX: Codex Alimentarius (Normas alimentarias establecidas por la FAO/OMS)

COX: ciclooxigenasas

DAG: Dieta alta en grasas

DC: Dieta control

DG: Diacilglicéridos

DHA: Ácido docosaheptanoico

DHB1: ácido 2,5-dihidroxibenzoico

DPA: Ácido docosapentaenoico

DSC: Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés)

DT2: Diabetes mellitus tipo 2

EE: Ésteres etílicos de ácidos grasos

EFSA: European Food Safety Authority

EMAG: Ésteres metílicos de ácidos grasos

ENT: Enfermedades no transmisibles

EPA/DHA en *sn-2*: ácidos grasos EPA o DHA ubicados en posición *sn-2* del glicerol

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FINUT: Fundación Iberoamericana de Nutrición

FL: Sonda de fluoresceína

FSC: Fluidos en medio supercrítico

GOED: Organización Global para el EPA y DHA

GOT: Transaminasa glutámica oxalacética

GPT: Transaminasa glutámica pirúvica

GRAS: Sustancia generalmente reconocida como segura

HOMA-IR: Índice de modelo homeostático de evaluación de resistencia a la insulina

HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de luz UV

HRS: Hígado de ratón sano

IMC: Índice de masa corporal

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

LC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas

MALDI-TOF: Ionización-desorción asistida por matriz en tiempo de vuelo

MG: Monoacilglicérido

MSR: Metodología de Superficie Respuesta

n-3: Ácidos grasos omega 3 (ω -3)

n-6: Ácidos grasos omega 6 (ω -6)

ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PC: Punto crítico (en referencia a fluidos supercríticos)

PFB: Punto de fusión bajo (en referencia a la calorimetría diferencial de barrido)

PFM: Punto de fusión medio (en referencia a la calorimetría diferencial de barrido)

RI: Resistencia a la insulina

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RSA: Reglamento Sanitario de los Alimentos (Chile)

SC: condiciones supercríticas

TEs: Triacilglicéridos estructurados

TG: Triacilglicérido

TLL: *Thermomyces lanuginosus*

TROLOX: ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

U/AGL: Relación establecida entre las proporciones de urea y ácidos grasos libres (g)

RESUMEN

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICLn-3) han obtenido una creciente atención en las últimas décadas. Nutricionalmente, los ácidos *cis*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (20:5n-3, EPA) y *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (22:6n-3, DHA) son los más importantes en la familia omega-3. Su consumo ha sido asociado a una prevalencia menor de enfermedades no transmisibles [Ofosu *et al.*, 2017] así como a la disminución de biomarcadores inflamatorios [Kavyani *et al.*, 2022], la mortalidad y el riesgo cardíaco [Takahashi *et al.*, 2017]. Por otra parte, el ácido gálico es un compuesto fenólico añadido a los alimentos como antioxidante, del cual se ha descrito que puede regular la homeostasis de la glucosa y de los lípidos [Ge *et al.*, 2018; Donado-Pestana *et al.*, 2018]. Esta información proporciona una base farmacológica para que pueda usarse como un metabolito antioxidante coadyuvante en hiperglicemia y resistencia a la insulina. Tanto el ácido gálico como los AGPICLn-3 podrían ser estructurados en acilglicéridos mediante reacciones enzimáticas empleando lipasas, por sus ventajas demostradas en la modificación de aceites [Chaurasia *et al.*, 2016]. Estas estructuraciones enzimáticas pueden ocurrir en medio CO₂ supercrítico, que permite acelerar la transferencia de masa en dichas reacciones [Budisa & Schulze-Makuch, 2014]. De esta forma sería posible obtener acilglicéridos fenólicos estructurados, que ofrezcan propiedades combinadas, tanto de los fenoles como de los AGPICLn-3, con el consumo de un único compuesto.

El objetivo general de esta tesis fue obtener acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico mediante acidólisis enzimática en medio CO₂ supercrítico y evaluar su efecto en la reversión de alteraciones en los parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina, inducida por obesidad en un modelo murino.

El primer objetivo fue obtener un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) mediante la optimización del proceso de complejación con urea. La optimización se realizó mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR) utilizando un diseño experimental de Box-Behnken para maximizar las variables respuestas contenido de EPA, DHA y EPA+DHA; siendo el aceite de salmón comercial

refinado desodorizado (ASCRD) la materia prima de partida y obteniéndose finalmente un concentrado AGPICLn-3 óptimo con 41,33 g/100g AGT de EPA+DHA.

El segundo objetivo contempló la estructuración de acilglicéridos con EPA/DHA (AEs) mediante reacciones de acidólisis enzimática (lipasa b de *Candida antarctica*) partiendo del concentrado AGPICLn-3 obtenido en el objetivo 1 y del aceite inicial (ASCRD). Estas reacciones se efectuaron en medio CO₂ supercrítico y se optimizaron mediante MSR, maximizando el contenido de EPA, DHA, EPA+DHA, EPA/DHA en posición *sn*-2 del glicerol y minimizando el contenido de ácido palmítico.

El tercer objetivo consistió en obtener acilglicéridos fenólicos estructurados (AFEs) utilizando la enzima lipasa de *T. lanuginosus*, para incluir ácido gálico en las posiciones *sn*-1/*sn*-3 del glicerol. Las materias primas de partida fueron el AEs obtenido en el objetivo 2 y el ácido gálico. Este proceso bajo condiciones de CO₂ supercríticas se optimizó mediante MSR, maximizando el contenido de EPA, DHA, EPA+DHA y el porcentaje de síntesis de los acilglicéridos fenólicos (% acidólisis fenólica); resultando en un AFEs optimizado con 33,3% de acidólisis fenólica, 19,55 g/100g AGT de EPA+DHA y 12 ± 0,10 mg de ácido gálico por ml de AFEs.

En el cuarto objetivo se evaluó el efecto de la suplementación con AFEs en la reversión de alteraciones de los parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina inducida por obesidad en un modelo murino. Se obtuvo una disminución significativa ($*p < 0,05$) del área bajo la curva de glucosa, la glicemia e insulina en ayunas, el índice HOMA y la grasa visceral en el grupo suplementado con AFEs, con respecto al grupo suplementado con aceite de maravilla (manteniéndose en ambos la dieta alta en grasas).

Los resultados obtenidos confirman la hipótesis planteada de que es posible estructurar acilglicéridos fenólicos que contengan EPA/DHA y ácido gálico mediante acidólisis enzimática en medio CO₂ supercrítico, y que el tratamiento con dichos estructurados fenólicos influye en la reversión de alteraciones en los parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina, inducida por obesidad en modelo murino.

ABSTRACT

Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFALC_n-3) have gained increasing attention in recent decades. Nutritionally, cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA) and cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) are the most important of the omega-3 family. Its consumption has been associated with a lower prevalence of non-communicable diseases [Ofosu *et al.*, 2017] as well as a decrease in inflammatory biomarkers [Kavyani *et al.*, 2022], mortality, and cardiac risk [Takahashi *et al.*, 2017]. On the other hand, gallic acid is a phenolic compound added to food as an antioxidant, which has been described as able to regulate glucose and lipid homeostasis [Ge *et al.*, 2018; Donado-Pestana *et al.*, 2018]. This information provides a pharmacological basis for its use as an adjuvant antioxidant metabolite in hyperglycemia and insulin resistance. Both gallic acid and PUFALC_n-3 could be structured into acylglycerides by enzymatic reactions using lipases due to their demonstrated advantages in modifying oils [Chaurasia *et al.*, 2016]. These enzymatic structures can occur in a supercritical CO₂ medium, which allows accelerating mass transfer in these reactions [Budisa & Schulze-Makuch, 2014]. In this way, it would be possible to obtain structured phenolic acylglycerides, which offer combined properties of phenols and PUFALC_n-3, by consuming a single compound.

The general objective of this thesis was to obtain phenolic acylglycerides with EPA/DHA and gallic acid by enzymatic acidolysis in a supercritical CO₂ medium and to evaluate its effect on the reversal of alterations in the biochemical parameters associated with insulin resistance induced by obesity in a model murine.

The first objective was to obtain a concentrate of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFALC_n-3) by optimizing the urea complexation process. The optimization was carried out using the Response Surface Methodology (RSM) using a Box-Behnken experimental design to maximize the response variables EPA, DHA, and EPA+DHA content; refined deodorized commercial salmon oil (RDCSO) being the starting raw material and finally obtaining an optimal PUFALC_n-3 concentrate with 41.33 g/100g TFA of EPA+DHA.

The second objective contemplated the structuring of acylglycerides with EPA/DHA (AEs) by enzymatic acidolysis reactions (lipase b from *Candida antarctica*) starting from the PUFALCn-3 concentrate obtained in objective one and the initial oil (RDCSO). These reactions were carried out in a supercritical CO₂ medium. They were optimized by RSM, maximizing the content of EPA, DHA, EPA+DHA, and EPA/DHA in the *sn*-2 position of glycerol and minimizing palmitic acid content.

The third objective was to obtain structured phenolic acylglycerides (AFEs) using the enzyme lipase from *T. lanuginosus*, to include gallic acid in the *sn*-1/*sn*-3 positions of glycerol. The starting raw materials were the AEs obtained in objective two and gallic acid. This process under supercritical CO₂ conditions was optimized by RSM, maximizing the content of EPA, DHA, EPA+DHA, and the percentage of synthesis of phenolic acylglycerides (% phenolic acidolysis), resulting in an optimized AFEs with 33.3% phenolic acidolysis, 19.55 g/100g TFA of EPA+DHA and 12 ± 0.10 mg of gallic acid per ml of AFEs.

In the fourth objective, the effect of supplementation with AFEs on the reversal of alterations in biochemical parameters associated with insulin resistance induced by obesity in a murine model was evaluated. A significant decrease (*p < 0.05) was obtained in the area under the glucose curve, fasting glucose and insulin, the HOMA index, and visceral fat in the group supplemented with AFEs, compared to the group supplemented with sunflower oil (keeping both on the high-fat diet).

The results confirm the hypothesis that it is possible to structure phenolic acylglycerides containing EPA/DHA and gallic acid by enzymatic acidolysis in a supercritical CO₂ medium, and treatment with said phenolic structures influences the reversal of alterations in the biochemical parameters associated with insulin resistance induced by obesity in a murine model.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos dietarios se consideran macronutrientes fundamentales en la alimentación humana. Son componentes integrales de todos los sistemas celulares y cumplen roles energéticos, estructurales y regulatorios en el organismo. Los ácidos grasos de la dieta se encuentran agrupados principalmente como triacilglicéridos en el tejido adiposo blanco, que es capaz de almacenar una gran cantidad de energía (~7.000 kcal/kg) [Galgani *et al.*, 2015]. Son compuestos químicamente diversos que pueden obtenerse a partir de animales, plantas y microorganismos mediante una amplia variedad de métodos, y cuyos beneficios potenciales van mucho más allá de su rol como combustible [Burlingame *et al.*, 2009]. Tal es el caso de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega 3 (AGPICLn-3), cuyos principales exponentes son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Sus fuentes naturales más importantes son organismos marinos (peces, mariscos, algas), que se alimentan, directa o indirectamente, de fitoplancton, el principal productor de omega-3 en la cadena trófica.

En las últimas décadas se ha incrementado el interés de los consumidores con respecto a las propiedades nutricionales de los AGPICLn-3 (EPA+DHA). El consumo de los aceites que contienen este tipo de ácidos grasos se ha asociado a una baja prevalencia de enfermedades cardíacas, circulatorias e inflamatorias [Minihane *et al.*, 2016]. Los AGPICLn-3 manifiestan su papel como mediadores lipídicos bioactivos de la acción ejercida por dietas ricas en estos compuestos [Schunck *et al.*, 2018]. Además, diferentes estudios clínicos indican su eficacia en la disminución de distintos biomarcadores inflamatorios [Kavyani *et al.*, 2022]. Una relación adecuada de n-6/n-3 en la dieta, unido al consumo diario de AGPICLn-3, se asocia con la menor prevalencia de enfermedades no transmisibles (ENT) [Ofosu *et al.*, 2017] y con la disminución de la mortalidad [Zhang *et al.*, 2018].

La demanda de AGPICLn-3 en la población ha impulsado el surgimiento de nuevos desafíos para concentrar o purificar estos ácidos grasos a partir de aceites de pescado [Furche & Martinez, 2011] y así obtener suplementos enriquecidos. Sin embargo, la

entrega de EPA y DHA como ácidos grasos libres concentrados no es la condición más deseable debido a su baja estabilidad oxidativa (por el mayor número de dobles enlaces en la cadena carbonada). El perfil general de los ácidos grasos así como la estructura intramolecular de las grasas de la dieta son importantes cuando se consideran sus efectos nutricionales [Mu & Porsgaard, 2005; Genot *et al.*, 2016]. Una forma química más estable a considerar para el consumo humano sería la estructuración de estos concentrados AGPICLn-3 en forma de triacilglicéridos [Wang *et al.*, 2012a] ya que se ha descrito que es posible mejorar sus propiedades nutricionales o funcionales mediante dicha estructuración [Moreno & Perea, 2008]. Además, se podrían incorporar al triacilglicérido otras moléculas de naturaleza no lipídica, como los antioxidantes fenólicos. De esta manera sería posible retrasar la oxidación y potenciar su actividad biológica; indicando la relevancia de nuevos estudios al respecto.

1.1. Estructuras lipídicas

1.1.1. Ácidos grasos

Los principales componentes de los lípidos biológicos son los ácidos grasos, esenciales en la nutrición humana como fuente de energía y para cumplir funciones de carácter metabólico y/o estructural [Rossmeisl *et al.*, 2011; *FAO-OMS/FINUT*, 2012]. Generalmente, se encuentran formando parte de triacilglicéridos, fosfolípidos y ésteres de esterol. Poseen una amplia variedad de funciones metabólicas esenciales y son una rica fuente de energía (9 kcal/g) de almacenamiento, permiten el aislamiento térmico, eléctrico y mecánico, forman parte de la estructura de membrana influenciando su fluidez y su actividad asociada a proteínas. También pueden ser moléculas señalizadoras intracelulares que responden a estímulos extracelulares, pueden ser precursores de mediadores lipídicos como los eicosanoides y pueden modular la transcripción de genes [Kremmyda *et al.*, 2011; Watkins & German, 2017].

Los ácidos grasos son estructuras hidrocarbonadas formadas por 4 o más carbonos unidos a un grupo funcional ácido carboxilo. El número de átomos de carbono y el grado de insaturación que poseen es determinante en sus propiedades físicas y químicas

[Valenzuela & Valenzuela, 2013]. Según el largo de la cadena carbonada se organizan de la siguiente forma: los ácidos grasos saturados se clasifican en ácidos grasos de cadena corta (3 a 7 carbonos), ácidos grasos de cadena media (8 a 13 carbonos), ácidos grasos de cadena larga (14 a 20 carbonos) y ácidos grasos de cadena muy larga (21 o más carbonos). Los ácidos grasos insaturados por su parte se clasifican en: ácidos grasos de cadena corta (19 carbonos o menos), ácidos grasos de cadena larga (entre 20-24 carbonos) y ácidos grasos de cadena muy larga (con 25 o más carbonos) (FAO-OMS/FINUT, 2012). En cuanto al grado de insaturación se organizan en tres grupos: saturados (AGS) que son de cadena lineal y no poseen dobles enlaces, ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) que poseen un doble enlace, y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que poseen dos o más dobles enlaces. De esta manera, los ácidos grasos de cadena larga con dos o más insaturaciones se abrevian como AGPICL (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga).

1.1.2. Triacilglicéridos

Los triacilglicéridos son compuestos constituidos por una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos, unidos a través de enlaces tipo éster, formados entre los grupos hidroxilo del glicerol y los grupos carboxilo de los ácidos grasos (TG, **Figura 1**). Las características físicas, químicas, nutricionales y los efectos en la salud de los TG están influenciados en gran medida por el tipo, distribución y proporción de los ácidos grasos en su estructura. En cuanto a la distribución, es relevante desde el punto de vista nutricional la estequiometría de los TG.

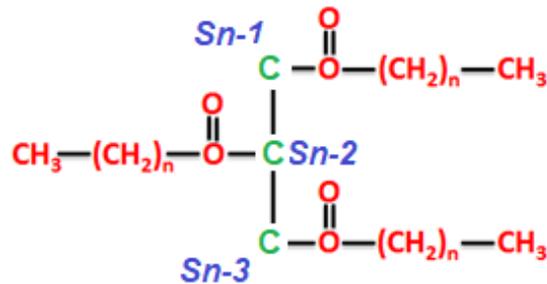


Figura 1. Estructura de un triacilglicérido. Numeración (sn) estereoespecífica sn-1, sn-2 y sn-3 en la que pueden unirse los ácidos grasos mediante enlaces éster en el TG. Fuente: Modificado de Valenzuela y Valenzuela (2013).

Estas moléculas son estructuralmente asimétricas, de modo que cada unión del glicerol con un ácido graso particular es diferente de otra, dependiendo de la posición de la unión de los ácidos grasos con el respectivo grupo hidroxilo del glicerol. Las moléculas que son estereoquímicamente numeradas de esta manera tienen el prefijo “*sn*” (*sn*= numeración estereoespecífica) inmediatamente precedida por el término “glicerol” en el nombre del compuesto [Valenzuela y Valenzuela, 2013].

Las diferencias en la distribución de los ácidos grasos en las tres posiciones del glicerol (*sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3) en los TG dietarios implica algunas particularidades ya que en la posición *sn*-2; por ejemplo, se facilita la absorción en el enterocito como 2-monoacilglicerol (Badui, 2006; Ratnayake & Galli, 2009; *FAO-OMS/FINUT*, 2012).

1.1.3. Digestión y absorción de TG

El proceso de digestión de los TG está mediado por la acción de enzimas lipolíticas, denominadas lipasas, así como de cofactores, hormonas y sales biliares que son necesarios para la actividad específica de cada una de estas enzimas. Su denominación bioquímica es acil-éster-hidrolasas y son enzimas relativamente específicas en su actividad catalítica, distinguiéndose algunas de ellas por su alta estereoespecificidad (capacidad de seleccionar e hidrolizar en forma específica una o algunas de las uniones ésteres de los ácidos grasos con el glicerol en las posiciones *sn*-1, *sn*-2 o *sn*-3 (Valenzuela *et al.*, 2002).

En un principio, los TG son hidrolizados parcialmente por la lipasa lingual y la lipasa gástrica (**Figura 2**) que son de alta especificidad para la posición *sn*-3, dando lugar a la formación de 1,2 diacilglicéridos (1,2-DG), una pequeña porción de 2 monoacilglicerol (2-MAG) y ácidos grasos libres (AGL) con cadenas carbonadas de distinto tamaño. Estos compuestos pasan al intestino donde actúa la lipasa pancreática (estereoespecífica para las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del TG) y la carboxil ester hidrolasa (inespecífica, actúa a nivel de diacilglicéridos principalmente). Estas hidrólisis en el intestino producen 2-MAG y AGL. Los 2-MAG se absorben a través del enterocito facilitando la absorción de AG que se encuentren en la posición *sn*-2 y la retención de estos en los glicerolípidos

que se generan y transfieren posteriormente a los tejidos (Dominiczak *et al.*, 2014). Los AGL obtenidos en la hidrólisis serán adsorbidos dependiendo de su largo de cadena y número de insaturaciones. Los de cadena corta y media y el glicerol pueden solubilizarse en la fase acuosa del contenido intestinal, absorbidos, unidos a la albúmina y transportada al hígado vía porta donde se oxidan rápidamente como fuente energética.

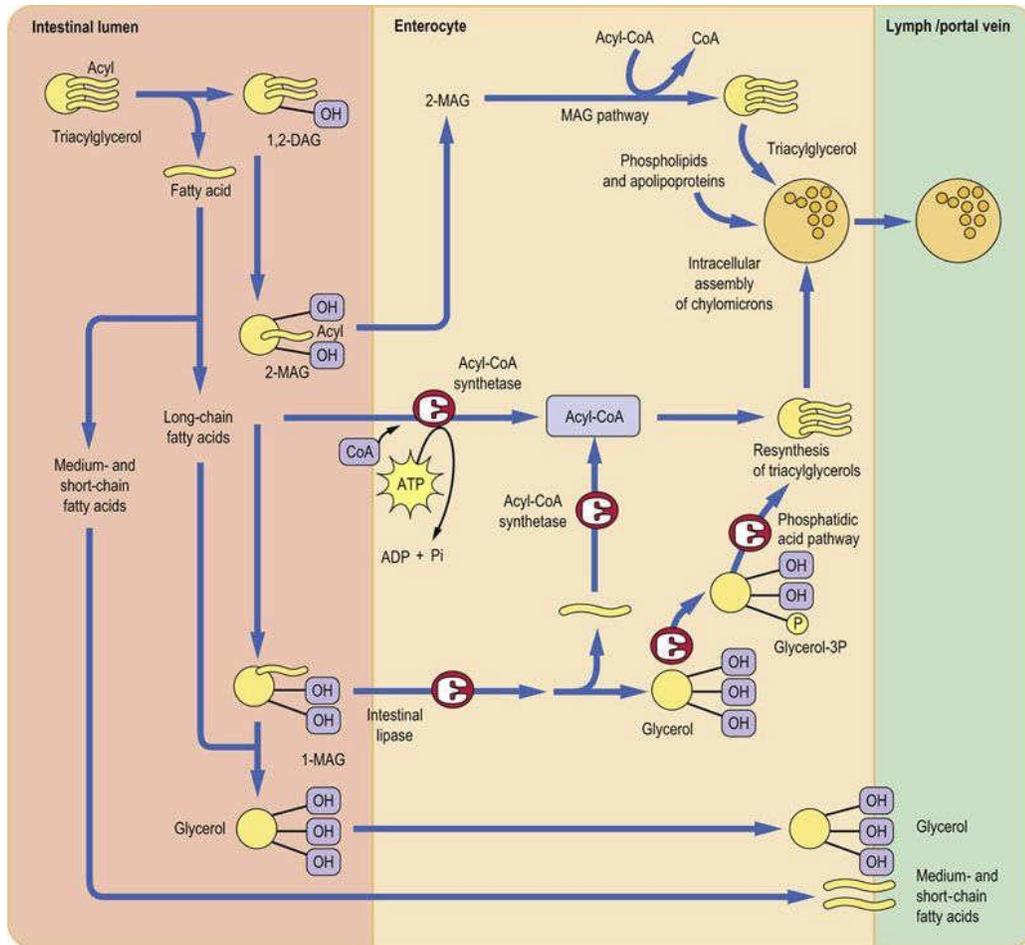


Figura 2. Digestión y absorción de triacilglicéridos. Fuente: Dominiczak *et al.*, 2014.

Los otros productos de la hidrólisis, como los AGPICL y 2-MAG son emulsificados con sales biliares y lecitina para formar micelas, ser absorbidos a través de la pared intestinal y posteriormente ser re-esterificados a TG en el enterocito. Los nuevos TG re-esterificados pasarán a formar parte de los quilomicrones junto con apolipoproteínas de novo, alcanzando luego la circulación periférica a través de los vasos linfáticos

[Valenzuela *et al.*, 2002]. Por su parte, los AGL saturados de cadena larga forman jabones insolubles al reaccionar con iones divalentes y se eliminan en las deposiciones [Ramírez *et al.*, 2001; Dominiczak *et al.*, 2014].

1.1.4. Ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados son aquellos con dos o más dobles enlaces en su cadena carbonada. Brindan características estructurales y funcionales a diferentes componentes biológicos e intervienen en los diferentes procesos bioquímicos celulares, de transporte y respuesta celular ante estímulos. Están involucrados en procesos fisiológicos, que incluyen la respuesta inmune, entre otras funciones [Sahena *et al.*, 2009]. Los dos grupos de mayor importancia son los que forman la familia de la serie n-6 y la familia de la serie n-3 y se diferencian entre sí por la posición del primer doble enlace de la cadena carbonada, contando a partir del extremo metilo de la molécula de ácido graso (nomenclatura omega).

Entre estos tipos de ácidos grasos encontramos al ácido linoleico (AL, n-6) y ácido α -linolénico (ALA, n-3), que son ácidos grasos considerados esenciales ya que los mamíferos no pueden sintetizarlos y por tanto deben obtenerse de la dieta. Las plantas sí pueden sintetizar AL y ALA al introducir dobles enlaces en las posiciones $\Delta 12$ y $\Delta 15$, a partir del extremo carboxilo terminal (nomenclatura delta) [Ratnayake & Galli, 2009; Crawford *et al.*, 2009; FAO-OMS/FINUT, 2012] mientras que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para insertar dobles enlaces en los átomos de carbono que están más allá del carbono 9 ($\Delta 9$) [Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005; Watkins & German, 2017].

El AL y el ALA pueden entonces obtenerse de la dieta y ser modificados mediante reacciones alternas de desaturación y alargamiento que tienen lugar en el hígado (**Figura 3.**) Primeramente ocurre la inserción de un doble enlace en la posición $\Delta 6$ del AL y del ALA por la acción de la $\Delta 6$ -desaturasa, luego tiene lugar el alargamiento de dos unidades de carbono de la cadena mediante la elongasa y la introducción de otro doble enlace en la posición $\Delta 5$ mediante la $\Delta 5$ -desaturasa para formar el ácido araquidónico (20:4n-6 o AA) y el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 o EPA), respectivamente. Estos ácidos (AA y EPA) son alargados mediante dos unidades de

carbono a 22:4n-6 y 22:5n-3 (DPA) y posteriormente un alargamiento adicional de 22:4n-6 y 22:5n-3 mediante dos unidades de carbono produce 24:4n-6 y 24:5n-3, respectivamente. A continuación, estos AGPICL de 24 carbonos son desaturados por la $\Delta 6$ -desaturasa para producir 24:5n-6 y 24:6n-3. Esta es la misma enzima que desatura al AL y al ALA. El ácido docosahexaenoico (22:6n-3 o DHA) se obtiene a partir del acortamiento de dos unidades de carbono de la cadena carbonada del 24:6n-3 durante un ciclo de la ruta β -peroxisómica. Mediante el mismo mecanismo de acortamiento de la cadena, el 24:5n-6 da lugar al 22:5n-6. Las enzimas mencionadas intervienen en estas dos vías metabólicas de transformación de los ácidos grasos AL y ALA y al ser compartidas existe competencia entre ambas vías, por lo que el equilibrio entre estos ácidos grasos y sus derivados AGPICL en la dieta es fundamental [Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005; Ratnayake & Galli, 2009; Crawford *et al.*, 2009; FAO-OMS/FINUT, 2012; Valenzuela *et al.*, 2014; O'Keefe & Sarnoski, 2017].

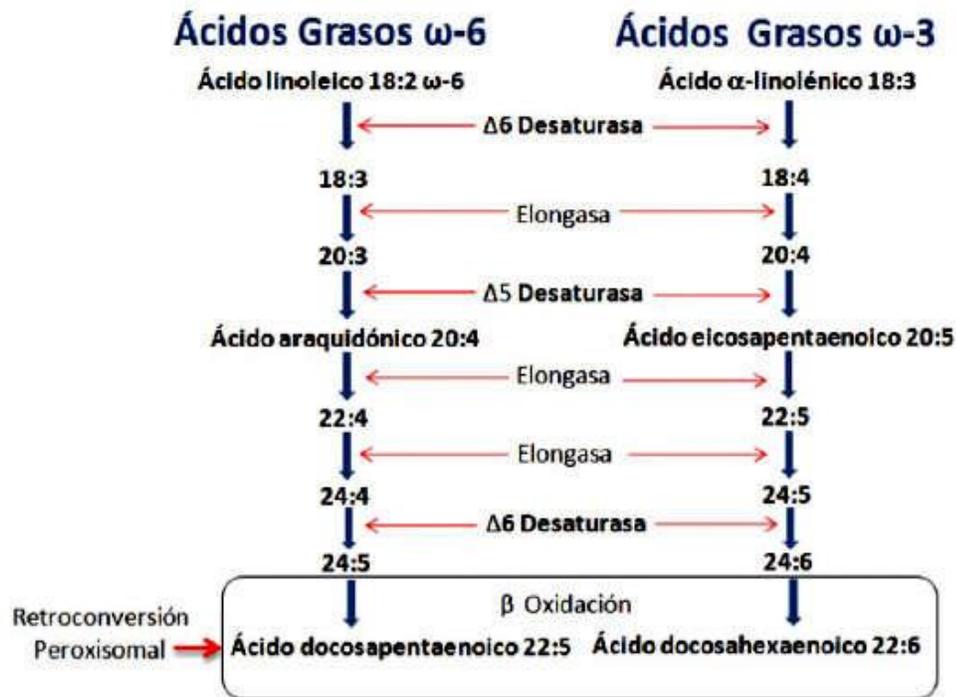


Figura 3. Transformación metabólica de los ácidos grasos n-6 y n-3. Fuente: Valenzuela *et al.*, 2011.

1.1.5. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga: EPA y DHA

EPA y DHA son sustratos para la formación de una serie de derivados lipídicos como prostaglandinas de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5 llamados eicosanoides (derivados de EPA, y diferentes a los eicosanoides derivados del ácido araquidónico como las prostaglandinas de la serie 2 y los leucotrienos de la serie 4) y docosanoides (derivados de DHA), los cuales ejercen importantes funciones en el metabolismo celular [Valenzuela *et al.*, 2002].

Al formarse AGPICL de los grupos n-6 y n-3 mediante la serie de desaturaciones y elongaciones ya mencionadas (punto 1.1.4) AA y EPA compiten por la síntesis de eicosanoides. EPA compite con el AA por los niveles de enzimas ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX) para dar lugar a la formación de DHA. Desde la perspectiva inmunológica, se ha reportado que los AGPICLn-3 poseen efectos anti-inflamatorios directos al ser precursores de eicosanoides con esas propiedades (**Tabla 1**), provenientes principalmente de la actividad de la isoenzima COX-2. Igualmente se ha reportado que poseen efectos anti-inflamatorios indirectos al competir por las enzimas COX-2 y las LOX con el AA, que por efecto de estas enzimas da origen a los principales eicosanoides de las vías pro-inflamatorias [FAO-OMS/FINUT, 2012].

Tabla 1. Acciones fisiológicas de los eicosanoides y docosanoides derivados de los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosaheptaenoico (DHA). Extraído de FAO-OMS/FINUT, 2012.

Eicosanoide/Docosanoide	Acción fisiológica
PGE3	Antiagregante leve y vasodilatador.
PGI3	Antiagregante leve.
TXA3	Proagregante muy leve.
EPA Resolvina E1	Potente antiinflamatorio
DHA Resolvina D	Potente antiinflamatorio
DHA Protectina D1	Potente antiinflamatorio

*PG: prostaglandina; TX: tromboxano.

Un resumen del metabolismo oxidativo del AA, EPA y DHA para la producción de eicosanoides, resolvinas y protectinas se muestra en la **Figura 4**.

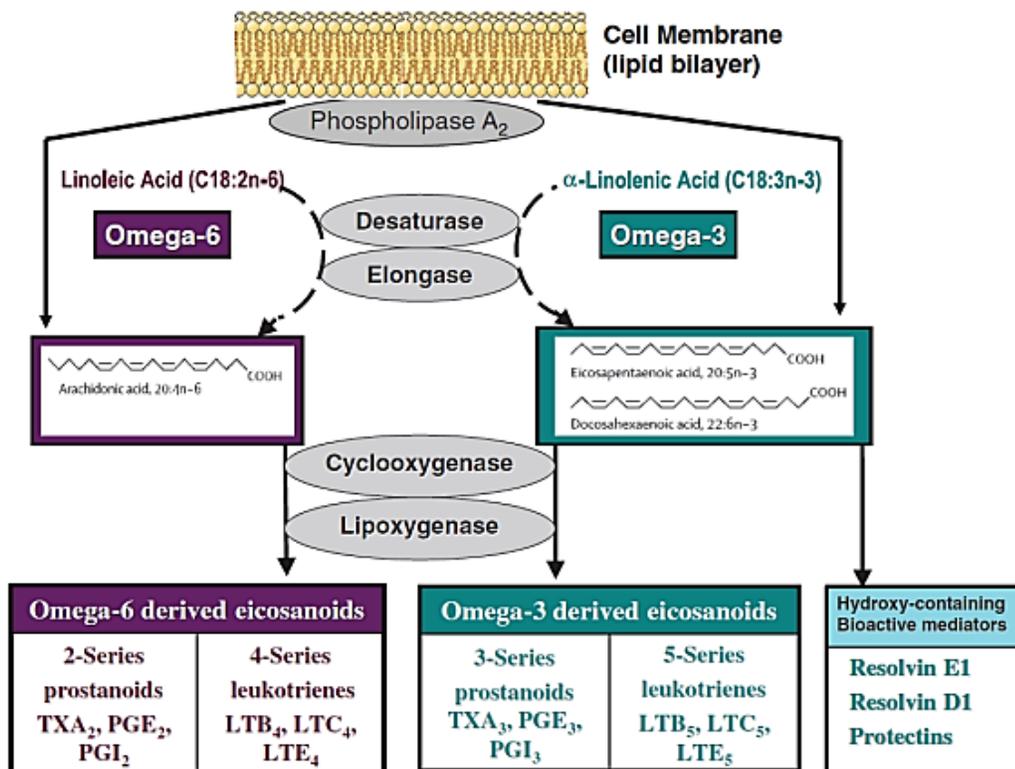


Figura 4. Vías metabólicas para la producción de mediadores lipídicos derivados de AGPCLn-6 y AGPICL n-3. LT: leucotrieno; PG: prostaglandina; TX: tromboxano. Fuente: Kang & Weylandt, 2008.

Estos últimos compuestos mencionados son derivados cíclicos de los AGPICL y se ha reportado su actividad biológica incluyendo prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT). En las dos rutas principales de formación de eicosanoides intervienen las enzimas mencionadas: la ciclooxigenasa (COX) que transforma los ácidos grasos en prostanoides (PG y TX) y la lipooxigenasa (LOX) que transforma los ácidos grasos en LT principalmente. Al ser diferentes el número de dobles enlaces de AA y EPA, cada uno de estos ácidos grasos da lugar a una serie diferente de eicosanoides. Los prostanoides de la serie 2 (Tromboxano A2, Prostaglandina E2 y Prostaglandina I2) y los leucotrienos de la serie 4 (Leucotrienos B4, C4 y E4) se forman a partir del AA en

respuesta a una lesión o estrés, mientras que los prostanoides de la serie 3 (Tromboxano A3, Prostaglandina E3 y Prostaglandina I3) y los leucotrienos de la serie 5 (Leucotrienos B5, C5 y E5) se producen a partir del EPA para la modulación de la formación de los derivados de AA [Valenzuela *et al.*, 2011; Kremmyda *et al.*, 2011; FAO-OMS/FINUT, 2012; Alabdulkarim *et al.*, 2012].

Existe evidencia de que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICLn-3) poseen efectos en la salud, manifestándose su rol como lípidos bioactivos mediadores de la acción protectora que ejercen las dietas ricas en estos compuestos [Schunck *et al.*, 2018]. Una relación adecuada n-6/n-3, unido al consumo cotidiano de AGPICLn-3 se asocia con una prevalencia menor de enfermedades no transmisibles (también nombradas como enfermedades crónicas no transmisibles) [Ofosu *et al.*, 2017] y con la disminución de la mortalidad y el riesgo cardíaco [Takahashi *et al.*, 2017].

1.2. Enfermedades no transmisibles y obesidad

Las Enfermedades No Transmisibles (ENT) son un grupo de patologías caracterizadas por una duración prolongada y aparición lenta en el individuo, y que no tienen asociado un agente infeccioso en su etiología. Afectan el funcionamiento adecuado de órganos relevantes del organismo como el hígado y el sistema cardiovascular [Benziger *et al.*, 2016]. Entre las ENT pueden citarse la hipertensión arterial, el cáncer, la enfermedad de hígado graso no alcohólico, la resistencia a la insulina (RI) y la diabetes tipo 2 (DT2) [Puoti *et al.*, 2017]. Los factores desencadenantes en cada una de ellas pueden ser de carácter genético, ambiental o ambos, sin embargo, un factor de riesgo común para la mayoría es la obesidad [Chai *et al.*, 2017; Dale *et al.*, 2017].

La obesidad está definida por la Organización Mundial para la Salud (OMS) como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud debido fundamentalmente al desequilibrio entre el aumento del consumo de calorías y/o la disminución del gasto energético [OMS, 2018]. Esta organización ha informado además que en el año 2016 más de 650 millones de adultos presentaban obesidad. En Chile existe un panorama nutricional crítico pues el porcentaje de obesidad en adultos creció

de 22,9% a 31,2% en los últimos 6 años, mientras que el sobrepeso se mantuvo en un 39,8%. En cuanto a la obesidad mórbida, aumentó desde 2,2% a 3,3% llegando a un 4,9% en el grupo etario de 30-49 años, evidenciando así un crecimiento alarmante en los últimos años [Encuesta Nacional de Salud, 2010-2016-2017].

1.2.1. Obesidad y resistencia a la insulina

A nivel metabólico, la obesidad induce alteraciones en vías claves de producción y utilización de la glucosa en el individuo, como la lipólisis y captación de glucosa en las células, respectivamente. Existen múltiples mecanismos por los cuales se genera alteración en la homeostasis de la glucosa; ya que tanto la inflamación como el estrés oxidativo son parte de algunos mecanismos moleculares alterados por el aumento del tejido adiposo que podrían afectar la señalización intracelular de la insulina [Niemann *et al.*, 2017] y con ello la homeostasis de la glucosa.

La regulación de la glicemia en el organismo ocurre a través de la interacción de varios órganos, entre ellos el hígado, el tejido adiposo y el tejido muscular esquelético. En el hígado ocurren procesos como la gluconeogénesis, la síntesis de glucógeno y la glicogenólisis, posibilitando la regulación de la glicemia en niveles constantes, tanto en los períodos de ayuno como postprandiales. En el caso del tejido adiposo, interviene en varios procesos, entre ellos la entrada de glucosa y ácidos grasos hacia el adipocito en el periodo postprandial y el almacenamiento de ácidos grasos en forma de TG, los que se utilizan cuando el organismo requiere energía, a través de la activación de la lipólisis. El músculo esquelético por su parte es otro de los principales órganos que participa en la homeostasis de la glucosa, siendo el principal sitio en el cual ésta ingresa después de la ingesta de alimentos [Henriksen *et al.*, 2011]. La elevación de la glicemia luego de la ingesta provoca la liberación de la insulina, hormona a la cual responden los tres órganos mencionados.

La insulina es una hormona generada en el páncreas y su incremento promueve la captación de glucosa mediante la activación de una compleja cascada de eventos de señalización intracelular [Taniguchi *et al.*, 2006; Thirone *et al.*, 2006]. A grandes

rasgos, esta hormona se une a su receptor produciendo un cambio conformacional en la estructura de este, permitiendo la transfosforilación en residuos de tirosina de las cadenas beta (dominios intracelulares), convirtiéndose en un receptor activado [Pessin y Saltiel, 2000]. Luego de la activación del receptor de insulina, que posee actividad tirosina quinasa intrínseca, éste fosforila al primer sustrato del receptor de insulina (IRS-1) [Saltiel y Kahn, 2001]. Esta proteína fosforilada inicia una serie de eventos río abajo que permite la activación de la enzima fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), que conduce a la señalización de una serie de eventos moleculares que resultan finalmente en la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) desde sus vesículas de almacenamiento intracelular hasta la membrana plasmática (**Figura 5**), permitiendo que la glucosa pueda ingresar al interior de la célula muscular o de los adipocitos [Taniguchi *et al.*, 2006; Thirone *et al.*, 2006].

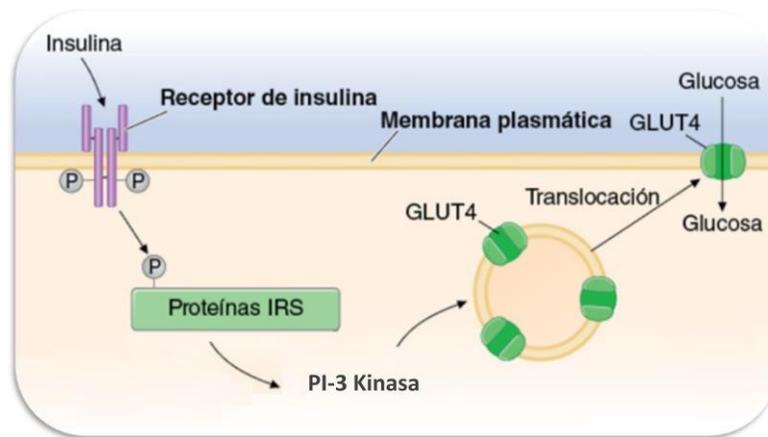


Figura 5. Diagrama general del proceso de captación de glucosa (músculo). Modificado de *Principles of Internal Medicine, 18th Edition*. www.accessmedicine.com

Cuando esta cascada de señalización se ve afectada comienza a producirse la resistencia a la insulina (RI), que ha sido definida como la respuesta insuficiente o desensibilización al estímulo de la insulina en todos los tejidos blanco que expresen un receptor para esta hormona [Bajaj y Defronzo, 2003]. Una de las consecuencias de esta desensibilización es la disminución en el ingreso de glucosa inducido por insulina, acentuada luego en hiperglicemias postprandiales [Mitrakou, 1990].

Una de las hipótesis más aceptadas que vincula la obesidad con la RI es que cuando el tejido adiposo se hipertrofia, el sistema vascular no lo hace a la misma velocidad, por lo que en esas condiciones el riego sanguíneo se vuelve insuficiente y puede llegar a inducir la muerte de los adipocitos por hipoxia. Dicho fenómeno, unido a la expansión del tejido adiposo visceral, provoca el reclutamiento de células del sistema inmune, que producen la liberación de mediadores de la inflamación, e inician un proceso caracterizado por la presencia de citoquinas y adipoquinas [Lau *et al.*, 2017; Pirola y Ferraz, 2017].

Este proceso inflamatorio induce también un exceso en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La generación incrementada de ROS provoca estrés oxidativo y unido a la inflamación pueden deteriorar la correcta señalización intracelular de la insulina en sus células blanco. Estudios realizados en animales han descrito que el tejido adiposo hipóxico mencionado muestra una activación de las vías inflamatorias JNK1 e IKK/NF- κ , así como el aumento de la expresión de genes implicados en la inflamación y el estrés oxidativo [Hosogai *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2007]. En humanos se ha observado que podría ocurrir lo mismo, según lo descrito en la literatura por Bluher (2016), Dilek & Havva (2017) entre otros. La activación de estas vías inflamatorias JNK1 e IKK/NF- κ conduce a la liberación incontrolada de ácidos grasos libres, citoquinas inflamatorias y adipoquinas por parte del tejido adiposo blanco hacia la circulación sistémica [Cinti *et al.*, 2005]. El exceso de ácidos grasos libres en la circulación es un estímulo que genera la acumulación de intermediarios lipídicos intracelulares como diacilglicerol (DG) y ceramidas que alteran la señalización de la insulina tanto en el tejido adiposo como en el músculo esquelético.

Con respecto a la RI en el hígado, se manifiesta en el incremento de la lipogénesis de novo y la consiguiente producción de triglicéridos a nivel hepático, los que a su vez estimulan la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad [Unger, 1995] y favorecen la acumulación de gotas lipídicas en hepatocitos provocando esteatosis hepática, primera etapa característica de la enfermedad de hígado graso no alcohólico [Kitade *et al.*, 2017].

1.2.2. Resistencia a la insulina y AGPICLn-3

Se ha reportado que los aceites marinos pueden tener aplicación en la salud debido a su contenido en AGPICLn-3, tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6n-3), y que su consumo se ha asociado a una baja prevalencia de enfermedades cardíacas, circulatorias e inflamatorias [Minihane *et al.*, 2016]. De acuerdo a lo reportado por FAO-OMS/FINUT (2012) en relación a los AGPICLn-3, estudios de alimentación controlada y de cohortes de ingesta de EPA y DHA han demostrado beneficios fisiológicos en la presión arterial, latido cardíaco, niveles de TG y probablemente, inflamación, función endotelial y función diastólica cardíaca, y evidencia consistente de riesgo reducido de enfermedad coronaria fatal y muerte súbita cardíaca con un consumo de alrededor de 250 mg diarios de EPA+DHA [Mozaffarian & Rimm, 2006; Yokoyama *et al.*, 2007; Gissi-Hf, 2008].

Según lo anterior, la FAO-OMS establece el consumo adecuado de EPA+DHA en 250 mg diarios (como mínimo) para los varones adultos y mujeres adultas no embarazadas, ni lactantes. Según diferentes estudios estos AGPICLn-3 podrían disminuir la liberación de citoquinas proinflamatorias como el interferon- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2 y IL-6, al actuar directamente sobre el factor transcripcional NF- κ B, alterando la expresión de genes proinflamatorios [Kang y Weylandt, 2008; Wall *et al.*, 2010]. Estos efectos antiinflamatorios podrían servir de base para utilizar los AGPICLn-3 como coadyuvantes en contra del desarrollo de ENT con base inflamatoria, como RI [Simopoulos, 2008; Calder, 2013; Calder, 2014; Pusceddu *et al.*, 2016]. Su efecto antiinflamatorio podría estar respaldado por la producción de protectinas y resolvinas ya mencionadas (punto 1.1.5) que son mediadores generados durante la etapa aguda de la inflamación y que actúan localmente en el sitio del daño. Estos mediadores contrarregulan la infiltración de leucocitos y promueven la etapa de resolución a través de la inhibición de las acciones del factor NF- κ B en la expresión de genes de moléculas proinflamatorias [Diaz *et al.*, 2012].

Los efectos antiinflamatorios reportados del EPA se basan además en su capacidad de inhibir la transformación del ácido araquidónico en sus derivados pro-inflamatorios

prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2) y leucotrieno B4 (LTB4), al competir por las mismas enzimas para la generación de los eicosanoides antiinflamatorios: tromboxano A3 (TXA3), prostaglandinas I3 y E3 (PGI3 y PGE3) y leucotrieno B5 (LTB5) [Kohashi *et al.*, 2014]. El DHA por su parte se encuentra en altas concentraciones en el tejido nervioso, particularmente en el cerebro, siendo crítico para su desarrollo y mantención [Rapoport, 2001; Brenna & Carlson, 2014]. Los efectos del consumo de DHA a nivel celular en función del sistema nervioso y visual reportados son: aumentar la fluidez de las membranas neuronales, gliales y membranas de conos y bastoncitos; disminuir la apoptosis neuronal y facilitar el reciclaje de neurotransmisores. También tiene una importante función al inhibir el estrés oxidativo, ya que al ser liberado desde los fosfolípidos de membrana es metabolizado para formar docosanoides como la neuroprotectina D1 que inhibe la expresión de genes proinflamatorios mediados por estrés oxidativo y apoptosis [Bazán 2006; Bazán 2009].

Uno de los mecanismos por los cuales el DHA actúa en la célula es como ligando de miembros de la familia de receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPARs), de esta forma DHA puede activar PPARs para que aumente la expresión de enzimas relacionadas con la β -oxidación de ácidos grasos, favoreciendo la utilización de éstas en vez de su acumulación [Martínez-Fernández *et al.*, 2015; Anderson *et al.*, 2014] y así regular la expresión de enzimas pertenecientes al metabolismo de lípidos y disminuir la RI en tejidos periféricos (muscular y adiposo) [Valenzuela & Sanhueza, 2009].

En general la literatura existente sobre los AGPICLn-3 y homeostasis de la glucosa es amplia y variada. Entre los diferentes estudios que abordan este tema existen meta-análisis que respaldan su uso en la salud humana y otros que no son concluyentes al respecto. Gao *et al.*, (2017), por ejemplo, reportó sobre la relación entre la suplementación con aceites de pescado y la sensibilidad a la insulina para estudios clínicos realizados entre los años 1995 a 2014. Se realizó el análisis en conjunto y por subgrupos concluyendo en el primer caso que no hubo diferencias significativas para la sensibilidad a la insulina con respecto al placebo ($p = 0,292$) pero en el análisis por

subgrupos la suplementación con aceites de pescado (excluidos omega 3 vegetales) mejoró significativamente ($p < 0,001$) la sensibilidad a la insulina entre las personas que presentaron al menos un síntoma de trastornos metabólicos (IMC anormales, hipertensión y desórdenes lipídicos). Las mediciones para estimar la sensibilidad a la insulina incluyeron el clamp hiperinsulinémico-euglicémico, índice HOMA-IR, índice QUICKI (Quantitative Insulin Sensivity Check Index) y prueba de tolerancia a la glucosa. Se concluyó además que los estudios que duraron entre 4 a 24 semanas tuvieron mejores resultados que otros más extensos y las dosis suministradas variaron entre 1 a 4 gramos de aceite de pescado sin evidencia de diferencias significativas entre las dosis o el método de estimación de la sensibilidad a la insulina. En un meta-análisis anterior [Abbott *et al.*, 2016] se evaluó el efecto de la intervención con ácidos grasos poliinsaturados $n-3$ en la resistencia a la insulina en hombres y mujeres con sobrepeso; y se concluyó que en forma general no hubo efecto significativo aunque en ensayos superiores a las 6 semanas de tratamiento se observó una mejora significativa solo en el subgrupo de mujeres ($p = 0,045$). En otro meta-análisis publicado en 2021 [Zhang *et al.*, 2021] en el cual se evaluó el efecto de la suplementación dietaria con EPA/DHA en el síndrome metabólico, se obtuvieron resultados inconsistentes en general, pero al evaluar los subgrupos se observó que el DHA aumentó los niveles de glucosa en ayuno y los niveles de insulina sérica en personas menores de 60 años con suplementación por 3 meses en América del Norte. Este efecto de la ubicación geográfica también se reportó en el meta-análisis realizado por Jang *et al.*, (2019) donde los altos niveles de AGPICL $n-3$ fueron asociados con un 26% menos de riesgo de síndrome metabólico en general, y con un 31% menos de riesgo en población asiática con respecto a la norteamericana. Por último, en otro meta-análisis [Cheng *et al.*, 2021] sobre la asociación del consumo de pescados grasos o magros y de suplementos de aceite de pescado e incidencia de DT2, en medio millón de personas no diabéticas en Reino Unido, se concluyó que una mayor ingesta de pescado azul estaba asociada a un menor IMC y a la disminución significativa inversa entre el consumo de este tipo de pescado y el riesgo de padecer DT2 ($p = 0,001$). También en los participantes que consumieron suplementos de aceite de pescado durante los 10 años de seguimiento de este estudio se

observó de un 9 a un 23 % menos de riesgo en dependencia de la frecuencia de consumo. Los efectos positivos coadyuvantes de la suplementación con aceites de pescado, sus derivados, o los pescados grasos, pueden estar dados por los diferentes mecanismos mencionados al inicio de este epígrafe y que son respaldados por diferentes investigaciones sobre su eficacia en biomarcadores inflamatorios en humanos [Kavyani *et al.*, 2022, meta-análisis umbrella]. Sin embargo, al observarse la influencia que ejercen los diferentes factores (forma de suplementación, sexo, hábitos y dieta de los participantes, ubicación geográfica, estructura del suplemento y fuente de obtención) sobre el estado de salud, son necesarios estudios clínicos con metodología más controlada y mejores diseños estadísticos. Ello podría ser determinante para explicar la pérdida de efectividad de los AGPICLn-3 con respecto a la resistencia a la insulina al tratar de reproducir los tratamientos murinos exitosos en humanos.

1.3. Aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD) como fuente de obtención de EPA y DHA.

Hoy en día, el pescado es la fuente más común de omega-3 en la dieta y los peces grasos de las familias *Scombridae*, *Clupeidae* y *Salmonidae* se han reportado como las especies con el mayor porcentaje de EPA y DHA por porción de alimento [Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010]. El cultivo de salmones en Chile constituye más del 73% de la actividad acuícola del país, convirtiéndose en la cuarta industria más importantes de la economía chilena, junto con ser la segunda potencia productora de salmones a nivel mundial luego de Noruega [Buschmann *et al.*, 2009]. Para 2030, Chile incrementará su exportación pesquera a 2,1 millones de toneladas, el equivalente a un crecimiento del 56%, con respecto a 2016, lo cual lo posicionaría como el principal exportador de pescados en América Latina y el Caribe. Así, particularmente se espera que, para 2030, la producción acuícola crecerá a más de 1,3 millones de toneladas, correspondiendo a un aumento del 26,4% respecto a 2016 (FAO, 2019).

Durante el procesamiento típico del pescado se generan subproductos que equivalen entre un 20 a 60% de la materia prima inicial. La mayor cantidad de residuos es representada por despojos, cabeza, cola, piel, huesos y sangre obtenidos en el proceso

de evisceración, desollado, corte y fileteo del pescado [Awarenet, 2004]. Estos subproductos provocan un problema de disposición de desechos con implicancias medioambientales [Folador *et al.*, 2005], por lo que su aprovechamiento en la industria de harinas y aceites es de gran importancia [Ankenman *et al.*, 2012]. Hoy en día, del aceite de pescado producido a nivel mundial, un 21% es destinado para consumo humano, mientras que la harina de pescado es destinada en un 100% a consumo animal (Koeleman, 2017). Además, en las últimas décadas comenzaron a identificarse las propiedades nutricionales de los AGPICLn-3 (EPA+DHA) contenidos en los aceites marinos y se ha generado una gran demanda de aceite de pescado. Por este motivo, la industria acuícola está recurriendo cada vez más al uso de aceites vegetales con contenido relativamente alto de ácidos grasos α -linolénico, entre ellos aceite de canola, soya y otros, con la finalidad de reemplazar el aporte de omega-3 del aceite de pescado requerido para la preparación de las raciones de alimentación de peces [Valenzuela *et al.*, 2012].

En este aspecto, las características de los aceites de especies de cultivo obtenidos reflejarán las propiedades de la materia prima utilizada en sus raciones alimenticias, evidenciando las diferencias entre los aceites obtenidos según sus especies debido a los cambios en su alimentación. Lo anterior refleja las condiciones y prácticas de alimentación actuales de la industria acuícola, lo que ha sido informado anteriormente por investigadores nacionales [Valenzuela, 2005; Méndez *et al.*, 2010; Pando *et al.*, 2014]. El cambio de ingredientes en la dieta de salmónidos ha generado una disminución de AGPICLn-3 en el músculo [Bell *et al.*, 2001]. La declinación del porcentaje de estos ácidos grasos en los tejidos del salmón, y consecuentemente en su aceite, puede reducir la disponibilidad de AGPICLn-3 para los consumidores [Nanton *et al.*, 2007], unido al aumento de demanda de harina y aceite de pescado para cubrir las necesidades de la acuicultura. Dicho inconveniente ha impulsado el surgimiento de nuevos desafíos para concentrar o purificar estos ácidos grasos a partir de aceite de pescado [Furche & Martinez, 2011] y así lograr obtener compuestos con mayores

concentraciones de AGPICLn-3, que generen beneficios nutricionales y de salud al consumidor.

1.3.1. Concentración de AGPICLn-3, a partir de ASCRD, mediante el proceso de complejación con urea.

La complejación con urea se ha utilizado ampliamente para concentrar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de diferentes fuentes marinas y vegetales [Ackman *et al.*, 1988; Hayes *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2006]. Este proceso de concentración permite el manejo de grandes cantidades de materia prima con un equipamiento y método simple y eficiente [Patil, 2014; Thammapat *et al.*, 2016]. La urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) forma complejos en forma de espiral con moléculas que contienen cadenas alquílicas lineales, como los ácidos grasos saturados (AGS) y monoinsaturados (AGMI) [Hayes *et al.*, 1998]. Cada átomo de oxígeno de una molécula de urea forma puentes de hidrógeno con 4 átomos de nitrógeno, y cada átomo de nitrógeno forma enlace de hidrógeno con dos átomos de oxígeno. En la **Figura 6** se observa la estructura de los compuestos de inclusión con urea. Esta estructura se determinó en base a difracción de rayos X a temperatura ambiente [Yeh *et al.*, 2013]. La separación de los complejos de urea de la fracción no complejada con urea elimina eficazmente los AGM y los AGS y enriquece la fracción no complejada con AGPICL libres [Babbit, 1990; Wanasundara & Shahidi, 1999; Zuta *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006].

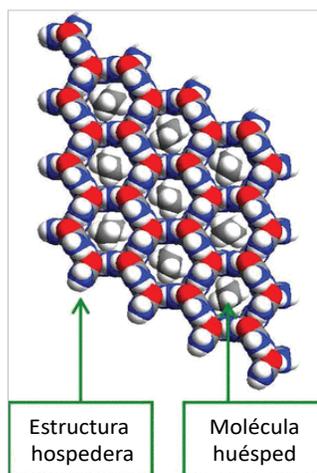


Figura 6. Estructura de los compuestos de inclusión con urea. Extraído de Yeh *et al.*, 2013.

Las cantidades de EPA luego del proceso de concentración podrían aumentar entre 1,6 a 4,1 veces y las cantidades de DHA entre 3,3 a 7,8 veces [Pando *et al.*, 2014; Pando *et al.*, 2017; Berríos *et al.*, 2017a; Dovale-Rosabal *et al.*, 2019]. Según lo anterior, sería posible alcanzar como mínimo un 36% de EPA+DHA en la fracción no complejada (concentrado) a partir de aceites marinos. Sin embargo, la entrega de concentrados de EPA y DHA en forma de AGPICL libres no es la mejor dada su baja estabilidad oxidativa y otros factores que afectan la biodisponibilidad.

1.3.2. Biodisponibilidad

Un gran número de investigaciones han sido publicadas evaluando el efecto potencial de los AGPICLn-3, sin embargo son necesarios más estudios acerca de la forma en que son entregados, ya sea como alimentos o suplementos dietarios [Ghasemifard *et al.*, 2014]. Al ingerir cualquier matriz alimentaria o de suplementación que contenga EPA/DHA, la proporción liberada en el intestino se denomina bioaccesibilidad y la cantidad que alcanza la circulación sistémica o su sitio de actividad fisiológica se denomina biodisponibilidad [Schuchardt & Hand, 2013].

Los productos de suplementación obtenidos a partir de aceites marinos se ofrecen en forma de ácidos grasos libres (AGL), ésteres metílicos (EM), ésteres etílicos (EE) y triacilglicéridos (TG) re-esterificados. Al estar disponibles en el mercado múltiples alternativas para consumir EPA y DHA, es necesario tomar en cuenta la biodisponibilidad de las diferentes formas químicas o las fuentes naturales de EPA y DHA (alimento o aceite de pescado).

Al día de hoy se conoce que independientemente de la cantidad real de EPA y/o DHA entregada, existen una serie de factores que podrían afectar su biodisponibilidad en diferentes formas como: la actividad de la lipasa pancreática en el sistema digestivo, recuperación linfática de los ácidos grasos, posición en el esqueleto de glicerol, el peso de las formulaciones y la matriz que vehiculiza estos ácidos grasos [Schuchardt & Hahn, 2013]. El perfil general de los ácidos grasos así como la estructura intramolecular de las grasas de la dieta son importantes cuando se consideran sus efectos nutricionales

[Mu & Porsgaard, 2005]. Un ejemplo para tener en consideración es la posición de los AG en el esqueleto de glicerol, factor esencial a considerar cuando se busca maximizar la biodisponibilidad de los ácidos grasos en el TG. Durante el proceso digestivo, un importante producto de hidrólisis de los TG mediante lipasas es el 2-monoacilglicerol (2-MAG) y su formación se debe a que las lipasas hidrolizan mayoritariamente en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del glicerol [Dominiczak *et al.*, 2014]. Por lo tanto, es fundamental la ubicación de EPA y DHA en la posición *sn*-2 para maximizar su biodisponibilidad.

Con respecto a la forma química se han realizado estudios de digestibilidad a corto plazo (días) en humanos y animales informándose que la biodisponibilidad de EPA y DHA es mayor en forma de TAG que en forma de ésteres etílicos (EE) por ejemplo [Ghasemifard *et al.*, 2014]. Los resultados anteriores contrastan con los obtenidos por Dyerberg *et al.* (2010) donde las formas de EPA y DHA presentaron una biodisponibilidad menor en AGL en comparación con TAG naturales. En este caso los sujetos en estudio recibieron un total de 3,3 g de EPA + DHA durante 2 semanas. Tres preparaciones de concentrados de etilésteres, AGL y TAG re-esterificados de EPA/DHA fueron comparadas con fuentes naturales de EPA y DHA tales como aceite de pescado y aceite de hígado de bacalao. Considerando el promedio de aumento de EPA y DHA en los lípidos séricos se observó que la biodisponibilidad de EPA y DHA en etilésteres, AGL y TG re-esterificados comparados con las fuentes naturales fue de 73%, 91% y 124%, respectivamente. La menor absorción para los AGL puede deberse a que forman sales insolubles o jabones de calcio lo que podría influir negativamente en su asimilación. Otros reportes han indicado que la mejor forma es la de AGL pero son susceptibles a oxidación y a generar síntomas gastrointestinales [Schuchardt *et al.*, 2013]. Von Schacky (2014) ha propuesto la conclusión general de que la biodisponibilidad de EPA y DHA en orden decreciente según la forma química a la cual están unidos es la siguiente; Fosfolípidos > triacilglicéridos combinados > triacilglicéridos > ácidos grasos libres > etil ésteres. Esto independiente de si se encuentra en una matriz alimentaria (ingesta de cápsulas junto con ingesta de alimento,

contenido de grasa en el alimento) o una forma galénica específica (microencapsulación, emulsificación). Sería posible concluir entonces que los TG con AGPICLn-3 en su estructura se consideran como la forma más deseable para la producción de suplementos o alimentos enriquecidos para consumo humano [Lin *et al.*, 2006]. Por lo tanto, si los AGPICL libres obtenidos por concentración con urea fueran estructurados en triacilglicéridos podrían ser considerados como la forma más estable para el consumo humano [Wang *et al.*, 2012a] y al mismo tiempo se podría obtener una mayor cantidad de AGPICLn-3 que en un aceite comercial de pescado.

1.4. Triacilglicéridos estructurados

Los triacilglicéridos estructurados (TEs) son aquellos triacilglicéridos que tienen modificada su composición y/o su distribución posicional de ácidos grasos en el esqueleto de glicerol, mediante reacciones de catálisis enzimática y/o ingeniería, con mejoras en sus propiedades nutricionales o funcionales [Moreno & Perea, 2008]. La estructuración es una forma de producir TG “hechos a la medida” con características físicas, propiedades químicas y/o beneficios nutricionales. Esta estructuración puede realizarse a través de reacciones de transesterificación química o enzimática con el fin de alterar la composición y distribución de ácidos grasos en la molécula de glicerol (**Figura 1**) [Berríos (a) *et al.*, 2018; Pando *et al.*, 2017].

1.4.1. Lipasas en la estructuración de TEs

Diferentes tipos de biocatalizadores enzimáticos, como las lipasas, esterasas y fosfolipasas pueden ser utilizados para la modificación de lípidos. Los más versátiles entre estos biocatalizadores son las lipasas, debido a su regioespecificidad (la enzima conduce un determinado tipo de reacción, de tal manera que lo realiza en un lugar determinado de la molécula) como una de las principales ventajas en la estructuración de aceites y grasas para obtener productos de alto valor añadido, como suplementos de EPA+DHA [Shimada, 2006].

Se definen como enzimas que hidrolizan enlaces ésteres de ácidos grasos y de alcoholes y catalizan reacciones de esterificación/transesterificación (acidólisis, alcoholólisis e

interesterificación) (**Figura 7**). Poseen especificidad posicional por los ácidos grasos en el TG, lo cual es particularmente importante en la modificación de lípidos [Shahidi, 2005]. Las lipasas difieren en sus propiedades según los organismos que las originan y su especificidad hacia distintos ácidos grasos unidos a TG es difícil de predecir, ya que es afectada por factores como la distribución de los ácidos grasos en las tres posiciones del TG [Lyberg & Adlercreutz 2008].

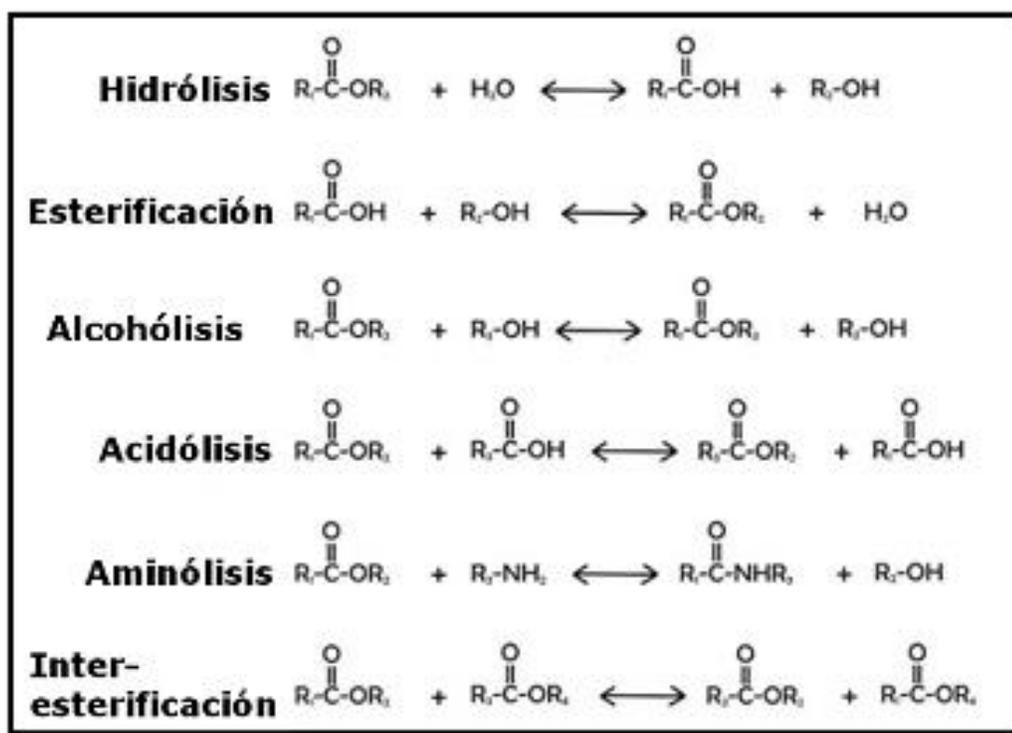


Figura 7. Reacciones de hidrólisis, síntesis y de transferencia de grupos catalizadas por las lipasas. Fuente: modificada de Borrelli & Trono (2015).

La acidólisis catalizada por las lipasas ha demostrado ser una buena herramienta para utilizar concentrados de AGPICL en acilgliceroleos y son la mejor posibilidad para obtener TG enriquecidos [Cerdán *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2007]. La lipasa-B de *Candida antarctica* se ha categorizado como una lipasa inespecífica para la hidrólisis de los ácidos grasos del TG y es selectiva para ácidos grasos de cadena larga porque tiene un sitio de unión de sustrato muy estrecho y profundo en comparación con otras lipasas. Este pequeño espacio dentro del sitio de unión hace que sólo un sustrato muy específico

para unirse, resultando en un alto grado de selectividad [Poppe *et al.*, 2013; Chaurasia *et al.*, 2016]. La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (*TLL*), por su parte, es un triacilglicerol lipasa específica para la hidrólisis en las posiciones *sn*-1, *sn*-3, lo cual quiere decir que con las reacciones que implican TG, la *TLL* selecciona las posiciones del acil *sn*-1,3 del esqueleto de glicerol teniendo también la habilidad de seleccionar ciertos sustratos y sus esteroisómeros, es decir es regioselectiva. [Chandler, 2001; Du *et al.*, 2005; Zhang, 2007; Fernandez-Lafuente, 2010; Svensson & Adlercreutz, 2011]. Las enzimas descritas pueden ser utilizadas en medio supercrítico (una de las tecnologías utilizadas para producir TEs) que proporciona condiciones para el aumento de la solubilidad de sustratos lipídicos e hidrofóbicos en medios no polares; produciendo reacciones reversas a la hidrólisis y favoreciendo así las síntesis enzimáticas como esterificación, transesterificación y acidólisis [Gunnlaugsdottir *et al.*, 1998].

1.4.2. Fluidos supercríticos como medio para la obtención de TEs mediante reacciones enzimáticas

Un Fluido Supercrítico (FSC) es aquel que al someterlo a una presión y temperatura superiores a sus valores críticos adquiere propiedades de un estado de la materia en el que ésta es compresible, se comporta como un gas, llena y toma la forma de su contenedor. No obstante, tiene la densidad de un líquido (0,1-1 g/mL) y por lo tanto su poder disolvente. De esta forma se comporta como un gas denso con poder disolvente controlable, o bien como una forma de la materia en la que los estados líquido y gaseoso son indistinguibles entre sí [Demirbas, 2000].

El diagrama de fases general para una sustancia pura (**Figura 8**), muestra las regiones de temperatura y presión donde la sustancia existe como una fase única (sólido, líquido o gas). Estas zonas están delimitadas por las curvas de coexistencia de dos fases sólido-gas, sólido-líquido y líquido-gas, correspondientes a los equilibrios de sublimación, fusión y vaporización, respectivamente. Existe un punto de coexistencia de los tres estados llamado punto triple (PT). El cambio de estado se asocia a un cambio brusco de densidad y, para que se produzca, es necesario un aporte extra de energía llamado entalpía de cambio de estado. Pero por encima del punto crítico (PC) este cambio de

densidad no se produce, por tanto, se podría definir este punto como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar y por ende un fluido supercrítico es aquel que se encuentra por encima de dicho punto [Mendiola, 2008].

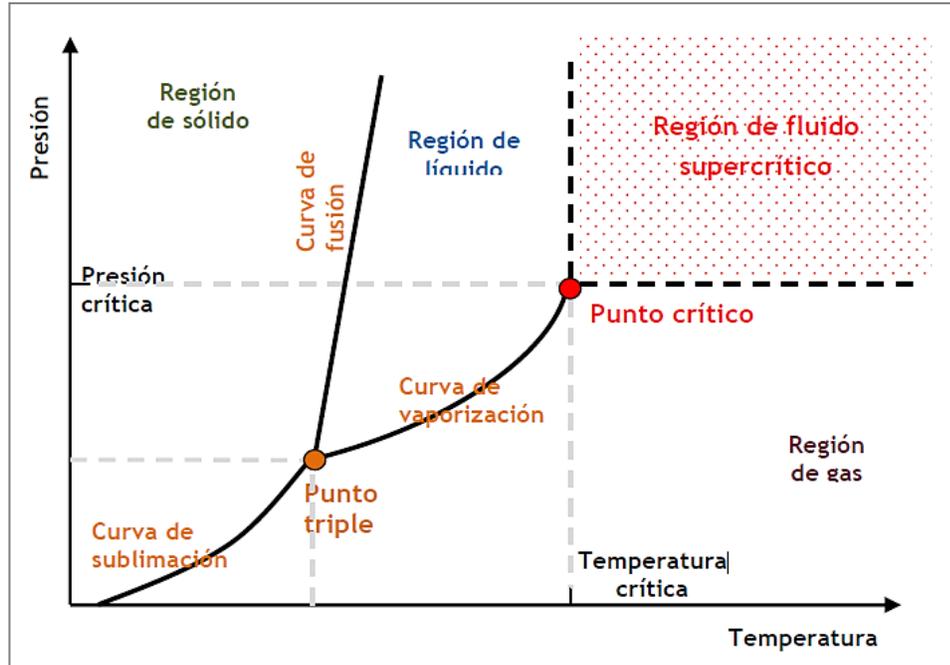


Figura 8. Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia, correspondiente a una sustancia pura. Fuente: (Domínguez & Parzanese, 2009).

La densidad de los fluidos supercríticos puede cambiarse y manipularse en función de la presión y temperatura, ya que a su presión crítica su compresibilidad es máxima y pequeños cambios en estos parámetros pueden llevar a grandes cambios en la densidad local [Luque de Castro *et al.*, 1993; Ikushima, 1997], lo cual ofrece ventajas para producir TEs mediante reacciones enzimáticas. La tecnología de los FSC se ha aplicado en procesos de extracción, fraccionamiento, cromatografía y reacciones químicas, permitiendo obtener fracciones de una mezcla y productos diseñados a la medida [King, 2004]. Entre los fluidos supercríticos conocidos se encuentra el dióxido de carbono (CO_2), que es un solvente ideal para aplicaciones en alimentos [Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010; Budisa & Schulze-Makuch, 2014]. Está considerado como un compuesto Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS por sus siglas en inglés) [FDA, 2019].

Presenta una densidad variable, gran poder disolvente, bajo costo y puede ser fácilmente separado del medio de reacción despresurizando [Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010]. Cuando el CO₂ se comprime a una temperatura de 31,1 °C y una presión de 72,9 atm por encima de su punto crítico, no se licúa, sino que alcanza un estado gaseoso denso y se comporta como un disolvente. El uso de dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC) para la estructuración de lípidos reduce significativamente el empleo de solventes orgánicos, evita problemas de eliminación de desechos, elimina el uso de solventes potencialmente tóxicos e inflamables, y reduce el tiempo de reacción. Además, los lípidos no están sujetos a altas temperaturas durante el proceso enzimático en CO₂SC [Del Valle, 1988] y es posible evitar o disminuir su degradación. De esta manera el CO₂SC se puede usar para la catálisis enzimática especialmente para aplicaciones en alimentos, ya que no provoca desnaturalización significativa en las enzimas al permitir el uso de temperaturas adecuadas para las reacciones enzimáticas [Budisa & Schulze-Makuch, 2014]. También ofrece un ambiente no oxidante y permite realizar procesos con materiales termosensibles como los aceites, pues a menor temperatura de reacción es posible disminuir la ocurrencia de procesos oxidativos. La mayor ventaja del CO₂SC frente a otros solventes líquidos son su alta difusividad, baja viscosidad y tensión superficial que les permite acelerar la transferencia de masa en las reacciones enzimáticas [Shekarchizadeh *et al.*, 2009; Rubio-Rodríguez *et al.*, 2010].

1.4.3. Uso de antioxidantes en aceites

El alto número de dobles enlaces en los AGPICL del aceite marino lo hacen más susceptible a la oxidación rápida, provocando el deterioro de su calidad y valor nutricional [Moure *et al.*, 2001; FAO-OMS/FINUT, 2012]. Entre los antioxidantes utilizados en alimentos para proteger las grasas contra la rancidez oxidativa se encuentran los compuestos fenólicos. Éstos pueden ser usados para aumentar la vida útil de los alimentos al inhibir la peroxidación de lípidos y proteger contra el daño oxidativo y el crecimiento de microorganismos [López-Vélez *et al.*, 2003]. Su potencia antioxidante está relacionada con la estructura, en particular con la deslocalización de electrones del núcleo aromático. De hecho, cuando reaccionan con los radicales libres

formados durante la autooxidación, generan un nuevo radical que se estabiliza por el efecto de resonancia del núcleo aromático.

1.4.4. Compuestos fenólicos como antioxidantes

Los compuestos fenólicos son sustancias bioactivas con propiedades de neutralización de radicales libres, anti-oxidativas [Sroka & Cisowski, 2003], antifúngicas [Kubo *et al.*, 2001], quimioprotectoras [Lambert & Yang 2003] y antiinflamatorias [Le Sage *et al.*, 2017], de gran importancia para la industria alimentaria y farmacéutica. Se ha descrito que los compuestos fenólicos podrían prevenir eventos asociados a hiperlipidemia, obesidad, afecciones inflamatorias y reacciones alérgicas [Pandey & Rizvi, 2009; Shahidi & Yeo, 2018].

Al ser añadidos en productos alimenticios afectan significativamente su estabilidad, características sensoriales y nutricionales, previniendo el deterioro mediante reacciones de extinción de radicales responsables de la oxidación de lípidos [Ghafoor *et al.*, 2020; Koski *et al.*, 2003; Tuberoso *et al.*, 2007]. La estructura de su cadena carbonada permite dividirlos en diferentes grupos, de los cuales los ácidos fenólicos, flavonoides y lignanos son los que principalmente se han encontrado en aceites [Alu'datt *et al.*, 2017; Neo *et al.*, 2010] siendo los primeros los más comunes en la dieta humana.

La función de los ácidos fenólicos como antioxidantes primarios ha sido ensayada principalmente en aceites de oliva [Lanza & Ninfali, 2020; Velasco & Dobarganes, 2002] y varios autores han demostrado una relación lineal positiva entre la estabilidad de este tipo de aceite y su contenido total de fenoles [Mansouri *et al.*, 2016; Nieves Franco *et al.*, 2014]. Se ha reportado que los fenoles totales fueron los principales factores que se correlacionaron positivamente con la estabilidad oxidativa de aceites y grasas comerciales estudiados [Redondo-Cuevas *et al.*, 2018]. Debido al bajo contenido de componentes fenólicos nativos en la mayoría de los aceites comerciales se han realizado muchos intentos para prevenir el deterioro oxidativo de los lípidos mediante la optimización de su uso [Blasi & Cossignani, 2020]. Su presencia podría inhibir eficazmente la degradación termo-oxidativa de los aceites comerciales, así como la

formación de sustancias tóxicas de degradación termo-oxidativa como acrilamida y aminas heterocíclicas [Cheng *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2010].

Los ácidos fenólicos son derivados del ácido benzoico y ácido hidroxicinámico y poseen uno o más sustituyentes (OH, grupo hidroxilo) en el anillo aromático. Entre ellos encontramos ácidos fenólicos con estructura C₆-C₁ como el ácido gálico (AG: ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) y sus derivados de ácidos hidroxibenzoicos; productos naturales que se encuentran particularmente abundantes en nueces, frambuesas, grosellas negras y fresas, así como en bebidas procesadas como los vinos tintos y el té verde [Baladia *et al.*, 2014]. El AG es un aditivo alimentario de fórmula molecular C₇H₆O₅ (masa molar 170,12 g/mol) añadido a los alimentos como antioxidante, ya que por ejemplo, protege contra la degradación de las antocianinas y la pérdida de color en el jugo de arándano enriquecido con vitamina C [Roidoung *et al.*, 2016]. Existe predominantemente como ácido hidroxibenzoico [NCBI (a), 2023; Nabavi *et al.*, 2016] y se encuentra en diferentes formas de ésteres y sales que incluyen: galato de epigalocatequina (PubChem CID: 65064) [NCBI (b), 2023], etil galato (PubChem CID: 13250) [NCBI (c), 2023], metil galato (PubChem CID:7428) [NCBI (d), 2023], propil galato (PubChem CID: 4947) [NCBI (e), 2023], entre otras (**Figura 9**):

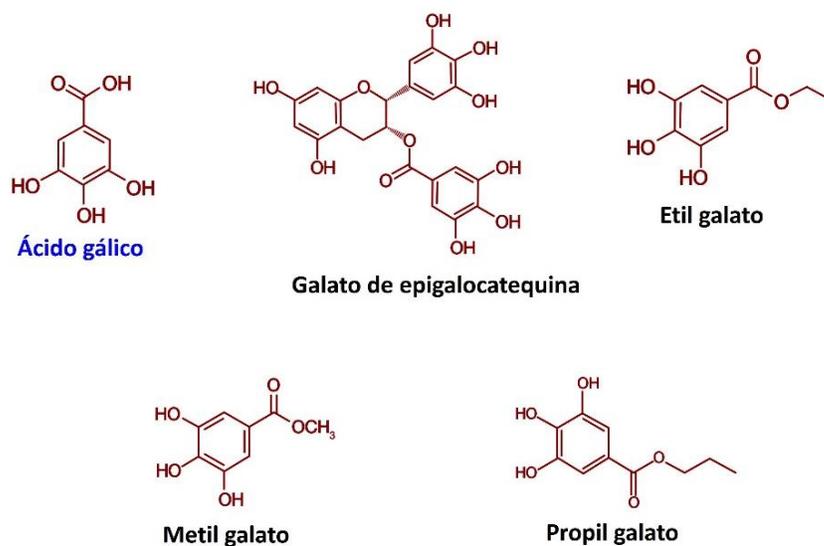


Figura 9. Estructura química del ácido gálico y de algunos de sus componentes derivados. Fuente: Modificado de Dłudla *et al.* (2019).

Se ha descrito que el AG también podría regular la homeostasis de la glucosa y de los lípidos [Eun-Jung *et al.*, 2013; Chao *et al.*, 2014; Khanh *et al.*, 2015]. Gandhi *et al.*, (2014) encontró que este ácido fenólico podría mejorar la sensibilidad a la insulina a través de la translocación y activación de GLUT4 (Vía dependiente de (PI3K)/p-Akt) y que aumentó moderadamente en la expresión génica de PPAR γ . Se ha descrito que estimula la diferenciación de adipocitos y la secreción de adiponectina [Makihara *et al.*, 2016] así como un efecto inhibitorio en la formación de gotas de grasa y acumulación de triacilglicéridos [Pandey *et al.*, 2014]. Ge *et al.*, (2018) encontró que extractos vegetales con alto contenido de ácido gálico podían regular la expresión de proteínas involucradas en las complicaciones observadas en obesidad y DT2, como TNF α , PPAR γ , IRS1 e IL-6. Esto coincide con lo reportado por Donado-Pestana *et al.*, (2018), que además demostró un efecto protector contra la dislipidemia, hiperglicemia en ayuno y la inflamación. Estos antecedentes proporcionan una base farmacológica para que pueda usarse el ácido gálico como un metabolito antioxidante para el tratamiento de enfermedades como la hiperglicemia y la enfermedad del hígado graso no alcohólico [Huang *et al.*, 2016; Dłudla *et al.*, 2019].

1.4.5. Síntesis de lípidos fenólicos

Sin embargo, el uso de ácidos fenólicos como el ácido gálico en sistemas de grasas y aceites está limitado por su naturaleza hidrofílica [Iwasaki *et al.*, 1999], no obstante, pueden lograrse mejoras o cambios en las características de solubilidad y miscibilidad de los compuestos fenólicos tras su incorporación a TG estructurados [King, 2004; Karboune *et al.*, 2008; Ciftci & Saldaña, 2012]. Los lípidos fenólicos se han sintetizado a través de reacciones de transesterificación para mejorar la solubilidad de los ácidos fenólicos en medios lipofílicos. Ello ha permitido su uso como antioxidantes potenciales con aplicaciones importantes en la industria del procesamiento de alimentos, farmacéutica y cosmética. El desarrollo de lípidos estructurados que contienen antioxidantes podría afectar directamente sus propiedades nutricionales y ofrecer ingredientes nutracéuticos para la formulación de alimentos (Laszlo *et al.*, 2006). La síntesis química de este tipo de lípidos fenólicos, típicamente realizada a temperaturas

elevadas (200-250 °C), está limitada debido a la sensibilidad al calor y susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos [Gunstone, 1999]. La síntesis enzimática realizada en solvente hexano ofrece ventajas en comparación con los procesos químicos que ya se llevan a cabo de forma industrial, ya que ocurren a menores temperaturas y aunque pueden llevar más tiempo poseen mayor especificidad del sustrato y selectividad posicional [Sabally *et al.*, 2006a, 2006b]. Sin embargo, aunque esta síntesis enzimática en solvente orgánico ofrece ventajas en comparación con la síntesis química, tiene desventajas, como la dificultad de aislar los medios de reacción, el disolvente residual en el producto final y la eliminación de los residuos de estos disolventes. Para mejorar dichos aspectos se ha usado con éxito la síntesis enzimática en FSC como una alternativa ecológica a los solventes orgánicos. El CO₂SC es el fluido más utilizado para las modificaciones enzimáticas de lípidos debido a sus propiedades ya mencionadas (punto 1.4.2.) Estos lípidos fenólicos producidos por bioprocesos enzimáticos exhiben una alta selectividad hacia sustratos polifuncionales y tienen lugar en condiciones de reacción suaves en comparación con las vías de síntesis química o en solventes orgánicos.

En este aspecto, las investigaciones sobre lípidos feruloilados se limitan a pocos estudios como el de Ciftci *et al.*, (2012) en el cual se produce una transesterificación del ácido ferúlico con aceite vegetal para sintetizar lípidos fenólicos compuestos por una mezcla de monoacilgliceroles y diacilgliceroles feruloilados. En dicho caso, se estudió la síntesis enzimática de lípidos fenólicos a partir de aceite de linaza y ácido ferúlico en medio supercrítico, usando lipasa inmovilizada de *Candida antarctica*. Sus resultados mostraron que se alcanzó un rendimiento máximo de $58 \pm 0,2$ % a 80 °C y 215 bar. Sin embargo, no se han encontrado informes sobre procesos de acidólisis enzimática para sintetizar lípidos estructurados antioxidantes con EPA y DHA, con mayor estabilidad frente a la oxidación y con efectos potenciales para la salud tales como la disminución de la hiperglucemia y el daño hepático presentes en la obesidad. La incorporación de ácidos fenólicos como el AG en los TG podría dar lugar a lípidos fenólicos estructurados con efectos hipoglucémicos indirectos a través de la potencial

disminución de intermediarios pro-inflamatorios. Estas nuevas moléculas podrían ofrecer propiedades positivas combinadas, tanto de los polifenoles como de los AGPICLn-3. Por lo tanto, sería relevante sintetizar acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y AG, en medio CO₂SC, que sean efectivos en la reversión de alteraciones de los parámetros bioquímicos asociados a RI inducida por obesidad en modelo murino, mediante el consumo de un único compuesto estructurado.

1.5. HIPÓTESIS

Es posible estructurar acilglicéridos fenólicos que contengan EPA/DHA y ácido gálico mediante acidólisis enzimática en CO₂SC. El tratamiento con acilglicéridos fenólicos estructurados influye en la reversión de alteraciones en los parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina, inducida por obesidad en modelo murino.

1.6. OBJETIVOS

1.6.1. Objetivo General

Estructurar acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico mediante acidólisis enzimática en medio CO₂SC y evaluar su efecto sobre la reversión de alteraciones en parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina, inducida por obesidad en modelo murino.

1.6.2. Objetivos específicos

1. Obtener un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) con máximo contenido de EPA+DHA, a partir de aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de complejación con urea.
2. Estructurar acilglicéridos con EPA/DHA en posición *sn*-2 (AEs), a partir del concentrado óptimo de AGPICLn-3 obtenido en el objetivo 1 y del aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) bajo CO₂SC.
3. Obtener acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA a través de la incorporación de ácido gálico en el acilglicérido estructurado del objetivo anterior, mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (*Thermomyces lanuginosus*) bajo CO₂SC.
4. Evaluar el efecto de los acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA en la reversión de alteraciones en parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina inducida por obesidad en modelo murino.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Materias primas

El estudio se realizó utilizando aceite comercial refinado desodorizado de salmón de acuicultura (ASCRD), de la empresa Fiordo Austral S.A. (Santiago de Chile, Chile) y aceite de maravilla (AM) (*Helianthus annuus*), primer prensado en frío, marca Natura (Aceitera General la Dehesa, Santa Fe, Argentina) como control. Ambos fueron almacenados a -80°C en botellas de vidrio color ámbar en formato de 125 mL para facilitar su uso y conservación.

2.1.2. Reactivos

El ácido gálico, así como los estándares para la cromatografía en capa fina (CCF) y estándares para el ensayo de Folin-Ciocalteu se compraron en la empresa Sigma Aldrich, de Merck. Las lipasas *Lipozyme TLL* de *Thermomyces lanuginosus* y Novozyme 435 de *Candida antarctica* (Bagsværd, Dinamarca) se obtuvieron de la empresa Blumos S.A. (Santiago, Chile). El estándar interno de metil tricosanoato (23:0), estándar de referencia GLC-463 para cromatografía gaseosa y el estándar de triacilglicéridos fueron obtenidos de Nu-Check-Prep, Elysian, EE.UU. Los gases CO₂, N₂ y H₂ y Aire Zero fueron comprados a la empresa Gaslab-Linde (Santiago, Chile). Pruebas biológicas: la prueba Insulin (mouse) Ultrasensitive ELISA se obtuvo de la empresa Mercodia (Uppsala, Suecia). Para las determinaciones de colesterol total, triacilglicéridos plasmáticos y transaminasa glutámica pirúvica (GPT), transaminasa glutámica oxalacética (GOT) y fosfatasa alcalina (ALP) se utilizaron las tiras reactivas PANEL-V2 y KENSHIN-2 obtenidas de la empresa ARKRAY INC.

2.2. Métodos

2.2.1. Análisis de calidad

Los parámetros de calidad de los aceites fueron analizados según el método oficial AOCS (*Official Methods and Recommended Practices de American Oil Chemists Society*) como se describe a continuación:

2.2.1.1. Acidez Libre (AOCS Ca 5a-40)

Determinación de los ácidos grasos libres en la muestra mediante titulación con NaOH 0,1N. El método es aplicable a aceites crudos y refinados vegetales, marinos y animales.

2.2.1.2. Índice de Peróxidos (AOCS Cd 8b-90)

Determinación de todas las sustancias que oxidan el yoduro de potasio bajo las condiciones indicadas, y que se asume corresponden a peróxidos o productos similares de la oxidación.

2.2.1.3. Humedad y volátiles (AOCS Ca 2b-38)

Determinación de la humedad y cualquier otro material volátil bajo las condiciones del ensayo y se realiza por diferencia de peso antes y después de someter la muestra a calentamiento en estufa.

2.2.1.4. Impurezas Insolubles (AOCS Ca 3a-46)

Determinación de suciedad, harinilla y otras sustancias extrañas insolubles en éter de petróleo.

2.2.1.5. Índice de *p*-anisidina (AOCS Cd 18-90)

Determinación de la cantidad de aldehídos saturados e insaturados y cetonas presentes en aceites vegetales y animales, a través de la medición de la absorbancia de la preparación a 350 nm.

2.2.1.6. Índice Totox (AOCS Cg 3-91)

Considera la cantidad de aldehídos saturados e insaturados (Índice de *p*-anisidina) y la cantidad de las sustancias que oxidan el yoduro de potasio (Índice de peróxidos), como expresión del nivel de oxidación total. Su valor corresponde al valor del índice de *p*-anisidina sumado al doble del valor del índice de peróxidos.

2.2.1.7. Determinación de dienos y trienos conjugados (AOCS Ti 1a-64)

Esta determinación espectrofotométrica permite evaluar los cambios en la posición de los enlaces dobles (dienes, lectura a 233 nm) o triples (trienos, lectura a 268 nm) en la cadena hidrocarbonada y es una medida de la posible oxidación primaria y secundaria de los ácidos grasos.

2.2.2. Análisis de las materias primas lipídicas y los productos de la estructuración mediante cromatografía gas líquido (CGL)

El análisis cuantitativo de los perfiles de los ácidos grasos del ASCRD, del aceite de maravilla, de los concentrados de AGPICLn-3 y de los estructurados se realizó por triplicado mediante CGL, previa metilación de las muestras como se describe a continuación.

2.2.2.1. Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG)

La metilación fue realizada de acuerdo con las normas de la IUPAC 2301 (1987) y se hizo con el objetivo de obtener ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) detectables en CGL. Se realizó una metilación por calentamiento con metilato en metanol seguido por una esterificación en medio ácido, utilizando fenolftaleína como indicador. Se trabajó utilizando calentamiento a reflujo durante todo el proceso añadiendo hexano en la etapa final, además de 2,5 mg de estándar interno de metil-tricosanoato (23:0). Posteriormente, el matraz fue aforado con solución saturada de NaCl, se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 30 min en refrigeración a 4°C hasta que se produjo la separación de fases. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -23°C hasta su análisis.

2.2.2.2. Análisis, identificación y cuantificación mediante CGL

Los EMAG se analizaron empleando un cromatógrafo Agilent 7890B, equipado con detector de ionización de llama, y sistema de inyección split, columna capilar de sílice HP-88 (112-88A7) de 100m x 0,25mm x 0,2µm (Agilent, Santa Clara, CA, United States), utilizando hidrógeno como gas transportador y un volumen de inyección de 1µl de muestra. El programa utilizado fue: temperatura del inyector y del detector 250 °C, temperatura inicial del horno 180 °C mantenida por 20 min, velocidad de calentamiento 2 °C/min, temperatura final 215 °C, un tiempo final de 15 min y un tiempo total de 52,5 min, de acuerdo a AOCS *Official Method* (AOCS 2009, Ce 1j-7) con modificaciones. El estándar utilizado para la identificación de los perfiles de ácidos grasos fue NU-CHEK GCL-463 y se usó el software Open Lab CDS Chem Station Edition A.02.05.021 para el análisis de los cromatogramas. La identificación de los ácidos

grasos se realizó por comparación de los tiempos de retención de los *peaks* de la muestra y los *peaks* del estándar de la referencia CGL-463 (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA). La estandarización y la cuantificación de los ácidos grasos se realizó según el método oficial de la AOCS Ce1j-7 (2009). La cantidad de cada ácido graso se expresó como g/100 g de ácidos grasos totales (AGT) [Pando *et al.*, 2014].

2.2.3. Identificación por cromatografía de capa fina (CCF)

La identificación de las especies lipídicas obtenidas en cada objetivo se realizó mediante el uso de CCF con placas de sílica gel 60 F254 (Merck). Se extrajeron alícuotas de 1 μ L de cada muestra y sus controles para sembrarlas, utilizando como eluyente una solución de cloroformo, acetona y ácido acético glacial en una proporción de 96:4:1, v/v/v, respectivamente [Sabally *et al.*, 2006a]. El orden de migración en la placa cromatográfica fue observado desde abajo hacia arriba de acuerdo con su polaridad decreciente: monoacilglicéridos (MG), diacilglicéridos (DG), ácidos grasos libres (AGL) y triacilglicéridos (TG) según lo descrito por Wanasundara & Shahidi (1997). Una vez finalizada la elución, las placas fueron teñidas con vapor de yodo para observar los ácidos grasos insaturados.

2.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido

Para la caracterización térmica de los compuestos, se evaluó su comportamiento de fusión en un Calorímetro de Barrido Diferencial Perkin Elmer (6000 MT-DSC) con modelación de temperatura. Las muestras (9-10 mg) fueron cargadas en cápsulas de aluminio para compuestos volátiles (N°219-0062) herméticamente selladas mediante una prensa y refrigeradas a 5 °C por 24 h previo al análisis. Luego se sometieron a calentamiento gradual a una velocidad de escaneado de 5 °C/min dentro de un rango de temperatura entre -80 a 100 °C en comparación con una cápsula vacía. El calorímetro fue previamente calibrado con Indio (punto de fusión = 156,61°C, ΔH de fusión = 28,45 J/g) y se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas purga (99,9999%) a flujo de 20 mL/min. Tanto la muestra como la referencia (cápsula vacía) se sometieron a los siguientes pasos en el programa de temperatura:

1. Enfriar desde 20°C a -80°C a una velocidad de 5°C/min.
2. Mantener por 5 minutos a -80°C
3. Calentar desde -80°C a 100°C a una velocidad de 5°C/min
4. Mantener por 5 minutos a 100°C

Los termogramas de fusión y la entalpía de fusión (ΔH) expresada como J/g, obtenida desde el inicio (*onset*) y fin (*endset*) de fusión de las muestras y los *peaks* máximos de fusión fueron analizados usando el Software Pyris DSC [Rodríguez *et al.*, 2001].

2.2.5. Purificación de las muestras

Para la separación de los productos obtenidos luego de la acidólisis, se utilizó el protocolo de Jiménez *et al.*, (2010) con algunas modificaciones, basado en la neutralización básica de los ácidos grasos libres con solución hidroetanólica de NaOH y extracción de los acilglicéridos en hexano. Para ello se pesó 1 g de la muestra obtenida, y se mezcló con 50 mL de solución de etanol al 95 % a 70 °C y 1 mL de solución de fenolftaleína al 1% en etanol. Se procedió a titular la mezcla con NaOH (1N) hasta observar color rosado permanente. Luego se realizaron dos lavados con 20 mL de hexano cada uno, las fases hexánicas fueron lavadas con 10 mL de etanol al 10% (en agua destilada) las veces necesarias para hacer desaparecer las sales de ácidos grasos (hasta desaparición total de la coloración rosada al comprobar añadiendo una gota de fenolftaleína). Se evaporó el solvente en rotavapor a 38 °C y las muestras fueron almacenadas a -23 °C hasta su posterior análisis.

2.3. Obtención del concentrado de AGPICLn-3 con EPA+DHA a partir de ASCRD, mediante la optimización de las variables del proceso de complejación con urea.

2.3.1. Hidrólisis básica del ASCRD para obtener los ácidos grasos libres (AGL)

Para obtener los AGL, entre los que se encuentran los AGPICLn-3, se emplearon distintos protocolos [Guil-Guerrero & Belardi, 2001; Pando *et al.*, 2014; Pando *et al.*, 2017; Berríos *et al.*, 2017b]. Se mezclaron 500 g de ASCRD con solución de hidróxido

de potasio. Esta mezcla se calentó a 60 °C bajo reflujo por 90 min, con agitación constante en atmósfera de nitrógeno. Luego se transfirió a embudo de decantación y se añadieron 250 mL de agua destilada, 165 mL de etanol (95 % v/v) y se realizó una extracción de la materia insaponificada con hexano (250 mL). La fase hexánica fue descartada y la fase acuosa acidificada a pH 1,0 con HCl (6 N). Se extrajeron los AGL con hexano y se descartó la fase acuosa. La fase hexánica se mantuvo a 4 °C por 12 h y luego se filtró con papel Whatman N°1 utilizando Na₂SO₄ anhidro. El solvente fue evaporado a vacío (32 °C) en rotavapor y su remanente se evaporó con nitrógeno. Los AGL obtenidos se almacenaron a -80 °C hasta el proceso de complejación con urea.

2.3.2. Preparación de concentrados de AGPICLn-3 por inclusión con urea

Una vez obtenidos los AGL, se procedió a la preparación de los concentrados AGPICLn-3 según los métodos descritos por Vázquez *et al.*, (2017) y Rincón-Cervera *et al.*, (2018) con modificaciones (**Figura 10**).

Para ello se pesaron los AGL y se mezclaron con urea según las proporciones propuestas (**Tabla 2**), se agregó etanol y hexano para facilitar la disolución. Las mezclas se sometieron a agitación a temperatura ambiente, hasta disolver la urea. Se cristalizaron los AGL con urea, según las condiciones de la **Tabla 2** para obtener los complejos de inclusión. Los cristales de urea formados fueron separados en filtro Büchner con papel Whatman N°1 en matraz kitasato acoplado a corriente de nitrógeno. Antes de filtrar se agregó hexano dos veces al embudo para recuperar efectivamente todos los AGL restantes.

A la fase líquida obtenida se le realizaron dos lavados, el primero con agua ácida (40% v/v) y el segundo con agua destilada (40% v/v). Estos lavados se llevaron a cabo para eliminar los restos de urea y otros compuestos polares para descartar la presencia de carbamatos. La razón de lavar primero con agua ácida fue disminuir el pH y evitar la formación de sales de amonio de ácidos grasos, las cuales pueden provocar emulsificación [Rincón-Cervera y col. 2018].

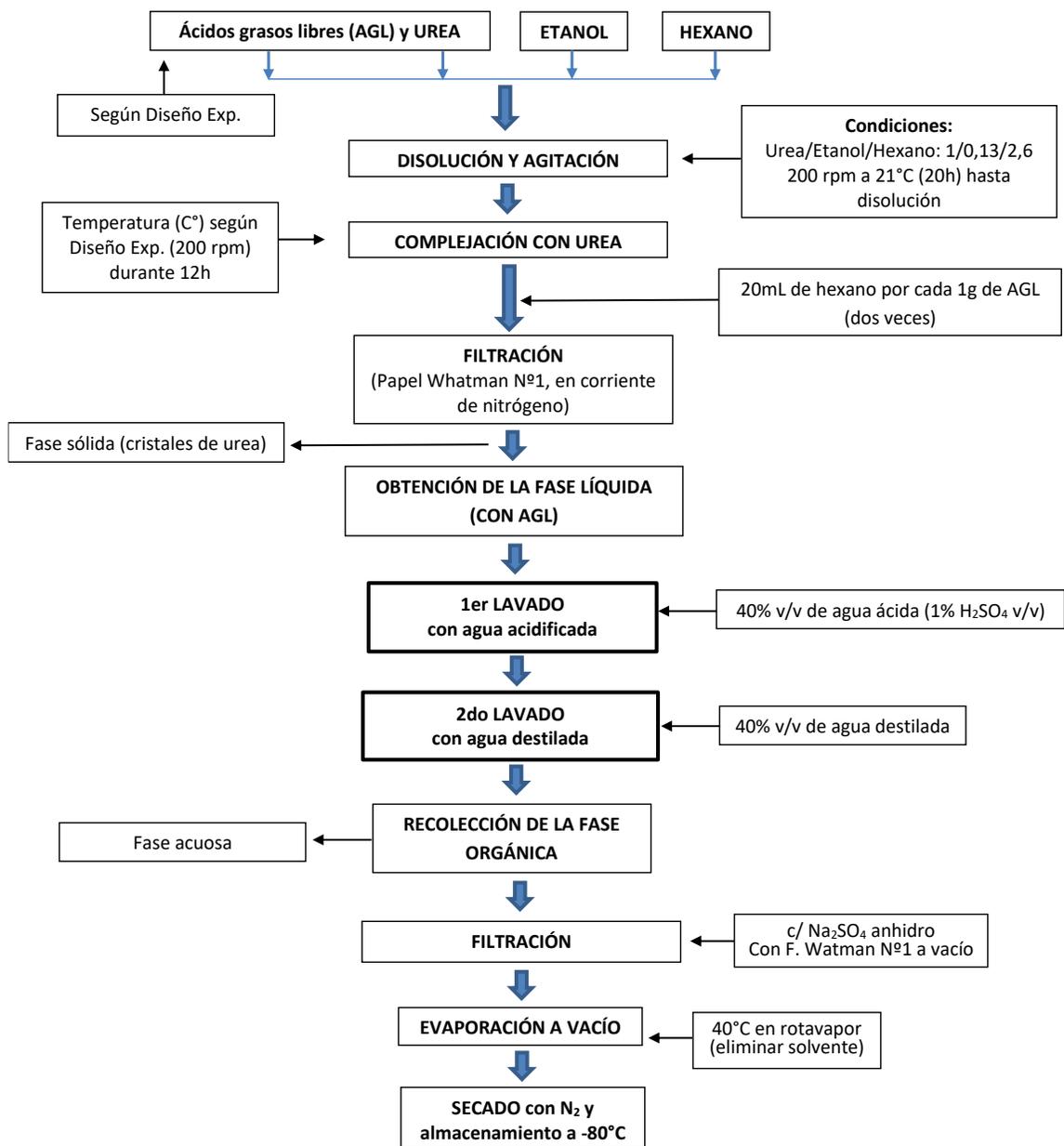


Figura 10. Diagrama de bloques del proceso de complejación con urea.

La fase orgánica colectada se filtró en embudo a vacío utilizando Na_2SO_4 anhidro para remover el remanente acuoso. Finalmente se eliminó el hexano por evaporación a vacío en rotavapor a 38 °C, obteniendo así los concentrados de AGPICLn-3. Éstos fueron secados con nitrógeno y almacenados a -80 °C hasta su uso posterior.

Tabla 2. Diseño experimental de Box-Behnken por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de complejación con urea para obtener concentrados AGPICLn-3:

Ensayo	Relación Urea/AGL (g/g)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	0	4	12
2	10	4	12
3	0	25	12
4	10	25	12
5	0	14,5	0
6	10	14,5	0
7	0	14,5	24
8	10	14,5	24
9	5	4	0
10	5	25	0
11	5	4	24
12	5	25	24
13	5	14,5	12
14	5	14,5	12
15	5	14,5	12

*Variables del proceso de complejación con urea: Relación Urea/AGL: Relación urea/ácidos grasos libres (g/g); Temperatura: temperatura de cristalización (°C); Tiempo: tiempo de cristalización (h).

2.3.3. Optimización y validación de las condiciones de obtención del concentrado AGPICLn-3 mediante metodología de superficie respuesta (MSR).

Para optimizar el proceso de obtención de AGPICLn-3 por complejación con urea mediante MSR [Hill y Hunter, 1966; Myers y Montgomery, 1995; Liu *et al.*, 2006] se realizó un diseño experimental de Box-Behnken (**Tabla 2**). Se estudió el efecto de las 3 variables independientes: relación urea/ácidos grasos libres (g/g), temperatura de cristalización (°C) y tiempo de cristalización (h) sobre las variables respuestas: concentración de EPA, DHA y EPA+DHA (g/100 AGT). El diseño contó con 15 ensayos, de los cuales 3 correspondieron a puntos centrales para estimar el error experimental. Se realizaron en forma aleatorizada para minimizar el efecto de las variables ocultas y cada uno fue sometido al procedimiento de complejación (punto

2.3.2.). El análisis de CGL (punto 2.2.2.) realizado a cada uno de los 15 concentrados, permitió construir modelos polinómicos cuadráticos predictivos en términos de sus coeficientes de regresión para las variables independientes y establecer la combinación para obtener un óptimo predicho del concentrado AGPICLn-3 con máximo EPA y/o DHA. Finalmente, el concentrado se validó experimentalmente según las condiciones propuestas en el óptimo teórico y fue almacenado bajo atmósfera de nitrógeno a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en la estructuración del acilglicérido estructurado (AEs).

2.4. Síntesis de acilglicéridos estructurados con EPA/DHA en *sn*-2 (AEs) a partir del concentrado óptimo AGPICLn-3 con contenido máximo EPA+DHA obtenido en el Objetivo 1 y del ASCRD, mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) bajo CO_2SC .

2.4.1. Síntesis de AEs con EPA y DHA en medio CO_2SC

Para obtener los AEs se efectuaron las reacciones de acidólisis enzimática en el equipo de CO_2SC Spe-edTM SFE Applied Separation (**Figura 11**).

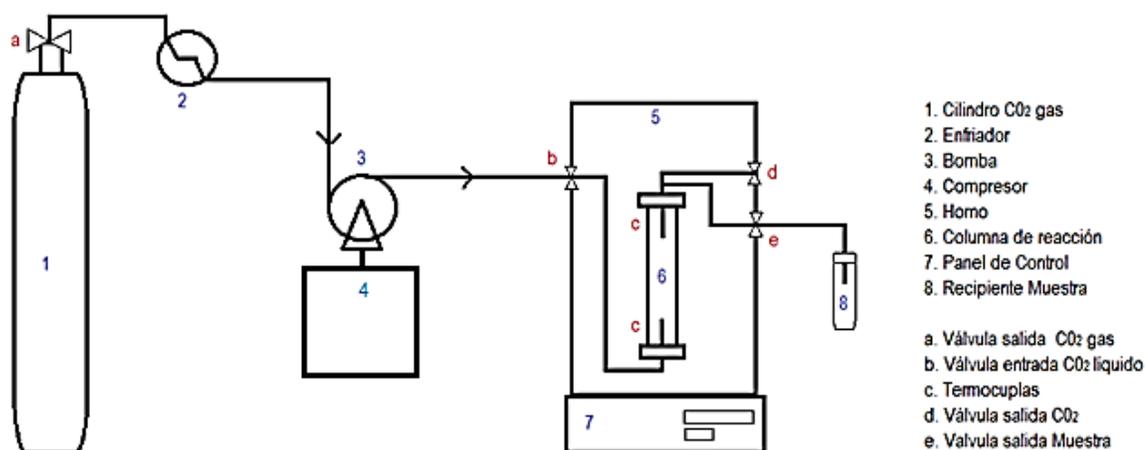


Figura 11. Esquema del equipo de CO_2 supercrítico. Fuente: Gutiérrez, 2020.

Se utilizó una columna de acero inoxidable con capacidad para 10 g de muestra y en ella se introdujeron los sustratos de la reacción (concentrado optimizado AGPICLn-3 con EPA+DHA y ASCRD) además de la enzima inespecífica (lipasa b de *Candida*

antarctica). La misma se colocó de forma ajustada en la cámara del reactor supercrítico y se procedió a ajustar las condiciones según el diseño establecido (**Tabla 3**).

Tabla 3. *Diseño compuesto de Draper-Lin por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención del acilglicérido estructurado.*

Ensayo	Relación AGPICLn-3/ASCRD (g/g)	Presión SC (bar)	Temperatura SC (°C)	Enzima (%)
1	7,2	255	56	2
2	7,2	255	44	2
3	7,2	123	56	8
4	1,8	255	44	8
5	7,2	123	44	8
6	1,8	123	56	2
7	1,8	255	56	8
8	1,8	123	44	2
9	0	189	50	5
10	9	189	50	5
11	4,5	78	50	5
12	4,5	300	50	5
13	4,5	189	40	5
14	4,5	189	60	5
15	4,5	189	50	0
16	4,5	189	50	10
17	4,5	189	50	5
18	4,5	189	50	5

**Relación AGPLICLn-3/ASCRD: relación entre el concentrado AGPLICLn-3 y el ASCRD (g/g); Presión SC: presión supercrítica (bar); Temperatura SC: temperatura supercrítica (°C); Enzima: porcentaje de enzima (Candida antarctica) utilizada (%).*

Éste fue un diseño compuesto de Draper-Lin de MSR con los siguientes niveles: -2, -1, 0, 1 y 2. Se realizaron 18 ensayos experimentales correspondientes cada uno a un experimento en condiciones distintas de los factores independientes, que incluyeron 2 puntos centrales (repeticiones). Las variables independientes consideradas fueron: relación concentrado AGPICLn-3/ASCRD (g), presión SC (bar), temperatura de reacción SC (°C) y cantidad de enzima (%) a utilizar. El tiempo de reacción se mantuvo

constante (6h). Las variables respuestas fueron: concentración de EPA, concentración de DHA, concentración de ácido palmítico y formación del AEs con máxima probabilidad de EPA/DHA en la posición *sn*-2 del glicerol. Los experimentos se realizaron de forma aleatorizada para minimizar el efecto de variables ocultas. Se utilizó CO₂ como disolvente para el proceso de obtención de los AEs empleando el sistema de CO₂SC del reactor Speed TM SFE (Separación Aplicada). Los AEs obtenidos fueron sellados bajo atmósfera de nitrógeno y almacenados a -80 °C hasta su utilización.

2.4.2. Análisis posicional del AEs mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)

Para la determinación de EPA o DHA en la posición *sn*-2 del acilglicerol las muestras obtenidas mediante acidólisis enzimática se purificaron (según lo descrito en 2.2.5) y se analizaron mediante espectrometría de masas en un equipo “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight” (MALDI-TOF) Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ión positivo mediante detección por reflexión.

2.4.2.1. Preparación de la muestra y obtención de los espectros

Después de purificar las muestras, se prepararon soluciones stock en 1,0 mL de cloroformo y a partir de estas se prepararon las soluciones de trabajo de concentración 1mg/ mL en cloroformo/isopropanol 1:1 para ser analizadas. Para la obtención de los espectros se mezclaron las soluciones de trabajo y blanco en razón 1:1 con 4 diferentes preparaciones de matrices: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA1) [Jaskolla *et al.*, 2009], 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol (CMBT1) [Teuber *et al.*, 2010] y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB1 y 2) [Teuber *et al.*, 2011; Schiller *et al.*, 2002] que se indican en la **Tabla 4**. De cada mezcla muestra/matriz y blanco/matriz se depositó 0,7 μ L en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA, **Figura 12**). Los espectros finales corresponden a la suma de 30 barridos de 30 impactos de láser (900 impactos de láser en total) aplicados en diferentes puntos tomados al azar de cada muestra depositada en la placa porta muestra.

Tabla 4. Preparación de las matrices de α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA1), 5-cloro-2-mercaptobenzotiazol (CMBT1) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB1 y 2).

Rótulo	Preparación
CHCA1	10.0mg/mL en acetonitrilo 70% v/v Ácido trifluoroacético 0.1% v/v
CMBT1	10.0mg/mL en metanol
DHB1	77.0mg/mL en metanol
DHB2	77.0mg/mL en metanol y ácido trifluoroacético 0.1% v/v

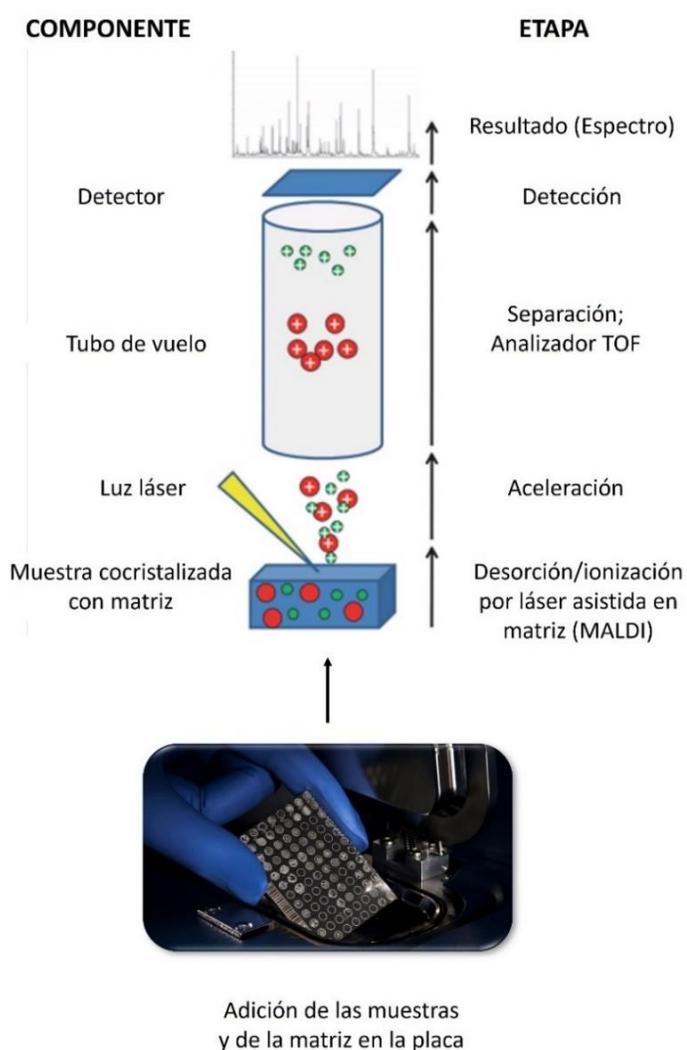


Figura 12. Diagrama general del análisis de muestras mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Fuente: Croxatto, 2012, con modificaciones.

2.4.2.2. Análisis de los espectros obtenidos mediante sistema MALDI-TOF

Para el análisis de los espectros fue utilizado el programa mMass versión 5.5.0 según protocolos ya descritos [Strohalm *et al.*, 2008; Strohalm *et al.*, 2010; Niedermeyer & Strohalm, 2012]. Para la detección de las señales m/z monoisotópicas de los espectros adquiridos, se empleó el algoritmo MALDI-TOF peptides (razón señal/ruido de 3,0 y un límite de intensidad relativa de 0,1%). Para la identificación se trabajó con las señales m/z monoisotópicas detectadas, que fueron asignadas a través de la opción Match & Annotate de la herramienta Compound Search mediante comparación con las masas monoisotópicas teóricas de diferentes tipos de glicerolípidos (GL) contenidos en la base de datos LIPID MAPS versión 16-11-2013.

2.4.3. Optimización de las condiciones de obtención del AEs mediante MSR.

Se cuantificó el contenido de EPA y DHA (g/100g AGT) mediante CGL de los AEs purificados obtenidos en cada uno de los 18 ensayos. Los datos permitieron construir modelos polinómicos cuadráticos predictivos en términos de sus coeficientes de regresión para las variables independientes y establecer la combinación de éstas para encontrar un óptimo teórico o predicho de AEs con un máximo contenido de EPA+DHA, mínimo de ácido palmítico y máximo de EPA o DHA en posición *sn-2*. Finalmente, el AEs con EPA/DHA óptimo fue validado experimentalmente aplicando las condiciones propuestas en el óptimo teórico y fue almacenado bajo atmósfera de nitrógeno a una temperatura de -80 °C hasta su utilización en la estructuración del acilglicérido fenólico con EPA/DHA y ácido gálico (AFEs).

2.5. Obtención de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA, a través de la incorporación de ácido gálico en el AEs con EPA/DHA en *sn-2* del objetivo anterior, mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (*Thermomyces lanuginosus*) bajo CO₂SC.

2.5.1. Obtención de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico (AFEs)

Las reacciones de acidólisis fenólica fueron catalizadas por la enzima *Lipozyme TLL* de *Thermomyces lanuginosus*, específica para las posiciones *sn-1* y *sn-3* del

triacilglicérido. La preparación de la columna de extracción (10 g) con los sustratos de reacción (AEs óptimo del objetivo 2 anterior y ácido gálico como compuesto fenólico antioxidante) así como el uso del sistema de CO₂SC se hicieron según lo descrito en 2.4.1. Se realizó un diseño factorial de cribado (**Tabla 5**) basado en la metodología de superficie de respuesta (MSR) de 2², de 2 factores: presión supercrítica (SC, bar) y temperatura supercrítica (SC, °C). Los rangos para estas variables independientes se mantuvieron entre 78-300 bar y 40-80 °C, respectivamente. La proporción de ácido gálico se mantuvo constante (400 mg) así como la cantidad de enzima (10% del sustrato) y el tiempo de reacción estática (6 h) [Lin *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008]. Se mantuvieron las mismas variables respuestas (concentración de EPA, DHA, EPA+DHA, expresados en g/100g de AGT) y se añadió la variable respuesta “porcentaje de acidólisis fenólica (%)”, correspondiente a la síntesis del estructurado con AG. Se realizaron los ensayos correspondientes a cada uno de los 7 experimentos, que incluyeron 3 puntos centrales (repeticiones) en orden de estimar el error experimental. Los AFEs fenólicos obtenidos fueron sellados bajo atmósfera de nitrógeno y almacenados a -80 °C hasta su utilización.

Tabla 5. *Diseño factorial de cribado 2², de 2 factores y 7 experimentos (MSR). Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención de acilglicéridos fenólicos estructurados (AFE).*

Ensayo	Variables independientes	
	Temperatura supercrítica (°C)	Presión supercrítica (bar)
1	40	78
2	80	78
3	40	300
4	80	300
5	60	189
6	60	189
7	60	189

2.5.2. Análisis de la síntesis de AFEs con ácido gálico mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV (HPLC-UV).

Este análisis se efectuó con el propósito de corroborar la formación de AFEs con ácido gálico en su estructura glicérica de acuerdo con la metodología propuesta por Sabally *et*

al., (2006a, 2006b). Las muestras obtenidas de cada uno de los 7 experimentos fueron purificadas según lo descrito anteriormente (2.2.5) y a continuación analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se prepararon a una concentración de 50 mg/mL en isopropanol y se examinaron en un cromatógrafo HPLC HP 1100 (Agilent Technologies Inc. CA-USA) equipado con un detector ultravioleta para detectar la presencia de mono, di y triacilgliceroles (215 nm), así como el ácido gálico unido a estas estructuras (280 nm). Se calculó el rendimiento de acidólisis (% acidólisis fenólica) a partir del cálculo del área total de los *peaks* correspondientes a lípidos fenólicos dividido por el área total del ácido fenólico en el blanco multiplicado por 100 [Sabally *et al.*, 2006a, 2006b]. Para el control del cromatógrafo se utilizó el programa ChemStation for LC 3D Rev. A.10.02 (Agilent Technologies Inc. CA-USA). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Luna C18 (2) de 150×4.6 mm. 5 μm y 100 Å (Phenomenex Inc. CA-USA). La elución de 20 μL de muestra inyectada se realizó mediante un sistema de gradiente usando una mezcla de acetonitrilo/metanol (7: 5, v/v) como disolvente (A) e isopropanol como disolvente (B). La elución se inició mediante un flujo isocrático del 100% del disolvente A durante 10 minutos, seguido de un gradiente lineal de 10 minutos al 60% del disolvente B y luego al 100% del disolvente B en otros 10 minutos. El caudal se ajustó a 1 mL/min y la detección se realizó a 215 y 280 nm [Sabally *et al.*, (2006b) y Andrikopoulos *et al.*, (1991)].

2.5.3. Análisis de la síntesis de AFEs con ácido gálico mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS).

2.5.3.1. Obtención de cromatogramas y espectros:

Las muestras se resuspendieron a una concentración de 50 mg/mL en isopropanol, los que se examinaron en un sistema LC-MS que consistió en el cromatógrafo Elute UHPLC (Bruker Daltonik GmbH, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización de tipo electrospray y analizador de masas de tiempo de vuelo ESI-TOF Compact (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para el control del cromatógrafo y del espectrómetro se utilizó el programa HyStar 4.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Kinetex C18 de

100×2.1 mm (Phenomenex Inc., CA-USA). El proceso de ionización (nebulización) mediante electrospray se realizó a 4500 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una presión de 1.8 bar y flujo de 9 L/min, asistido por nitrógeno como gas de secado (220°C). Los cromatogramas y espectros de masas se adquirieron en polaridad positiva y negativa. Los espectros se adquirieron para el intervalo m/z 20-2500.

2.5.3.2. Análisis de cromatogramas y espectros:

Para la visualización de los cromatogramas y espectros de masas se utilizó el programa DataAnalysis versión 4.4 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Previo a los diferentes análisis los datos espectrométricos se calibraron utilizando los calibrantes presentes en el peak de calibración (tR 0.1 min) para el intervalo m/z 20-2500 correspondientes a diferentes agrupaciones de iones formados por ácido fórmico y ion sodio (cúmulos de iones Na/formato). Los datos espectrométricos calibrados se exportaron en formato mzXML considerando espectros de masas de línea (centroides). Adicionalmente, se realizó la colección de datos espectrométricos utilizando la opción Compounds-AutoMS(n) que permitió la detección de las señales m/z (precursor) y sus correspondientes fragmentaciones.

2.5.3.3. Análisis de identificación de acilgliceroles y ácidos grasos

Los datos espectrométricos exportados en formato mzXML se utilizaron para su análisis de identificación en el servidor GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking (<https://gnps.ucsd.edu/>) [Wang *et al.*, 2016], a través de la opción Library Search considerando todas las bibliotecas disponibles y utilizando los siguientes parámetros: tolerancia de masa de ion precursor, ± 0.025 Da; tolerancia de masa de ion fragmento, 0.02 Da; clase librería, *gold*; búsqueda de análogos, *do search*; para otros parámetros se utilizaron los valores por defecto. Se seleccionaron aquellas identificaciones en las que la diferencia entre el valor m/z experimental (m/z-exp) y el de librería (m/z-teo) fuese ≤ 0.1 unidades de masa. Complementariamente, se utilizó la opción Molecular Networking de GNPS que permite la determinación/detección de nuevas moléculas considerando todas las bibliotecas disponibles y utilizando los siguientes parámetros: tolerancia de masa de ion precursor, ± 0.02 Da; tolerancia de

masa de ion fragmento, 0.02 Da; búsqueda de análogos, *do search*; para otros parámetros se utilizaron los valores por defecto.

2.5.3.4. Análisis de identificación de acilgliceroles fenólicos

Los datos espectrométricos exportados en formato mgf se utilizaron para su análisis de interpretación automática mediante el programa Sirius versión 5.6.3 [Dührkop *et al.*, 2019]. Para el análisis de los datos adquiridos en polaridad positiva se consideró que las señales m/z detectadas corresponderían a las especies $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ y/o $[M+K]^+$, mientras que para el análisis de los datos adquiridos en polaridad negativa se consideró que las señales m/z detectadas corresponderían a $[M-H]^-$ y/o $[M+Cl]^-$. En ambos casos en la opción *Molecular Formula Identification* se consideraron los siguientes parámetros: instrumento, Q-TOF; filtrado de distribución isotópica, activado; error de asignación MS2, 10 ppm; filtrado de fórmulas basado bases de datos, todas seleccionadas; elementos permitidos en la fórmula, valor por defecto; en la opción *CSI:FingerID-Fingerprint Prediction*, se consideraron los mismos aductos seleccionados en la ionización; en la opción *CSI:FingerID-Structure Database Search*, se consideraron todas las bases de datos; y se activó la opción *CANOPUS-Compound Class Prediction*. Alternativamente, la identificación de acilgliceroles fenólicos se realizó manualmente mediante el programa *DataAnalysis*, para lo cual se buscó en los diferentes espectros de fragmentación los iones m/z 171.0294, m/z 153.0188, m/z 143.0344 y m/z 127.0395 en polaridad positiva o los iones m/z 169.0137, m/z 151.0031, m/z 141.0288 y m/z 125.0239 en polaridad negativa que corresponderían a los fragmentos teóricos esperados debido a la presencia de ácido gálico. Además, en ambas polaridades se consideró la pérdida de fragmento neutro de 170.0215 y 154.0266 también asociados a la presencia de ácido gálico. Posteriormente los compuestos seleccionados se sometieron a interpretación manual de espectros.

2.5.4. Optimización de las condiciones de obtención de AFEs mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR)

Para optimizar el proceso de acidólisis se cuantificó el contenido de EPA y DHA (g/100g AGT) mediante CGL de los AFEs purificados, a partir de las 7 corridas

experimentales realizadas y se calculó el rendimiento de la acidólisis fenólica según lo descrito en 2.5.2. Los ensayos fueron realizados de forma aleatoria para minimizar el efecto de la variabilidad en las respuestas observadas. El proceso de optimización fue desarrollado utilizando MSR según lo descrito por Myers & Montgomery (1995). Los datos obtenidos permitieron construir modelos polinómicos predictivos en términos de sus coeficientes de regresión para las variables independientes y establecer la combinación de éstas para encontrar un óptimo teórico de AFEs con máximo contenido de EPA+DHA y síntesis fenólica. Finalmente, el AFEs óptimo fue validado experimentalmente aplicando las condiciones propuestas en el óptimo teórico y almacenado bajo atmósfera de nitrógeno a una temperatura de -80 °C hasta su utilización en el modelo murino obeso.

2.5.5. Actividad antioxidante del AFEs óptimo validado mediante determinación de la capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (ORAC)

El ensayo se realizó de acuerdo con el método propuesto por Prior *et al.*, (2003), en un Fluorímetro BioTek FLx800 con el software GEN 5 versión 2.09. La lectura se hizo desde la parte superior de la placa con un filtro de excitación de 485 nm con 20 nm ancho de banda, y un filtro de emisión de 528 nm con 20 nm de ancho de banda. Se preparó una solución de *buffer* fosfato 0,075 M con agua miliQ a pH 7,4 y una solución stock de fluoresceína (FL, 50 ml) de concentración 0,5 mg/mL disolviendo en *buffer* fosfato 0,075 M a pH 7,4. Se hizo una primera dilución con una alícuota de 50 µL de la solución stock y se aforó a 10 mL (2,5 µg/mL) y la segunda dilución se hizo con una alícuota de 2 mL y se aforó a 100 mL (0,5 µg/mL). Ambas se aforaron con *buffer*. Se preparó una solución stock de estándar Trolox (disolución de 25 mg en 50 mL con el *buffer* fosfato (0,5 mg/mL)) y se diseñó una curva de calibración de concentraciones 100 µM, 50 µM, 25 µM y 12,5 µM. Se preparó también una solución de AAPH (2,2-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro) como generador de radicales libres, en una concentración de 46 mg/mL en *buffer* fosfato. Para la extracción y lectura de compuestos fenólicos se pesaron 2,5g de muestra en un tubo para centrifuga (15ml) y se agregó 5 mL de una solución metanol:agua (80:20) para la extracción. Posteriormente

se agitó en vortex (15 minutos), se llevó al baño ultrasónico (15 minutos) y se centrifugó (25 minutos, 5000 rpm). Se tomó una alícuota de la fase superior de 125 μL y se aforó con *buffer* fosfato 0,075 M a pH 7,4 en un matraz de 10 mL. La placa ORAC se conformó de la siguiente manera: se llenaron los pocillos del borde con 300 μL de agua MiliQ. Luego se llenaron los pocillos correspondientes a cada punto de la curva de Trolox (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) con un volumen de 25 μL de Trolox y 150 μL de fluoresceína. Se procedió a llenar los pocillos para la muestra con 25 μL del extracto metanol/agua disuelto en *buffer* fosfato y 150 μL de fluoresceína y los pocillos para el blanco con 25 μL de *buffer* con 150 μL de fluoresceína. La placa se incubó (30 minutos, 37°C) y la reacción se inició con la adición desde el inyector del fluorímetro de 25 μL de AAPH (150 mM) en cada pocillo. Las lecturas se obtuvieron en el Lector de Fluorescencia FLx800 –TBID. La capacidad antioxidante (ORAC) en la muestra (expresada en μmol de equivalente Trolox (ET)/g de aceite) se midió interpolando el valor del área neta bajo la curva en la regresión lineal de la curva de Trolox, generada con la variación cinética del “apagamiento” de la FL que registró el equipo a cada minuto.

2.5.6. Determinación de polifenoles totales en el AFEs óptimo validado

Se realizó el ensayo Folin-Ciocalteu que se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El patrón utilizado fue ácido gálico PA. Se prepararon soluciones patrones de AG a partir de una solución madre de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (PPM), en concentraciones crecientes de 0 a 500ppm. De cada una de estas diluciones se tomó 0,1 ml y se aforó en matraces de 10 ml con agua destilada, reactivo de Folin-Ciocalteu y carbonato de sodio al 20 %. Se dejaron reposar en oscuridad durante 30 minutos y realizó la lectura en un espectrofotómetro Jenway 7305 con lámpara de luz UV (765nm) para obtener la curva de calibración y su correspondiente ecuación. Las muestras se analizaron según el mismo procedimiento y su concentración fue determinada sustituyendo los valores de absorbancia en la ecuación obtenida anteriormente.

2.6. Análisis estadístico de las propiedades físicas y químicas de los aceites

Los análisis químicos de caracterización de materias primas se realizaron por triplicado. El 95% de intervalo confianza de cada parámetro se calculó tomando en cuenta el número de réplicas y considerando la desviación estándar (SD) de cada muestra. Los resultados se analizaron mediante ANOVA empleando el software Statgraphics® Centurion XVI-2011 software (StatPoint Technologies Inc., Rockville, USA).

2.7. Modelos matemáticos obtenidos mediante Metodología de Superficie Respuesta (MSR)

En los diseños experimentales de los objetivos 1, 2 y 3 se utilizó la metodología de superficie respuesta, que consiste en un grupo de técnicas estadísticas y matemáticas útiles para el desarrollo, mejoramiento y optimización de procesos [Myers *et al.*, 2016]. La optimización de respuesta múltiple se realizó para evaluar la combinación de niveles de factores experimentales que permiten optimizar simultáneamente todas las respuestas del diseño experimental. Como resultado, se obtuvo la maximización de la función de deseabilidad, cuyos valores se encuentran en el rango 0-1 [Derringer & Suich, 1980]. En los diseños de los objetivos 1 y 2 los datos se analizaron según un modelo de segundo orden (modelo de regresión polinomial cuadrático) mientras que en el objetivo 3 fueron analizados según un modelo de primer orden (modelo de efectos principales). Los modelos ajustados de las ecuaciones se obtuvieron tomando en cuenta las variables independientes y sus interacciones [Myers *et al.*, 2016]. Las variables respuestas fueron obtenidas de acuerdo con las siguientes ecuaciones según cada diseño experimental:

Modelo de complejación con urea (2.3.)

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Modelo de acidólisis enzimática (*C. antarctica*) para la síntesis de AEs óptimos con EPA/DHA en posición *sn-2* (2.4.)

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Modelo de acidólisis enzimática (TLL) para la obtención de AFEs óptimos con EPA/DHA y ácido gálico (2.5.)

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} representan los coeficientes de regresión del intercepto, lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente, y X_i y X_j son las variables independientes y ε corresponde al error aleatorio. 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 $p < 0,05$. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI-2011 (Stat Point Technologies, Inc., Rockville, USA).

2.8. Evaluación del efecto de la suplementación con los acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico (AFEs) en la reversión de alteraciones de los parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina, inducida por obesidad en un modelo murino.

2.8.1. Modelo animal

Se utilizó un diseño experimental basado en un modelo animal de ratón con obesidad inducida por la alimentación con una dieta de alto contenido en grasas. Se trabajó con ratones macho de la cepa C57BL/6, de 7 semanas de edad para asegurar que fuesen ratones adultos ya desarrollados, con un peso entre 18-22g, condiciones ya estandarizadas en el laboratorio [Espinosa *et al.*, 2013 ; Eun-Jung *et al.*, 2013; Chao *et al.*, 2014]. El modelo de ratón C57BL/6 se ha descrito como un buen modelo para el estudio de alteraciones metabólicas inducidas por la obesidad de origen nutricional [Dossi *et al.*, 2014 ; Illesca *et al.*, 2019; Echeverría *et al.*, 2019a; Echeverría *et al.*, 2019b]. Los animales fueron obtenidos del Instituto de Salud Pública y luego trasladados a la Unidad de Mantenimiento Animal (UMA) del Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDIS, según sus siglas en inglés) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

El Certificado de Bioética (# CBA 1001 FMUCH, aprobado el 7 de mayo de 2018) fue otorgado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El número de animales que se utilizó por cada condición fue de 6 por cada grupo. Este es el número mínimo de animales necesarios para alcanzar diferencias entre resultados estadísticamente válidos. Se utilizó como variable el área bajo la curva de glucosa en ayuno y se consideró una disminución del 20% correspondiente a la disminución mínima generada por un tratamiento estándar como el tratamiento con metformina [Inzucchi *et al.*, 1998; Hundal *et al.*, 2000; Giannarelli *et al.*, 2003]. Las técnicas incluyeron el perfil bioquímico (con un error asociado a cada medición, cercano al 5%). El cálculo se realizó basándose en la siguiente fórmula [Taucher, 1999]:

$$n = 2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}) \times \frac{s^2}{D^2}$$

Donde:

n: Número de observaciones mínimas necesarias

Z α : Probabilidad de cometer un error tipo I (5%)

Z β : Probabilidad de cometer un error tipo II (10%)

s: Desviación estándar de los valores individuales, que se asume igual en todos los grupos. Se utilizó 0.2, equivalente a un 20%.

D: Diferencia que se estimó como estadísticamente significativa. Se utilizó 0,2; equivalente a una reducción de la curva de tolerancia a la glucosa en un 20%.

Si se fija el nivel de significancia mínima en 0,05 y la potencia que se desea para la prueba es (1- β) = 0,90, los correspondientes Z $_{(\alpha/2)}$ y Z $_{\beta}$ son 1,96 y 1,28, respectivamente. Resultando en:

$$n = 2 \times (1,96 + 1,28) \times \frac{0,2^2}{0,2^2}$$

Luego, el número mínimo de animales por cada grupo = 6 ratones.

Los animales fueron alimentados con dieta control (DC, D12450b) inicialmente y luego con dieta obesogénica con 60% de calorías en base a la grasa (DAG) (LabDiet, D12492,

Research Diet) durante 12 semanas. Posteriormente fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos (n=6) y suplementados con los aceites (**Tabla 6**) durante 4 semanas.

Tabla 6. Descripción de los productos lipídicos empleados en la suplementación.

Código	Tipo de aceite suplementado
AM	Aceite de maravilla como aceite control que no posee EPA ni DHA
AM+AG	Aceite de maravilla + ácido gálico
AS+AG	Aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD) + ácido gálico
AEs	Acilglicéridos estructurados con EPA/DHA (sin ácido gálico).
AFEs	Acilglicéridos fenólicos estructurados con EPA/DHA y ácido gálico

Se administraron 200µl diarios de cada producto de acuerdo a los tratamientos (**Figura 13**), equivalentes en volumen a la administración de 150 mg/kg de peso de ácido docosahexaenoico (DHA) aportados por el aceite de salmón comercial refinado desodorizado ASCRD (Chao *et al.*, 2014).

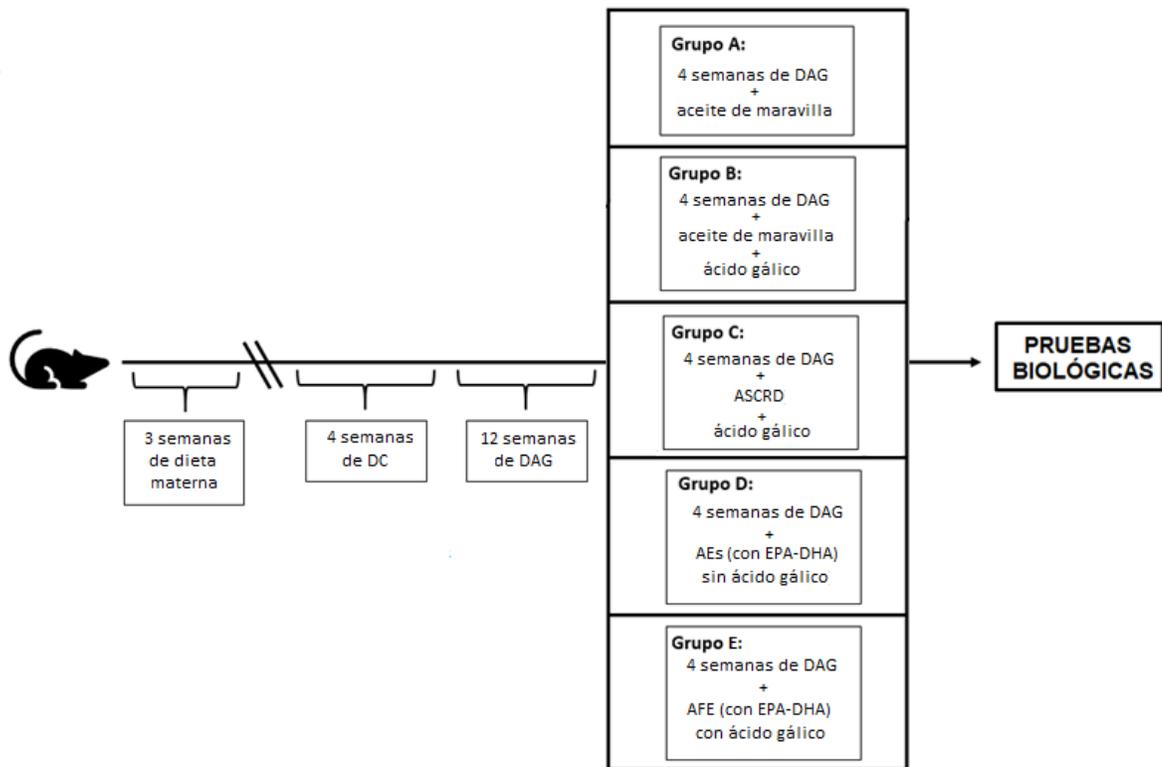


Figura 13. Diagrama de trabajo para la suplementación de los grupos de ratones en estudio.

2.8.2. Pruebas biológicas:

2.8.2.1. Test de tolerancia a la glucosa:

A cada uno de los grupos en estudio se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa después de 4 h de ayuno, mediante la administración de un bolo de glucosa de 2g/kg de peso vía intraperitoneal. Se obtuvieron muestras de sangre de la cola para medir las concentraciones de glucosa utilizando un Glucómetro OneTouch Johnson & Johnson. Se realizaron las determinaciones de glicemia a los 15 minutos desde la administración de la carga, repitiéndose a los 30, 60, 120 minutos. Los datos fueron expresados como área bajo la curva, obtenidas a través del programa GraphPad Prism versión 8.0.1.

2.8.2.2. Medición de insulina

La determinación de insulina en plasma se realizó con el inmunoensayo Insulin (mouse) Ultrasensitive ELISA (Mercodia, Uppsala, Suecia), de acuerdo con las instrucciones incluidas en el kit. El cálculo de resultados se desarrolló a través de la herramienta de análisis cubic-spline del programa Graphpad Prism versión 8.0.1. para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

2.8.2.3. HOMA-IR

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa en ayuno, para establecer la condición de resistencia a la insulina a través del índice HOMA-IR (15). El procedimiento fue el siguiente: después de las 4 semanas con la suplementación, cada ratón fue puesto en ayuno por 6 horas, luego el animal fue eutanasiado y se extrajo la sangre venosa rápidamente por punción cardíaca. La muestra fue centrifugada por 10 minutos a 500xG (fuerza centrífuga relativa), el suero fue almacenado a -20°C para el posterior análisis. La determinación de glucosa plasmática se realizó mediante el método de glucosa oxidasa (tiras reactivas PANEL-V2, equipo SPOTCHEM™ EZ, Minneapolis, MN, USA). Obtenidos estos valores, la resistencia a la insulina se evaluó a través del índice de modelo homeostático de evaluación de resistencia a la insulina (HOMA-IR) mediante la siguiente expresión:

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Insulinemia } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glicemia } (\text{mg/dL})] / 405$$

2.8.2.4. Perfil bioquímico

Colesterol total, triacilglicéridos plasmáticos, transaminasa glutámica pirúvica (GPT), fosfatasa alcalina (ALP) y transaminasa glutámico-oxalacética (GOT). Para estas determinaciones se utilizaron las tiras reactivas PANEL-V2 y KENSHIN-2, empleando el principio de determinación por química seca. El análisis en su totalidad, así como el cálculo de resultados se realizó mediante el equipo Analizador Profesional SPOTCHEM™ EZ, Minneapolis, MN, USA.

2.8.2.5. Histología hepática

El tejido hepático fue fijado en formaldehído al 4% p/v 0,1 M pH 7,0 durante 18 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a la deshidratación por cambios de alcoholes de concentraciones ascendentes (70°, 95°, 100°, 100°, 100°), al aclaramiento con xilol, impregnación e inclusión con parafina (histosec®). Se realizaron cortes de 3 µm adheridos en portaobjetos cargados StarFrost®, se secaron durante 1 hora a 60°C, se aclararon e hidrataron por cambios de alcoholes descendentes. Posteriormente se les realizó la tinción de hematoxilina (C.I. 75290, CAS 517-28-2 Sigma Aldrich) y eosina (C.I. 45380, CAS 17372-87-1 Sigma Aldrich). Los cortes se tiñeron por 5 minutos con la solución de hematoxilina de Mayer, se viró en agua corriente durante 3 minutos y se lavó con agua destilada. Posteriormente, se tiñó con solución de eosina acuosa al 1% durante 30 segundos y se lavó con agua destilada. Los cortes se deshidrataron por cambios de alcoholes de concentración ascendente, se aclararon y montaron utilizando medio de montaje hidrofóbico Entellan ®. Los núcleos de las células presentan una coloración azul, mientras que el citoplasma una coloración rosada que fueron observadas mediante el microscopio óptico de luz convencional.

2.8.2.6. Peso de los órganos

Para la realización de este análisis se determinaron los pesos de cada animal según los diferentes grupos suplementados. Se obtuvo el peso de la grasa abdominal, grasa epididimal y del hígado de todos los ratones antes y después de los tratamientos, con el fin de constatar su aumento o disminución.

2.8.3. Análisis estadístico de los datos biológicos

El análisis de la distribución de los datos se realizó utilizando la prueba de Shapiro Wilk. En los casos en que la distribución de los datos fue normal, se evaluó si existían diferencias significativas entre los grupos experimentales mediante ANOVA, seguido de una prueba de Tukey que realiza comparaciones múltiples. En el caso que la distribución de los datos no sea normal, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis, con post test de Dunn. Se consideró que existen diferencias significativas cuando $p < 0.05$. Los resultados se expresaron como promedio \pm SEM. Para todos estos análisis se utilizó el software GraphPad Prism versión 8.0.1., San Diego, CA, USA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Objetivo 1. Obtención de un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) con máximo contenido de EPA+DHA, a partir de aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de complejación con urea.

3.1.1. Ensayos preliminares

3.1.1.1. Caracterización del aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD)

La **Tabla 7** muestra la caracterización del ASCRD mediante análisis químicos y físicos. Los valores obtenidos para el contenido de acidez libre, valor de peróxidos, valor de *p*-anisidina e índice TOTOX ($0,20 \pm 0,00$ g de ácido oleico/100g de aceite; $0,40 \pm 0,00$ meq oxígeno activo/kg aceite; $1,13 \pm 0,02$; y $1,93 \pm 0,02$, respectivamente) revelan una baja oxidación lipídica y deterioro hidrolítico lo cual concuerda con resultados obtenidos previamente en diferentes tipos de aceites de pescado, incluyendo aceite de salmón [Pando *et al.*, 2014; Hernández, 2015; Berríos *et al.*, 2017a; Espinosa *et al.*, 2020]. El valor de AGL indica el grado de deterioro hidrolítico que posee el aceite, siendo una medida de la rancidez hidrolítica.

Tabla 7. Caracterización física y química del ASCRD

Parámetros	Resultados
Ácidos grasos libres (AGL, g de ác. oleico/100 g aceite)	$0,20 \pm 0,00$
Valor de Peróxidos (VP, mEq O ₂ / 1000 g)	$0,40 \pm 0,00$
Valor <i>p</i> -anisidina (VA, Unidades)	$1,13 \pm 0,02$
Índice TOTOX	$1,93 \pm 0,02$
Impurezas insolubles (IMPI, %)	$0,00 \pm 0,00$
Humedad y compuestos volátiles (HCV)	$0,04 \pm 0,00$
Dienos conjugados (DC)	$0,01 \pm 0,00$
Trienos conjugados (TC)	$0,04 \pm 0,00$

*Valores corresponden al promedio ($n=3$) \pm desviación estándar.

Los datos usualmente encontrados para aceite refinado deteriorado se encuentran entre 0,5 y 1,5% [Masson & Mella, 1985, FAO-OMS/FINUT 2012]. El resultado de AGL de

este aceite fue muy bajo, en concordancia con lo obtenido por Hernández (2015) y Méndez *et al.*, (2010), quienes reportaron valores de $0,30 \pm 0,01$ y $0,73 \pm 0,01$ respectivamente, (expresados en gramos de ácido oleico/100g de aceite de salmónidos). Los hidroperóxidos acumulados (Valor de peróxido, VP) corresponden a la primera etapa de la rancidez oxidativa u oxidación primaria de las materias. Los resultados usuales para aceite refinado de pescado pueden alcanzar un máximo de 5 meq de oxígeno activo/kg de materia grasa [CODEX, 2017; GOED 2016] (**Tabla 8**). Los obtenidos en este proyecto fueron de $0,40 \pm 0,00$ meq de oxígeno activo/kg de aceite, menor que los reportados por Pando *et al.*, 2017, quien registró $3,54 \pm 0,16$ meq de oxígeno activo/kg de aceite en aceite de salmón refinado.

Tabla 8. Caracterización química del aceite de pescado refinado y aceite vegetal de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente.

Parámetros de calidad	Aceite refinado de pescado			
	RSA (2021)	CODEX (2017)	GOED (2016)	EFSA (2010)
Ácidos grasos libres (AGL; g de ácido oleico /100 g aceite)	<0,25%	<1,51%	<0,25%	<0,1%
Valor de Peróxidos (VP; meq de oxígeno activo /kg de aceite)	<10	<5	<5	<0,1
Valor p-anisidina (VA)		<20	<20	
Valor TOTOX (TV)		<26	<26	

*RSA: Reglamento Sanitario de los Alimentos, CODEX: Codex Alimentarius, GOED: Global Organization for EPA and DHA y EFSA: European Food Safety Authority.

El índice de *p*-anisidina es una medida de la formación de compuestos de oxidación altamente reactivos con predominación de estructuras carbonilo tales como aldehídos y cetonas [Wanasundara & Shahidi, 1997]. Para el ASCRD este índice resultó menor que el límite de 20 establecido por el CODEX y el GOED (**Tabla 8**). Además, el ASCRD cumple también con la *Canadian legislation NHP Fish Oil, PhEur Fish Oil Types I and II, Br Pharm, Fish Oil, Australia Natural Fish Oil Types I and II and USP Fish oil* [De boer, 2018]. La formación de dienos conjugados está relacionada con el bajo índice de peróxidos, ya que son índices de oxidación correspondientes a la oxidación primaria [Codony, 2010; Javidipour *et al.*, 2017]. Por lo tanto, debía esperarse que este valor de

dienos conjugados fuese lo más cercano a cero, como se observa en la **Tabla 7**. Por otra parte, la oxidación secundaria es representada por los valores de anisidina y trienos conjugados obtenidos para ASCRD, lo cual indica que existe una mínima, o casi imperceptible oxidación secundaria. Los resultados de humedad e impurezas son bajos también por lo que puede concluirse que el ASCRD posee una calidad inicial óptima. Todos los resultados obtenidos cumplen con las normativas establecidas por el Reglamento sanitario de los Alimentos (RSA, 2021), *Codex Alimentarius* (CODEX, 2017) y *Global Organization for EPA and DHA* (GOED, 2016) (**Tabla 8**).

3.1.1.2. Identificación y cuantificación de ácidos grasos del ASCRD mediante cromatografía gas-líquido (CGL)

La composición en ácidos grasos para el ASCRD se muestra en la **Tabla 9** y proporcionó la siguiente secuencia decreciente para los ácidos grasos más abundantes (expresados en g/100g de ácidos grasos totales (AGT)): ácido oleico ($36,95 \pm 0,08$), ácido linoleico ($15,77 \pm 0,07$), ácido palmítico ($12,76 \pm 0,03$), ácido α -linolénico ($4,91 \pm 0,00$), EPA ($3,92 \pm 0,04$), DHA ($3,83 \pm 0,04$), ácido palmitoleico ($3,74 \pm 0,01$), ácido esteárico ($3,64 \pm 0,01$), ácido cis-vaccénico ($3,32 \pm 0,00$) y finalmente, ácido mirístico ($2,90 \pm 0,01$). Así, el aceite analizado reportó 19,94% de ácidos grasos saturados (AGS), 47,27% de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y 32,79% de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

El total de AGPICL_{n-3} de cadena larga fue de 9,44 %. En cuanto a los ácidos grasos más abundantes (ácidos oleico, linoleico y palmítico), similares resultados fueron obtenidos por Pando *et al.*, (2017) y Méndez *et al.*, (2010). Sin embargo, existen marcadas diferencias para los ácidos grasos menores al comparar con estos estudios previos; y una baja concentración de EPA/DHA para tratarse de un aceite de pescado. Esto podría explicarse por las diferentes condiciones de cultivo, que pueden variar en términos de dieta y lugar, principalmente porque los aceites marinos de la dieta son sustituidos por aceites vegetales (ricos en ácido linoleico) y por lo tanto se incorporan en los tejidos grasos de los salmónidos (Jacobsen *et al.*, 2013).

Tabla 9. Composición y cuantificación de ácidos grasos del aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD, expresados en (g/100g AGT)).

Ácidos grasos		ASCRD*
Láurico	C12:0	0,06 ± 0,00
Mirístico	C14:0	2,90 ± 0,01
Palmítico	C16:0	12,76 ± 0,03
Palmitelaídico	C16:1 9t	0,07 ± 0,00
Palmitoleico	C16:1 9c	3,74 ± 0,01
Heptadecanoico	C17:0	0,22 ± 0,00
Heptadecenoico	C 17:1 10c	0,13 ± 0,00
Estearico	C18:0	3,64 ± 0,01
<i>Trans</i> -vaccénico	C 18:1 11t	N/I
Oleico	C18:1 9c	36,95 ± 0,08
<i>Cis</i> -vaccénico	C18:1 7c	3,32 ± 0,00
Linoelaidico	C18:2 9t 12t	0,06 ± 0,00
Linoleico	C18:2 9c 12c	15,77 ± 0,07
Gamma linolénico	C18:3 6c 9c 12c	0,32 ± 0,00
5-Eicosaenoico	C 20:1 5c	0,22 ± 0,00
8-Eicosaenoico	C 20:1 8c	0,44 ± 0,01
11-Eicosaenoico	C 20:1 11c	1,84 ± 0,04
α -Linolénico	C 18:3 9c 12c 15c	4,91 ± 0,00
Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c	1,34 ± 0,01
Behenoico	C 22:0	0,36 ± 0,00
Eicosatrienoico	C 20:3	0,33 ± 0,00
Erúxico	C 22:1	0,29 ± 0,01
Araquidónico	C 20:4	0,35 ± 0,04
Docosadienoico	C 22:2	0,12 ± 0,01
Eicosapentaenoico	C 20:5	3,92 ± 0,04
Nervónico	C 24:1	0,27 ± 0,03
Docosatetraenoico	C 22:4	0,15 ± 0,03
Docosapentaenoico	C 22:5	1,69 ± 0,05
Docosahexaenoico	C 22:6	3,83 ± 0,04
Total de ácidos grasos saturados (AGS)		19,94
Total de ácidos grasos monoinsaturados (AGM)		47,27
Total de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)		32,79
Total de AGPI de cadena larga n-3 (AGPICLn-3)		9,44
EPA+DHA		7,75

*Valores obtenidos corresponden al promedio (n=3) ± desviación estándar.

3.1.1.3. Análisis posicional de EPA/DHA en los acilglicéridos de ASCRD, mediante diferentes matrices por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Se evaluaron las matrices: CHCA1, CMBT1, DHB1 y DHB2 (punto 2.4.2.), para seleccionar la más conveniente al visualizar adecuadamente los componentes del ASCRD mediante espectrometría de masa por MALDI-TOF [Strohalm *et al.*, 2008; Strohalm *et al.*, 2010; Niedermeyer & Strohalm 2012]. Los resultados de la selección se muestran en la **Tabla 10**. En la sección **10a**, la presencia de EPA y DHA y su posición en diacilglicéridos (DG) y triacilglicéridos (TG) de ASCRD se pudo identificar adecuadamente utilizando la matriz CHCA1. Se encontró que es más probable que el EPA esté ubicado en la posición *sn*-2 del glicerol, mientras que el DHA se encuentra principalmente en la posición *sn*-3. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Berríos *et al.*, (2018) ya que la baja probabilidad de que haya DHA en la posición *sn*-2 puede deberse a su mayor tamaño con respecto al EPA.

Como se puede observar en las secciones **10b** y **10c**, la presencia de EPA y DHA en los monoacilglicéridos (MG) y DG de ASCRD no se identificó en las matrices CMBT1 y DHB1, respectivamente. Además, en estas matrices fue nula la aparición de TG. La sección **10d** muestra la posición de EPA/DHA en el DG y TG de ASCRD según la identificación con la matriz DHB2. Se identificaron TG con DHA en posición *sn*-3 diferentes a los obtenidos de la matriz CHCA1. Además, se identificaron 12 compuestos con EPA ubicados en la posición *sn*-2, siendo los mismos que se visualizaron en la matriz CHCA1.

La sección **10e** muestra que la matriz CHCA1 contiene la mayoría de los compuestos probables identificados en comparación con el resto de las matrices. En la matriz DHB2 se encontraron 12 TG probables que presentan DHA en la posición *sn*-3, siendo diferentes a los encontrados en CHCA1. Sin embargo, debido a la importancia de la posición *sn*-2, se seleccionó la matriz CHCA1 como la ideal para continuar con el análisis de las muestras y además por ser la matriz donde se encontró el mayor número probable de TG con EPA/DHA en *sn*-2. Estos resultados ya se encuentran publicados [Dovale-Rosabal *et al.*, 2021].

Tabla 10. Resultados de la posición de EPA y DHA en el glicerol obtenidos mediante espectrometría de masas Maldi-TOF: (a) Posición sn-2 de EPA/DHA en el DG y TG de ASCRD identificada con la matriz CHCA1*; (b) Posición de ácidos grasos (AG) en el MG de ASCRD identificada con la matriz CMBT1*; (c) Posición de AG en el DG de ASCRD identificada con la matriz DHB1*; (d) Posición sn-2 de EPA/DHA en el DG y TG de ASCRD identificada con la matriz DHB2*; (e) Resumen de la presencia de EPA/DHA en el DG/TG de ASCRD identificadas en las diferentes matrices*.

(a)	
m/z	EPA y/o DHA en posición sn-2 identificados en la matriz CHCA1 *
601.4827	DG (15:0/20:5/-)
877.7280	TG (12:0/20:5/22:2), TG (16:0/16:1/22:6)
877.6892	TG (12:0/20:5/22:5), TG (14:0/20:5/20:5), TG (14:1/18:3/22:6)
879.7436	TG (12:0/20:5/22:1), TG (16:0/16:0/22:6)
879.6473	TG (13:0/20:5/20:5)
879.7048	TG (12:0/20:5/22:4), TG (14:0/18:3/22:6)
881.7205	TG (12:0/20:5/22:3), TG (14:0/18:2/22:6)
881.6056	TG (12:0/20:5/20:5)
881.7593	TG (12:0/20:5/22:0), TG (13:0/20:5/21:0)
901.7831	TG (14:0/20:5/21:0), TG (13:0/20:5/22:0)
901.6892	TG (12:0/22:6/22:6), TG (14:1/20:5/22:6)
901.728	TG (14:0/20:5/22:4), TG (14:1/20:5/22:3)
901.7256	TG (12:0/20:5/22:1), TG (14:0/18:0/22:6)
903.7412	TG (12:0/20:5/22:0), TG (13:0/20:5/21:0)
903.7436	TG (14:0/20:5/22:3), TG (14:1/20:5/22:2)
903.7048	TG (14:1/20:5/22:5), TG (16:1/20:5/20:5), TG (14:0/20:5/22:6)
905.7205	TG (14:0/20:5/22:5), TG (16:0/20:5/20:5), TG (14:1/20:5/22:4)
905.7593	TG (14:0/20:5/22:2), TG (14:1/20:5/22:1)
905.6995	TG (12:0/20:5/21:0)
905.663	TG (13:0/20:5/22:6), TG (15:1/20:5/20:5)
907.7749	TG (15:1/20:5/21:0), TG (14:0/20:5/22:1), TG (14:1/20:5/22:0)
907.6786	TG (15:0/20:5/20:5), TG (13:0/20:5/22:5)
907.7361	TG (14:0/20:5/22:4), TG (14:1/20:5/22:3)
907.6212	TG (14:1/20:5/20:5), TG (12:0/20:5/22:6)
927.7987	TG (15:0/20:5/22:1), TG (15:1/20:5/22:0), TG (16:1/20:5/21:0)
927.7412	TG (14:0/20:5/22:2), TG (14:1/20:5/22:1)
927.6838	TG (13:0/20:5/22:3)
927.7436	TG (18:0/20:5/20:5), TG (16:0/20:5/22:5), TG (16:1/20:5/22:4)
927.7048	TG (18:3/20:5/20:5), TG (18:3/20:5/20:5), TG (14:1/22:6/22:6)
(b)	
m/z	AG identificados en la matriz CMBT1*
369.2402	MG (16:0/-/-)

381.2975	MG (18:0/-/-)			
401.2662	MG (-/20:4/-)			
(c)				
m/z	DG identificados en la matriz DHB1 *			
603.4288	DG (14:0/20:0/-), DG (17:0/17:0/-), DG (18:0/16:0/-), DG (16:0/18:0/-), DG (12:0/22:0/-), DG (-/16:0/18:1), DG (14:0/18:2/-), DG (16:1/16:1/-), DG (14:1/18:1/-), DG (12:0/20:2/0:0)			
(d)				
m/z	EPA y/o DHA en posición sn-2 identificados en la matriz DHB2 *			
601.4827	DG (15:0/20:5/-)			
905.7593	TG (14:0/20:5/22:2), TG (14:1/20:5/22:1), TG (14:0/20:1/22:6), TG(14:1/20:0/22:6), TG (16:0/18:1/22:6), TG (16:1/18:0/22:6)			
905.6995	TG (12:0/20:5/21:0)			
905.7205	TG (14:0/20:5/22:5), TG (16:0/20:5/20:5), TG (14:1/20:5/22:4), TG(16:1/18:3/22:6), TG (16:0/18:4/22:6), TG (16:1/18:3/22:6), TG (14:1/20:3/22:6), TG (14:0/20:4/22:6)			
907.7361	TG (14:0/20:5/22:4), TG (14:1/20:5/22:3), TG (16:0/18:3/22:6), TG (16:1/18:2/22:6)			
907.7749	TG (15:1/20:5/21:0), TG (14:0/20:5/22:1), TG (14:1/20:5/22:0), TG (14:0/20:0/22:6)			
(e)				
Matriz *	EPA (sn-2)	DHA (sn-2)	DHA (sn-3)	EPA (sn-2)/DHA (sn-3)
CHCA1	52	2	12	4
CMBT1	0	0	0	0
DHB1	0	0	0	0
DHB2	12	0	12	0

*MG: monoacilglicéridos, DG: diacilglicéridos, TG: triacilglicéridos

3.1.1.4. Cromatografía en capa fina del ASCRD purificado y no purificado

La separación por cromatografía en capa fina (CCF) de ASCRD purificado (carril A) y ASCRD no purificado (carril B) se muestra en la **Figura 14**. El orden de elución de los compuestos observados mostró que los ácidos grasos se encuentran predominantemente en forma de TG en ASCRD. No se evidenciaron diferencias marcadas entre el ASCRD purificado y no purificado, este resultado es característico de los aceites refinados en los que la presencia de ácidos grasos libres (AGL) ha sido minimizada por el proceso de refinado [Gunstone, 2011; Hamm *et al.*, 2013] y es consistente con el bajo índice de acidez libre encontrado en este aceite.

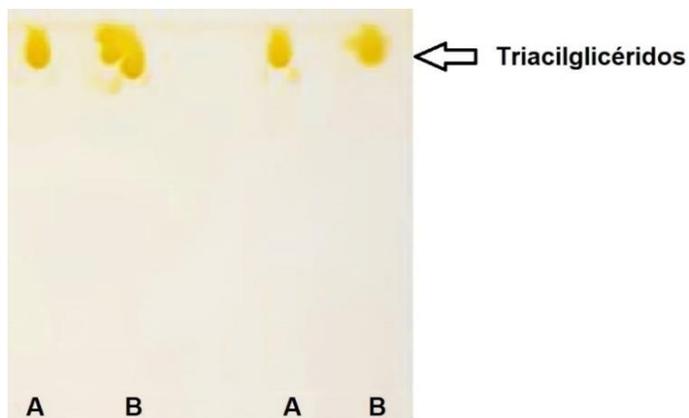


Figura 14. Separación cromatográfica en capa fina del aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD): (A) ASCRD purificado y (B) ASCRD no purificado.

3.1.1.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) del ASCRD

Los termogramas obtenidos mediante DSC del perfil de fusión representativo de ASCRD se muestra en la **Figura 15**, cuyo rango de fusión fue de $-71,97$ a $2,06^{\circ}\text{C}$, presentando una entalpía de $349,12$ J/g. Se observaron 4 *peaks* de fusión correspondientes a TG de bajo punto de fusión (PFB1) y TG con punto de fusión medio 1, 2 y 3 (PFM1, PFM2 y PFM3) (Tabla 11) a diferentes temperaturas.

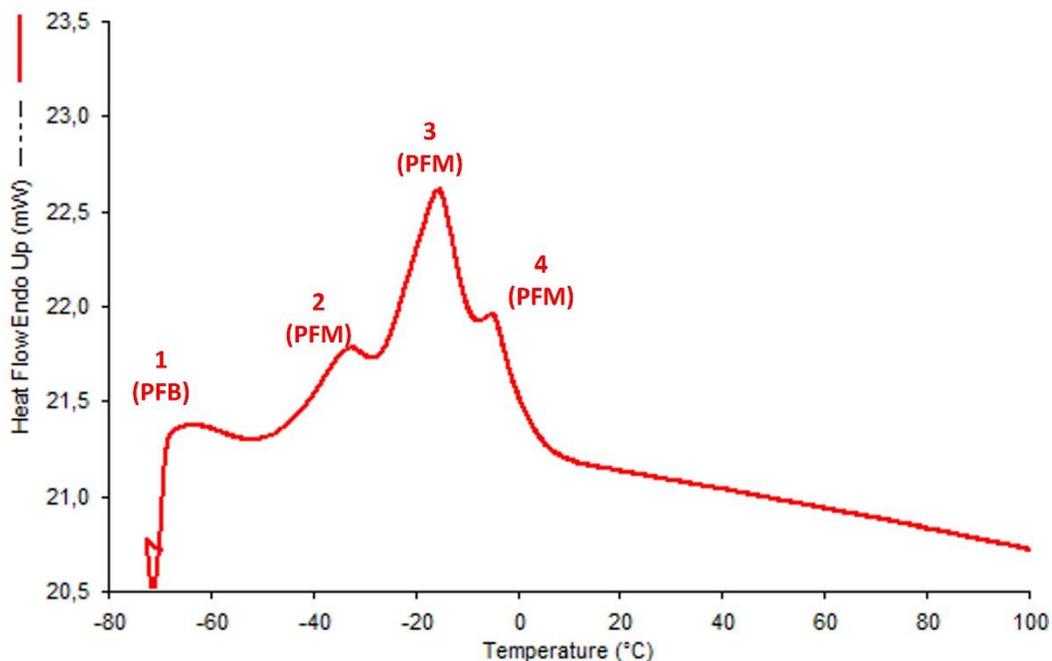


Figura 15. Termograma de fusión del ASCRD.

Tabla 11. Comportamiento térmico del ASCRD

Parámetros calorimétricos	ASCRD
Onset de fusión	-71,97 ± 2,32°C
PFB1	-68,17 ± 1,31°C
PFB2	-
PFB3	-
PFM1	-34,01 ± 0,08°C
PFM2	-15,97 ± 0,30°C
PFM3	-4,54 ± 0,14°C
Endset de fusión	2,06 ± 0,23°C
Rango de fusión	-71,97 a 2,06°C
Entalpía de fusión	349,12 J/g

*PFB: *peak de punto de fusión bajo*; PFM: *peak de punto de fusión medio*; ASCRD: *Aceite de salmón comercial refinado desodorizado*.

El punto de fusión a bajas temperaturas ($-68,17 \pm 1,31$ °C) es característico de los TG que lo componen, que son formados principalmente por ácidos grasos insaturados [Tan & Chen Man, 2000] y que en este caso podría deberse a la fusión de los AGPICLn-3 presentes en ASCRD. Lo anterior concuerda también con lo reportado por Sathivel (2005) quien menciona que los aceites de pescado refinados muestran *peaks* altos y estrechos en los termogramas de DSC y con rangos de fusión entre de $-69,6$ a $-0,36$ °C para el aceite de salmón rojo, señalando que las temperaturas negativas de los rangos de fusión son debidas a la presencia de ácidos grasos insaturados, donde el aumento del número de dobles enlaces disminuye el punto de fusión [Sathivel, 2001]. Rojas (2013) atribuye el *peak* a baja temperatura a los AGPICL, principalmente a los ácidos EPA y DHA, presentes en ASCRD según se confirmó en los resultados de cromatografía gaseosa (**Tabla 9**) Las diferencias que se observan entre los distintos rangos de aceites de salmón pueden deberse también a que es un material químicamente complejo y por lo tanto, es esperable que la fusión se produzca en un amplio rango de temperaturas [Dos Santos *et al.*, 2010].

3.1.2. Obtención del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) con máximo contenido de EPA+DHA, a partir de aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de complejación con urea.

En la **Tabla 12** se muestran las diferentes combinaciones del diseño experimental utilizado para obtener un concentrado óptimo con el máximo contenido de EPA y DHA.

Tabla 12. Diseño experimental de Box-Behnken mediante MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de complejación con urea para la obtención de concentrado AGPICLn-3 con un máximo contenido de EPA y/o DHA.

Ensayo	Variables independientes			Variables respuesta		
	Urea/AGL (g/g)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	EPA	DHA	EPA+DHA
	A	B	C	(g/100g AGT)		
1	0	4	12	3,54	3,67	7,21
2	10	4	12	16,8	25,34	42,14
3	0	25	12	3,56	3,66	7,22
4	10	25	12	11,66	13,38	25,04
5	0	14,5	0	3,71	3,83	7,54
6	10	14,5	0	7,29	8,02	15,31
7	0	14,5	24	3,58	3,87	7,45
8	10	14,5	24	10,65	12,66	23,31
9	5	4	0	9,74	12,2	21,94
10	5	25	0	7,09	8,72	15,81
11	5	4	24	12,84	15,89	28,73
12	5	25	24	12,16	14,15	26,31
13	5	14,5	12	11,12	13,35	24,47
14	5	14,5	12	11,07	13,46	24,53
15	5	14,5	12	11,04	13,37	24,41

*A: Relación urea/ácidos grasos (g/g); B: Temperatura de cristalización (°C); C: Tiempo de cristalización (h).

El análisis estadístico del diseño experimental mediante MSR determinó las variables que influyeron significativamente en las variables respuesta EPA, DHA y EPA+DHA del concentrado de AGPICLn-3. La significancia estadística de cada efecto independiente en el análisis de varianza de las tres variables respuestas se muestra en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Análisis de varianza para cada variable respuesta en la optimización del proceso de obtención del concentrado AGPICL n-3.

Efectos*	EPA					DHA					EPA+DHA				
	S.C.	GL	C.M.	Razón-F	Valor-P	S.C.	GL	C.M.	Razón-F	Valor-P	S.C.	GL	C.M.	Razón-F	Valor-P
Lineal															
A	128,08	1	128,08	78416,33	0,0000	246,087	1	246,087	71675,86	0,0000	729,238	1	729,238	202566,12	0,0000
B	8,925	1	8,925	5464,48	0,0002	36,937	1	36,937	10758,35	0,0001	82,1762	1	82,176	22826,72	0,0000
C	16,245	1	16,245	9945,92	0,0001	23,805	1	23,805	6933,50	0,0001	79,38	1	79,38	22050,00	0,0000
Cuadrático / interacción															
AA	37,064	1	37,064	22692,63	0,0000	52,281	1	52,281	15227,59	0,0001	177,387	1	177,387	49274,08	0,0000
AB	6,656	1	6,656	4075,35	0,0002	35,700	1	35,700	10398,24	0,0001	73,188	1	73,188	20330,01	0,0000
AC	3,045	1	3,045	1864,30	0,0005	5,29	1	5,29	1540,78	0,0006	16,362	1	16,362	4545,01	0,0002
BB	3,558	1	3,558	2178,47	0,0005	13,079	1	13,079	3809,43	0,0003	30,2809	1	30,280	8411,35	0,0001
BC	0,970	1	0,970	594,02	0,0017	0,756	1	0,756	220,46	0,0045	3,44102	1	3,441	955,84	0,0010
CC	9,462	1	9,462	5793,16	0,0002	23,735	1	23,735	6913,22	0,0001	63,1701	1	63,170	17547,25	0,0001
Falta ajuste	17,789	3	5,929	3630,40	0,0003	50,525	3	16,841	4905,39	0,0002	126,111	3	42,037	11676,97	0,0001
Error puro	0,003	2	0,001			0,006	2	0,003			0,0072	2	0,003		
Total (corr.)	232,148	14				490,429	14				1385,36	14			

*A: relación U/AGL (g/g); B: Temperatura de cristalización (°C); C: Tiempo de cristalización (h).
Abreviaturas: S.C.= suma de cuadrados; G.L.= grados de libertad; C.M.=cuadrados medios. Se expresan en rojo aquellos efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Puede observarse que las tres variables respuestas (EPA, DHA y EPA+DHA) tienen un comportamiento similar, donde los efectos estadísticamente significativos fueron: la relación U/AGL (A), la temperatura de cristalización (B) y el tiempo de cristalización (C); los términos cuadráticos de dichas variables y todas las interacciones.

Se construyeron los modelos polinómicos cuadráticos ajustados de las variables respuesta EPA, DHA y EPA+DHA. Los efectos que no presentaron significancia estadística ($p > 0,05$) no fueron incluidos en el modelo con el fin de obtener precisión en la respuesta. Los modelos (ecuaciones 1 - 3) en términos de sus coeficientes de regresión para las variables independientes proporción de U/AGL(A), temperatura de cristalización (B), tiempo de cristalización (C) fueron los siguientes:

$$\text{EPA} = 3,98314 + 2,24937 * A - 0,282859 * B + 0,256171 * C - 0,126733 * A^2 - 0,0245714 * AB \quad (1) \\ + 0,0145417 * AC + 0,00890401 * B^2 + 0,00390873 * BC - 0,0111169 * C^2$$

$$\text{DHA} = 4,00538 + 3,20954*A - 0,456608*B + 0,420427*C - 0,150517*A^2 - 0,0569048*AB \quad (2)$$

$$+ 0,0191667*AC + 0,0170711*B^2 + 0,00345238*BC - 0,0176071*C^2$$

$$\text{EPA+DHA} = 7,98852 + 5,4589*A - 0,739467*B + 0,676597*C - 0,27725*A^2 - 0,0814762 \quad (3)$$

$$+ 0,0337083*AC + 0,0259751*B^2 + 0,00736111*BC - 0,028724*C^2$$

Los tres modelos poseen un coeficiente de determinación (R^2 ajustado por grados de libertad) de 78,54% para EPA, 71,15% para DHA, y 74,51% para EPA+DHA lo cual indica que los modelos representan de manera adecuada la variabilidad de los resultados. La **Figura 16** muestra las principales variables que afectan el proceso de obtención de concentrados AGPICLn-3 mediante gráficos de tipo Pareto.

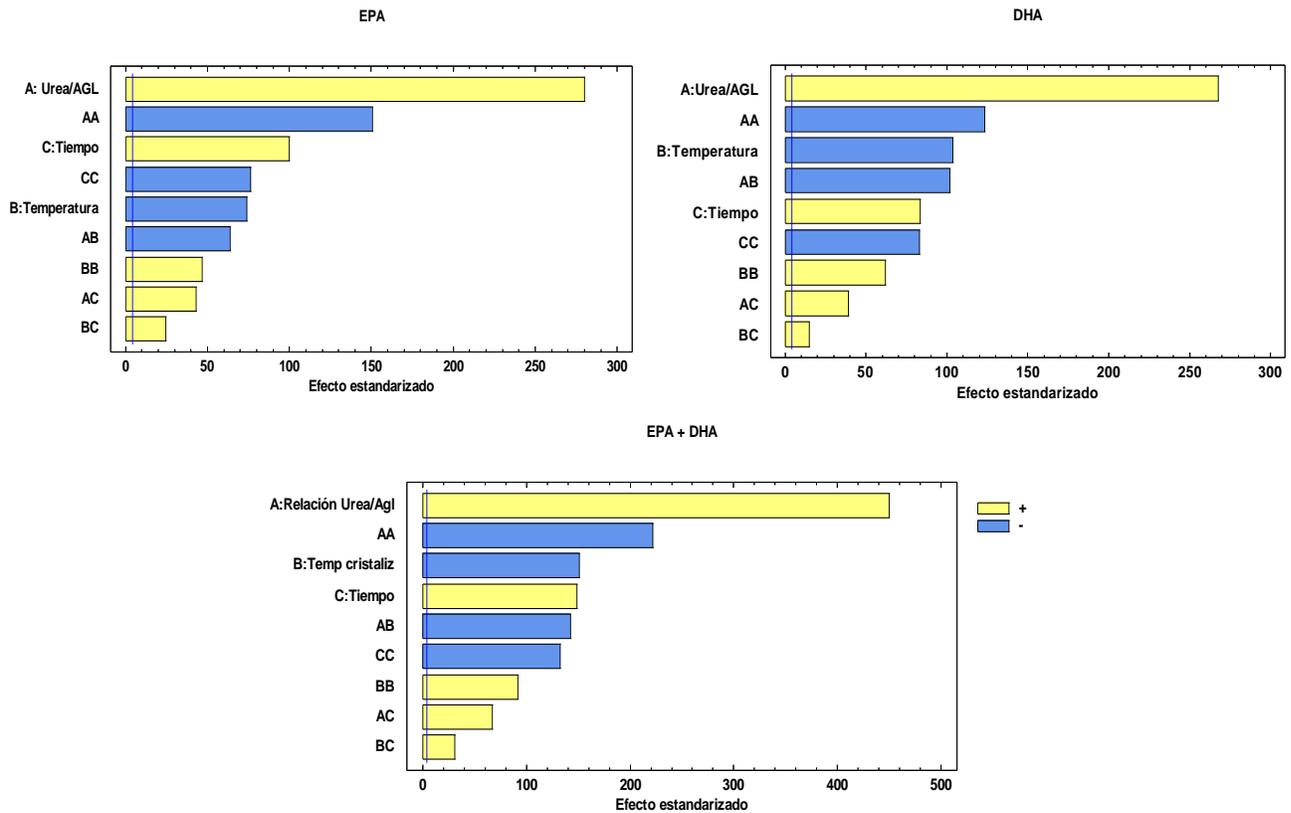


Figura 16. Diagramas de Pareto estandarizados de los efectos de las variables independientes sobre las variables respuestas EPA, DHA y EPA+DHA (la línea azul indica $p < 0,05$).

El efecto estandarizado lineal, cuadrático y de interacción para las variables respuesta EPA, DHA y EPA+DHA se observan en un orden decreciente de significancia (la línea

marca un $p < 0,05$). En todos los gráficos de Pareto las variables independientes A, B, C y D así como sus efectos cuadráticos y de interacción afectaron el proceso de complejación con urea para la obtención de concentrados AGPICLn-3 con un máximo contenido de EPA, DHA y EPA+DHA. Se puede observar el efecto positivo de las variables independientes A y C, de las interacciones entre sí y del efecto cuadrático de la temperatura de cristalización (B) en la obtención de concentrados con contenidos máximos de EPA, DHA y EPA+DHA.

En la **Figura 17** se observan las representaciones tridimensionales de gráficos de superficie respuesta y contorno, reflejando la influencia de la combinación de las principales variables del proceso (relación U/AGL y temperatura).

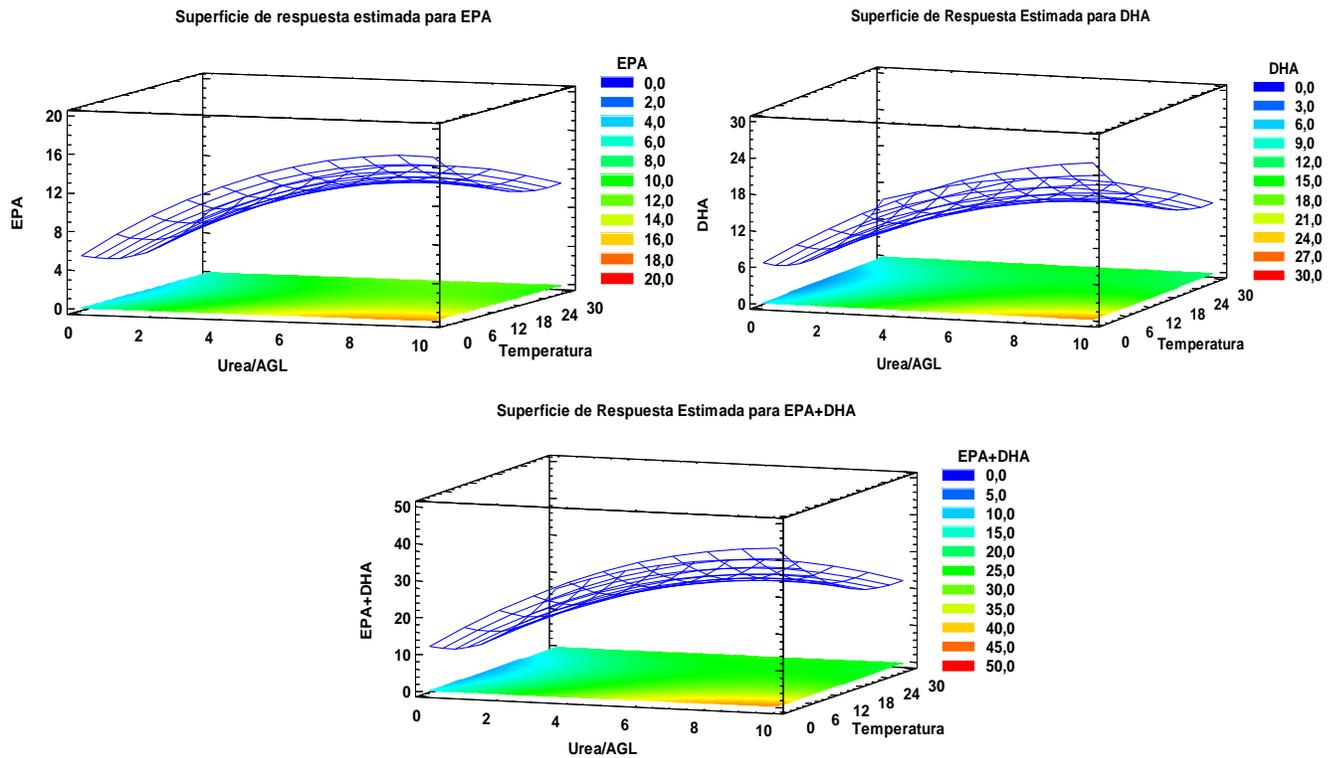


Figura 17. Gráficos de superficie respuesta y contorno de la combinación de las variables relación U/AGL y temperatura de cristalización sobre las variables respuestas EPA, DHA y EPA+DHA (considerando velocidad de agitación 500 rpm).

Se observa que la relación U/AGL influye significativamente de manera directa y la temperatura de manera inversa en las tres variables respuesta EPA, DHA y EPA+DHA;

es decir, a mayor relación U/AGL y menor temperatura, el contenido de EPA y DHA aumenta en el concentrado AGPICLn-3. Este análisis muestra resultados similares a los obtenidos por Liu *et al.*, (2006), Contreras (2017), Thammapat *et al.*, (2016) donde el contenido de EPA y DHA en el concentrado AGPICLn-3 aumenta con la disminución de la temperatura de cristalización y con un aumento de la relación U/AGL. Ha sido reportado incluso que la mayor recuperación de ácidos grasos poliinsaturados ocurre a 4°C [Guil-Guerrero & Belardi, 2001]. En consecuencia, es también evidente que la tendencia de los ácidos grasos de combinarse con los cristales de urea y formar complejos decrece a medida que el grado de insaturación y largo de cadena aumentan.

3.1.3. Optimización del proceso de complejación con urea:

La **Tabla 14** muestra los valores óptimos predichos de las variables del proceso de obtención de concentrado AGPICLn-3 obtenidos a partir de la metodología de superficie respuesta, donde las variables independientes fueron ajustadas para maximizar las respuestas de EPA, DHA y EPA+DHA. El contenido máximo predicho de estas variables es de 15,77(g/100g AGT), 22,78(g/100g AGT) y 38,52(g/100g AGT) respectivamente.

Tabla 14. Valores óptimos de las variables independientes U/AGL, temperatura y tiempo para maximizar las respuestas EPA, DHA y EPA+DHA y su optimización conjunta.

Optimización	Relación Urea/AGL	Temperatura cristalización	Tiempo cristalización	Punto estacionario	Valor óptimo predicho*
EPA	9,55024	4,0	18,4833	Máximo	15,77
DHA	10,0	4,0	17,7344	Máximo	22,78
EPA+DHA	9,99704	4,0	18,1157	Máximo	38,52
Optimización conjunta	9,99998	4,0	18,2125	Máximo	EPA: 15,74
					DHA: 22,78
					EPA+DHA: 38,52

*Contenidos de EPA, DHA y EPA + DHA expresados en (g/100gAGT)

El DHA alcanza mayores concentraciones que el EPA en la fracción no complejada debido a la menor tendencia del DHA para formar aductos de urea por la diferencia de estructura conformacional espacial entre ambos ácidos grasos [Haagsma *et al.*, 1982;

Ratnayake *et al.*, 1988; Wanasundara & Shahidi, 1999]. En la **Tabla 14** también se muestran los valores que maximizan en forma conjunta las variables respuesta, donde se espera una deseabilidad máxima (1). La máxima deseabilidad obtenida fue de 0,93 donde el contenido predicho de EPA, DHA y EPA+DHA fue 15,74; 22,77 y 38,52 (g/100g AGT) respectivamente, siendo prácticamente idénticos a los predichos en las optimizaciones individuales. En las **Figuras 18a** y **18b** se observa el comportamiento de la deseabilidad máxima ya explicada, donde se muestra una mayor deseabilidad a medida que aumenta la relación Urea/AGL y disminuye la temperatura de cristalización.

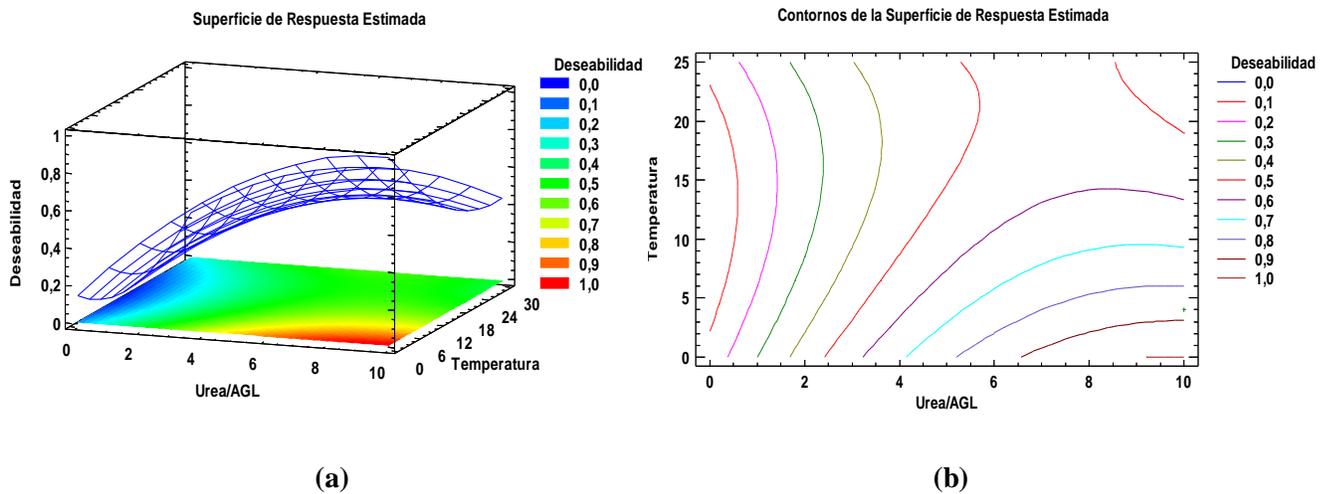


Figura 18. a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA, DHA y EPA+DHA. b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.

3.1.4. Validación del concentrado AGPICLn-3 óptimo:

Para validar el diseño experimental se consideraron los valores de la optimización conjunta para obtener un máximo de EPA+DHA de 38,52 g/100g de AGT. Estos valores fueron: 10 U/AGL (g/g), 4°C, 18 h y 500 rpm para obtener un máximo de EPA+DHA. En la **Tabla 15b** se observa la composición y cuantificación obtenidas a partir del concentrado optimizado en la validación experimental. Al comparar el ASCRD con el concentrado AGPICLn-3 óptimo validado se observan diferencias.

Tabla 15. Composición y cuantificación de ácidos grasos de a) Aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), b) Concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) (expresados en (g/100g AGT)).

Ácidos grasos		(a) ASCRD*	(b) AGPICLn-3*
Láurico	C12:0	0,06 ± 0,00	N/I
Mirístico	C14:0	2,90 ± 0,01	0,18 ± 0,00
Palmítico	C16:0	12,76 ± 0,03	0,25 ± 0,00
Palmitelaídico	C16:1 9t	0,07 ± 0,00	0,25 ± 0,00
Palmitoleico	C16:1 9c	3,74 ± 0,01	1,90 ± 0,00
Heptadecanoico	C17:0	0,22 ± 0,00	0,28 ± 0,00
Heptadecenoico	C 17:1 10c	0,13 ± 0,00	1,30 ± 0,00
Estearico	C18:0	3,64 ± 0,01	1,56 ± 0,00
Trans-vaccénico	C 18:1 11t	N/I	N/I
Oleico	C18:1 9c	36,95 ± 0,08	3,15 ± 0,00
Cis-vaccénico	C18:1 7c	3,32 ± 0,00	0,33 ± 0,00
Linoelaidico	C18:2 9t 12t	0,06 ± 0,00	2,14 ± 0,00
Linoleico	C18:2 9c 12c	15,77 ± 0,07	22,36 ± 0,03
Gamma linoléico	C18:3 6c 9c 12c	0,32 ± 0,00	1,10 ± 0,00
5-Eicosaenoico	C 20:1 5c	0,22 ± 0,00	1,18 ± 0,02
8-Eicosaenoico	C 20:1 8c	0,44 ± 0,01	N/I
11-Eicosaenoico	C 20:1 11c	1,84 ± 0,04	N/I
α-Linolénico	C 18:3 9c 12c 15c	4,91 ± 0,00	9,32 ± 0,01
Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c	1,34 ± 0,01	0,32 ± 0,00
Behenoico	C 22:0	0,36 ± 0,00	N/I
Eicosatrienoico	C 20:3	0,33 ± 0,00	1,78 ± 0,00
Erúxico	C 22:1	0,29 ± 0,01	1,53 ± 0,00
Araquidónico	C 20:4	0,35 ± 0,04	N/I
Docosadienoico	C 22:2	0,12 ± 0,01	3,03 ± 0,14
Eicosapentaenoico	C 20:5	3,92 ± 0,04	18,45 ± 0,04
Nervónico	C 24:1	0,27 ± 0,03	1,52 ± 0,00
Docosatetraenoico	C 22:4	0,15 ± 0,03	0,64 ± 0,01
Docosapentaenoico	C 22:5	1,69 ± 0,05	4,55 ± 0,01
Docosahexaenoico	C 22:6	3,83 ± 0,04	22,88 ± 0,04
Total de ácidos grasos saturados (AGS)		19,94	2,27
Total de ácidos grasos monoinsaturados (AGM)		47,27	11,16
Total de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)		32,79	86,57
Total de AGPI de cadena larga n-3 (AGPICLn-3)		14,68	56,98
EPA+DHA		7,75	41,33

*Valores corresponden al promedio (n=3) ± desviación estándar.

Los principales ácidos grasos del ASCRD con respecto al concentrado AGPICLn-3 optimizado fueron (expresado en g/100g AGT) ácido oleico (36,95 vs 3,15); ácido linoleico (15,77 vs 22,36), ácido palmítico (12,76 vs 0,25), ácido α -linolénico (4,91 vs 9,32), EPA (3,92 vs 18,45), DHA (3,83 vs 22,88), ácido palmitoleico (3,74 vs 1,90), ácido esteárico (3,64 vs 1,56), ácido cis-vaccénico (3,32 vs 0,33) y finalmente, ácido mirístico (2,90 vs 0,18). Mediante el proceso de optimización se incrementaron los contenidos de EPA, DHA, EPA+DHA en AGPICLn-3 en 2,6; 3,9; 4,7; 5,9 y 5,3 veces respecto al ASCRD, respectivamente (**Tabla 15a**). La optimización permitió disminuir el contenido de AGS en 8,8 veces y el ácido palmítico disminuyó en 51 veces, lo cual es significativo si se toman en cuenta los efectos perjudiciales que tiene su consumo excesivo[Ruiz *et al.*, 2021]. El aumento de DHA fue mayor que el observado en EPA concordando con los resultados obtenidos por Liu *et al.*, (2006) y Berríos (2019) donde se plantea que este fenómeno puede estar vinculado a una mayor afinidad del EPA por los compuestos de inclusión con urea. Finalmente el concentrado óptimo validado mostró contenidos de EPA, DHA y EPA+DHA ((18,45; 22,88 y 41,33 (expresados en g/100g AGT)) superiores a los óptimos predichos por MSR (15,74; 22,78 y 38,52, respectivamente).

3.1.5. Cromatografía en capa fina del concentrado AGPICLn-3 optimizado

La separación por cromatografía en capa fina del concentrado AGPICLn-3 optimizado se observa en la **Figura 19b**.

El orden de elución de los compuestos observados mostró que los AG evaluados se encuentran en forma de ácidos grasos libres en el concentrado lo cual concuerda con lo descrito por Muñoz (2019) y Encina (2017). Este resultado es característico de los concentrados obtenidos por complejación con urea, en los que la presencia de acilglicerolés ha sido eliminada por el proceso de saponificación que precede a la complejación con urea y se puede distinguir al comparar el carril D (concentrado AGPICLn-3) con el carril C (Aceite refinado de maravilla como control) en la elución.

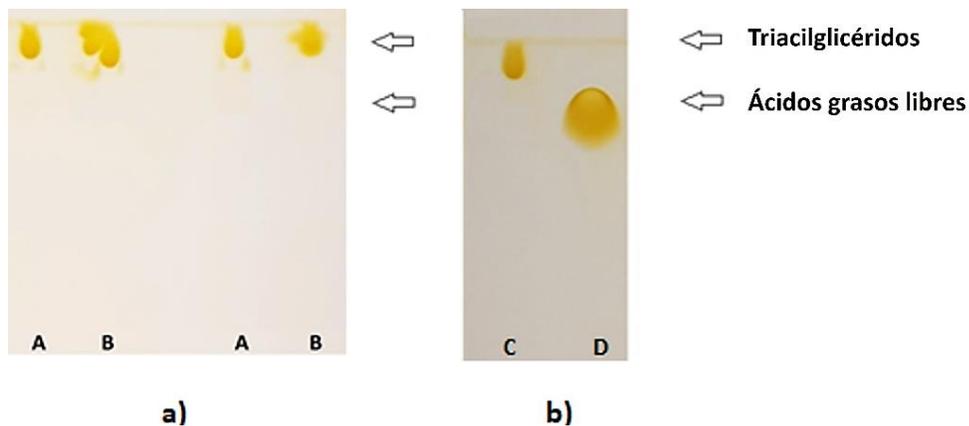


Figura 19. Separación cromatográfica en capa fina del concentrado AGPICLn-3. a) (A) ASCRD purificado y (B) ASCRD no purificado; b) (C) Aceite de maravilla control y (D) concentrado óptimo AGPICLn-3.

3.1.6. Calorimetría diferencial de barrido del concentrado AGPICLn-3

En la **Figura 20** se muestra el termograma de fusión del concentrado AGPICLn-3, cuyo rango de fusión fue de $-67,84$ a $-24,4^{\circ}\text{C}$ y su entalpía de fusión fue de $190,38$ J/g. En este caso se observan tres puntos de fusión bajos distintos, a las temperaturas de $-64,17$, $-55,23$ y $-47,22$ $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

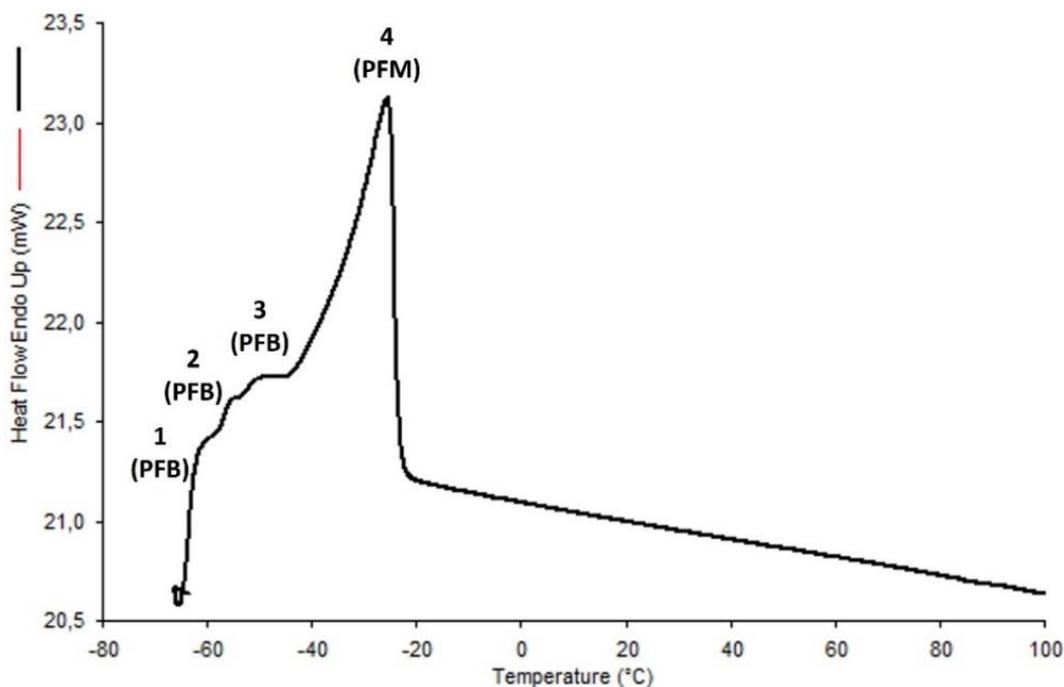


Figura 20. Termograma de fusión del concentrado AGPICLn-3.

El PFB1 y PFB2 se sitúan en el rango de -68 a -50°C (**Tabla 16**) y es en dicho rango donde se encuentra el EPA que según Sato *et al.*, (2009) funde a -54°C, luego el PFB3 se observa entre -50°C a -40°C, correspondiendo al intervalo de temperatura del *peak* del DHA, que fue informado a -44 °C por el mismo autor. A mayor largo de cadena y presencia de insaturaciones, los ácidos grasos funden a más bajas temperaturas [Rustan & Drevon, 2005; Tvrzicka *et al.*, 2011]. También se muestra un punto de fusión medio (-26,87°C) que se encuentra en el rango de -38 a -20°C donde podría encontrarse el ácido docosapentaenoico (C22:5).

Tabla 16. Comportamiento térmico de ASCRD (a) y concentrado AGPICLn-3 (b)

Parámetros calorimétricos	ASCRD (a)	AGPICLn-3 (b)
Onset de fusión	-71,97 ± 2,32 °C	-67,84 ± 4,69 °C
PFB1	-68,17 ± 1,31°C	-64,17 ± 3,55 °C
PFB2	-	-55,23 ± 0,50 °C
PFB3	-	-47,22 ± 4,17 °C
PFM1	-34,01 ± 0,08 °C	-26,87 ± 1,89 °C
PFM2	-15,97 ± 0,30 °C	-
PFM3	-4,54 ± 0,14 °C	-
Endset de fusión	2,06 ± 0,23 °C	-24,40 ± 1,78 °C
Rango de fusión	-71,97 a 2,06 °C	-67,84 a -24,40 °C
Entalpía de fusión	349,12 J/g	190,38 J/g

*PFB: *peak de punto de fusión bajo*; PFM: *peak de punto de fusión medio*; ASCRD: *Aceite de salmón comercial refinado desodorizado*; AGPICLn-3: *concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3*.

Al comparar el ASCRD con el concentrado AGPICLn-3 (**Figura 21**) se observa que los ácidos grasos libres de este último poseen puntos de fusión más bajos y su rango de fusión también es más estrecho con un *endset* negativo (**Tabla 16a y 16b**), indicando que a esta última temperatura el concentrado de AGPICL n-3 óptimo se encuentra totalmente fundido. Lo anterior evidencia que la concentración de ácidos grasos mediante complejación con urea ha eliminado la mayoría de los ácidos grasos saturados [Dovale-Rosabal *et al.*, 2019] como el C14:0, C16:0 y C18:0 (**Tabla 15a y 15b**)

aumentando en el concentrado AGPICLn-3 los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

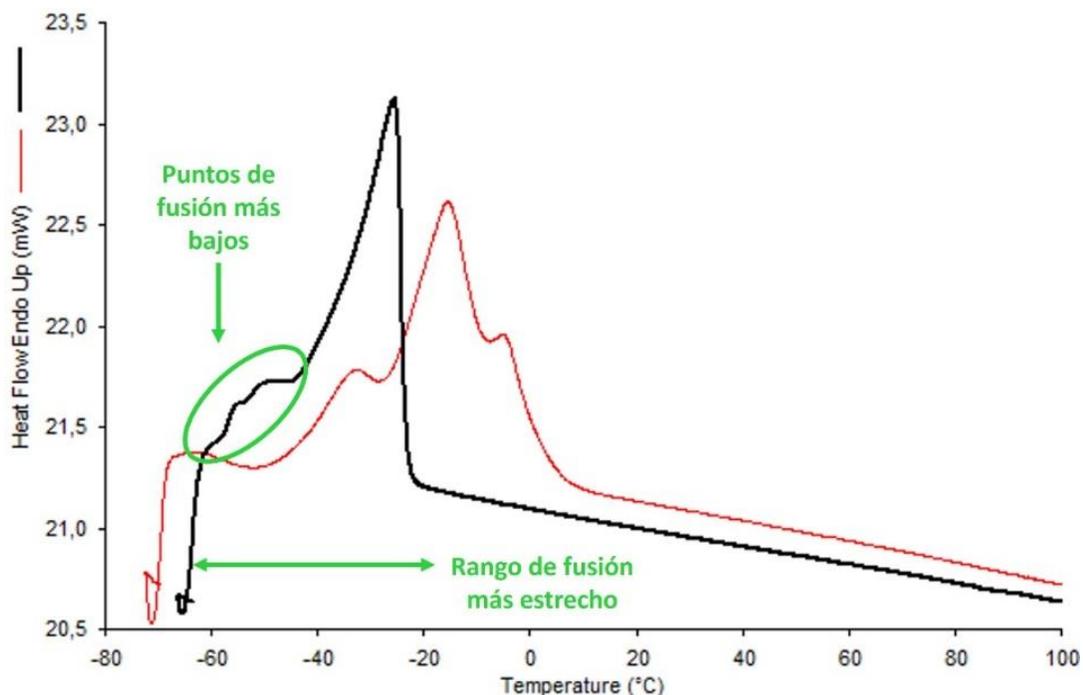


Figura 21. Comparación entre los termogramas de fusión de AGPICLn-3 y ASCRD (la línea roja corresponde al ASCRD y la línea azul corresponde al AGPICLn-3).

3.2. Estructuración de acilglicéridos con EPA/DHA, a partir del concentrado óptimo de AGPICLn-3 obtenido en el objetivo 1 y del aceite de salmón refinado comercial (ASCRD), mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) bajo CO₂SC.

En la **Tabla 17** se puede observar el diseño experimental de Draper-Lin de 18 ensayos para dar respuesta al objetivo 2. Diferentes condiciones de: temperatura (°C) y presión (bar) supercríticas (SC) así como porcentaje de lipasa b de *Candida antarctica* y relación entre el concentrado óptimo AGPICLn-3 y el ASCRD permitieron la estructuración de acilglicéridos con un máximo de estructuras con EPA/DHA en posición *sn*-2. Las variables respuestas fueron: concentración de EPA, DHA, EPA+DHA, ácido palmítico (AP) (expresada en g/100g AGT) y cantidad de estructuras

diferentes identificadas con EPA/DHA en *sn-2* en las muestras resultantes de las reacciones de acidólisis.

Tabla 17. Diseño compuesto de Draper-Lin por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención del acilglicérido estructurado (AEs).

Exp.	Variables Independientes				Variables respuestas				
	n-3/ASCRD (g/g) A	Presión SC (bar) B	Temp. SC (°C) C	Lipasa B (%) D	EPA	DHA	EPA + DHA	AP	EPA/ DHA en <i>sn-2</i>
						(g/100g AGT)			
1	7,2	255	56	2	4,441	4,485	8,926	11,372	17
2	7,2	255	44	2	4,107	4,086	8,193	12,079	16
3	7,2	123	56	8	4,983	4,787	9,770	10,289	20
4	1,8	255	44	8	4,305	4,270	8,575	11,607	19
5	7,2	123	44	8	4,110	4,078	8,188	11,896	22
6	1,8	123	56	2	4,107	4,102	8,208	11,996	19
7	1,8	255	56	8	4,220	4,045	8,265	11,867	17
8	1,8	123	44	2	4,093	4,001	8,094	12,050	16
9	0	189	50	5	3,746	3,758	7,505	12,585	15
10	9	189	50	5	3,830	3,702	7,533	12,114	18
11	4,5	78	50	5	4,613	4,546	9,159	11,060	34
12	4,5	300	50	5	4,606	3,822	8,428	11,630	25
13	4,5	189	40	5	4,288	4,272	8,560	11,798	12
14	4,5	189	60	5	4,696	4,428	9,124	10,882	21
15	4,5	189	50	0	3,880	3,799	7,679	12,626	15
16	4,5	189	50	10	4,337	4,318	8,655	11,654	16
17	4,5	189	50	5	4,646	4,446	9,092	11,101	17
18	4,5	189	50	5	4,541	4,325	8,866	11,192	16

*A: *n-3/ASCRD* (relación *AGPICLn-3/ASCRD*; g/g); B: Presión supercrítica (bar); C: Temperatura supercrítica (°C); AP: Ácido palmítico, EPA, DHA y EPA+DHA (contenido expresado en g/100g de ácidos grasos totales) y EPA/DHA en *sn-2*: cantidad probable de EPA/DHA en posición *sn-2* de los AEs.

Las variables independientes que influyeron significativamente en las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en *sn-2* fueron determinadas mediante análisis estadístico utilizando metodología de superficie respuesta MSR (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis de varianza para cada variable respuesta en la optimización del proceso de síntesis del AEs.

	Efectos	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Razón-F	Valor-P
EPA	A: AGPCLn-3/ASCRD	0,0818505	1	0,0818505	3,49	0,0914
	B: Presión	0,00393345	1	0,00393345	0,17	0,6909
	C: Temperatura	0,243124	1	0,243124	10,36	0,0092
	D: Enzima	0,196601	1	0,196601	8,38	0,0160
	AA	0,801562	1	0,801562	34,15	0,0002
	AC	0,20416	1	0,20416	8,70	0,0146
	D²	0,233436	1	0,233436	9,94	0,0103
	Error total	0,234735	10	0,0234735		
	Total (corr.)	1,87696	17			
DHA	A: AGPCLn-3/ASCRD	0,00156801	1	0,00156801	0,05	0,8366
	B: Presión	0,262088	1	0,262088	7,66	0,0278
	C: Temperatura	0,113746	1	0,113746	3,32	0,1111
	D: Enzima	0,139214	1	0,139214	4,07	0,0835
	A²	0,278673	1	0,278673	8,14	0,0246
	Error total	0,23959	7	0,0342272		
	Total (corr.)	1,53976	17			
EPA + DHA	A: AGPCLn-3/ASCRD	0,000391992	1	0,000391992	0,00	0,9524
	B: Presión	0,26718	1	0,26718	2,60	0,1506
	C: Temperatura	0,689012	1	0,689012	6,72	0,0359
	D: Enzima	0,667134	1	0,667134	6,50	0,0381
	A²	2,25214	1	2,25214	21,96	0,0022
	AC	0,78814	1	0,78814	7,68	0,0276
	Error total	0,718019	7	0,102574		
	Total (corr.)	6,23516	17			
AP	A: AGPCLn-3/ASCRD	0,524399	1	0,524399	8,39	0,0200
	B: Presión	0,199984	1	0,199984	3,20	0,1114
	C: Temperatura	0,974728	1	0,974728	15,60	0,0042
	D: Enzima	0,883053	1	0,883053	14,13	0,0056
	A²	1,39641	1	1,39641	22,34	0,0015
	AC	0,7938	1	0,7938	12,70	0,0074
	D²	0,832279	1	0,832279	13,32	0,0065
	Error total	0,499997	8	0,0624996		
	Total (corr.)	6,01579	17			
EPA /DHA en sn-2	A: AGPCLn-3/ASCRD	5,99105	1	5,99105	0,99	0,3496
	B: Presión	40,4995	1	40,4995	6,67	0,0325
	C: Temperatura	16,7757	1	16,7757	2,76	0,1350
	D: Enzima	9,99243	1	9,99243	1,65	0,2354
	B²	208,143	1	208,143	34,29	0,0004
	Error total	48,5651	8	6,07064		
	Total (corr.)	402,278	17			

*AGPCLn-3/ASCRD: relación AGPCLn-3/ASCRD; SC: condiciones supercríticas; X: efecto lineal; X²: efecto cuadrático; XY: interacción entre efectos de variables; G.L.= grados de libertad. Se expresan en rojo aquellos efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

En este caso las variables respuestas presentaron comportamientos diferentes entre sí y los efectos significativos estadísticamente ($p < 0,05$) fueron: la relación n-3/ASCRD (A), temperatura (C) y porcentaje de enzima (D). Además, el término cuadrático de A así como las interacciones AC y DD fueron significativas para todas las variables respuesta excepto para DHA y EPA/DHA en *sn-2*. Para estas últimas variables la presión (B) si tuvo efecto significativo estadísticamente a diferencia del resto. Los modelos (ecuaciones 4 - 8) en términos de sus coeficientes de regresión para las variables independientes fueron los siguientes:

$$\text{EPA} = 4,36956 - 0,160495*A - 0,000257139*B - 0,0221375*C + 0,187589*D - 0,0337653*A^2 + 0,00986111*AC - 0,0147594*D^2 \quad (4)$$

$$\text{DHA} = 7,67672 - 0,175753*A + 0,0104104*B - 0,195362*C + 0,2849*D - 0,019909*A^2 \quad (5)$$

$$\text{EPA+DHA} = 4,603 - 0,345359*A + 0,0226964*B + 0,0261942*C + 0,600326*D - 0,0565978*A^2 + 0,019375*AC - 0,0221855*AD \quad (6)$$

$$\text{AP} = 13,677 + 0,498547*A - 0,0173269*B - 0,00910498*C - 0,159978*D + 0,0445666*A^2 - 0,0194444*AC + 0,0278689*D^2 \quad (7)$$

$$\text{EPA/DHA en } sn-2 = 23,2582 + 1,946*A - 0,392551*B + 0,462498*C + 4,98636*D + 0,000931243*B^2 \quad (8)$$

Los 5 modelos poseen un coeficiente de determinación (R^2 ajustado por grados de libertad) de 78,74%; 62,21%; 72,03%; 82,34% y 74,35% para EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en *sn-2* respectivamente; indicando que representan adecuadamente la variabilidad de los datos. En la **Figura 22** se muestran, mediante gráficos tipo Pareto, las principales variables independientes que afectan el proceso de estructuración enzimática. El efecto estandarizado lineal, cuadrático y de interacción para cada una de las variables respuestas se muestra en orden decreciente (la línea marca un $p < 0,05$).

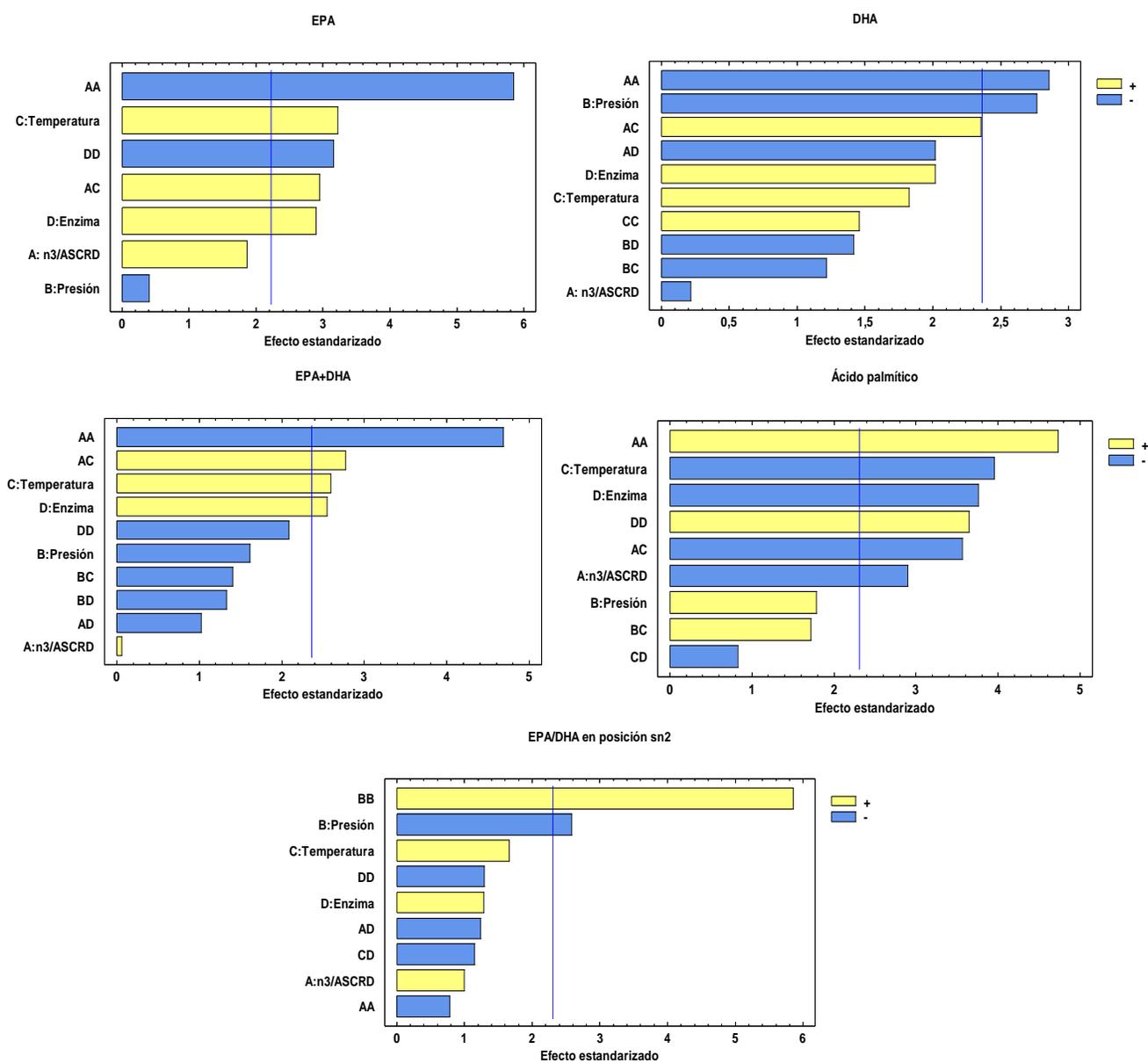


Figura 22. Diagramas de Pareto estandarizados de los efectos de las variables independientes en la acidólisis enzimática sobre las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en posición sn-2 del glicerol. A: n3/ASCRD (relación AGPICLn-3/ASCRD); B: presión CO₂SC; C: temperatura CO₂SC y D: % de enzima, (la línea azul indica $p < 0,05$).

Puede observarse que el efecto cuadrático de la relación AGPICLn-3/ASCRD (A) fue significativo en todos los gráficos excepto para la variable respuesta EPA/DHA en sn-2, en donde la presión (B) y su efecto cuadrático fueron los factores independientes que afectaron el proceso de estructuración. Se muestra el efecto positivo de la temperatura

(C) y del porcentaje de enzima (D) en el aumento de la concentración de EPA, DHA y EPA+DHA, mientras que para el ácido palmítico tiene efecto negativo. Esto confirma que a mayores valores de las variables C y D se produce un aumento de EPA, DHA y EPA+DHA en desmedro de la concentración de AP. En la **Figura 23** se observan los gráficos de superficie respuesta y contorno, reflejando la influencia de las variables del proceso de estructuración para cada una de las variables respuestas.

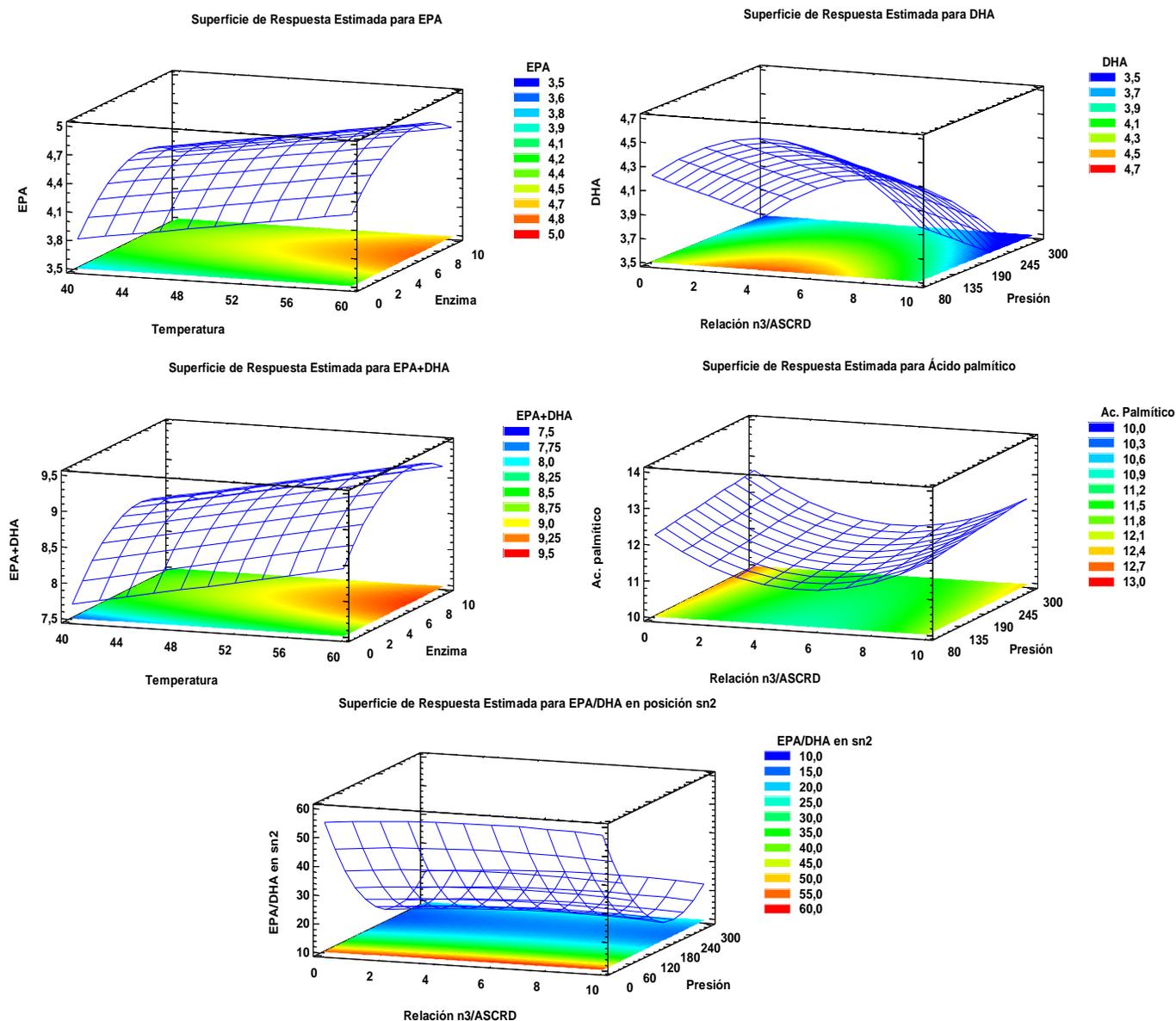


Figura 23. Gráficos de superficie respuesta y contorno de la combinación de variables independientes sobre las respuestas EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en sn-2.

En los gráficos de EPA y EPA+DHA el efecto de la temperatura y la presión supercríticas fue similar, pues a medida que aumentan se incrementa la concentración de dichas variables respuestas. Para los gráficos restantes influyen las mismas variables independientes (presión SC y relación n3/ASCRD) pero éstas no muestran un comportamiento similar, pues para el ácido palmítico se produce una disminución de su concentración a medida que disminuye la presión y la relación n3/ASCRD, mientras que para las variables DHA y EPA/DHA en *sn-2* tiene el efecto contrario.

3.2.1. Optimización del proceso:

La **Tabla 19** muestra los valores óptimos predichos de las variables del proceso de estructuración obtenidos mediante MSR en donde las variables independientes fueron ajustadas para maximizar las respuestas EPA, DHA, EPA+DHA, EPA/DHA en *sn-2* y minimizar la variable AP. Puede observarse que el % de enzima se encuentra en el rango entre 5 y 10 % , coincidiendo con lo reportado para reacciones de acidólisis (Nunes *et al.*, 2011; Nagachinta & Akoh 2012) en las que se espera la mayor incorporación de AG.

Tabla 19. Valores óptimos de las variables independientes para maximizar EPA, DHA, AP, EPA+DHA (g/100g AGT) y EPA/DHA en *sn-2* y la optimización conjunta de estas variables.

Optimización	AGPICLn-3 /ASCRD (g/g)	Presión SC (bar)	Temp. SC (°C)	Enzima (%)	Punto estacionario	Valor óptimo predicho
EPA	6,41	78,00	60,09	5,69	Máximo	4,99
DHA	4,33	78,00	60,09	10,03	Máximo	5,77
EPA+DHA	6,14	78,00	60,09	8,72	Máximo	10,65
AP	9,04	300	60,09	10,04	Mínimo	9,59
EPA/DHA en <i>sn-2</i>	9,01	79,01	60,09	0	Máximo	37,33
Optimización conjunta	7,24	82,03	60,09	5,16	Máximo	EPA: 4,95
						DHA: 5,27
						EPA+DHA: 10,25
					Mínimo	AP: 9,74
Máximo	EPA/DHA en <i>sn-2</i> : 33,45					

En cuanto a la relación AGPICLn-3/ASCRD, la mayoría de los autores [Carrín & Crapiste, 2008; Hamam & Shahidi, 2005; Wang *et al.*, 2012b] utilizan relaciones mayores a 1:1, donde se favorece la proporción de ácidos grasos libres incorporados, similar a la relación AGPICLn-3/ASCRD de 7,24 predicha en la **Tabla 19**.

El contenido predicho individualmente para las respuestas EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en *sn*-2 fue de 4,99; 5,77; 10,65; 9,59 (g/100g AGT) y 37,33 respectivamente. En la optimización conjunta de las mismas se obtuvo una deseabilidad máxima de 0,98, donde el contenido predicho final de EPA, DHA, EPA+DHA, AP y EPA/DHA en *sn*-2 fue de 4,95; 5,27; 10,25; 9,74 (g/100g AGT) y 33,45 respectivamente. En la **Figura 24** se observa el comportamiento de la deseabilidad máxima mencionada, donde se aprecia su aumento a medida que disminuye la presión y aumenta la temperatura.

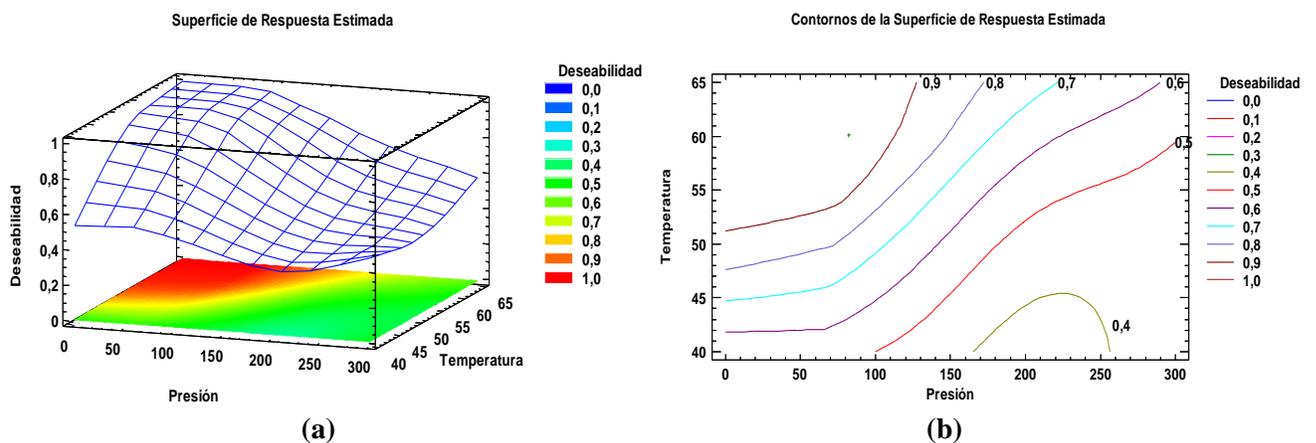


Figura 24. a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de las variables respuestas EPA, DHA, AP, EPA+DHA y EPA/DHA en posición *sn*-2. b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.

3.2.2. Validación del acilglicérido estructurado con EPA/DHA en *sn*-2 óptimo:

Para validar el diseño experimental se consideraron los valores de optimización conjunta de la **Tabla 19**. En la **Tabla 20c** se muestra la composición y cuantificación del estructurado (*AEs*) con EPA/DHA en *sn*-2 optimizado en la validación experimental.

Tabla 20. Composición y cuantificación de ácidos grasos de a) Aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), b) Concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) y c) Acilglicéridos estructurados (AEs)(expresados en (g/100g AGT)).

Ácidos grasos		(a) ASCRD*	(b) AGPICLn-3*	(c) AEs*
Láurico	C12:0	0,06 ± 0,00	N/I	N/I
Mirístico	C14:0	2,90 ± 0,01	0,18 ± 0,00	2,15 ± 0,00
Palmítico	C16:0	12,76 ± 0,03	0,25 ± 0,00	10,6 ± 0,00
Palmitelaídico	C16:1 9t	0,07 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,21 ± 0,00
Palmitoleico	C16:1 9c	3,74 ± 0,01	1,90 ± 0,00	3,39 ± 0,00
Heptadecanoico	C17:0	0,22 ± 0,00	0,28 ± 0,00	N/I
Heptadecenoico	C 17:1 10c	0,13 ± 0,00	1,30 ± 0,00	0,44 ± 0,00
Esteárico	C18:0	3,64 ± 0,01	1,56 ± 0,00	3,17 ± 0,00
<i>Trans</i> -vaccénico	C 18:1 11t	N/I	N/I	0,47 ± 0,01
Oleico	C18:1 9c	36,95 ± 0,08	3,15 ± 0,00	34,66 ± 0,03
<i>Cis</i> -vaccénico	C18:1 7c	3,32 ± 0,00	0,33 ± 0,00	2,74 ± 0,00
Linoelaidico	C18:2 9t 12t	0,06 ± 0,00	2,14 ± 0,00	0,75 ± 0,01
Linoleico	C18:2 9c 12c	15,77 ± 0,07	22,36 ± 0,03	15,48 ± 0,00
Gamma linolénico	C18:3 6c 9c 12c	0,32 ± 0,00	1,10 ± 0,00	0,37 ± 0,00
5-Eicosaenoico	C 20:1 5c	0,22 ± 0,00	1,18 ± 0,02	N/I
8-Eicosaenoico	C 20:1 8c	0,44 ± 0,01	N/I	N/I
11-Eicosaenoico	C 20:1 11c	1,84 ± 0,04	N/I	1,94 ± 0,00
α -Linolénico	C 18:3 9c 12c 15c	4,91 ± 0,00	9,32 ± 0,01	4,78 ± 0,00
Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c	1,34 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,90 ± 0,00
Behenoico	C 22:0	0,36 ± 0,00	N/I	N/I
Eicosatrienoico	C 20:3	0,33 ± 0,00	1,78 ± 0,00	1,29 ± 0,00
Erúcido	C 22:1	0,29 ± 0,01	1,53 ± 0,00	N/I
Araquidónico	C 20:4	0,35 ± 0,04	N/I	N/I
Docosadienoico	C 22:2	0,12 ± 0,01	3,03 ± 0,14	1,07 ± 0,00
Eicosapentaenoico	C 20:5	3,92 ± 0,04	18,45 ± 0,04	5,92 ± 0,01
Nervónico	C 24:1	0,27 ± 0,03	1,52 ± 0,00	N/I
Docosatetraenoico	C 22:4	0,15 ± 0,03	0,64 ± 0,01	0,49 ± 0,00
Docosapentaenoico	C 22:5	1,69 ± 0,05	4,55 ± 0,01	2,0 ± 0,00
Docosahexaenoico	C 22:6	3,83 ± 0,04	22,88 ± 0,04	7,18 ± 0,0
Total de ácidos grasos saturados (AGS)		19,94	2,27	15,92
Total de ácidos grasos monoinsaturados (AGM)		47,27	11,16	43,85
Total de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)		32,79	86,57	40,23
Total de AGPI de cadena larga n-3 (AGPICLn-3)		14,68	56,98	21,17
EPA+DHA		7,75	41,33	13,1

*Valores corresponden al promedio (n=3) ± desviación estándar.

Al compararlo con el ASCRD se observan diferencias. Los principales ácidos grasos del ASCRD versus el AEs optimizado fueron (expresado en g/100g AGT): ácido oleico (36,95 vs 34,66); ácido linoleico (15,77 vs 15,48), ácido palmítico (12,76 vs 10,60), ácido α -linolénico (4,91 vs 4,78), EPA (3,92 vs 5,92), DHA (3,83 vs 7,18), ácido palmitoleico (3,74 vs 3,39), ácido esteárico (3,64 vs 3,17), ácido cis-vaccénico (3,32 vs 2,72) y finalmente, ácido mirístico (2,90 vs 2,15). Mediante el proceso de optimización de la estructuración mediante acidólisis enzimática se incrementaron los contenidos de AGPI, AGPICLn-3, EPA, DHA, EPA+DHA en 1,2; 1,5; 1,5; 1,9 y 1,7 veces respecto al ASCRD, respectivamente. Se observó que el aumento de la concentración de EPA + DHA fue superior a lo que había sido predicho en la optimización conjunta (10,25 vs 13,1, (expresados en g/100g AGT)).

3.2.3. Análisis posicional del EPA y DHA en AEs, identificado en la matriz seleccionada CHCA1 mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

En la **Tabla 21** se muestran los MG y TG con EPA o DHA en la posición *sn*-2 del glicerol identificados en el AEs optimizado mediante la matriz CHCA1 seleccionada.

Tabla 21. Estructuras probables con EPA/DHA en posición *sn*-2 del MG y TG de AEs identificada en la matriz previamente seleccionada CHCA1*

m/z	EPA y/o DHA en posición <i>sn</i> -2
441.2402	MG (-/22:6/-)
881.6630	TG (13:0/18:3/22:6); TG (13:0/20:4/20:5); TG (13:0/18:3/22:6); TG (15:0/18:4/20:5); TG (15:1/18:3/20:5); TG(15:1/18:3/20:5); TG (14:1/17:2/22:6)
881.7593	TG (16:0/18:0/20:5); TG (14:0/20:0/20:5); TG (17:0/17:0/20:5); TG (12:0/20:5/22:0); TG (15:0/19:0/20:5); TG (13:0/20:5/20:0)
901.6682	TG (13:0/18:1/22:6); TG (15:0/18:2/20:5); TG (14:0/17:1/22:6); TG (15:0/16:1/22:6); TG (14:1/19:1/20:5); TG (13:0/20:2/20:5); TG (12:0/19:1/22:6); TG (14:1/17:0/22:6); TG (15:1/16:0/22:6); TG (15:1/18:1/20:5); TG (16:0/17:2/20:5); TG (16:1/17:1/20:5)
901.7280	TG (16:0/18:3/22:6); TG (16:0/18:3/22:6); TG (16:1/18:2/22:6); TG (14:1/20:2/22:6); TG (14:0/20:3/22:6); TG (14:0/20:5/22:4); TG (16:0/20:4/20:5); TG (16:1/20:3/20:5); TG (18:0/18:4/20:5); TG (12:0/22:3/22:6); TG (18:1/18:3/20:5); TG (17:1/17:2/22:6); TG (18:2/18:2/20:5); TG (18:1/18:3/20:5); TG (14:1/20:5/22:3)
901.7256	TG (16:0/18:1/20:5); TG (16:1/18:0/20:5); TG (13:0/19:0/22:6); TG (12:0/20:0/22:6); TG (15:0/19:1/20:5); TG (14:1/20:0/20:5); TG (15:0/17:0/22:6); TG (16:0/16:0/22:6); TG (17:0/17:1/20:5); TG (15:1/19:0/20:5); TG (12:0/20:5/22:1); TG (14:0/18:0/22:6)

903.6838	TG (15:0/18:1/20:5); TG (14:1/19:0/20:5); TG (15:0/16:0/22:6); TG (15:1/18:0/20:5); TG (16:1/17:0/20:5); TG (14:0/19:1/20:5); TG (16:0/17:1/20:5); TG (13:0/20:1/20:5); TG (12:0/19:0/22:6); TG (13:0/18:0/22:6); TG (14:0/17:0/22:6)
903.7436	TG (16:0/20:3/20:5); TG (15:1/19:1/22:6); TG (17:2/19:1/20:5); TG (16:0/18:3/22:5); TG (16:0/18:2/22:6); TG (14:0/20:5/22:3); TG (16:1/20:2/20:5); TG (18:1/18:2/20:5); TG (18:0/18:3/20:5); TG (18:0/18:3/20:5); TG (12:0/22:2/22:6); TG (14:1/20:1/22:6); TG (17:0/17:2/22:6); TG (17:1/17:1/22:6); TG (14:0/20:2/22:6); TG (16:1/18:4/22:3); TG (16:1/18:1/22:6); TG (14:1/20:5/22:2)
903.7412	TG (16:0/18:0/20:5); TG (14:0/20:0/20:5); TG (17:0/17:0/20:5); TG (12:0/20:5/22:0); TG (15:0/19:0/20:5); TG (13:0/20:5/21:0)
905.7593	TG (14:0/20:1/22:6); TG (18:1/18:1/20:5); TG (18:0/18:2/20:5); TG (16:1/20:1/20:5); TG (16:0/20:2/20:5); TG (14:1/20:0/22:6); TG (17:0/17:1/22:6); TG (17:2/19:0/20:5); TG (12:0/22:1/22:6); TG (16:0/18:1/22:6); TG (16:1/18:0/22:6); TG (15:0/19:1/22:6); TG (16:1/18:4/22:2); TG (14:0/20:5/22:2); TG (15:1/19:0/22:6); TG (17:1/19:1/20:5); TG (14:1/20:5/22:1)
905.6630	TG (17:2/18:4/20:5); TG (15:1/18:4/22:6); TG (13:0/20:5/22:6); TG (15:1/20:5/20:5)
905.6995	TG (15:0/18:0/20:5); TG (16:0/17:0/20:5); TG (14:0/19:0/20:5); TG (12:0/20:5/21:0); TG (13:0/20:0/20:5)
907.6786	TG(15:0/20:5/20:5); TG (15:0/18:4/22:6); TG (17:2/18:3/20:5); TG (15:1/18:3/22:6); TG (15:1/18:3/22:6); TG (15:1/20:4/20:5); TG (17:1/18:4/20:5); TG (13:0/20:4/22:6); TG (13:0/20:5/22:5); TG (17:2/18:3/20:5)
907.7749	TG (18:0/18:1/20:5); TG (15:1/20:5/21:0); TG (12:0/22:0/22:6); TG (15:0/19:0/22:6); TG (17:0/17:0/22:6); TG (17:1/19:0/20:5); TG (13:0/21:0/22:6); TG (16:0/18:0/22:6); TG (17:0/19:1/20:5); TG (16:1/20:0/20:5); TG (16:0/20:1/20:5); TG (14:0/20:0/22:6); TG (14:0/20:5/22:1); TG (14:1/20:5/22:0)
923.6525	TG(15:0/20:5/20:5); TG (15:0/18:4/22:6); TG (17:2/18:3/20:5); TG (15:1/18:3/22:6); TG (15:1/18:3/22:6); TG (15:1/20:4/20:5); TG (17:1/18:4/20:5); TG (13:0/20:4/22:6); TG (13:0/20:5/22:5); TG (17:2/18:3/20:5)
923.7123	TG(18:3/18:3/22:6); TG (16:1/20:5/22:6); TG (18:3/18:3/22:6); TG (18:2/18:4/22:6); TG(18:2/20:5/20:5); TG (18:3/20:4/20:5); TG (14:1/22:5/22:6); TG (18:3/20:4/20:5); TG (18:3/18:3/22:6); TG (18:4/20:3/20:5); TG (14:0/22:6/22:6)
923.8062	TG (15:0/20:5/22:0); TG (17:0/20:0/20:5); TG (16:0/20:5/21:0); TG (18:0/19:0/20:5)
923.6371	TG (16:0/18:3/22:6); TG (16:0/18:3/22:6); TG (16:1/18:2/22:6); TG (14:1/20:2/22:6); TG (14:0/20:3/22:6); TG (14:0/20:5/22:4); TG (16:0/20:4/20:5); TG (16:1/20:3/20:5); TG (18:0/18:4/20:5); TG (12:0/22:3/22:6); TG (18:1/18:3/20:5); TG (17:1/17:2/22:6); TG (18:2/18:2/20:5); TG (18:1/18:3/20:5); TG (14:1/20:5/22:3)
927.7777	TG(18:0/18:4/22:6); TG (18:0/20:5/20:5); TG (18:4/20:1/20:5); TG (16:0/20:5/22:5); TG (16:1/20:5/22:4); TG (18:3/20:2/20:5); TG (16:0/20:4/22:6); TG (16:1/20:3/22:6); TG (18:2/18:2/22:6); TG (18:3/20:2/20:5); TG (14:1/22:3/22:6); TG (18:1/18:3/22:6); TG (18:1/18:3/22:6); TG (18:1/20:4/20:5); TG (18:2/20:3/20:5); TG (14:0/22:4/22:6);

927.7436	TG (14:0/20:1/22:6); TG (18:1/18:1/20:5); TG (18:0/18:2/20:5); TG (16:1/20:1/20:5); TG (16:0/20:2/20:5); TG (14:1/20:0/22:6); TG (17:0/17:1/22:6); TG (17:2/19:0/20:5); TG (12:0/22:1/22:6); TG (16:0/18:1/22:6); TG (16:1/18:0/22:6); TG (15:0/19:1/22:6); TG (14:0/20:5/22:2); TG (15:1/19:0/22:6); TG (17:1/19:1/20:5); TG (14:1/20:5/22:1)
927.8375	TG (15:0/20:3/20:5); TG (17:0/18:3/20:5); TG (14:1/19:1/22:6); TG (17:2/18:1/20:5); TG (16:1/17:1/22:6); TG (16:0/17:2/22:6); TG (15:1/20:2/20:5); TG (15:0/18:2/22:6); TG (15:1/18:1/22:6); TG (17:1/18:2/20:5); TG (17:0/18:3/20:5); TG (13:0/20:5/22:3); TG (13:0/20:2/22:6)

Se observó que el EPA fue identificado principalmente en la posición *sn*-2 mientras que el DHA se encontró en la posición *sn*-3 de forma similar a lo descrito para el ASCRD. DHA no fue identificado en los espectros a 881,7593; 903,7412; 905,6995 y 923,8062 (m/z) mientras que EPA si estuvo presente. El rango m/z para EPA y DHA en general fue encontrado en el espectro entre 441,2402 y 927,8375 (m/z) y fueron visualizados formando parte siempre de TG, con excepción del DHA cuyo espectro a 441.2402 (m/z) fue relacionado con su estructura como monoglicérido (MG, **Figura 25**).

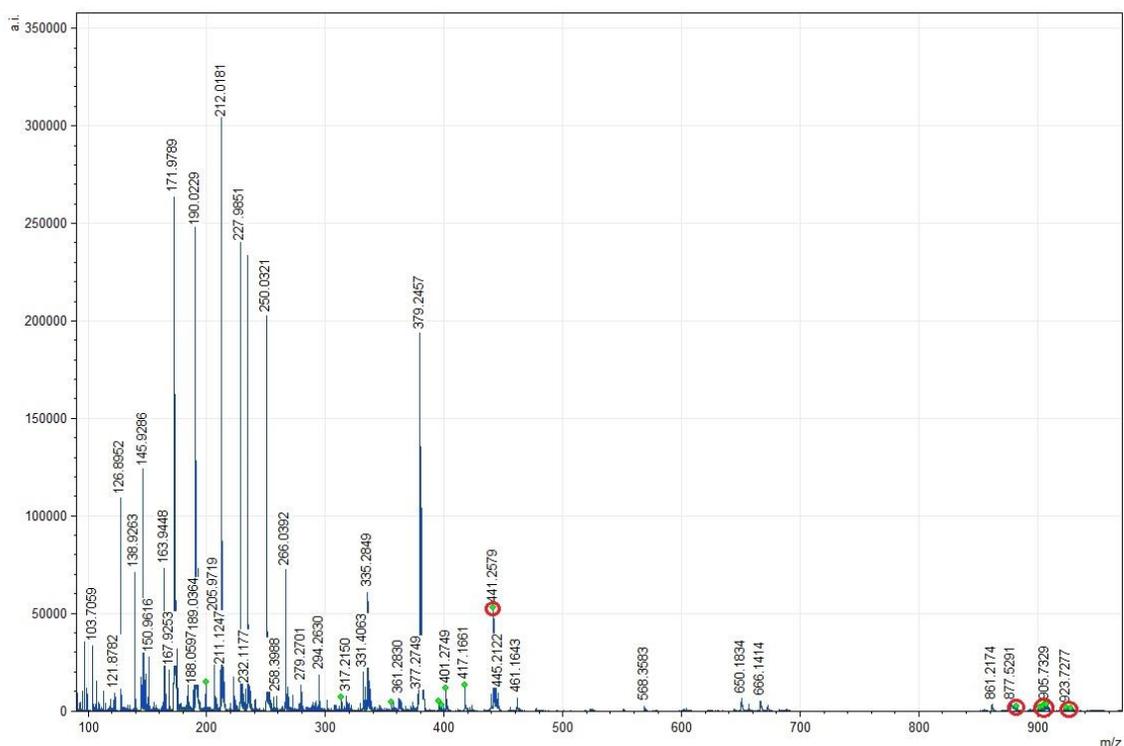


Figura 25. Reporte de espectros resultantes de AEs, obtenido entre los valores de relación masa/carga 100 y 900 m/z. La señal de relación m/z marcada en rojo corresponde a los MG y TG que presentan EPA/DHA en la posición *sn*-2 del glicerol. LIPID MAPS for glycerolipids.

La **Tabla 22** muestra un resumen del número de especies de acilglicéridos identificados con EPA/DHA en posición *sn*-2. Para realizar esta comparación se evaluaron al mismo tiempo el AEs optimizado y nuevamente el ASCRD mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Se observó que en el AEs hubo un aumento de la cantidad de EPA y DHA en posición *sn*-2 (35 vs 24) y disminuyó el número de AP en posición *sn*-2 (191 vs 158) con respecto al ASCRD mejorando las características estructurales del AEs.

Tabla 22. Resumen de la presencia de EPA/DHA identificada en el acilglicérido estructurado con EPA/DHA en *sn*-2 (AEs), con respecto al ASCRD, en la matriz CHCA1.

Muestras	EPA/ <i>sn</i> -2	EPA/ <i>sn</i> -3	DHA/ <i>sn</i> -2	DHA/ <i>sn</i> -3	PAL/ <i>sn</i> -1	PAL/ <i>sn</i> -2
ASCRD	24	66	-	60	167	24
AEs	33	101	2	93	135	23

EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; AP: ácido palmítico

3.2.4. Cromatografía en capa fina del AEs optimizado

La separación por cromatografía en capa fina del AEs optimizado se observa en la **Figura 26c**. El orden de elución de los compuestos observados mostró que las muestras evaluadas se encuentran en forma de triacilglicéridos y ácidos grasos libres en el AEs. En el carril E se muestra el AEs sin purificar, evidenciando los ácidos grasos libres presentes en la muestra además de los TG característicos del estructurado.

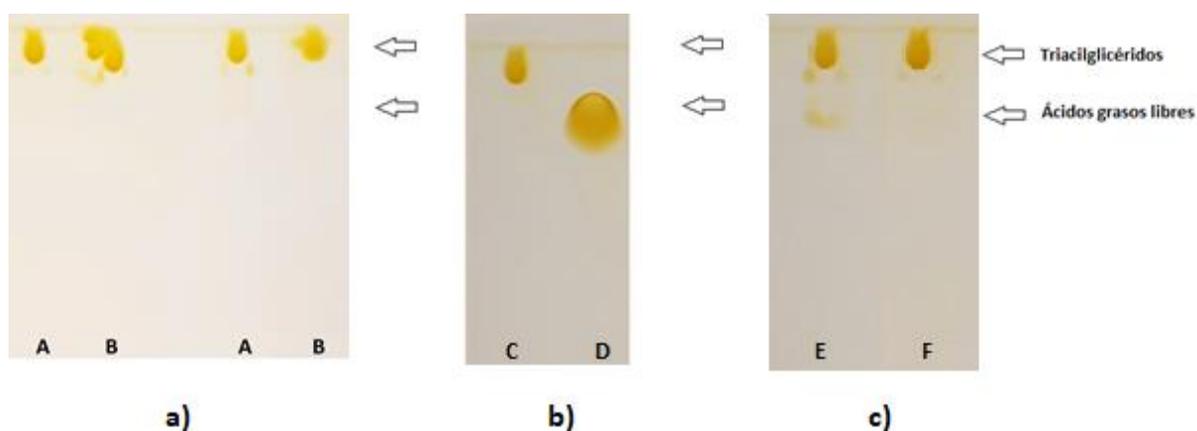


Figura 26. Separación cromatográfica en capa fina de AEs. a) (A) ASCRD purificado y (B) ASCRD no purificado; b) (C) Aceite de maravilla control y (D) concentrado óptimo AGPICLn-3; (E) AEs óptimo sin purificar y (F) AEs óptimo purificado.

En el carril F se identificaron solamente TG como único producto de la reacción de acidólisis enzimática, comprobando la efectividad del método de purificación utilizado [Hita *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2010]. Estos resultados coinciden con los determinados por espectrometría de masas, en los que fueron identificados mayormente TG estructurados, sin evidencia de DG. Los resultados de este objetivo 2 ya se encuentran publicados [Dovale-Rosabal *et al.*, 2023].

3.2.5. Calorimetría diferencial de barrido del AEs optimizado

En la **Figura 27** se muestra el termograma de fusión del AEs, cuyo rango de fusión fue de -71,76 a 5,08°C y su entalpía de fusión fue de 422,36 J/g.

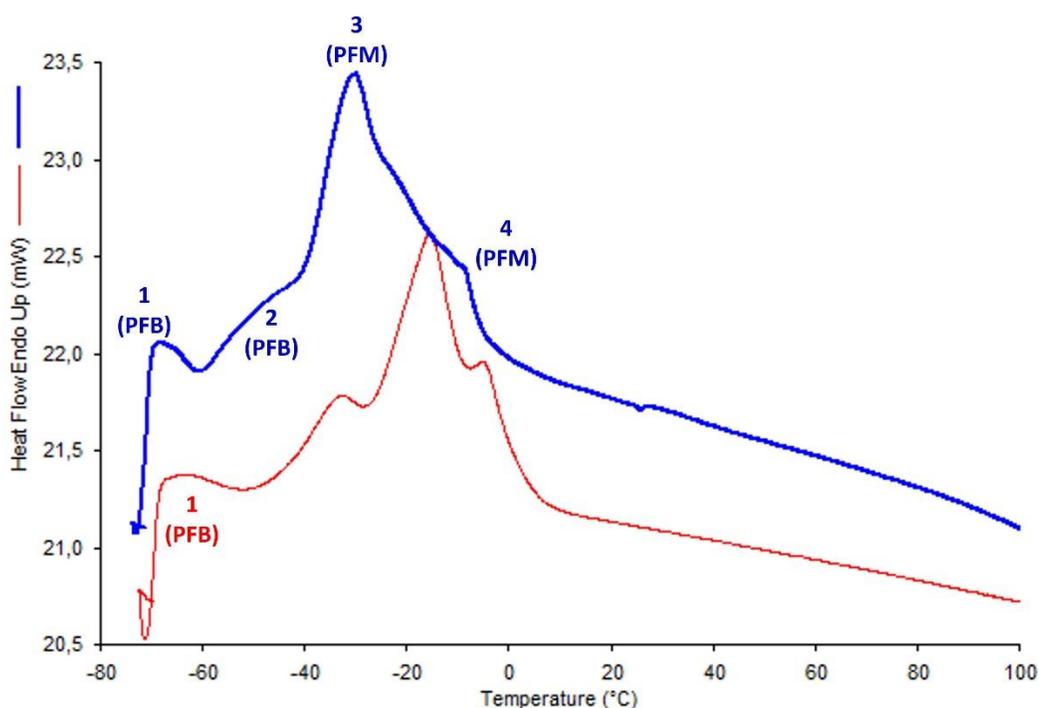


Figura 27. Termograma de fusión del acilglicérido estructurado (AEs, línea azul) respecto al aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD, línea roja). PFB: peak de punto de fusión bajo; PFM: peak de punto de fusión medio.

En este estructurado (línea azul) se observan 2 puntos de fusión bajos, a las temperaturas de -68,70 y -53,53 °C respectivamente, característico de los TG que contienen EPA y DHA, siendo similares en el primer caso al PFB1 de ASCRD y en el

segundo caso al PFB2 de AGPICLn-3 (**Tabla 23**), ya que la reacción ha ocurrido entre estas dos materias primas. Lo anterior puede ser corroborado al observar la composición de AEs (**Tabla 20**), que evidencia un mayor contenido de EPA+DHA en AEs con respecto a ASCRD. Al compararlos también se observa que ambos poseen un *onset* (alrededor de los 71°C) y un rango de fusión similar. Lo anterior permite comprobar que la estructuración mediante acidólisis enzimática y la posterior purificación fueron efectivas, pues en AEs se observa un perfil de fusión característico de estructuras en forma de triacilglicérido, diferenciándose de AGPICLn-3 por la ausencia de AGL.

Tabla 23. Comportamiento térmico de ASCRD (a), concentrado AGPICLn-3 (b) y AEs (c).

Parámetros calorimétricos	ASCRD (a)	AGPICLn-3 (b)	AEs (c)
Onset de fusión	-71,97 ± 2,32 °C	-67,84 ± 4,69 °C	-71,76 ± 0,57 °C
PFB1	-68,17 ± 1,31°C	-64,17 ± 3,55 °C	-68,70 ± 0,75 °C
PFB2	-	-55,23 ± 0,50 °C	-53,53 ± 2,27 °C
PFB3	-	-47,22 ± 4,17 °C	-
PFM1	-34,01 ± 0,08 °C	-26,87 ± 1,89 °C	-30,37 ± 0,24 °C
PFM2	-15,97 ± 0,30 °C	-	-
PFM3	-4,54 ± 0,14 °C	-	-8,43 ± 0,24 °C
Endset de fusión	2,06 ± 0,23 °C	-24,40 ± 1,78 °C	5,08 ± 0,18 °C
Rango de fusión	-71,97 a 2,06 °C	-67,84 a -24,40 °C	-71,76 a 5,08 °C
Entalpía de fusión	349,12 J/g	190,38 J/g	442,36 J/g

*PFB: peak de punto de fusión bajo; PFM: peak de punto de fusión medio; ASCRD: Aceite de salmón comercial refinado desodorizado; AGPICLn-3: concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3; AEs: Acilglicérido estructurado con EPA+DHA.

En la **Figura 27** se puede analizar que el termograma del AEs presenta *peaks* de fusión menos definidos (*peaks* 2 y 4 en azul) comparados con los *peaks* de ASCRD, una de las razones de esta situación podría deberse a que según estudios realizados por Tan & Che Man (2002), en calorimetría diferencial de barrido la velocidad de calentamiento afecta la magnitud relativa de los *peaks* y su forma. La definición y magnitud de los *peaks* aumenta a medida que la velocidad de calentamiento es mayor, esto indica que la velocidad escogida en el programa de temperatura de 5 °C/min fue adecuada para ASCRD pero no demasiado satisfactoria para el AEs.

3.3. Obtención de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA a través de la incorporación de ácido gálico en el acilglicérido estructurado (AEs) obtenido en el objetivo anterior, mediante la optimización de las variables del proceso de acidólisis fenólica enzimática (*Thermomyces lanuginosus*) bajo CO₂SC.

En este tercer objetivo, el AEs obtenido en el objetivo 2 fue sometido a un proceso experimental de acidólisis fenólica enzimática (*Thermomyces lanuginosus*) en medio CO₂SC (SC) para introducir las moléculas de ácido gálico en su estructura lipídica; obteniéndose acilglicéridos fenólicos estructurados (AFEs) y optimizando el contenido de EPA/DHA y el porcentaje de acidólisis fenólica. En la **Tabla 24** se muestran las condiciones del diseño factorial de cribado de 2² basado en la metodología de superficie de respuesta (MSR), cuyas variables independientes fueron: presión SC (bar) y temperatura SC (°C). Las variables respuesta fueron: EPA, DHA, contenido de EPA+DHA y porcentaje de síntesis enzimática del acilglicérido fenólico estructurado (AFEs). El diseño contempló 7 corridas con tres repeticiones del punto central para estimar el error experimental. El rango de las variables de diseño fue de 40 a 80 °C (temperatura SC) y de 78 a 300 bar (presión SC).

Tabla 24. Diseño factorial de cribado 2², de 2 factores por MSR. Ensayos para la optimización de las condiciones de obtención del acilglicérido fenólico estructurado (AFEs).

Ensayo	Variables independientes		Variables dependientes			
	Temperatura SC (°C) A	Presión SC (bar) B	EPA	DHA	EPA+DHA	Síntesis de AFEs (% acidólisis)
			(g/100g AGT)			
1	40	78	10,745	7,504	18,249	28,10
2	80	78	11,089	8,421	19,510	33,3
3	40	300	10,730	7,837	18,567	21,4
4	80	300	11,779	8,636	20,415	23,9
5	60	189	11,043	8,337	19,381	24,2
6	60	189	11,016	8,223	19,239	23,8
7	60	189	11,088	8,009	19,097	24,4

*SC: en medio CO₂ supercrítico. AFEs: acilglicéridos fenólicos estructurados

Los porcentajes de acidólisis (*Thermomyces Lanuginosus*) en medio SC mostrados en la **Tabla 24** se obtuvieron (según lo descrito en el punto 2.5.2.) a partir de las áreas calculadas en los cromatogramas obtenidos por HPLC (a las longitudes de onda de 215 nm y 280 nm) para la síntesis de AFEs de cada uno de los 7 ensayos.

Las variables independientes que influyeron significativamente en el contenido de EPA, DHA, EPA+DHA y en la síntesis de AFEs fueron determinadas mediante análisis estadístico de varianza utilizando MSR (**Tabla 25**).

Tabla 25. Análisis de varianza para cada variable respuesta en la optimización del proceso de acidólisis fenólica para sintetizar AFEs.

	Efectos	Suma de Cuadrados	G.L.	Cuadrados Medios	Razón-F	Valor-P
EPA	A: Temperatura SC	0,485863	1	0,485863	293,76	0,0004
	B: Presión SC	0,113854	1	0,113854	68,84	0,0037
	AB	0,123902	1	0,123902	74,91	0,0032
	Error total	0,00496177	3	0,00165392		
	Total (corr.)	0,728581	6			
DHA	A: Temperatura SC	0,736292	1	0,736292	31,84	0,0110
	B: Presión SC	0,075339	1	0,075339	3,26	0,1688
	AB	0,00347675	1	0,00347675	0,15	0,7241
	Error total	0,0693665	3	0,0231222		
	Total (corr.)	0,884475	6			
EPA + DHA	A: Temperatura SC	2,41838	1	2,41838	160,89	0,0011
	B: Presión SC	0,374425	1	0,374425	24,91	0,0155
	AB	0,0858684	1	0,0858684	5,71	0,0967
	Error total	0,0450935	3	0,0150312		
	Total (corr.)	2,92376	6			
Síntesis de AFE (% acidólisis fenólica)	A: Temperatura SC	14,8225	1	14,8225	4,23	0,1318
	B: Presión SC	64,8025	1	64,8025	18,51	0,0231
	AB	1,8225	1	1,8225	0,52	0,5227
	Error total	10,5011	3	3,50036		
	Total (corr.)	91,9486	6			

* SC: condiciones supercríticas; X: efecto lineal; XY: interacción entre efectos de variables; G.L.: grados de libertad. Se expresan en rojo aquellos efectos estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

En este caso las variables dependientes presentaron comportamientos diferentes entre sí, y los efectos significativos estadísticamente ($p < 0,05$) fueron la temperatura (A) y presión (B) supercríticas para EPA y EPA+DHA. La interacción AB resultó

significativa solo para la variable respuesta EPA, que a su vez fue la única variable donde todos los factores resultaron significativos. Para la respuesta DHA fue significativa solamente la temperatura SC, a diferencia de la síntesis de AFEs, donde la presión SC resultó ser la única con esta característica. Las ecuaciones (9-12) representan los modelos propuestos en términos de sus coeficientes de regresión para EPA, DHA, EPA+DHA (expresados en g/100g AGT) y síntesis de AFEs (% acidólisis), para los niveles de dos factores (temperatura SC y presión SC), utilizando un polinomio de primer grado:

$$\text{EPA} = 10,6364 + 0,0024423*A - 0,00323679*B + 0,0000792786*AB \quad (9)$$

$$\text{DHA} = 6,46687 + 0,0239618*A + 0,0020332*B - 0,0000132802*AB \quad (10)$$

$$\text{EPA+DHA} = 17,1033 + 0,0264041*A - 0,00120359*B + 0,0000659985*AB \quad (11)$$

$$\text{AFE síntesis} = 23,2447 + 0,153716*A - 0,018018*B - 0,000304054*AB \quad (12)$$

Los 4 modelos poseen un coeficiente de determinación (R^2 ajustado por grados de libertad) de 98,64%; 84,31%; 96,91% y 77,16% para EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis de AFEs, respectivamente; indicando que representan adecuadamente la variabilidad de los datos.

La **Figura 28** muestra las principales variables independientes que afectan el proceso de acidólisis fenólica enzimática utilizando gráficos tipo Pareto. Las variables independientes que influyeron significativamente en el contenido de EPA, DHA y EPA+DHA en la síntesis de AFEs se determinaron mediante análisis estadístico utilizando MSR. Los gráficos de comparación muestran el efecto lineal y la interacción para cada variable respuesta en orden decreciente (la línea azul marca $p < 0,05$). En términos generales, la temperatura CO_2SC mostró efecto significativo ($p < 0,05$) positivo para los contenidos de EPA, DHA y EPA+DHA, como se observa en los 3 primeros gráficos de la **Figura 28**. La presión CO_2SC sin embargo, afectó significativamente

($p < 0,05$) el contenido de EPA y de EPA+DHA de forma positiva, pero no tuvo efecto sobre DHA. Con respecto a la interacción entre variables A y B (temperatura CO₂SC y presión CO₂SC) puede observarse que solo fue significativo ($p < 0,05$) en el caso del contenido de EPA. Para la síntesis de acilglicéridos fenólicos estructurados la variable presión CO₂SC fue la única que ejerció efecto significativo ($p < 0,05$) y este efecto fue además negativo, mostrando un comportamiento totalmente diferente al de las restantes variables dependientes.

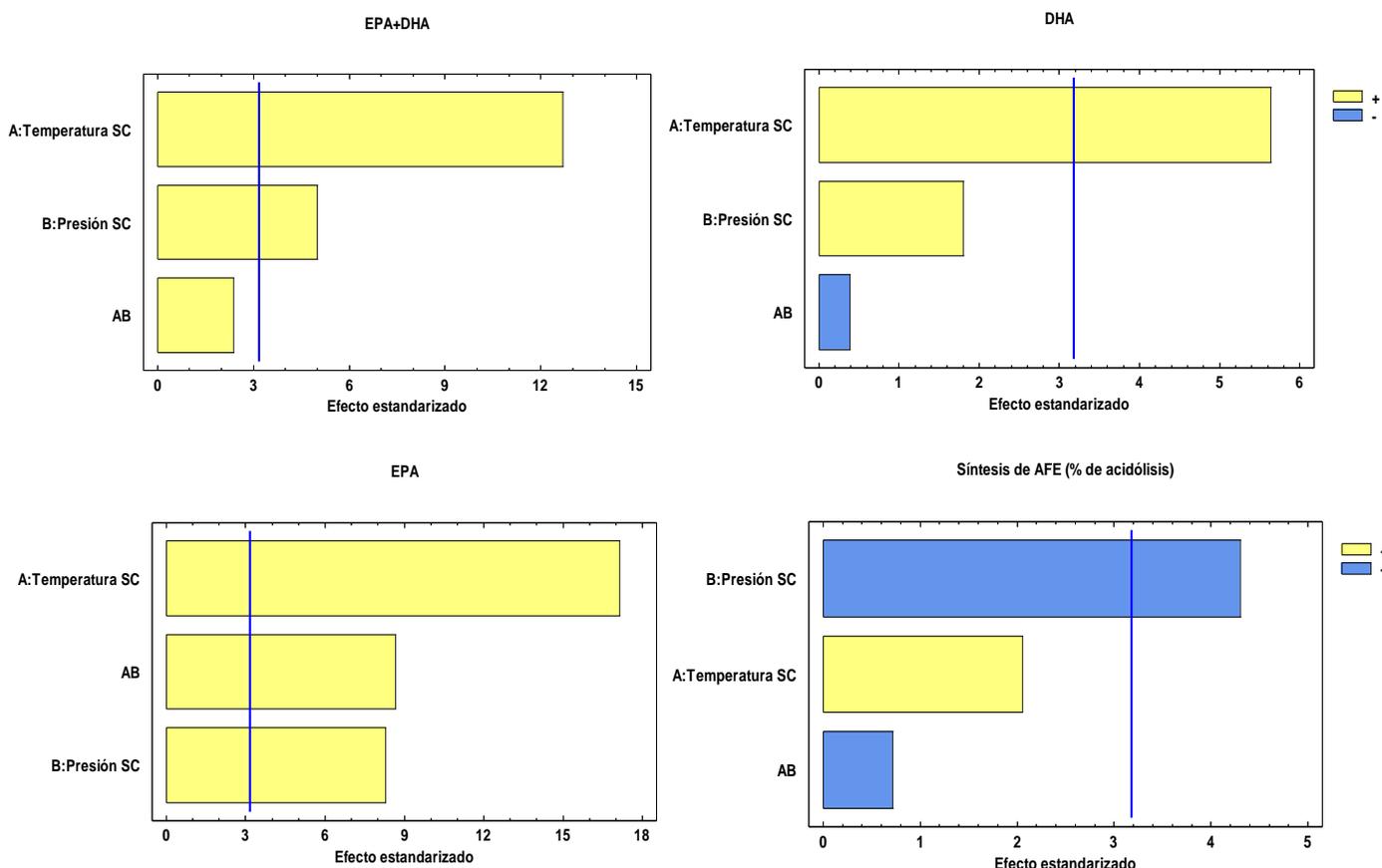


Figura 28. Diagramas de Pareto estandarizados donde se observan los efectos de las variables independientes sobre las variables respuesta EPA, DHA, EPA+DHA, y síntesis de AFE (la línea azul indica un $p < 0,05$).

En la **Figura 29** se muestran los gráficos de superficie respuesta y contorno para incorporar EPA, DHA, EPA+DHA y ácido gálico en el AFEs, reflejando la influencia de la combinación de las principales variables del proceso (presión CO₂SC y

temperatura CO₂SC) para cada una de esas variables respuestas. El contenido de EPA (g/100g AGT) aumentó de forma positiva con la temperatura y la presión supercríticas, alcanzando su máximo a niveles altos de estas dos variables independientes ($p < 0,05$). El mismo comportamiento fue observado para las variables contenido de DHA y EPA+DHA, expresado en g/100g AGT, cuya incorporación alcanzó niveles máximos a alta temperatura CO₂SC ($p < 0,05$) y presión CO₂SC. Con respecto al comportamiento de la acidólisis fenólica, la superficie y el contorno de respuesta en función de la temperatura y la presión supercríticas fue diferente.

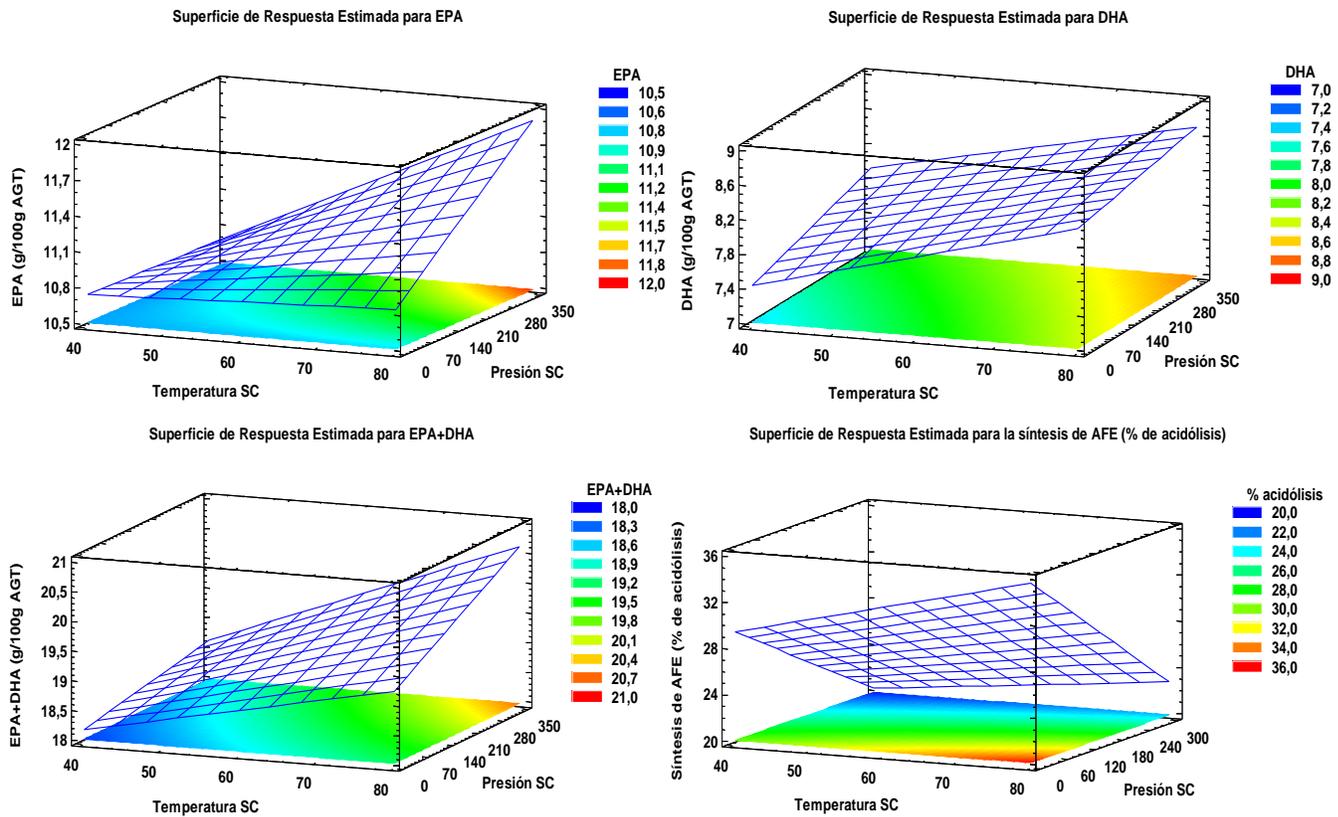


Figura 29. Gráficos de superficie respuesta y contorno de la combinación de las variables independientes presión CO₂SC y temperatura CO₂SC sobre las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis fenólica de AFEs.

En este caso, la variable presión CO₂SC condujo a un contenido máximo de acidólisis fenólica a niveles bajos ($p < 0,05$), mientras que la temperatura CO₂SC no fue

significativa ($p > 0,05$). Así, la presión CO_2SC fue el factor más determinante en la acidólisis fenólica, y una presión CO_2SC baja conduce a un aumento de esta ($p < 0,05$), hecho que coincide con lo observado en el diagrama de Pareto respectivo (**Figura 1 d**). En resumen, en los gráficos de EPA, DHA y EPA+DHA, a medida que aumentan la temperatura y presión supercríticas se produce un aumento de la concentración de las variables respuesta mencionadas; mientras que en el caso de la acidólisis fenólica (síntesis de AFEs) su aumento está influenciado solamente por la disminución de la presión supercrítica.

3.3.1. Optimización del proceso:

El objetivo de optimizar las variables independientes del proceso (presión y temperatura) (**Tabla 26**) fue maximizar el contenido de EPA, DHA y EPA+DHA (g/100g AGT) en AFEs y maximizar la unión de ácido gálico al acilglicérido (acidólisis fenólica, %).

Tabla 26. Valores óptimos de las variables independientes presión y temperatura supercríticas para maximizar las variables respuestas EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis fenólica de AFEs, así como la optimización conjunta de estas variables.

Optimización	Temperatura SC (°C)	Presión SC (bar)	Punto estacionario	Valor óptimo predicho
EPA	80	300	Máximo	11,76
DHA	80	300	Máximo	8,67
EPA+DHA	80	300	Máximo	20,44
Síntesis de AFEs	80	78	Máximo	32,24
Optimización conjunta	80,0	78,0	Máximo	EPA: 11,15 DHA: 8,38 EPA+DHA: 19,53
			Máximo	Síntesis de AFEs: 32,24

*SC: medio supercrítico. Concentración de EPA, DHA y EPA+DHA expresada en g/100g AGT.

Las condiciones óptimas para el contenido de EPA, DHA y EPA+DHA fueron 80,0 °C (temperatura CO_2SC) y 300 bar (presión CO_2SC), mientras que, para la síntesis de AFEs su máximo se alcanzó a 80°C y 78,0 bar siendo los valores óptimos predichos individualmente de 11,76 (EPA); 8,67 (DHA), 20,44 (EPA+DHA) expresados en

g/100g de AGT y 32,24% de acidólisis fenólica, respectivamente (**Tabla 26**). La optimización conjunta predicha para maximizar las diferentes respuestas resultó en una formulación que maximiza la síntesis de AFEs (%) cuando la temperatura CO₂SC fue 80°C y la presión CO₂SC 78,0 bar. De esta manera, la síntesis de lípidos fenólicos alcanzó un máximo de 32,24%, conteniendo finalmente según lo predicho 19,53 g/100g de AGT de EPA+DHA. En la **Figura 30**, se muestra el comportamiento de la máxima deseabilidad mencionada en gráficos de superficie respuesta y contorno, donde se puede observar su incremento a medida que disminuye la presión y aumenta la temperatura. El óptimo se observa con una cruz en la **Figura 30b** a 80°C y 78,0°C de la región supercrítica. Otros investigadores (Pando *et al.*, 2021) estudiaron la síntesis de acilglicéridos estructurados mediante la esterificación de EPA o DHA y ácido caprílico, utilizando lipasa de *Thermomyces lanuginosus* como biocatalizador, obteniendo valores de optimización conjunta de 40°C de temperatura SC y 300 bar de presión SC, con deseabilidad cercana a 1. Lo reportado no coincide con los resultados de este estudio debido a otros factores en juego, como la naturaleza hidrofílica del AG y su comportamiento afín a la disminución de la presión SC en vez de su aumento, que se observa en la **Figura 29**, siendo distinto al comportamiento del resto de las variables.

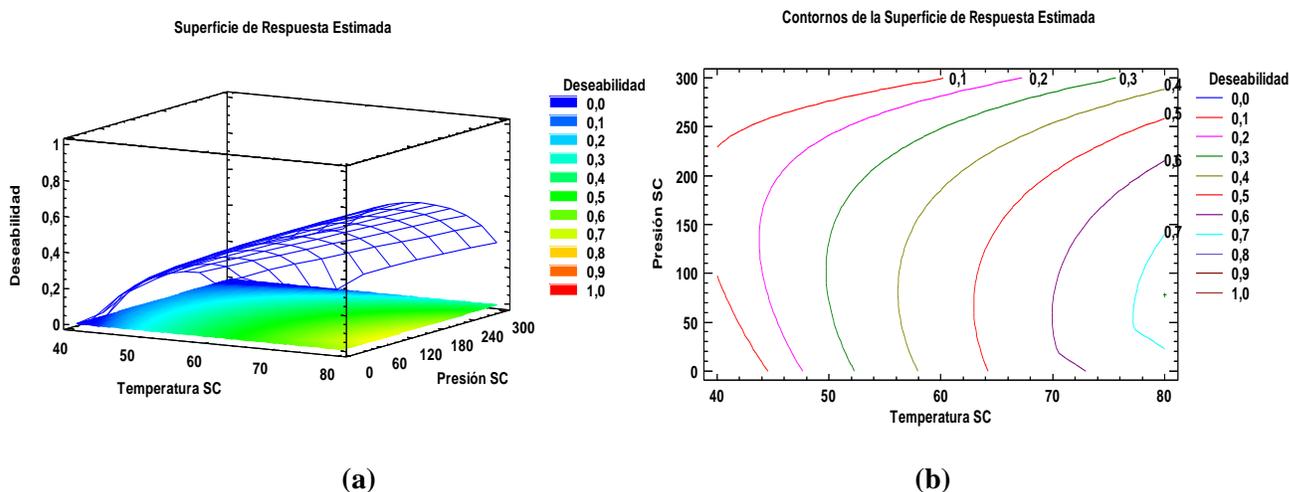


Figura 30. a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA, DHA, EPA+DHA y síntesis de AFE. b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.

3.3.2. Validación del triacilglicérido estructurado con EPA/DHA óptimo:

Para la validación del proceso de síntesis del AFEs se tuvieron en cuenta las condiciones supercríticas teóricas de la optimización conjunta (78 bar; 80 °C) que predijeron el valor máximo de EPA+DHA y la incorporación del ácido gálico mediante acidólisis enzimática con 19,55 g/100g AGT de EPA+DHA (**Tabla 27**), aumentando su contenido en 1,49 veces con respecto al AEs obtenido en el Objetivo 2 y 2,52 veces con respecto a la materia prima inicial (ASCRD). EPA y DHA individualmente aumentaron su contenido en 1,87 y 1,17 veces respectivamente, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados disminuyeron (1,31 y 1,2 veces respectivamente) con respecto al AEs.

Los principales ácidos grasos del AFEs mostraron cambios frente al AEs con la disminución del contenido (expresado en g/100g AGT) de ácido oleico (34,66 vs 27,60) y ácido palmítico (10,6 vs 7,90) y con el aumento del ácido linoleico (15,48 frente a 18,12), ácido alfa-linolénico (4,78 frente a 5,95), EPA (5,92 frente a 11,11) y DHA (7,18 frente a 8,44). Por tanto, el proceso de acidólisis fenólica enzimática en CO₂SC, optimizado por MSR, intercambió los ácidos grasos de AEs, favoreciendo la incorporación de EPA y DHA

Con respecto al ASCRD los cambios fueron más notables pues los contenidos de EPA y DHA aumentaron en 2,83 y 2,20 veces respectivamente (expresados en g/100g AGT). El ácido palmítico, los ácidos grasos saturados totales y los ácidos grasos monoinsaturados disminuyeron en 1,62; 1,65; y 1,30 veces respectivamente (expresados en g/100g AGT), evidenciando los cambios positivos de la acidólisis fenólica enzimática al disminuir ácidos grasos que pueden resultar perjudiciales para la salud [Ruiz *et al.*, 2021]. Debe señalarse que los valores obtenidos (expresados en g/100g AGT) en la validación experimental para las variables independientes DHA y EPA+DHA fueron superiores a los esperados según la optimización conjunta (DHA 8,44 vs 8,38 y EPA+DHA 19,55 vs 19,53).

Tabla 27. Composición y cuantificación de ácidos grasos de a) ASCRD, b) AGPICLn-3, c) AEs y d) Acilglicéridos fenólicos estructurados (AFEs) expresados en g/100g AGT.

Ácidos grasos (g/100g AGT)		(a) ASCRD*	(b) AGPICLn-3*	(c) AEs*	(c) AFEs*
Láurico	C12:0	0,06 ± 0,00	N/I	N/I	N/I
Mirístico	C14:0	2,90 ± 0,01	0,18 ± 0,00	2,15 ± 0,00	1,66 ± 0,00
Palmítico	C16:0	12,76 ± 0,03	0,25 ± 0,00	10,6 ± 0,00	7,90 ± 0,01
Palmitelaídico	C16:1 9t	0,07 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,22 ± 0,00
Palmitoleico	C16:1 9c	3,74 ± 0,01	1,90 ± 0,00	3,39 ± 0,00	3,21 ± 0,00
Heptadecanoico	C17:0	0,22 ± 0,00	0,28 ± 0,00	N/I	N/I
Heptadecenoico	C 17:1 10c	0,13 ± 0,00	1,30 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,57 ± 0,00
Estearico	C18:0	3,64 ± 0,01	1,56 ± 0,00	3,17 ± 0,00	2,54 ± 0,00
Trans-vaccénico	C 18:1 11t	N/I	N/I	0,47 ± 0,01	0,61 ± 0,00
Oleico	C18:1 9c	36,95 ± 0,08	3,15 ± 0,00	34,66 ± 0,03	27,60 ± 0,03
Cis-vaccénico	C18:1 7c	3,32 ± 0,00	0,33 ± 0,00	2,74 ± 0,00	2,22 ± 0,00
Linoelaídico	C18:2 9t 12t	0,06 ± 0,00	2,14 ± 0,00	0,75 ± 0,01	0,94 ± 0,01
Linoleico	C18:2 9c 12c	15,77 ± 0,07	22,36 ± 0,03	15,48 ± 0,00	18,12 ± 0,00
Gamma linolénico	C18:3 6c 9c 12c n-6	0,32 ± 0,00	1,10 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,44 ± 0,00
5-Eicosaenoico	C 20:1 5c	0,22 ± 0,00	1,18 ± 0,02	N/I	0,44 ± 0,00
8-Eicosaenoico	C 20:1 8c	0,44 ± 0,01	N/I	N/I	N/I
11-Eicosaenoico	C 20:1 11c	1,84 ± 0,04	N/I	1,94 ± 0,00	1,57 ± 0,00
α-Linolénico	C 18:3 9c 12c 15c n-3	4,91 ± 0,00	9,32 ± 0,01	4,78 ± 0,00	5,95 ± 0,01
Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c	1,34 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,90 ± 0,00	0,78 ± 0,00
Behenoico	C 22:0	0,36 ± 0,00	N/I	N/I	N/I
Eicosatrienoico	C 20:3 n-9	0,33 ± 0,00	1,78 ± 0,00	1,29 ± 0,00	1,08 ± 0,01
Erúcido	C 22:1	0,29 ± 0,01	1,53 ± 0,00	N/I	N/I
Araquidónico	C 20:4 n-6	0,35 ± 0,04	N/I	N/I	N/I
Docosadienoico	C 22:2	0,12 ± 0,01	3,03 ± 0,14	1,07 ± 0,00	1,41 ± 0,00
Eicosapentaenoico	C 20:5 n-3	3,92 ± 0,04	18,45 ± 0,04	5,92 ± 0,01	11,11 ± 0,03
Nervónico	C 24:1	0,27 ± 0,03	1,52 ± 0,00	N/I	N/I
Docosatetraenoico	C 22:4	0,15 ± 0,03	0,64 ± 0,01	0,49 ± 0,00	0,67 ± 0,00
Docosapentaenoico	C 22:5 n-3	1,69 ± 0,05	4,55 ± 0,01	2,0 ± 0,00	2,52 ± 0,00
Docosahexaenoico	C 22:6 n-3	3,83 ± 0,04	22,88 ± 0,04	7,18 ± 0,02	8,44 ± 0,00
Total de ácidos grasos saturados (AGS)		19,94	2,27	15,92	12,1
Total de ácidos grasos monoinsaturados (AGM)		47,27	11,16	43,85	36,44
Total de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)		32,79	86,57	40,23	51,46
Total de AGPI de cadena larga n-3 (AGPICLn-3)		9,44	45,88	16,39	23,15
Total de ácidos grasos n-3		14,35	55,2	21,17	29,10
EPA+DHA		7,75	41,33	13,1	19,55

*Valores corresponden al promedio (n=3) ± desviación estándar. ASCRD: aceite de salmón comercial refinado desodorizado, AGPICLn-3: concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3, AEs: acilglicéridos estructurados.

3.3.3. Validación de la síntesis del acilglícido fenólico estructurado (AFEs) óptimo, mediante cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó la separación cromatográfica en capa fina (**Figura 31**) de las muestras de AFEs purificadas y sin purificar, con el fin de comprobar la síntesis de acilglícidos fenólicos. Se observó la elución de los productos resultantes de las reacciones de acidólisis enzimática con ácido gálico: monoglicéridos (MG), diacilglícidos (DG), así como mono y diacilglícidos fenólicos según el grado de polaridad [Dovale-Rosabal *et al.*, 2021]. Como era de esperarse, la migración de MG se desarrolló más lentamente, mientras que el TG migró mucho más rápido, similar a lo reportado [Haq *et al.*, 2018]. Los compuestos fenólicos, correspondientes a mono y diglicéridos de AFEs, migraron más lentamente que sus correspondientes acilglícidos no fenólicos [Sabally, 2006a]. El estándar de ácido gálico no eluyó, probablemente debido a su alta polaridad (Ousji & Sleno, 2022). Este análisis cromatográfico confirmó la presencia de AFEs en las bandas C-F (no purificado) y G (purificado), mostrando también que la purificación con NaOH elimina una parte de MG y MG fenólicos.

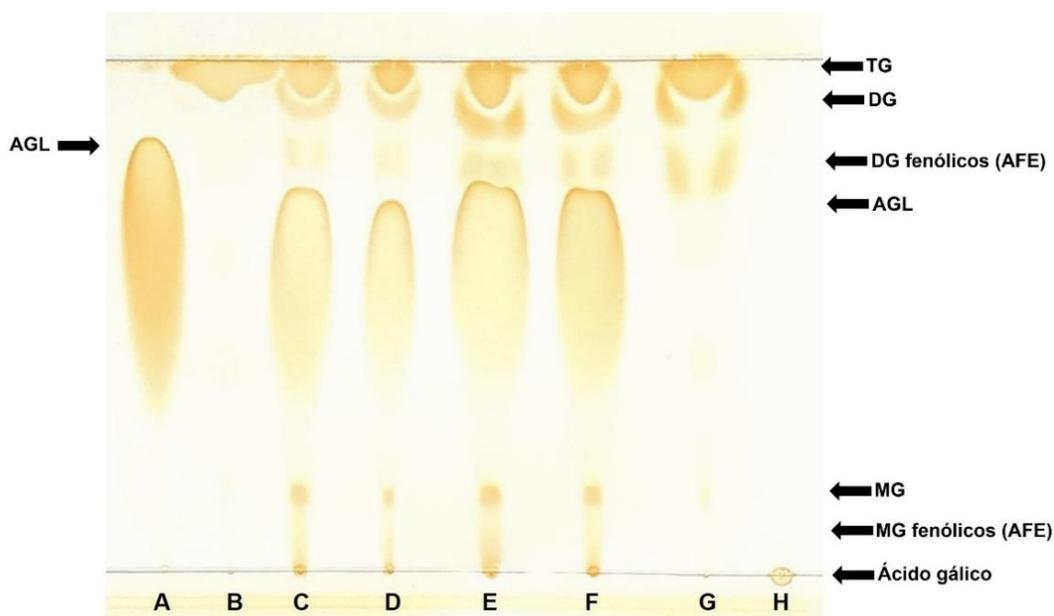


Figura 31. Separación cromatográfica en capa fina de AFEs: (A) estándar de ácidos grasos libres, (B) ASCRD, (C-F) AFEs no purificado, (G) AFEs purificado y (H) estándar de ácido gálico.

3.3.4. Validación de la síntesis del acilglicérido fenólico estructurado (AFEs) mediante análisis estructural por HPLC-UV.

El AFEs óptimo se validó mediante HPLC-UV con el fin de comprobar el porcentaje alcanzado de síntesis fenólica, de la misma forma que se obtuvo para los 7 experimentos del diseño (punto 2.5.2). La **Figura 32** muestra el perfil de elución correspondiente, monitoreado a 280 nm y 215 nm.

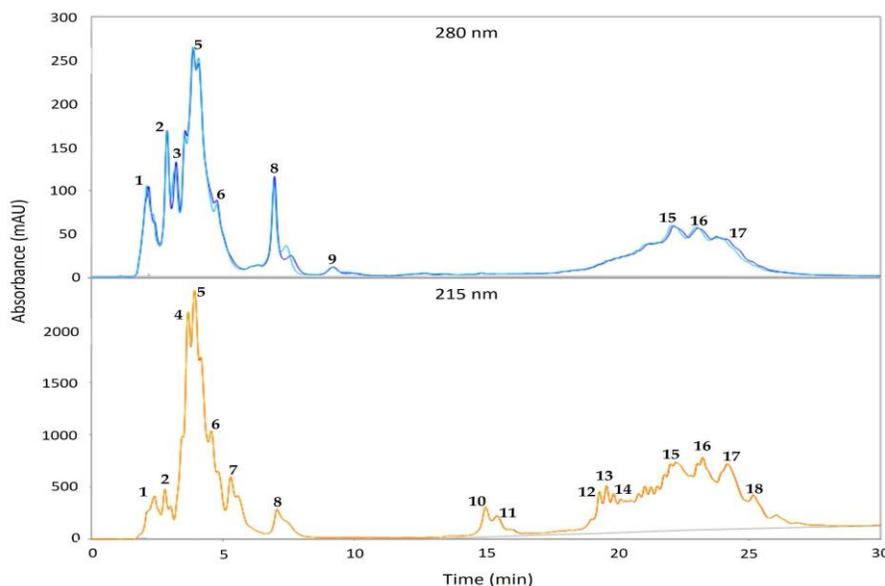


Figura 32. Cromatogramas HPLC a 280 y 215 nm del AFEs óptimo validado. Los peaks cromatográficos fueron identificados numéricamente según lo siguiente: #1 ácido gálico; #18 triacilglicéridos, #2, 5-6 y 8 monoacilgliceroles fenólicos de AFE, #15-17 diacilgliceroles fenólicos de AFE, #4 y 7 monoacilgliceroles, #10-14 diacilgliceroles, #3 y 9 productos de reacción secundaria [Dovale-Rosabal et al., 2022].

El *peak* #1, que absorbió en ambas longitudes de onda (215 y 280 nm) se identificó como ácido gálico en referencia al estándar, mientras que el *peak* 18, que absorbió solo a 215 nm, corresponde a triacilglicéridos del AEs inicial. Los *peaks* # 2, 5-6 y 8 se caracterizaron como monoglicéridos fenólicos y los *peaks* # 15-17 como diacilglicéridos fenólicos ya que absorbieron tanto a 215 como a 280 nm [Sabally, 2006b], evidenciando de esta manera la presencia del ácido gálico unido a las molécula de acilglicéridos. Los subproductos hidrolíticos de AEs (que absorben solo a 215 nm) se representaron como

La revisión manual de los datos de fragmentación en polaridad positiva permitió la detección de al menos 16 compuestos modificados con ácido gálico. A continuación se examinó la fragmentación para determinar en más detalle la estructura. Un compuesto con señal m/z de 655 (señalado en rojo) fue detectado en AFEs, cuyo espectro de fragmentación se muestra en la **Figura 34**. Los fragmentos de baja intensidad m/z 155 y m/z 171 (llave azul) indicaron la presencia de ácido gálico en la molécula; el fragmento m/z 313 (señalado en verde) indicaría la presencia de DHA; un tercer sustituyente del glicerol correspondería a ácido acetoacético (señalado en negro) identificado de acuerdo a los fragmentos observados.

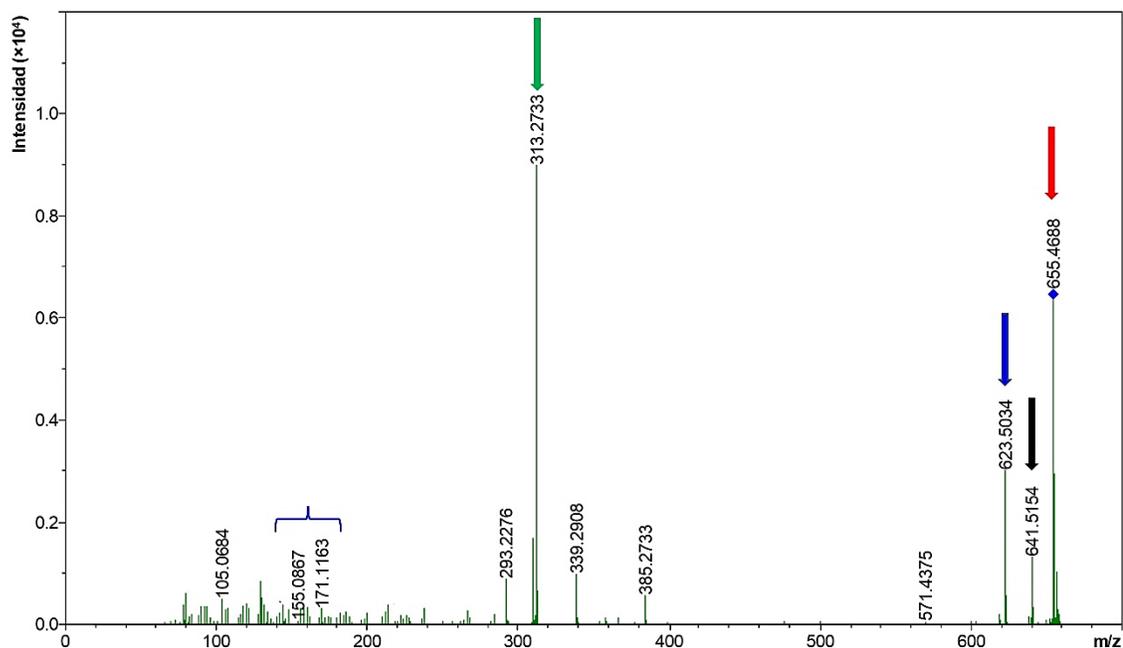


Figura 34. Espectro de fragmentación de una de las moléculas identificadas en AFEs, con señal m/z de 655 (flecha roja). Los fragmentos señalados en verde, azul y negro están asociados al ácido docosahexaenoico (DHA), ácido gálico (AG) y ácido acetoacético, respectivamente.

De acuerdo a Zeb & Murkovic (2010), el fragmento de mayor intensidad (DHA) estaría asociado a la posición *sn*-2, mientras el ácido gálico y ácido acetoacético estarían en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 según su correspondiente intensidad. La estructura determinada para el compuesto se muestra a continuación (**Figura 35**):

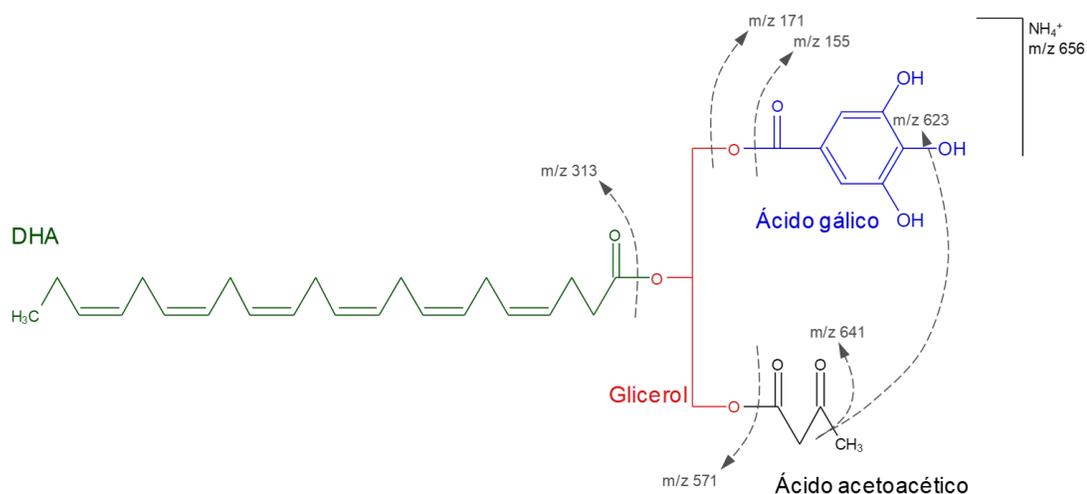


Figura 35. Estructura determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS) para una de las moléculas lipídicas/fenólicas identificadas en AFEs.

En este proyecto de tesis no se contempló la evaluación de la absorción o biodisponibilidad de AFEs, no obstante, se pueden realizar algunas observaciones al respecto. Por lo general los compuestos fenólicos están presentes en una amplia variedad de plantas en forma de ésteres o de glicósidos conjugados con otros compuestos, tales como flavonoides, alcoholes o esteroides. El inicio de la asimilación de estas sustancias en el organismo ocurre en la cavidad bucal a través de la masticación. El nivel de glicosilación, la astringencia y la interacción con las enzimas salivales intervienen en su liberación de la matriz alimenticia comenzando con la acción de las β -glucosidasas [Wojtunik-Kulesza *et al.*, 2020; Cereceres-Aragón *et al.*, 2019] aunque el tiempo de permanencia en la cavidad bucal es corto. En la estructura molecular observada en la **Figura 35**, el ácido gálico se encuentra unido mediante enlace éster al glicerol, de la misma forma que los otros dos grupos sustituyentes (DHA y ácido acetoacético) que también se encuentran esterificados. En este caso, no hay presencia de grupos glucosídicos unidos al fenol como en los extractos vegetales, por lo que se podría esperar que las glucosidasas presentes en la cavidad bucal no actúen en gran medida. Posteriormente, los compuestos fenólicos dentro del bolo alimenticio pasan al estómago, iniciándose la etapa gástrica. A este nivel algunos elementos de estructuras

más simples como los ácidos fenólicos pueden ser liberados y se encuentran disponibles para su absorción a nivel gástrico [Cereceres-Aragón *et al.*, 2019]. De esta forma pueden ingresar a la circulación y posteriormente generar un efecto protector antioxidante, no obstante, la absorción de polifenoles es efectuada en la etapa intestinal en mayor proporción [Teng *et al.*, 2019]. En el caso de la molécula representada (**Figura 35**), las lipasas (estearasas) lingual y gástrica podrían escindir los enlaces tipo éster, preferentemente en la posición *sn*-3. Con ello podría liberarse el ácido acetoacético dando lugar a la formación de 1,2 diacilglicéridos y 2-monoacilglicerol con DHA y ácido gálico, que pasaría al intestino delgado para su posterior reesterificación y absorción según lo descrito en el capítulo 1 (punto 1.3.3). El ácido gálico, al ser un compuesto fenólico simple, también podría ser absorbido directamente desde el estómago en caso de encontrarse en su forma libre y transitar desde la circulación sistémica hacia sus sitios diana [Barrios & Bravo., 2021].

Los compuestos fenólicos pasan del lumen intestinal al citosol de los enterocitos a través de diferentes mecanismos: difusión pasiva, transporte activo, transporte paracelular y difusión facilitada. [Cereceres-Aragón *et al.*, 2019]. Este transporte dependerá de la estructura química, permitiendo principalmente el paso de las moléculas más simples. Los polifenoles complejos por su parte deberán ser hidrolizados por las enzimas intestinales o por la microbiota colónica antes de ser absorbidos [D'Archivio *et al.*, 2007]. Las fracciones libres no absorbidas del ácido gálico, así como las que puedan quedar esterificadas, serían susceptibles a la hidrólisis por la lipasa pancreática (estereoespecífica para las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del TG) y la carboxil ester hidrolasa (inespecífica, actúa a nivel de diacilglicéridos principalmente) pudiendo luego ser absorbidos en el enterocito, transitando hacia el torrente sanguíneo y pudiendo metabolizarse también en otros órganos [Zanotti *et al.*, 2015; Cereceres-Aragón *et al.*, 2019; Tamargo, 2021]. El ácido acetoacético, por otra parte, se ha descrito como el más simple de los cuerpos cetónicos y se produce naturalmente en el organismo (principalmente en el hígado) durante la oxidación de los ácidos grasos. Después de su absorción podría ser transportado a diferentes tejidos extrahepáticos para convertirse en

acetil-CoA y oxidarse a través del ciclo del ácido cítrico, proporcionando energía para tejidos tales como los músculos esquelético y cardíaco y la corteza suprarrenal [Nelson & Cox, 2017]. Según lo descrito, la síntesis de acilglicéridos fenólicos y su ingesta dietaria podría tal vez permitir la protección contra la absorción del triacilglicérido por una parte, y una más rápida absorción de fenoles simples como el ácido gálico; al no encontrarse en forma de glucósidos de difícil absorción y al ser susceptibles a reacciones lipolíticas como un acilglicérido más de la dieta.

3.3.6. Validación de la síntesis de AFEs mediante la determinación de polifenoles totales.

En la **Figura 36** se observa la curva de calibración del ácido gálico usada como patrón de referencia para la determinación de compuestos fenólicos totales del AFEs optimizado.

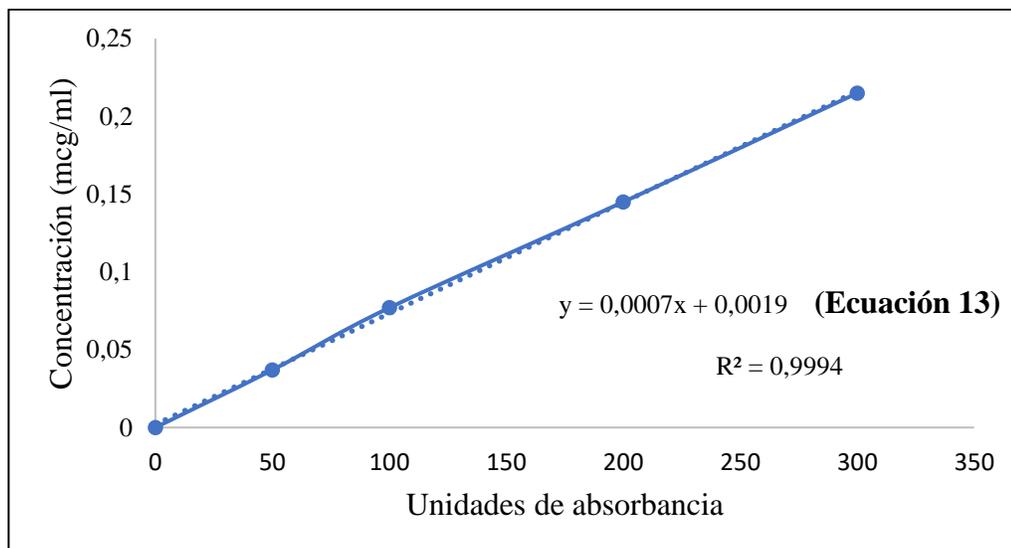


Figura 36. Curva de calibración con ácido gálico.

Mediante esta curva de calibración se obtuvo la ecuación correspondiente **(13)** que permitió determinar la concentración final de polifenoles de AFEs, que resultó en 12 ± 0.10 mg de ácido gálico por ml de AFEs.

Dicho valor se encuentra en concordancia con el porcentaje de síntesis fenólica obtenido (33,3%) para el punto óptimo, ya que este último corresponde a 13,32 mg de ácido

gálico por g de aceite añadido en la acidólisis en medio SC. De esta forma fue posible comprobar por un método de análisis distinto, que el ácido gálico es capaz de unirse al esqueleto del glicerol en AFEs en condiciones supercríticas, tal como se esperaba. Al ser AFEs un acilglicérido específico de síntesis que no se encuentra normalmente en la naturaleza se hace difícil su comparación con compuestos similares, pues los casos reportados en la literatura no fueron obtenidos en medio supercrítico o con adición de ácido gálico [Ciftci & Saldaña, 2012; Sabally *et al.*, 2005; Figueroa-Espinoza *et al.*, 2013; Alencar *et al.*, 2009; Roby, 2017] ya que principalmente se emplean solventes químicos para la estructuración. Sin embargo, puede ser comparado con el contenido de polifenoles reportado para diferentes frutos en base a datos existentes, siendo similar en contenido de polifenoles al arándano fresco (13,04 mg EAG/g (mg equivalentes a ácido gálico)), a la ciruela negra fresca sin cáscara (13,91 mg EAG/g), inferior al maqui fresco (43,52 mg EAG/g) y superior a la cereza fresca (mg EAG/g), por solo citar algunos ejemplos [INTA, Base de datos, 2023].

3.3.7. Capacidad antioxidante de AFEs óptimo validado mediante ORAC_{FL}

El ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) determina la capacidad de los antioxidantes de una muestra para proteger la sonda de fluoresceína (FL) de la oxidación provocada por radicales peroxilos, los cuales se generan por descomposición térmica del AAPH en un *buffer* fosfato acuoso. Los antioxidantes reaccionan rompiendo la reacción en cadena del radical mediante la transferencia de átomos de hidrógeno [Ou *et al.*, 2001].

Para la realización de este ensayo fue necesario saponificar el AFEs obtenido para liberar el ácido gálico unido a la estructura del glicerol, ya que de otra forma no sería posible su análisis al estar protegido dentro de la estructura del acilglicérido. El resultado de la capacidad antioxidante fue de 219 μ moles Eq de Trolox por gramo de AFEs, permitiendo constatar la presencia de ácido gálico en las muestras y por consiguiente la síntesis exitosa del estructurado fenólico en medio supercrítico. Además, se determinó también mediante el mismo ensayo que el ASCRD de este estudio no

posee capacidad antioxidante, por lo que su aparición en AFEs se debe solo a la adición del ácido gálico mediante la estructuración.

3.3.8. Calorimetría diferencial de barrido en AFEs

Los resultados de la caracterización calorimétrica muestran una entalpía de fusión de 417,45 J/g, muy similar a la encontrada en AEs. El rango de fusión de este acilglicérido fenólico (-70,72°C a 5,49°C) también tienen semejanzas con los rangos de fusión del aceite inicial ASCRD y del AEs (-71,97°C a 2,06°C y -71,76°C a 5,08°C respectivamente, (**Tabla 28**) evidenciando que las muestras analizadas poseen una estructura similar de triacilglicérido.

Tabla 28. Comportamiento térmico de ASCRD (a), AGPICLn-3 (b), AEs (c) y AFEs (d).

Parámetros calorimétricos	ASCRD (a)	AGPICLn-3 (b)	AEs (c)	AFEs (d)
Onset de fusión	-71,97 ± 2,32 °C	-67,84 ± 4,69 °C	-71,76 ± 0,57 °C	-70,72 ± 0,17 °C
PFB1	-68,17 ± 1,31 °C	-64,17 ± 3,55 °C	-68,70 ± 0,75 °C	-67,41 ± 0,23 °C
PFB2	-	-55,23 ± 0,50 °C	-53,53 ± 2,27 °C	-
PFB3	-	-47,22 ± 4,17 °C	-	-
PFM1	-34,01 ± 0,08 °C	-26,87 ± 1,89 °C	-30,37 ± 0,24 °C	-38,02 ± 0,11 °C
PFM2	-15,97 ± 0,30 °C	-	-	15,01±0,94 °C
PFM3	-4,54 ± 0,14 °C	-	-8,43 ± 0,24 °C	-
Endset de fusión	2,06 ± 0,23 °C	-24,40 ± 1,78 °C	5,08 ± 0,18 °C	5,49±0,39 °C
Rango de fusión	-71,97 a 2,06 °C	-67,84 a -24,40 °C	-71,76 a 5,08 °C	-70,72 a 5,49 °C
Entalpía de fusión	349,12 J/g	190,38 J/g	442,36 J/g	417,45 J/g

*PFB: *peak de punto de fusión bajo*; PFM: *peak de punto de fusión medio*; ASCRD: *Aceite de salmón comercial refinado desodorizado*; AGPICLn-3: *concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3*; AEs: *Acilglicérido estructurado con EPA+DHA*, AFEs: *acilglicérido fenólico estructurado*.

Se esperaba obtener un compuesto con estas características después de efectuar la estructuración fenólica y la posterior purificación para eliminar los ácidos grasos libres, ya que éstos hubiesen disminuido el rango de fusión como ocurrió en el concentrado AGPICLn-3 obtenido en el Objetivo 1. En los resultados de calorimetría se observan 3 *peaks* de fusión (**Figura 37**), siendo similares los *peaks* 1 y 2 al ASCRD. Sin embargo, a diferencia del resto de los termogramas descritos anteriormente, muestra un *PFM* menos y un comportamiento calorimétrico no característico para esta temperatura. Estos cambios podrían explicarse por las diferencias entre los procesos de estructuración,

donde la acidólisis fenólica entre AEs y ácido gálico, catalizada por la lipasa específica de *T. lanuginosus* en CO₂SC, intercambió los ácidos grasos de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del AEs original e incorporó el ácido gálico en el nuevo AFEs.

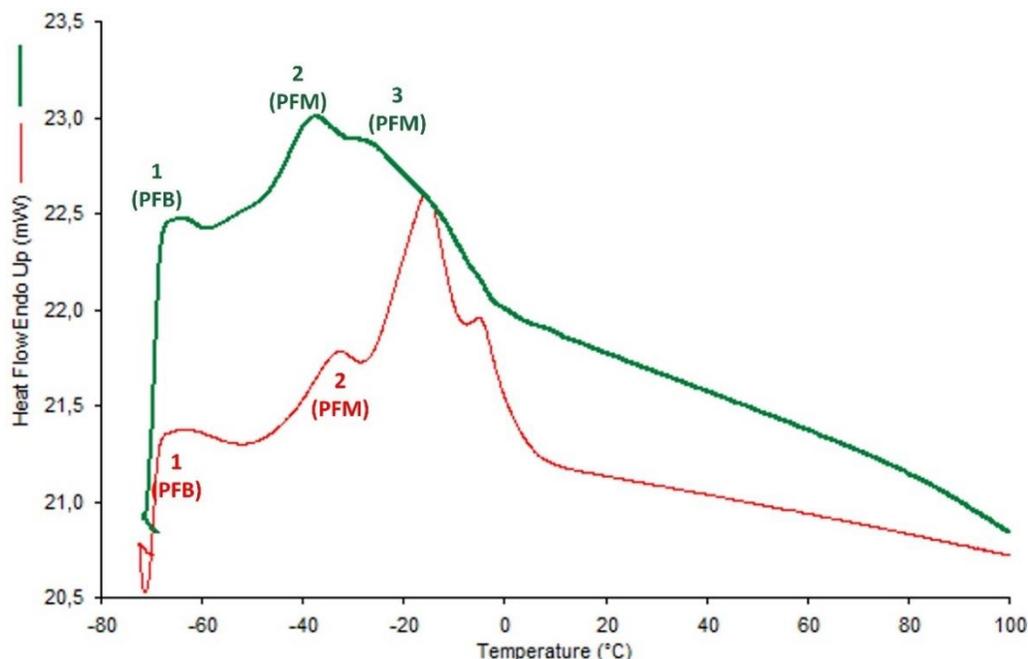


Figura 37. Comparación de los termogramas de fusión del ASCRD (roja) y AFEs (verde).

Para finalizar el Objetivo 3, se resumen en la **Tabla 29** los resultados que evidencian la obtención efectiva de AFEs a partir de AEs con EPA/DHA en *sn*-2 y ácido gálico, mediante acidólisis enzimática (*TLL*) en medio CO₂SC.

Tabla 29. Resumen de los análisis y resultados que permitieron comprobar la estructuración de acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA y ácido gálico (AFEs)

Ensayos realizados	AFEs
Cromatografía en capa fina (TLC)	Elución/migración característica de mono y diglicéridos fenólicos (3.3.3.)
Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector UV (HPLC-UV)	Absorbancia en ambas longitudes de onda (215 nm y 280 nm) y determinación del porcentaje de acidólisis fenólica = 33,3% de síntesis (3.3.4)
Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS)	Identificación de una de las estructuras presentes en AFEs (Figura 35) con ácido gálico y DHA en el mismo esqueleto de glicerol (3.3.5)
Determinación de polifenoles totales (Folin-Ciocalteau)	12 ± 0.10 mg de ácido gálico por ml de AFEs versus valor 0 obtenido en el ASCRD (3.3.6.)
Determinación de la capacidad antioxidante (ORAC)	219 µmoles Eq de Trolox por gramo de AFEs, versus ASCRD sin capacidad antioxidante (3.3.7)

3.4. Objetivo 4. Evaluación del efecto del tratamiento con los acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA (AFEs) en la reversión de alteraciones de parámetros bioquímicos asociados a resistencia a la insulina inducida por obesidad en modelo murino.

Después de tres meses de alimentación con dieta alta en grasas (DAG), los ratones fueron tratados con los suplementos durante cuatro semanas. El AFEs óptimo validado experimentalmente, así como los restantes suplementos (acilglicérido estructurado obtenido en el Objetivo 2 (AEs), aceite de salmón comercial refinado desodorizado (ASCRD), ácido gálico (AG) y aceite de maravilla (AM) como control fueron suministrados a los animales en estudio para dar cumplimiento a este objetivo según lo descrito en 2.8.

3.4.1. Efecto del tratamiento con AFEs en la homeostasis de la glucosa:

Con el propósito de evaluar el manejo de la glicemia de los distintos grupos de animales, se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa una semana previa a la eutanasia. Se registraron las glicemias por un periodo de 2 horas luego de la inyección de glucosa (1g de glucosa por kg de peso). Los resultados mostraron que el grupo AM presentó una glicemia en ayuno anormal de 275,5 mg/dl, los valores de glicemia alcanzaron un valor máximo de 558,6 mg/dl a los 30 min posteriores a la inyección. A las 2 horas posteriores a la inyección las glicemias no disminuyeron a estado basal, manteniéndose un valor de 367,2 mg/dl. Si se comparan estos valores con las curvas de tolerancia realizadas en grupos controles [Nocetti *et al.*, 2020] se puede concluir que el grupo AM presentó una curva alterada demostrando el establecimiento de la intolerancia a la glucosa luego del tratamiento de 3 meses con DAG. Estos resultados concuerdan por los reportados por Pino-de la Fuente (2020); Espinosa *et al.*, (2020), donde se observó que a partir de 8 semanas de alimentación con DAG se comenzó a constatar la intolerancia a la glucosa.

Los resultados muestran que los únicos grupos que mejoraron su sensibilidad a la glucosa de manera significativa (con respecto a los ratones obesos) fueron los que recibieron ASCRD+AG o el grupo suplementado con AFEs (**Figura 38 a y b**). Este

resultado es similar a lo reportado por da Cunha de Sá (2020) y Bak (2013) quienes observaron mejoras significativas de la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con aceites de pescado y ácido gálico respectivamente.

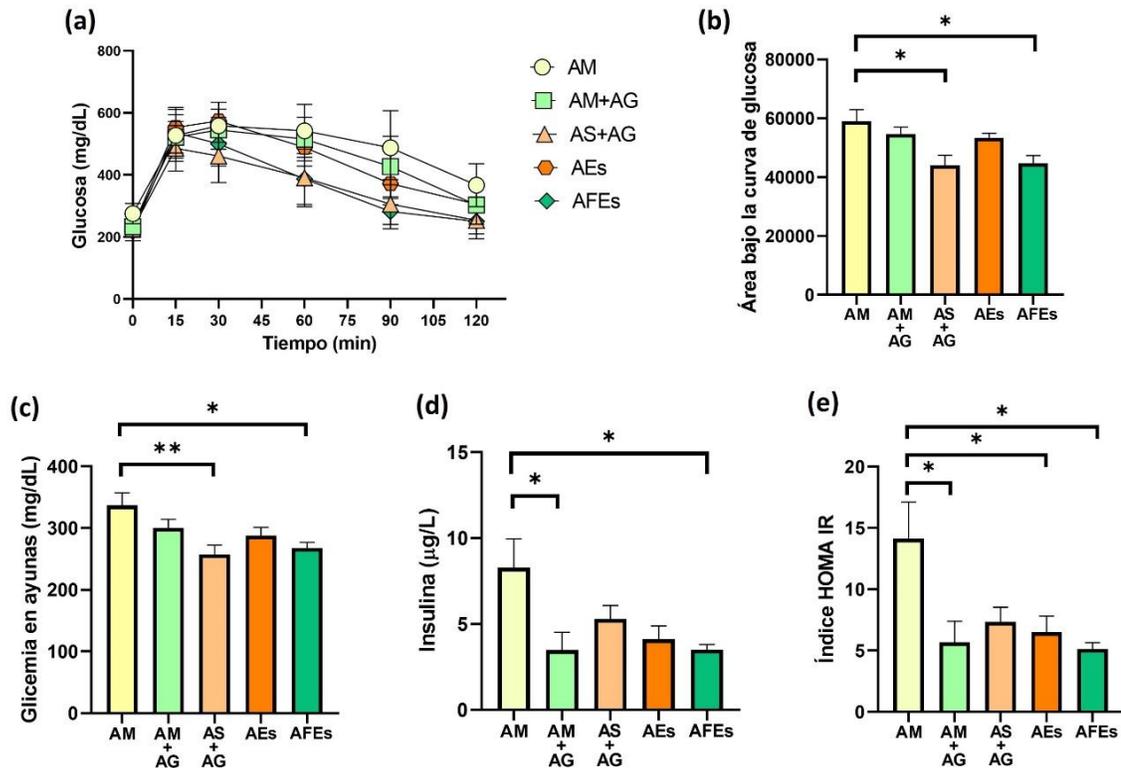


Figura 38. Efectos del tratamiento con AFEs en el control de la glicemia y de la insulina en ratones obesos. (a) prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal PTGi; (b) área bajo la curva de glucosa de PTGi; (c) glicemia posterior a ayuno; (d) concentración sérica de insulina en ayunas y (e) evaluación del modelo homeostático para la resistencia a la insulina (HOMA-IR). Grupo AM, aceite de maravilla; grupo AM+AG, aceite de maravilla + ácido gálico; grupo AS+AG, ASCRD + ácido gálico; grupo AEs, acilglicéridos estructurados y grupo AFEs, acilglicéridos fenólicos estructurados. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (S.E.M.). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

El día de la eutanasia de los animales, se realizó un ayuno previo de 6 horas con el propósito de depletar las reservas de glicógeno del hígado y obtener valores séricos de los marcadores en una condición metabólicamente basal. El promedio de las glicemias basales en el grupo AM resultó elevado, con un valor de 336,7mg/dl. Los resultados

muestran que los tratamientos que permitieron mejorar los valores de glicemia en ayuno de manera significativa fueron los del grupo que recibió el AS+AG y el grupo que recibió el AFEs (**Figura 38c**), de forma similar a lo ocurrido con respecto a la tolerancia a la glucosa.

Para confirmar la condición de resistencia a la insulina de los animales se determinó tanto la concentración de esta hormona en el suero como el cálculo del HOMA-IR posterior a 6 horas de ayuno. Si bien el cálculo del HOMA-IR es un modelo matemático que ha sido validado en humanos, otros autores [Anderson *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2016] lo han utilizado en modelos animales ya que al utilizar tanto el valor de glicemia como el de insulina en condiciones de ayuno aumenta la sensibilidad de las pruebas por separado al incorporar ambos valores en una relación matemática. Los resultados mostraron que el promedio de los valores de la concentración de insulina en el grupo AM fue de 8,3µg/L, siendo un valor elevado respecto a los reportados para otros grupos de ratones no obesos [Wang & Liao, 2012] al igual que los valores basales de glucosa ya mencionados [Savontaus *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008]. Estos datos en conjunto con el aumento del índice de evaluación de la homeostasis de la glucosa (HOMA-IR) confirmaron el desarrollo de resistencia a la insulina en el grupo AM posterior a los 3 meses de alimentación con DAG, similar a lo reportado por otros investigadores [Pino-de la Fuente, 2020] Los tratamientos que mostraron una disminución significativa de la concentración sérica de insulina fueron las suplementaciones con AM+AG y AFEs como se observa en la **Figura 38d**. Dicho comportamiento coincide con lo observado en el índice HOMA-IR, donde además se observó una disminución significativa para el tratamiento con AEs (**Figura 38e**). Se puede concluir que los resultados de la **Figura 38** sugieren que todos los suplementos utilizados mejoraron los marcadores de la homeostasis de la glucosa en condiciones basales, con solo un mes de tratamiento. Los niveles de glicemia disminuyeron en más del 10% y los de insulina en más de un 35% para todos los tratamientos suministrados, lo cual coincide con lo reportado por Rossmeisl *et al.*, (2012) y Janovska *et al.*, (2013) en relación a la suplementación con aceites de pescado y antioxidantes para mejorar los niveles de glicemia e insulina. Es

importante destacar que la disminución provocada por AFEs en los diferentes marcadores resultó ser siempre significativa, tal como se esperaba de acuerdo a lo planteado en los objetivos de este proyecto de tesis. Se sugiere entonces que cuatro semanas de tratamiento con estructuras ricas en lípidos AGPICLn-3 más ácido gálico pueden mejorar potencialmente los marcadores de homeostasis de glucosa en ratones obesos con resistencia a la insulina.

3.4.2. Efecto del tratamiento con AFEs en marcadores de daño hepático

Para evaluar una posible lesión hepática que pudieran provocar los suplementos en los animales, se analizaron marcadores séricos clásicos utilizados en clínica; como la transaminasa glutámica oxalacética (GOT), glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y de los conductos biliares (ALP) y así demostrar que no empeoró el daño hepático asociado a la alimentación con dieta alta en grasas (**Figura 39**).

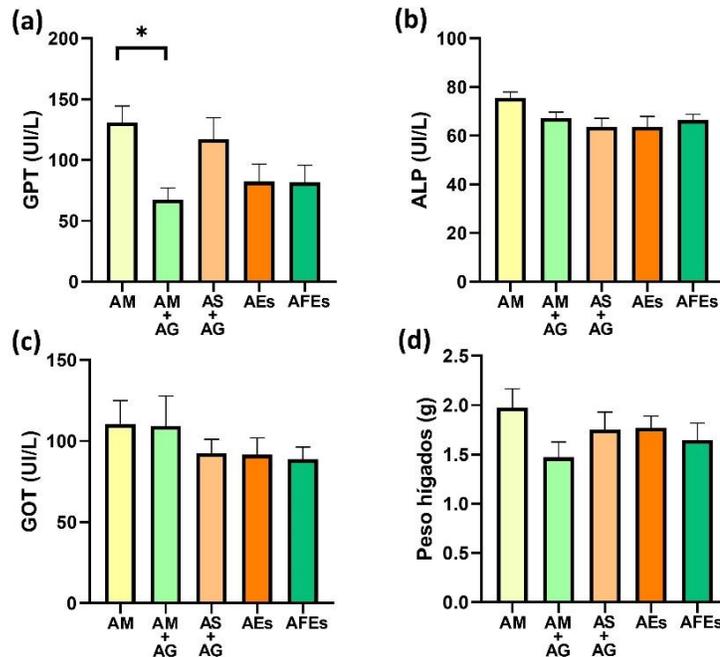


Figura 39. Efectos del tratamiento con AFEs sobre marcadores hepáticos en ratones obesos. (a) glutamato-piruvato transaminasa; (b) fosfatasa alcalina; (c) glutamato-piruvato transaminasa; (d) peso del hígado. Grupo AM, aceite de maravilla; grupo AM+AG, aceite de maravilla + ácido gálico; grupo AS+AG, ASCRD + ácido gálico; grupo AEs, acilglicéridos estructurados y grupo AFEs, acilglicéridos fenólicos estructurados. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (S.E.M.). Diferencias estadísticas determinadas mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de Tukey: $*p < 0,05$.

Es importante destacar que el grupo obeso (AM) alcanzó valores de GPT y GOT de 130 UI/L y 110,5 UI/L respectivamente, los cuales están significativamente elevados si se comparan con animales controles de otros estudios en condiciones similares [Nocetti *et al.*, 2020]. Estos niveles de transaminasas demuestran que existe un grado de daño hepático, propio de la condición de esteatosis, que es la manifestación hepática de la resistencia a la insulina. Puede observarse que ni la actividad de transaminasas glutámico oxalacética, fosfatasas alcalina ni transaminasas glutamato-piruvato aumentaron después de los tratamientos (**Figura 39a, b y c**), por lo tanto ninguno de los tratamientos suministrados empeoró el daño basal. Todos los gráficos muestran una disminución con los tratamientos en el tiempo de estudio pero particularmente solo el tratamiento con ácido gálico (AM+AG) disminuyó de manera significativa los niveles de GPT, que es la transaminasa más específica para daño de hepatocitos.

También se verificó el peso del hígado y no se detectaron cambios significativos entre los grupos, aunque el grupo AM+AG mostró una reducción del 25,4 % del peso del hígado (**Figura 39d**).

El tratamiento con ácido gálico indujo una disminución significativa de la GPT sérica reflejando una mejora de la lesión hepática. Respaldando este último resultado, se observó también que esta suplementación con AG revirtió el daño histológico, mostrando un menor grado de esteatosis macrovesicular y microvesicular (**Figura 40 Grupo B**). De igual forma, el grupo tratado con AFEs evidenció una importante regeneración tisular alrededor de la zona portal (**Figura 40 Grupo E**, flecha negra). El análisis histológico muestra una infiltración lipídica evidente caracterizada por macro y microesteatosis, con gotitas lipídicas grandes y aisladas o gotitas lipídicas intracelulares, respectivamente, y sumado hipertrofia de los hepatocitos y algunos focos de inflamación. Ambos fenómenos estaban presentes en el grupo AM (**Figura 40 grupo A**) coincidiendo también con lo reportado [Rahmadi *et al.*, 2021] en comparación con una imagen de referencia de ratones sanos (**Figura 40 HRS**).

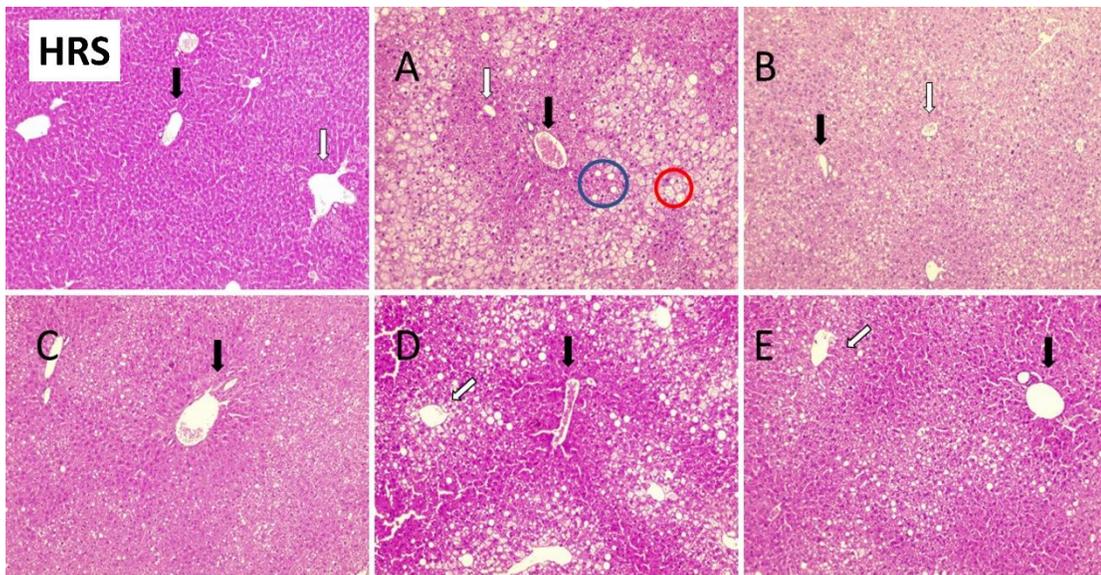


Figura 40. Histología hepática de los ratones tratados con una dieta alta en grasas (DAG) complementada con los diferentes tratamientos. Las flechas negras indican el área porta; flecha blanca muestra una vena porta; un círculo azul rodea un área de esteatosis macrovesicular; un círculo rojo incluye esteatosis microvesicular con gotas de grasa dentro de los hepatocitos. Hígado de ratón sano (HRS); las siguientes imágenes son representativas de cada grupo suplementado: Grupo A, aceite de maravilla (AM); grupo B, aceite de maravilla + ácido gálico (AM+AG); grupo C, ASCRD + ácido gálico (AS+AG); grupo D, acilglicéridos estructurados (AEs) y grupo F, acilglicéridos fenólicos estructurados (AFEs) (n=4).

El estudio morfológico muestra que los hígados de los grupos AM+AG (**Figura 40 Grupo B**), AS+AG (**Figura 40 Grupo C**) y AFEs (**Figura 40 Grupo E**) disminuyeron la superficie hepática con zonas de infiltración grasa, probablemente debido a la acción antioxidante del ácido gálico, tanto en la mezcla como en la propia estructura en el caso de AFEs o a la acción sinérgica entre el fenol y los aceites de origen marino. El grupo AEs fue el que menos mejoró en cuanto a la reversión de la esteatosis; sin embargo, se evidencian nódulos de regeneración, la mayoría de ellos rodeando el espacio porta (**Figura 40 Grupo D** flecha negra).

3.4.3. Perfil lipídico

La obesidad se caracteriza por la presencia de dislipemia con alta concentración de partículas ricas en triglicéridos (lipoproteínas de muy baja densidad) en suero y alta presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y baja concentración de lipoproteínas

de alta densidad (HDL); los dos últimos forman parte de los niveles de colesterol total en suero. El colesterol total fue de 176 ± 8 mg/dl en ratones obesos, y ninguna suplementación redujo estos niveles séricos (**Figura 41a**).

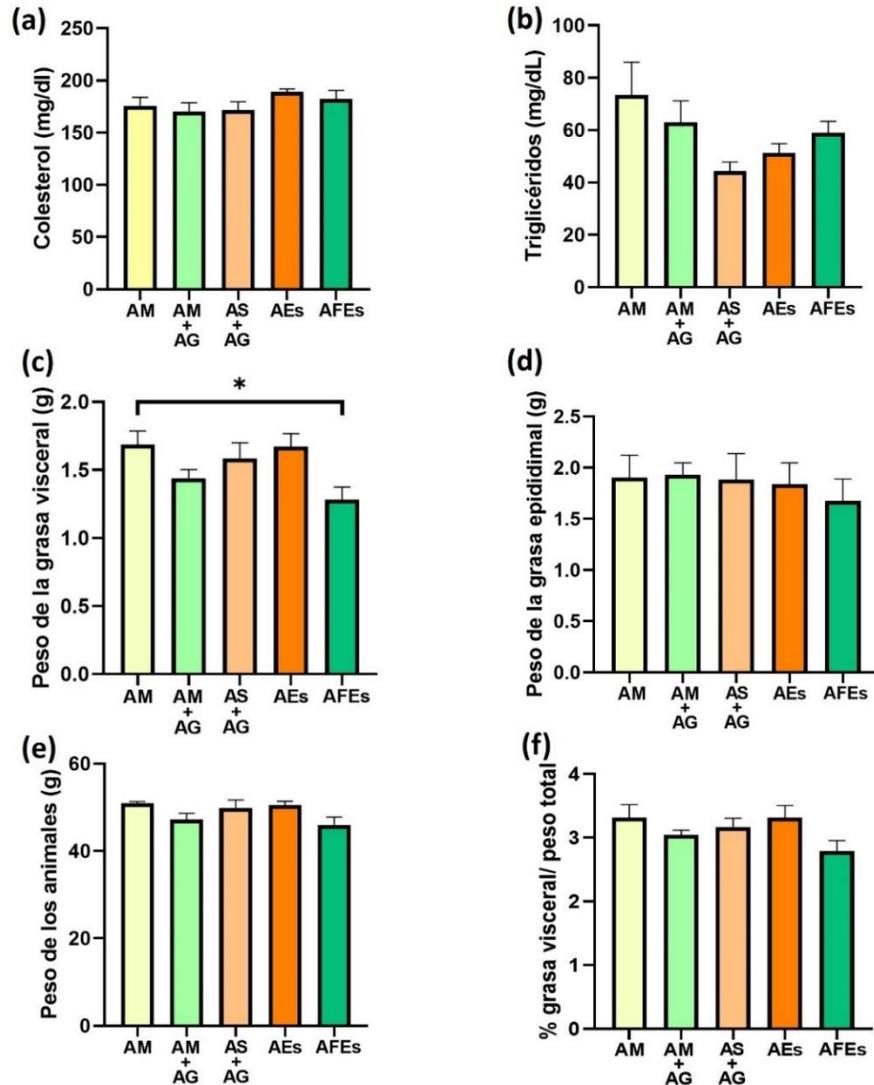


Figura 41. Perfil lipídico del suero, peso del tejido adiposo y peso de los ratones obesos en estudio: (a) colesterol; (b) triacilglicéridos; (c) peso total de la grasa visceral; (d) peso total de las grasas epididimal; (e) peso de los animales y (f) relación entre la grasa visceral y el peso total de los animales. Grupo AM, aceite de maravilla; grupo AM+AG, aceite de maravilla + ácido gálico; grupo AS+AG, ASCRD + ácido gálico; grupo AEs, acilglicéridos estructurados y grupo AFEs, acilglicéridos fenólicos estructurados. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (S.E.M.). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba post-hoc de Tukey: * $p < 0,05$

La concentración sérica de triglicéridos totales fue de 73 ± 12 mg/dl en el grupo AM; y a pesar de que se observa una tendencia a la disminución, ninguna suplementación pudo reducir estos niveles de forma significativa (**Figura 41b**). En el grupo suplementado con AS+AG la tendencia a disminuir fue mayor, lo cual podría explicarse por los efectos que ejercen los ácidos grasos EPA y DHA al disminuir la disfunción del tejido adiposo y la menor acumulación de lípidos hepáticos [da Cunha de Sá *et al.*, 2020; Shang *et al.*, 2017].

Se determinaron los pesos del tejido adiposo para demostrar el estado de obesidad inducido por la alimentación DAG. La grasa visceral fue de 1,69g en ratones alimentados con DAG y aceite de maravilla, lo que corresponde al 48% del peso total del animal (**Figura 41c, e, f**). El aumento de la masa de la grasa visceral se ha asociado con la resistencia a la insulina en obesidad ya que es uno de los mecanismos fisiopatológicos que dan cuenta de su desarrollo [Tchernof & Després, 2013; Shimobayashi *et al.*, 2018]. El tratamiento con AFEs (**Figura 41e**) redujo la grasa visceral en un 24%, y fue el único grupo que mostró una reducción significativa en al compararlo con el grupo A (**Figura 41c**), lo cual concuerda con la disminución de los niveles de insulina en ayuno que se observó en el mismo grupo (**Figura 38d**). No se observaron cambios significativos en la grasa del epidídimo con ningún tratamiento (**Figura 41d**). Ni el peso total del animal ni el peso total de grasa pudieron ser revertidos completamente ($p > 0,05$) con ninguna suplementación. Se obtuvo una ligera disminución en el porcentaje total de grasa con respecto al peso del animal dentro de las cuatro semanas de la administración de AFEs (**Figura 41f**).

En los tiempos actuales en los que la obesidad se ha convertido en una epidemia, es crucial buscar estrategias que complementen los cambios en el estilo de vida, ayudando así a revertir algunas de las consecuencias asociadas a los cambios metabólicos generados por la obesidad. El modelo utilizado en esta tesis, consistente en ratones alimentados con DAG para promover la aparición de resistencia a la insulina, dislipidemia y esteatosis de bajo grado, logró representar las condiciones desarrolladas por la obesidad [Nocetti *et al.*, 2020; Ortiz *et al.*, 2020]. Los resultados mostraron que la

administración de AFEs durante cuatro semanas disminuyó significativamente ($*p < 0,05$) el área bajo la curva de glucosa, la glicemia e insulina en ayunas y el índice HOMA, con respecto al grupo alimentado con DAG (**Figura 38**). Estos resultados son alentadores, considerando que la resistencia a la insulina es el sello distintivo de la alteración metabólica generada por la alimentación con DAG. Además, se observó que la suplementación con este acilglicérido fenólico fue el único tratamiento que redujo significativamente la grasa visceral en el modelo murino. En la **Tabla 30** se muestran a modo de resumen los efectos de la suplementación observados en este estudio.

Tabla 30. Resumen de los efectos significativos ($*p < 0,05$) de la suplementación con AFEs en este estudio.

PARÁMETROS BIOLÓGICOS	GRUPOS EN ESTUDIO				
	DAG + AM	AM + AG	AS + AG	AEs	AFEs
Área bajo la curva de glucosa (AUC)	1	↓	↓ *	↓	↓ *
Glicemia en ayunas	336,7 mg/dL	↓	↓ **	↓	↓ *
Insulina en ayunas	8,3 µg/L	↓ *	↓	↓ *	↓ *
Índice HOMA-IR	14,1	↓ *	↓	↓	↓ *
GPT	130,8 UI/L	↓ *	↓	↓	↓
Grasa visceral	1,7 g	↓	↓	↓	↓ *

*DAG: Dieta alta en grasas, Grupo AM, aceite de maravilla; grupo AM+AG, aceite de maravilla + ácido gálico; grupo AS+AG, ASCRD + ácido gálico; grupo AEs, acilglicéridos estructurados y grupo AFEs, acilglicéridos fenólicos estructurados.

La administración de los productos lipídicos restantes (AM+AG, AS+AG y AEs) condujo también a una disminución en los valores de varios parámetros biológicos, en concordancia con otros investigadores [Ortiz *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2020; Espinosa *et al.*, 2020; Illesca *et al.*, 2020; Echeverría *et al.*, 2019]. Sin embargo, la suplementación con AFEs fue la única que logró disminuir significativamente ($*p < 0,05$) el mayor conjunto de parámetros bioquímicos (redujo los valores de 5 parámetros en total, **Tabla 30**) con lo que se hace posible dar cumplimiento a la segunda parte de la hipótesis planteada en esta investigación.

CONCLUSIONES

La importancia de este trabajo radica en demostrar que es posible estructurar moléculas lipídicas ricas en DHA/EPA e incluir una molécula de ácido gálico en su estructura de acilglicerol. Los resultados químicos exitosos obtenidos confirman la obtención de un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (AGPICLn-3) con el máximo contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) posible, mediante la optimización del proceso de complejación con urea. Se sintetizaron además los acilglicéridos estructurados con EPA/DHA en posición *sn*-2 del glicerol (AEs) mediante la optimización del proceso de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) en medio CO₂ supercrítico. Se confirma la primera parte de la hipótesis planteada de que es posible, mediante la acidólisis enzimática en CO₂ supercrítico, obtener acilglicéridos fenólicos con EPA/DHA (AFEs) y ácido gálico y comprobar que el proceso mediante lipasa de *Thermomyces lanuginosus* es eficiente debido a su alta capacidad transferencia de masa, posibilitando la unión del ácido gálico en el glicerol. En este primer acercamiento al modelo biológico se evaluaron los efectos en las alteraciones generadas por la obesidad en el modelo murino, concretamente a nivel de desarrollo de resistencia a la insulina y esteatosis hepática. Cuatro semanas de suplementación con el AFEs con EPA/DHA y ácido gálico influyeron en la reversión de alteraciones de los parámetros bioquímicos asociados resistencia a la insulina; mostrando una disminución de los marcadores de homeostasis de glucosa en ratones obesos y dando cumplimiento a la segunda parte de la hipótesis planteada. La suplementación con AFEs disminuyó significativamente el peso de la grasa visceral sin afectar el perfil lipídico o aumentar el daño hepático. Los resultados biológicos son alentadores, aunque discretos, y permiten considerar estos nuevos lípidos fenólicos estructurados como una alternativa coadyuvante en la reversión de algunas enfermedades metabólicas. Con la estrategia planteada se obtuvo, en un mismo compuesto, un potente antioxidante que protege al nuevo lípido de la oxidación y al mismo tiempo aporta su funcionalidad nutricional para mejorar la salud.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Abbott KA, Burrows TL, Thota RN, Acharya S, Garg ML. Do ω -3 PUFAs affect insulin resistance in a sex-specific manner? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2016 Nov;104(5):1470-1484. doi: 10.3945/ajcn.116.138172. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27680989.

Ackman RG, Ratnayake WMN, Olsson B. The “basic” fatty acid composition of atlantic fish oils: Potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation. *Journal of the American Oil Chemists’ Society.* 1988; 65:136-138.

Alabdulkarim B, Nabi Bakeet ZA, Arzoo SH. Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. *Journal of King Saud University Science* 2012; 24:319-329.

Alencar J, Gosset G, Robin M, Pique V, Culcasi M, Clément JL, Mercier A, Pietri S. Improving the stability and antioxidant properties of sesame oil: water-soluble spray-dried emulsions from new transesterified phenolic derivatives. *J Agric Food Chem.* 2009 Aug 26;57(16):7311-23. doi: 10.1021/jf9010627. PMID: 19653627.

Alu’datt MH, Rababah T, Alhamad MN, Al-Mahasneh MA, Almajwal A, Gammoh S, Ereifej K, Johargy K and Alli I. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chemistry.* 2017; 218, 99–106.

Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.* 2009 Mar;119(3):573-81. doi: 10.1172/JCI37048. Epub 2009 Feb 2. PMID: 19188683; PMCID: PMC2648700.

Anderson J, Thayne K, Harris M, Raza Shaikh S, Darden T, Lark D, Williams L, Chitwood W, Kypson A, Rodriguez E. Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via ppar γ activation? *Antioxidants and redox signalling*. 2014.

Andrikopoulos NK, Brueschweiler H, Felber H, Taeschler Ch. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *J Am Oil Chem Soc*. 1991;68(6):359-64.

Ankenman L, Flick G, Roy M. *The sea food industry: Species, products, processing and safety*. 2012. 2nd Ed. Blackwell Publishing Ltd, 489.

Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Arch Endocrinol Metab*. 2016 Apr;60(2):138-42. doi: 10.1590/2359-3997000000169. PMID: 27191048.

AOCS *Official Method* Ca 2b-38. Moisture and Volatile Matter in Butter, Fats, Margarines, and Oils, Hot Plate Method. En: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS *Official Method* Ca 3a-46. Insoluble Impurities in Fats and Oils. En: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS *Official Method* Ca 5a-40. Free Fatty Acids in Crude and Refined Fats and Oils. En: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS *Official Method* Cd 18-90 p-Anisidine Value. En: AOCS *Official Method* Cd 18-90 *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS *Official Method* Cd 8b-90 Peroxide Value, Acetic Acid, Isooctane Method. En: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS *Official Method* Ce 1j-7. Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids by capillary gas liquid chromatography (GLC). Sampling and analysis of commercial fats and oils. En: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS *Official Method* Cg 3-91 TOTOX index. En: AOCS *Official Method* Cd 18-90 *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS *Official Method* Ti 1a-64 Spectrophotometric Determination of Conjugated Dienoic Acid in Dehydrated Castor Oils and Acids. En: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*. 7th ed. Champaign, IL, USA: AOCS; 2017.

AOCS. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society*, 4th edition by AOCS, Champaign, IL (USA).1993

AOCS. Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids by capillary gas liquid chromatography (GLC). Sampling and analysis of commercial fats and oils. 2009; *Official Method* Ce 1j-7.

Awarenet. Handbook for the prevention and minimization of waste and valorization of byproducts in European agro-food industries. Agro-food waste minimization and reduction network (AWARENET). Grow Programme, European Commission. 2004;1-7.

Babbit KJ. Intrinsic quality and species of north Pacific fish in making profits out of seafood wastes. Keller S, editor. Proceedings of the International Conference on Fish ByProducts, April 25–27; Anchorage, Alaska. Fairbanks, Alaska: Univ. of Alaska Sea Grant.1990;39–43.

Badui S. Lípidos En: Badui. Química de los Alimentos. 4a ed. Mexico: Pearson Addison Wesley. 2006;p.245-297.

Bajaj M and Defronzo RA. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. *J Nucl Cardiol.* 2003; 10(3): 311-323.

Bak EJ, Kim J, Jang S, Woo GH, Yoon HG, Yoo YJ, Cha JH. Gallic acid improves glucose tolerance and triglyceride concentration in diet-induced obesity mice. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013 Dec;73(8):607-14. doi: 10.3109/00365513.2013.831470. PMID: 24219649.

Baladia E, Basulto J, Manera M, Martínez R and Calbet D. Effect of green tea or green tea extract consumption on body weight and body composition; systematic review and meta-analysis. *Nutr Hosp.* 2014; 29(3): 479-490.

Barrios IC, Bravo JI. Biodisponibilidad y bioaccesibilidad de polifenoles y flavonoides. Memoria para optar al Grado de Licenciada en Tecnología Médica. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Tecnología Médica. Universidad de Talca, 2021.

Bazán NG. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends in Neurosciences.* 2006; 29(5):.263-271.

Bazán NG. Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids.* 2009; 81(2-3): 205-211.

Bell JG, McEvoy J, Tocher DR. Replacement of Fish Oil with Rapeseed Oil in Diets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Tissue Lipid Compositions and Hepatocyte Fatty Acid Metabolism. *Journal of Nutrition.* 2001; 131 (5):1535-1543.

Benziger CP, Roth GA and Moran AE. The Global Burden of Disease Study and the Preventable Burden of NCD. *Glob Heart.* 2016; 11(4): 393-397.

Berríos MM,(b) Rodriguez A, Rivera M, Pando ME, Valenzuela MA, Aubourg SP. Optimisation of rancidity stability in long-chain PUFA concentrates obtained from a

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by-product. *Int J Food Sci Technol.* junio de 2017;52(6):1463-72. DOI:10.1111/ijfs.13406.

Berríos MM. Enriquecimiento de contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (epa y dha) y ácido caprílico en triacilglicéridos estructurados de aceite de maravilla (*helianthus annuus*) mediante acidólisis enzimática en CO₂ supercrítico. Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de: Doctor en Nutrición y Alimentos. Programa Conjunto. Universidad de Chile, 2018.

Blasi F and Cossignani L. An overview of natural extracts with antioxidant activity for the improvement of the oxidative stability and shelf life of edible oils. *Processes.* 2020; 8, 95. <https://doi.org/10.3390/pr8080956>

Bluher M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clinical Science* (2016) 130, 1603–1614 doi: 10.1042/CS20160005

Borrelli GM, Trono D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences.* 2015; 16(9): 20774-20840.

Brenna JT and Carlson SE. Docosahexaenoic acid and human brain development: evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *Journal of Human Evolution.* 2014; 77: 99-106.

Budisa N and Schulze-Makuch D. Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment. *Life.* 2014; 4(3): 331.

Burlingame B, Nishida CH, Uauy R, and Weisell R. Fats and fatty acids in human nutrition: Introduction. *Annals Nutrition and Metabolism.* 2009; 55:5-7.

Buschmann A, Cabello F, Young K, Carvajal J, Varela D, Henríquez L. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean & Coastal Management* 2009; 52:243–249.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2014.

Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 75(3): 645-662.

Carrín ME, Crapiste GH. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture. *Journal of Food Engineering*. 2008;84:243-249.

Cerdán LE, Medina AR, Giménez AG, González MJI, Grima EM. Synthesis of Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Triglycerides by Lipase-Catalyzed Esterification. *J Amer Oil Chem Soc* 1998, 75, 1329–1337, doi:10.1007/s11746-998-0180-y.

Cereceres-Aragón A, Rodrigo-García J, Álvarez-Parrilla E, Rodríguez-Tadeo A. Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutrición Hospitalaria*. 2019; 36(2):470-8.

Cereceres-Aragón A, Rodrigo-García J, Álvarez-Parrilla E, Rodríguez-Tadeo A. Ingestión de compuestos fenólicos en población adulta mayor. *Nutr Hosp* 2019; 36(2):470-478 DOI: <http://dx.doi.org/10.20960/nh.2171>

Chai W, Morimoto Y, Cooney RV, Franke AA, Shvetsov YB, Le Marchand L, Haiman CA, Kolonel LN, Goodman MT and Maskarinec G. Dietary Red and Processed Meat Intake and Markers of Adiposity and Inflammation: The Multiethnic Cohort Study. *J Am Coll Nutr*. 2017; 36(5): 378-385.

Chandler IC. Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2001; 78: 737.

Chao J, Huo TI, Cheng HY, Tsai JC, Liao JW and Lee MS. Gallic Acid Ameliorated Impaired Glucose and Lipid Homeostasis in High Fat Diet-Induced NAFLD Mice. Luque RM, editor. *PLoS ONE*. 11 de junio de 2014;9(6):e96969.

Chaurasia S, Bhandari K, Sharma A and Dalai A. A Review on Lipase Catalysed Synthesis of DHA Rich Glyceride from Fish Oils. Issue IA. 2016; Vol III. ISSN: 2321-2705.

Chen GC, Arthur R, Qin LQ, Chen LH, Mei Z, Zheng Y, Li Y, Wang T, Rohan TE, Qi Q. Association of Oily and Nonoily Fish Consumption and Fish Oil Supplements With Incident Type 2 Diabetes: A Large Population-Based Prospective Study. *Diabetes Care*. 2021 Mar;44(3):672-680. doi: 10.2337/dc20-2328. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33431419; PMCID: PMC7896269.

Cheng KW, Shi JJ, Ou SY, Wang M and Jiang Y. Effects of fruit extracts on the formation of acrylamide in model reactions and fried potato crisps. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 2010; 58, 309-312.

Cheng KW, Wu Q, Zheng ZP, Peng X, Simon JE, Chen F and Wang M. Inhibitory effect of fruit extracts on the formation of heterocyclic amines. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 2007; 55, 10359-10365.

Ciftci D and Saldaña MDA. Enzymatic synthesis of phenolic lipids using flaxseed oil and ferulic acid carbon in supercritical dioxide media. *J. of Supercritical Fluids*. 2012; 72: 255–262.

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS and Obin MS. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res*. 2005; 46: 2347–2355.

Codex Alimentarius. Standard for Fish Oils; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas CODEX STAN 329: Italy, Rome, 2017.

Codony R, Guardiola F, Bou R, Tres A. Valoración analítica y nutricional de las grasas. XXVI Curso de Especialización, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutricional Animal. FEDNA 2010, 7, 175–206. Madrid, Spain.

Contreras E. Enriquecimiento de helado con triacilglicéridos estructurados de EPA, DHA y ácido caprílico, de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) de AGPICLn-3 y aceite refinado comercial de salmónidos. Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2017.

Crawford MA, Bazinet RP, Sinclair AJ. Fat intake and CNS functioning: Ageing and disease. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2009; 55(1-2),202-228.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. marzo de 2012;36(2):380-407.

da Cunha de Sá RDC, Cruz MM, de Farias TM, da Silva VS, de Jesus Simão J, Telles MM, Alonso-Vale MIC. Fish oil reverses metabolic syndrome, adipocyte dysfunction, and altered adipokines secretion triggered by high-fat diet-induced obesity. *Physiol Rep*. 2020 Feb;8(4):e14380. doi: 10.14814/phy2.14380. PMID: 32109344; PMCID: PMC7048378.

Dale CE, Fatemifar G, Palmer TM, White J, Prieto-Merino D, Zabaneh D. Causal Associations of Adiposity and Body Fat Distribution with Coronary Heart Disease, Stroke Subtypes, and Type 2 Diabetes Mellitus: A Mendelian Randomization Analysis. 2017; 135 (24): 2373-2388.

D'Archivio M, Filesi C, Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007; 43(4):348-61.

De Boer AA, Ismail A, Marshall K, Bannenberg G, Yan KL, Rowe WJ. Examination of marine and vegetable oil oxidation data from a multi-year, third-party database. *Food Chemistry*. julio de 2018;254:249-55.

Del Valle JM, Aguilera JM. An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO₂. *Ind. Eng. Chem. Res*. 1988; 27: 1553-1555.

Demirbas A. Recovery of asphaltenes from tar sand by supercritical fluid extraction. *Petroleum Science and Technology - PET SCI TECHNOL.* 2000; 18: 771-781. DOI 10.1080/10916460008949872.

Derringer G, Suich R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology.* octubre de 1980;12(4):214-9.

Díaz JL, Vera CJ. Bases moleculares de los derivados metabólicos de ácidos omega -3 en el proceso antiinflamatorio. *UCV - Scientia* 2012; 4(2).

Dilek Y and Havva S. Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. *Obesity and Lipotoxicity, Advances in Experimental Medicine and Biology* 960, DOI 10.1007/978-3-319-48382-5_12

Dludla PV, Nkambule BB, Jack B, Mkandla Z, Mutize T, Silvestri S, Orlando P, Tiano L, Louw J, Mazibuko-Mbeje SE. Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. *Nutrients.* 2019; 11(1):23. <https://doi.org/10.3390/nu11010023>

Dominguez L, Parzanese M. Tecnologías para la Industria Alimentaria. Fluidos supercríticos. 2009. [citado: 05 Noviembre 2014]. Disponible en: https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_01_Fluidos.pdf

Dominiczak MH, Priest M, Kulkarni UV, et al. Digestión and absorption of nutrients: The gastrointestinal tract. En: Baynes JW, Dominiczak MH. *Medical Biochemistry.* 4a ed. London: Saunders Elsevier; 2014.

Donado-Pestana CM, Dos Santos-Donado PR, Daza LD, Belchior T, Festuccia WT, Genovese MI. Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. *Food Res. Int.* 2018, 103, 40–47.

Dos Santos MT, Le Roux G and Gerbaud V. Phase Equilibrium and Optimization Tools: Application for Enhanced Structured Lipids for Foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2010; 88(2), 223–233 DOI 10.1007/s11746-010-1665-z

Dossi CG, Tapia GS, Espinosa A, Videla LA, D'Espessailles A. Reversal of high-fat diet-induced hepatic steatosis by n-3 LCPUFA: role of PPAR- α and SREBP-1c. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. septiembre de 2014;25(9):977-84.

Dovale-Rosabal G, Espinosa A, Rodríguez A, Barriga A, Palomino-Calderón A, Romero N, Troncoso RH, Aubourg SP. Effect of Structured Phenolic Lipids with EPA/DHA and Gallic Acid against Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) in Mice. *Molecules*. 2022 Nov 9;27(22):7702. doi: 10.3390/molecules27227702. PMID: 36431812; PMCID: PMC9696657.

Dovale-Rosabal G, Rodríguez A, Contreras E, Ortiz-Viedma J, Muñoz M, Trigo M, Aubourg S, Espinosa A. Concentration of EPA and DHA from Refined Salmon Oil by Optimizing the Urea-Fatty Acid Adduction Reaction Conditions Using Response Surface Methodology. *Molecules*. 2019; 24(9):1642.

Dovale-Rosabal G, Rodríguez A, Espinosa A, Barriga A, Aubourg SP. Synthesis of EPA and DHA-Enriched Structured Acylglycerols at the *sn*-2 Position Starting from Commercial Salmon Oil by Enzymatic Lipase Catalysis under Supercritical Conditions. *Molecules* 2021, 26 (11), 3094. DOI: 10.3390/molecules26113094

Dovale-Rosabal, G.; Espinosa, A.; Rodríguez, A.; Barriga, A.; Palomino-Calderón, A.; Aubourg, S.P. Enzymatic Synthesis Process of EPA- and DHA-Enriched Structured Acylglycerols at the *sn*-2 Position Starting from Commercial Salmon Oil and Concentrated by Response Surface Methodology under Supercritical Conditions. *Processes* 2023, 11, 537. <https://doi.org/10.3390/pr11020537>

Du W, Xu YY, Liu DH and Li ZB. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2005; 37(1):68-71.

Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, Aksenov AA, Melnik AV, Meusel M, Dorrestein PC, Rousu J, Böcker S. (2019) "SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information" *Nat. Methods* 16(4):299-302. doi: 10.1038/s41592-019-0344-8

Dyerberg J, Madsen P, Møller JM. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2010; 83:137–141.

Echeverría F(a), Valenzuela R, Bustamante A, Álvarez D, Ortiz M, Espinosa A, Illesca P, Gonzalez-Mañan D, Videla LA. High-Fat Diet Induces Mouse Liver Steatosis with a Concomitant Decline in Energy Metabolism: Attenuation by Eicosapentaenoic Acid (EPA) or Hydroxytyrosol (HT) Supplementation and the Additive Effects upon EPA and HT Co-Administration. Food Funct 2019, 10, 6170–6183, doi:10.1039/c9fo01373c.

Echeverria F(b), Valenzuela R, Espinosa A, Bustamante A, Álvarez D, Gonzalez-Manan D, Ortiz M, Soto-Alarcon SA, Videla L. Reduction of high-fat diet-induced liver proinflammatory state by eicosapentaenoic acid plus hydroxytyrosol supplementation: involvement of resolvins RvE1/2 and RvD1/2. J Nutr Biochemistry. 2019; 63: 35-43.

Encina C. 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 *Rhizomucormiehei*. Tesis para optar al grado de Magíster en Alimentos, mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2017.

Encuesta Nacional de Salud. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Chile, 2010.

Encuesta Nacional de Salud. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Chile, 2017.

Espinosa A, Campos C, Díaz-Vegas A, Galgani J, Juretic N, Osorio-Fuentealba C, et al. Insulin-Dependent H₂O₂ Production Is Higher in Muscle Fibers of Mice Fed with a High-Fat Diet. IJMS. 29 de julio de 2013;14(8):15740-54.

Espinosa A, Ross A, Dovale-Rosabal G, La Fuente FPD, Uribe-Oporto E, Sacristán C, Ruiz P, Valenzuela R, Romero N, Aubourg SP and Rodríguez A. EPA/DHA Concentrate by Urea Complexation Decreases Hyperinsulinemia and Increases Plin5 in

the Liver of Mice Fed a High-Fat Diet. *Molecules* 2020, 25, 3289, DOI:10.3390/molecules25143289.

Eun-Jung B, Jinmoon K, Sungil J, Gye-Hyeong W, Ho-Geun Y, Yun-Jung Y and Jeong-Heon Ch. Gallic acid improves glucose tolerance and triglyceride concentration in diet-induced obesity mice, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2013; 73:(8)607-614. DOI: 10.3109/00365513.2013.831470

FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. *Topicals Fact Sheets*. Texto de Jean- Francois Pulvenis. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 27 February 2019. [Citado 8 August 2019]. <http://www.fao.org/fishery/http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/> 35

FAO-OMS-FINUT. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: Consulta de Expertos. Estudio FAO sobre alimentación y nutrición. 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). 2012.

FDA. 2019 <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>

Fernández-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010; 62(3):197-212.

Figueroa-Espinoza MC, Laguerre M, Villeneuve P and Lecomte J. From phenolics to phenolipids: Optimizing antioxidants in lipid dispersions. *Lipid Technology*, 2013, 25: 131-134. <https://doi.org/10.1002/lite.201300277>.

Folador J, Karr-Lilienthal L, Parsons C, Bauer L, Utterback P, Schasteen C, Bechtel P, Fahey G. Fish meals, fish components and fish protein hydrolyzates as potencias ingredients in pet foods. *J. Anim. Sci.* 2005; 84:2752-2765.

Furche C & Martinez H. Identificación y análisis de las fortalezas y restricciones del crecimiento agroalimentario chileno al año 2017 [citado: 05 julio 2017].2011. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/documentos-e-informes/estudio-identificacion-y-analisis-de-las-fortalezas-y-restricciones-del-crecimiento-agroalimentario-chileno-al-ano-2017>

Galgani JE, Cortés VA, Carrasco F. Chapter: “Carbohydrate, Fat and Protein Metabolism in Obesity” in “Metabolic Syndrome: A Comprehensive Textbook” edited by Rexford Ahima, In press, 2015.

Gandhi GR, Jothi G, Antony PJ, Balakrishna K, Paulraj MG, Ignacimuthu S, Stalin A, Al-Dhabi NA. Gallic acid attenuates high-fat diet fed-streptozotocin-induced insulin resistance via partial agonism of PPAR gamma in experimental type 2 diabetic rats and enhances glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 2014, 745, 201–216.

Gao H, Geng T, Huang T, Zhao Q. Fish oil supplementation and insulin sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Diseases.* 2017; 16, 131. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0528-0>

Ge Q, Chen L, Tang M, Zhang S, Liu L, Gao L. Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 2018, 833, 50–62.

Genot C, Meynier A, Bernoud-Hubac N, et al. Bioavailability of lipids in fish and fish oils. En: Raatz S, Bibus D. *Fish and Fish Oil in Health and Disease Prevention*. 1ª Edición, London, Elsevier. 2016, pp 61-74.

Ghafoor K, Al Juhaimi F, Ozcan MM, Ahmed IAM, Babiker EE and Ulil Azmi I. Evaluation of the antioxidant activity of some plant extracts (rosemary, sage and savory, summer) on stability of moringa oil. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2020 Article e15203. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15203>

Ghasemifard S, Turchini GM, Sinclair AJ. Omega-3 long chain fatty acid bioavailability: A review of evidence and methodological considerations. *Progress in Lipid Research*. 2014;56:92-108.

Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes & Metabolism*. 2003; 29(4):6S28-35.

Gissi-Hf Investigators. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Journal*. 2008; 9645 (372):1223-1230. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61239-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61239-8)

Global Organization for EPA and DHA. Omega-3 Voluntary Monograph; 16 June 2022, GOED: 2016. <http://www.goedomega3.com/images/stories/files/goedmonograph.pdf/>.

Guil-Guerrero J, Belarbi H. Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2001; 78:477–484.

Gunnlaugsdottir H, Järemo M, Sivik B. Process parameters influencing ethanolysis of cod liver oil in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1998; 12(1):85-93.

Gunstone FD. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of Science Food Agric*. 1999; 79: 1535-1549.

Gunstone FD. *Vegetable Oils in Food Technology. Composition, Properties and Uses*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK. 2013; 367.

Haagsma N, Gent C, Luten J, Jong R, Doorn E. Preparation of an ω 3 fatty acid concentrate from cod liver oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1982; 59:117-118.

Hamam F, Shahidi F. Structured Lipids from High-Laurate Canola Oil and Long-Chain Omega-3 Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2005;82(10):731-736.

Hamm W, Hamilton R, Calliauw G. *Edible Oil Processing*. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, 2013; PO19 8SQ, UK. 340 pp.

Haq M, Park SK, Kim MJ, Cho YJ, Chun BS. Modifications of Atlantic salmon by-product oil for obtaining different ω -3 polyunsaturated fatty acids concentrates: An approach to comparative analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2018; 26(2):545-56.

Hayes DG, Bengtsson YC, Van Alstine JM. Urea complexation for the rapid ecologically responsible fraction of FA from seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1998; 75:1403–1409.

Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, and Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(5): 993-999.

Hernández C. “Obtención de mantequilla con triacilglicéridos estructurados de alto contenido de EPA+DHA provenientes de la acidólisis (Lipasa B, *Candida antarctica*) de AGPICL n-3, ácido caprílico y aceite refinado de salmón en dióxido de carbono supercrítico”. Memoria pregrado Ingeniería en Alimentos. Universidad de Chile, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2015.

Hill WJ, Hunter WG. A Review of Response Surface Methodology: A Literature Survey. *Technometrics*. noviembre de 1966;8(4):571.

Hita E, Robles A, Camacho B, Ramírez A, Esteban L, Fernández JM, Muñío MM, González PA and Molina-Grima E. Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. *Process Biochemistry*. 2007;42:415-422.

Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M and Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007; 56: 901–911.

Huang DW, Chang WC, Wu JS, Shih RW and Shen SC. Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet. *Nutr Res*. 2016; 36(2): 150- 160.

Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1 de diciembre de 2000;49(12):2063-9.

Ikushima Y. Supercritical fluids: an interesting medium for chemical and biochemical processes. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1997; 71-72: 259-280.

Illesca P, Valenzuela R, Espinosa A, Echeverria F, Soto-Alarcon S, Ortiz M, Videla L. Hydroxytyrosol supplementation ameliorates the metabolic disturbances in white adipose tissue from mice fed a high-fat diet through recovery of transcription factors Nrf2, SREBP-1c, PPAR-gamma and NF-kappa B. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019; 109: 2472-2481. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.120> 36

Illesca P, Valenzuela R, Espinosa A, Echeverría F, Soto-Alarcon S, Campos C, Rodriguez A, Vargas R, Magrone T, Videla LA. Protective Effects of Eicosapentaenoic Acid Plus Hydroxytyrosol Supplementation Against White Adipose Tissue Abnormalities in Mice Fed a High-Fat Diet. *Molecules* 2020, 25, E4433, doi:10.3390/molecules25194433.

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Laboratorio de Antioxidantes. Base de Datos de Actividad Antioxidante (ORAC) y de Contenido de Polifenoles Totales (PFT) en Frutas. <http://portalantioxidantes.com/base-de-datos-de-actividad-antioxidante-orac-y-de-contenido-de-polifenoles-totales-pft-en-frutas/>. 2023

Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, et al. Efficacy and Metabolic Effects of Metformin and Troglitazone in Type II Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 26 de marzo de 1998;338(13):867-73.

IUPAC Standard Method 2.301. Preparation of Fatty Acid Methyl Ester. En: *Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. 7th Edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford; 1987.

Iwasaki Y, Jun Han J, Narita M, Rosu R, and Yamane T. Enzymatic Synthesis of Structured Lipids from Single Cell Oil of High Docosahexaenoic Acid Content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999; 76, 563-569.

Jacobsen C, Nielsen N, Frisenfeldt A, MoltkeSørensen A. *Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids*. Woodhead Publishing Limited. 2013; Oxford, U.K. 1029 pp.

JacobsenReglamento Sanitario de Alimentos (RSA) 2015. Decreto. N° 977/96 (D.OF. 13.05.97). Ministerio de Salud. Actualizado 02/02/2021.

Jang H, Park K. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr*. 2020 Mar;39(3):765-773. doi: 10.1016/j.clnu.2019.03.032. Epub 2019 Apr 5. PMID: 31010701.

Janovská P, Flachs P, Kazdová L, Kopecký J. Anti-obesity effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in mice fed high-fat diet is independent of cold-induced thermogenesis. *Physiol Res*. 2013; 62(2):153-61. doi: 10.33549/physiolres.932464. Epub 2012.

Jaskolla T, Fuchs B, Karas M, Schiller J. The new matrix 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid allows the detection of phosphatidylethanolamine chloramines by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1 de mayo de 2009;20(5):867-74.

Javidipour I, Erinç H, Baştürk A, Tekin A. Oxidative changes in hazelnut, olive, soybean, and sunflower oils during microwave heating. *International Journal of Food Properties*. 3 de julio de 2017;20(7):1582-92. <http://dx.DOI.org/10.1080/10942912.2016.1214963>

Jiménez MJ, Esteban L, Robles A, Hita E, González PA, Muñío MM. 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*. marzo de 2010;45(3):407-14.

Kang JX and Weylandt KH. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. *Sub-Cellular Biochemistry*. 2008; 49: 133-43.

Karboune S, St-Louis R and Kermasha S. Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by acidolysis of flaxseed oil with selected phenolic acids. *J Molecular Catalysis. B: Enzymatic*. 2008; 52: 96–105.

Kavyani Z, Musazadeh V, Fathi S, Hossein Faghfour A, Dehghan P, Sarmadi B. Efficacy of the omega-3 fatty acids supplementation on inflammatory biomarkers: An umbrella meta-analysis. *Int Immunopharmacol*. 2022 Oct;111:109104. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109104. Epub 2022 Jul 30. PMID: 35914448.

Khanh V, Chang M, Ann W, Dong J, Yun-Hee Ch. Gallic acid regulates body weight and glucosa homeostasis through AMPK Activation. *Endocrinology* 2015; 156: 157-168.

King JW. Critical fluid technology for the processing of lipid-related natural products. *Comptes Rendus Chimie*. 2004; (7): 647-659.

Kitade H, Chen G, Ni Y, Ota T. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance: New Insights and Potential New Treatments. *Nutrients* 2017, 9: 387. DOI: 10.3390/nu9040387.

Koeleman E. More fish meal, but growing interest in alternatives. *All About Feed & Dairy Global* 2017.

Kohashi K, Nakagomi A, Saiki Y, Morisawa T, Kosugi M, Kusama Y, Atarashi H and Shimizu W. Effects of eicosapentaenoic acid on the levels of inflammatory markers, cardiac function and long-term prognosis in chronic heart failure patients with dyslipidemia. *J. of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2014; 21(7): 712-729.

Koski A, Pekkarinen S, Hopia A, Wähälä K and Heinonen M. Processing of rapeseed oil: Effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *European Food Research and Technology*. 2003; 217, 110–114.

Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. Part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011 Sep;155(3):195-218. doi: 10.5507/bp.2011.052. PMID: 22286806.

Kubo I, Xiao P and Fujita K. Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of action. *Bioorg Med Chem Lett*. 2001; 11(3): 347-350.

Lambert JD and Yang CS. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res*. 2003; 523-524: 201-208.

Lanza B and Ninfali P. Antioxidants in extra virgin olive oil and table olives: Connections between agriculture and processing for health choices. *Antioxidants*. 2020; 9, 41. <https://doi.org/10.3390/antiox9010041>

Laszlo JA and Compton DL. Enzymatic glycerolysis and transesterification of vegetable oil for enhanced production of feruloylated glycerols. *J. Am Oil Chem Soc*. 2006; 83: 765–770.

Lau WB, Ohashi K, Wang Y, Ogawa H, Murohara T, Ma XL and Ouchi N. Role of Adipokines in Cardiovascular Disease. *Circ J*. 2017; 81(7): 920-928.

Le Sage F, Meilhac O, Gonthier MP. Anti-inflammatory and antioxidant effects of polyphenols extracted from *Antirhea borbonica* medicinal plant on adipocytes exposed to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharides. *Pharmacol Res*. 2017; 119: 303-312. 37

Lee S, Muniyappa R, Yan X, Chen H, Yue LQ, Hong EG, Kim JK, Quon MJ. Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and

hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Feb; 294(2):E261-70. doi: 10.1152/ajpendo.00676.2007. PMID: 18003716.

Lin JT, Arcinas A. Regiospecific Identification of 2-(12-Ricinoleoylricinoleoyl)-1,3-diricinoleoyl- sn -glycerol in Castor (*Ricinus communis* L.) Oil by ESI-MS 4. *J Agric Food Chem.* 1 de mayo de 2008;56(10):3616-22.

Lin TJ, Chen SW, Chang AC. Enrichment of n-3 PUFA contents on triglycerides of fish oil by lipase catalyzed trans-esterification under supercritical conditions. *Biochemical Engineering Journal.* 2006; 29:27-34.

Liu A, Zhang C, Hong P, Ji H. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. *Journal of Food Engineering.* 2006; 73:203-209

Liu S, Zhang C, Hong P, and Ji H. Lipase-catalysed acylglycerol synthesis of glycerol and n-3 PUFA from tuna oil: Optimisation of process parameters. *Food Chemistry.* 2007; 103(3): 1009-1015.

López-Vélez M, Martínez-Martínez F and Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43(3):233-244.

Luque de Castro MD, Valcárcel M and Tena MT. *Extracción con Fluidos Supercríticos en el Proceso Analítico*, Editorial Reverté. Barcelona, Spain, 1993 (46).

Lyberg A and Adlercreutz P. Lipase specificity towards eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid depends on substrate structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784. 2008:343–350.

Makihara H, Koike Y, Ohta M, Horiguchi-Babamoto E, Tsubata M, Kinoshita K, Akase T, Goshima Y, Aburada M, Shimada T. Gallic acid, the active ingredient of *Terminalia bellirica*, enhances adipocyte differentiation and adiponectin secretion. *Biol. Pharm. Bull.* 2016, 39, 1137–1143.

Mansouri F, Ben Moumen A, Richard G, Fauconnier ML, Sindic M, Serghini, Caid H and Elamrani A. Characterization of monovarietal virgin olive oils from introduced cultivars in eastern Morocco. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*. 2016; 93, 21–30.

Martínez-Fernández L, Laiglesia L, Huerta A, Martínez J, Moreno-Aliaga J. Omega-3 fatty acids and adipose tissue function in obesity and metabolic syndrome. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.07.003>

Masson L, Mella MA. *Materias Grasas de Consumo Habitual y Potencial en Chile: Composición en ácidos grasos*. 1ra ed. Santiago: Editorial Universitaria; 1985. 29 p.

Méndez C, Masson L, Jiménez P. Estabilización de aceite de pescado por medio de antioxidantes naturales. *Grasas Aceites*. 2010, 20, (3)492–500.

Mendiola J. Extracción de compuestos bioactivos de microalga mediante fluidos supercríticos. [Tesis]. Madrid, España. Universidad Autónoma de Madrid, 2008.

Minihane A, Armah C, Miles E, Madden JM, Clark AB, Caslake MJ, Packard CJ, Kofler BM, Lietz G, Curtis PJ, Mathers JC, Williams CM and Calder PC. Consumption of fish oil providing amounts of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid that can be obtained from the diet reduces blood pressure in adults with systolic hypertension: A retrospective analysis. *The Journal of Nutrition* 2016; 146: 516-523.

Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J and Gerich J. Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes*. 1990; 39(11): 1381-1390.

Moreno N & Perea A. Producción de lípidos estructurados por transesterificación enzimática del aceite de soja y aceite de palmiste en reactor de lecho empacado. *Grasas y Aceites*. 2008; 59(4): 337-345.

Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Núñez MJ and Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 2001; 72: 145-171.

Mozaffarian D, Rimm E. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA Journal*. 2007;14; 297(6):590. DOI: 10.1001/jama.296.15.1885

Mu H, Porsgaard T. The metabolism of structured triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*. 2005;44:430-448.

Muñoz M. Optimización del proceso de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (EPA + DHA) bajo condiciones de CO₂ supercrítico para la adición en pan. Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos y Memoria para optar al Título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 2019.

Myers RH and Montgomery DC. Response surface methodology. A E. Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc. 1995; USA, New York.

Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Fourth edition. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2016. 825 p. (Wiley series in probability and statistics).

Nabavi SF, Habtemariam S, Di Lorenzo A, Sureda A, Khanjani S, Nabavi SM, Daglia M. Post-stroke depression modulation and in vivo antioxidant activity of gallic acid and its synthetic derivatives in a murine model system. *Nutrients*. 2016; 8, 248.

Nagachinta S, Akoh CC. Enrichment of palm olein with long chain polyunsaturated fatty acids by enzymatic acidolysis. *Food science and technology*. 2012;46:29-35.

Nanton D, Vegusdal A, Bencze Rørå A, Ruyter B, Baeverfjord G, Torstensen B. Muscle lipid storage pattern, composition, and adipocyte distribution in different parts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fish oil and vegetable oil. *Aquaculture* 2007; 265, (1-4): 230-243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.053>

NCBI (a). National Center for Biotechnology Information: PubChem CID: 370. Available online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid (accessed on 23 april 2023).

NCBI (b). National Center for Biotechnology Information: PubChem CID: 245086. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24724290> (accessed on 23 april 2023).

NCBI (c). National Center for Biotechnology Information: PubChem CID: 13250. Available online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethyl_gallate (accessed on 23 april 2023).

NCBI (d). National Center for Biotechnology Information: PubChem CID: 7428. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7428> (accessed on 23 april 2018).

NCBI (e). National Center for Biotechnology Information: PubChem CID: 4947. Available online: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/propyl_gallate (accessed on 23 april 2023).

Nelson DL and Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 7th ed., W.H. Freeman, 2017. New York, NY. ISBN 9781319108243

Neo YP, Ariffin A, Tan CP and Tan YA. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. *Food Chemistry*.2010; 122, 353-359.

Niedermeyer THJ, Strohalm M. mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra. Koomen JM, editor. PLoS ONE. 13 de septiembre de 2012;7(9):e44913. DOI:10.1371/journal.pone.0044913.

Niemann B, Rohrbach S, Miller MR, Newvy DE, Fuster V and Kovacic JC. Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70(2): 230-251.

Nieves Franco M, Galeano-Díaz T, López O, Fernández-Bolaños JG, Sánchez J, De Miguel C, Gil MV and Martín-Vertedor D. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*. 2014; 15, 289–298.

Nocetti D, Espinosa A, Pino-De la Fuente F, Sacristán C, Bucarey JL, Ruiz P, Valenzuela R, Chouinard-Watkins R, Pepper I, Troncoso R, Puente L. Lipid droplets are both highly oxidized and Plin2-covered in hepatocytes of diet-induced obese mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2020 Dec;45(12):1368-1376. doi: 10.1139/apnm-2019-0966. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32585124.

Nunes PA, Pires P, Guillen M, Valero F, Luna D, Ferreira-Dias S. Production of MLM-type structured lipids catalyzed by immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011;88(4):473–480.

O'Keefe F, Sarnoski P. Nomenclatura and classification of lipids. En: Akoh C, *Food Lipids*, 4^o Edición, Florida, CRC Press Taylor and Francis Group 2017, 3-36.

Ofori FK, Daliri EBM, Lee BH and Yu X. Current trends and future perspectives on omega-3 fatty acids. *Research Journal of Biology*. 2017; 5(2): 11-20.

OMS. Obesidad y sobrepeso. 2018; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/.

Ortiz M, Soto-Alarcón SA, Orellana P, Espinosa A, Campos C, López-Arana S, Rincón MA, Illesca P, Valenzuela R, Videla LA. Suppression of High-Fat Diet-Induced Obesity-Associated Liver Mitochondrial Dysfunction by Docosahexaenoic Acid and Hydroxytyrosol Co-Administration. *Dig Liver Dis* 2020, 52, 895–904, doi:10.1016/j.dld.2020.04.019.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*. 2001; 49(10):4619-26. doi: 10.1021/jf010586o. PMID: 11599998.

Ousji O and Sleno L. Structural Elucidation of Novel Stable and Reactive Metabolites of Green Tea Catechins and Alkyl Gallates by LC-MS/MS. *Antioxidants (Basel)*. 2022

Aug 23;11(9):1635. doi: 10.3390/antiox11091635. PMID: 36139709; PMCID: PMC9495999.

Pandey A, Bani S, Sangwan PL. Anti-obesity potential of gallic acid from *Labisia pumila*, through augmentation of adipokines in high fat diet induced obesity in C57BL/6 mice. *Adv. Res.* 2014, 2, 556–570.

Pandey KB & Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2009; 2, 270–278.

Pando M, Rodríguez A, Galdames A, Berríos M, Rivera M, Romero N, Valenzuela MA, Ortiz J. and Aubourg S. Maximization of the docosaehaenoic and eicosapentaenoic acids content in concentrates obtained from a by-product of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing. *European Food Research and Technology.* 2017; 244(5): 937-948.

Pando ME, Bravo B, Berríos M, Galdames A, Rojas C, Romero N, Camilo C, Encina C, Rivera M, Rodríguez A, Aubourg SP. Concentrating n-3 fatty acids from crude and refined commercial salmon oil. *Czech J. Food Sci.* 2014, 32, 169–176, DOI:10.17221/532/2012-cjfs.

Pando ME, Rodríguez A, Valenzuela MA, Berríos M, Rivera M, Romero N. Acylglycerol synthesis including EPA and DHA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) belly flap oil and caprylic acid catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase under supercritical carbon dioxide. *Eur Food Res Technol.* 2021. 247, 499–511 <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03643-4>.

Patil D. Recent trends in production of polyunsaturated fatty acids (PUFA) Concentrates. *Journal of Food. Research and Technology.* 2014; 2:15-23.

Pessin JE and Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106(2): 165-169.

Pino-de la Fuente FJ, Nocetti D, Sacristán C, Ruiz P, Guerrero J, Jorquera G, Uribe E, Bucarey JL, Espinosa A, Puente L. *Physalis peruviana* L. Pulp Prevents Liver

Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscles of Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*. 2020 Mar 5;12(3):700. doi: 10.3390/nu12030700. PMID: 32151028; PMCID: PMC7146126.

Pirola L and Ferraz JC. Role of pro- and anti-inflammatory phenomena in the physiopathology of type 2 diabetes and obesity. *World J Biol Chem*. 2017; 8(2): 120-128.

Poppe JK, Garcia-Galan C, Matte CR, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC and Ayuba MAZ. Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013; 94:51-56.

Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J Agric Food Chem*. 1 de mayo de 2003;51(11):3273-9.

Puoti C, Elmo MG, Ceccarelli D and Ditrinco M. Liver steatosis: The new epidemic of the Third Millennium. Benign liver state or silent killer? *Eur J Intern Med*. 2017.

Pusceddu MM, Kelly P, Stanton C, Cryan JF and Dinan TG. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids through the Lifespan: Implication for Psychopathology. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2016; 19(12).

Rahmadi M, Nurhan AD, Pratiwi ED, Prameswari DA, Panggono SM, Nisak K and Khotib J. The Effect of Various High-Fat Diet on Liver Histology in the Development of NAFLD Models in Mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2021, 32, 547–553, doi:10.1515/jbcpp-2020-0426.

Ramírez M, Amate L, Gil A. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development*. 2001;65:S95-S101.

Rapoport SI, Chang MC and Spector AA. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *Journal of Lipid Research*. 2001; 42(5): 678-85.

Ratnayake W, Galli C, Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: A background review paper. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2009; 55:8-43.

Ratnayake W, Olsson B, Matthews D and Ackman RG. Preparation of omega-3 PUFA concentrates from Fish Oils via Urea Complexation. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 1988; 90(10):381-386.

Redondo-Cuevas L, Castellano G, Torrens F and Raikos V. Revealing the relationship between vegetable oil composition and oxidative stability: A multifactorial approach. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018; 66, 221–229.

Rincón-Cervera MA, Galleguillos-Fernández R, González-Barriga V, Valenzuela R, Valenzuela A. Concentration of gamma-linolenic and stearidonic acids as free fatty acids and ethyl esters from viper's bugloss seed oil by urea complexation. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2018; 120: 1800208.

Roby MHH. Synthesis and Characterization of Phenolic Lipids. En: Soto-Hernández M, Palma-Tenango M, Garcia-Mateos M del R, editores. *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications* [Internet]. InTech; 2017 [citado 27 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/phenolic-compounds-natural-sources-importance-and-applications/synthesis-and-characterization-of-phenolic-lipids>

Rodríguez A, Castro E, Salinas MC, López R and Miranda M. Interesterification of Tallow and Sunflower Oil. Paper no. J9410 in *JAOCS*. 2001; (78)431-436.

Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, Del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev. invest. clín.* [online]. 2005, vol.57, n.3 [citado 2023-04-23], pp.457-472. ISSN 2564-8896

Roidoung S, Dolan KD and Siddiq M. Gallic acid as a protective antioxidant against anthocyanin degradation and color loss in vitamin-C fortified cranberry juice. *Food Chem*. 2016; 210: 422-427.

Rojas C. Efectos de las variables de proceso de concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de aceite de belly de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre el comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido” Memoria para optar al título profesional de ingeniero en alimentos. Universidad de Chile. 2013.

Rossmeisl M, Jilkova ZM, Kuda O, Jelenik T, Medrikova D, Stankova B, Kristinsson B, Haraldsson GG, Svensen H, Stoknes I, Sjövall P, Magnusson Y, Balvers MG, Verhoeckx KC, Tvrzicka E, Bryhn M, Kopecky J. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS One*. 2012;7(6):e38834. doi: 10.1371/journal.pone.0038834. Epub 2012 Jun 11. PMID: 22701720; PMCID: PMC3372498.

Rubio-Rodríguez N, Beltrán S, Jaime I, de Diego SM, Sanz MT and Carballido JR. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010; 11: 1-12. 39

Ruiz M, Henricsson M, Borén J, Pilon M. Palmitic acid causes increased dihydroceramide levels when desaturase expression is directly silenced or indirectly lowered by silencing AdipoR2. *Lipids Health Dis*. 2021 Nov 28; 20(1):173. doi: 10.1186/s12944-021-01600-y. PMID: 34839823; PMCID: PMC8627610.

Rustan AC and Drevon CA. Fatty Acids: Structures and Properties. In: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley and Sons, Ltd. 2005; Chichester. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003894>

Sabally K (a), Karboune S, St-Louis R, Kermasha, S. Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids. *J. Biotechnology*. 2006, 127, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.010>.

Sabally K (b), Karboune S, St-Louis R, Kermasha S. Lipase-catalyzed transesterification of trilinolein or trilinolenin with selected phenolic acids. *J Amer Oil Chem Soc*. febrero de 2006;83(2):101-7. doi:10.1007/s11746-006-1181-3.

Sabally K, Karboune S, Yeboah FK, Kermasha S. Lipase-Catalyzed Esterification of Selected Phenolic Acids With Linolenyl Alcohols in Organic Solvent Media. *ABAB*. 2005;127(1):017-28. doi:10.1385/ABAB:127:1:017.

Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Saari N, Jahurul HA, Abbas KA, Norulaini NA. PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2009;8(2), 59-74.

Saltiel AR and Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414: 799-806.

Sathivel S. Production, Process Design and Quality Characterization of Catfish Visceral Oil. Ph.D. Dissertation, Louisiana State University, Baton Rouge. 2001; 143.

Sathivel S. Thermal and flow properties of oils from salmon heads. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2005; 82(2), 147–152.

Sato K, Kigawa T, Ueno S, Gotoh N, Wada S. Polymorphic Behavior of Structured Fats Including Stearic Acid and ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Am Oil Chem Soc*. 2009; 86:297-300.

Savontaus E, Fagerholm V, Rahkonen O, Scheinin M. Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jan 14;578(2-3):359-64. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.09.015. Epub 2007 Oct 2. PMID: 17964569.

Schiller J, SÜß R, Petkovi M, et al. Triacylglycerol analysis of vegetable oils by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and ^{31}P NMR spectroscopy. *Journal of Food Lipids*. 2002; 9(3):185-200.

Schuchardt JP, Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*. 2013;89:1–8.

Schunck W, Konkel A, Fischer R and Weylandt K. Therapeutic potential of omega-3 fatty acid-derived epoxyeicosanoids in cardiovascular and inflammatory diseases. *Pharmacology and Therapeutics*. 2018; 183:177-204.

Shahidi F & Yeo J. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19, 1573. <https://doi.org/10.3390/ijms19061573>

Shahidi F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Industrial and Nonedible Products from Oils and Fats*. Vol. 6. John Wiley & Sons, 2005.

Shang T, Liu L, Zhou J, Zhang M, Hu Q, Fang M, Wu Y, Yao P, Gong Z. Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. *Lipids Health Dis*. 2017 Mar 29;16(1):65. doi: 10.1186/s12944-017-0461-2. PMID: 28356106; PMCID: PMC5372293.

Shekarchizadeh H, Kadivar M, Ghaziaskar HS, Rezayat M. Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM). *Journal of Supercritical Fluids*.2009; 49(2):209-15.

Shimada Y. Enzymatic modification of lipids for functional foods and nutraceutical. En: Akoh C. *Handbook of functional lipids*. British Columbia, Canada. CRC Press Taylor & Francis Group; 2006:77-88.

Shimobayashi M, Albert V, Woelnerhanssen B, Frei IC, Weissenberger D, Meyer-Gerspach AC, Clement N, Moes S, Colombi M, Meier JA, Swierczynska MM, Jenö P, Beglinger C, Peterli R, Hall MN. Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2018 Apr 2;128(4):1538-1550. doi: 10.1172/JCI96139. Epub 2018 Mar 12. PMID: 29528335; PMCID: PMC5873875.

Simopoulos AP. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pacific J. of Clin. Nutr*. 2008; 17 Suppl 1: 131-4.

Singleton VL and Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* January 1965 16:144-158; published ahead of print January 01, 1965; **DOI:** 10.5344/ajev.1965.16.3.14

Sousa JN, Paraíso AF, Andrade JMO, Lelis DF, Santos EM, Lima JP, Monteiro-Junior RS, D'Angelo MFSV, de Paula AMB, Guimarães ALS, Sousa SH. Oral Gallic Acid Improve Liver Steatosis and Metabolism Modulating Hepatic Lipogenic Markers in Obese Mice. *Exp Gerontol* 2020, 134, 110881, doi:10.1016/j.exger.2020.110881.

Sroka Z and Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41(6): 753-758.

Strohalm M, Hassman M, Kosata B and Kodicek M. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid communications in Mass Spectrometry: RCM.* 2008; 22(6): 905-908. DOI:10.1002/rcm.3444.

Strohalm M, Kavan D, Novak P, Volný M and Havlíček V. mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemist.* 2010; 82(11): 4648-51. DOI:10.1021/ac100818g.

Svensson J. and Adlercreutz P. Effect of acyl migration in Lipozyme TL IM-catalyzed interesterification using a triacylglycerol model system. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2011; 113: 1258–1265.

Takahashi M, Ando J, Shimada K, Nishizaki Y, Tani S, Ogawa T, Yamamoto M, Nagao K, Hirayama A, Yoshimura M, Daida H, Nagai R and Komuro I. The ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids is associated with diabetes mellitus in patients with prior myocardial infarction: a multicenter cross-sectional study. *BMC Cardiovascular Disorders.* 2017; 17:14.

Tamargo A. Aplicaciones del simulador gastrointestinal simgi® al estudio de la co-digestión y bioaccesibilidad de componentes de los alimentos y la función digestiva humana: fibra dietética, polifenoles y microplásticos como contaminantes alimentarios. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid; 2021.

Tan CP and Che Man YB. Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: effects of scanning rate variation. *Food Chemistry*. 2002; 76: 89-102.

Taniguchi CM, Emanuelli B, and Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7: 85-96.

Taucher E. *Bioestadística*. 2a. ed. Santiago: Comité de Publicaciones Científicas, Vicerrectoría de Asuntos Académicos y Estudiantiles, Universidad de Chile : Editorial Universitaria; 1999.

Tchernof A, Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1):359-404. doi: 10.1152/physrev.00033.2011. PMID: 23303913.

Teng H, Chen L. Polyphenols and bioavailability: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59(13):2040-51.

Teuber K, Schiller J, Fuchs B, Karas M, Jaskolla TW. Significant sensitivity improvements by matrix optimization: a MALDI-TOF mass spectrometric study of lipids from hen egg yolk. *Chemistry and Physics of Lipids*. junio de 2010;163(6):552-60.

Teuber K, Schiller J, Jakop U, Lüpold S, Orledge JM, Blount JD, et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a simple tool to determine the phospholipid/glycolipid composition of sperm: Pheasant spermatozoa as one selected example. *Animal Reproduction Science*. febrero de 2011;123(3-4):270-8.

Thammapat P, Siriamornpun S, Raviyan P. Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) of Asian catfish oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2016; 38(2):163-170.

Thirone AC, Huang C, and Klip A. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signalling and glucose transport. *Trends Endocrinol. Metab.* 2006; 17: 72–78.

Tuberoso CIG, Kowalczyk A, Sarritzu E and Cabras P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*.2007; 103, 1494–1501.

Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2011 Jun;155(2):117-30. doi: 10.5507/bp.2011.038. PMID: 21804620.

Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*. 1995; 44(8): 863-70. 40

Valenzuela A, Sanhuesa J, De La Barra F. El aceite de pescado: Ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional. *Revista Chilena de Nutrición*. 2012; 39(2):201-211

Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Revista Chilena de Nutrición*. 2002; 29:106-15.

Valenzuela A, Sanhueza J. Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*. 2009; 36(3),246-257.

Valenzuela A. Salmon: a health banquet. *Rev. Chilena de Nutrición*. 2005; 32(1):8-17.

Valenzuela R, and Valenzuela A. En ‘Overview About Lipid Structure’. *Lipid Metabolism*, InTech, 23 Jan. 2013. Crossref, doi:10.5772/52306.

Valenzuela R, Morales G, González M, Morales J, Sanhueza J, Valenzuela A. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3 y enfermedad cardiovascular. *Revista Chilena de Nutrición*. 2014; 42(3):319-327.

Valenzuela R, Tapia G, Gonzalez M, Valenzuela A. ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 (EPA Y DHA) Y SU APLICACIÓN EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICAS. *Rev. chil. nutr*. 2011, vol.38, n.3 [citado 2023-04-23], pp.356-367.

Vázquez L, Prados IM, Reglero G, Torres CF. Identification and quantification of ethyl carbamate occurring in urea complexation processes commonly utilized for polyunsaturated fatty acid concentration. *Food Chemistry* 2017; 229: 28-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.123>

Velasco J and Dobarganes C. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2002; 104, 661–676.

Von Schacky V. Omega-3 index and cardiovascular health. *Nutrients*. 2014;(6):799-814.

Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF and Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*. 2010; 68(5):.280-9.

Wanasundara U and Shahidi F. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Food Chemistry*. 1999. 65:41-49.

Wanasundara UN, Shahidi F. Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols of seal blubber oil. *J Food Lipids*. marzo de 1997;4(1):51-64.

Wang CY and Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2012 ;821:421-433. DOI: 10.1007/978-1-61779-430-8_27. PMID: 22125082; PMCID: PMC3807094.

Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Nguyen DD, Watrous J, Kaponi CA, Luzzatto-Knaan T, Porto C, Bouslimani A, Melnik AV et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol*. 2016; 34(8):828-837. doi: 10.1038/nbt.3597

Wang W (a), Li T, Ning Z. A process for the synthesis of AGPICLCL-enriched triglycerides from high-acid crude fish oil. *Journal of Food Engineering*. 2012; 109:366–371.

Wang Y (b), Xia L, Xu X, Xie L and Duan Z. Lipase-catalyzed acidolysis of canola oil with caprylic acid to produce medium-, long- and medium-chain-type structured lipids. *Food and bioproducts processing*. 2012; 90:707-712.

Watkins SM, German JB. Unsaturated fatty acids. En: Akoh, C.C. (Ed.). (2017). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Fourth Edition (4th ed.)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315151854>

Wojtunik-Kulesza K, Oniszczyk A, Oniszczyk T, Combrzyński M, Nowakowska D, Matwijczuk A. Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols-A Non-Systematic Review. *Nutrients*. 2020;12(5):1401.

Ye J, Gao Z, Yin J and He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2007; 293: E1118-E1128.

Yeh SY, Harris KDM, Jupp PE. A drifting markov process on the circle, with physical applications. *Proceedings of the royal society*. 2013. [citado: 05 Noviembre 2017]. Disponible en: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspa.2013.0092>

Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *The Lancet Journal*, 2007; 9567(369) :1090-1098. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60527-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60527-3)

Zanotti IM, Dall'Asta P, Mena L, Mele R, Bruni S, Ray Y and Del Rio D. Atheroprotective effects of (poly) phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food Funct*. 2015; 6(1): 13-31.

Zeb A, Murkovic M. Analysis of triacylglycerols in refined edible oils by isocratic HPLC-ESI-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010; 112(8):844-851.

Zhang H. Evaluation of Practical Process Aspects for Lipozyme TL IM Catalyzed Bulk Fat Modification in a Batch Reactor. *The Open Biotechnology Journal*. 2007; 72-80.

Zhang HJ, Gao X, Guo XF, Li KL, Li S, Sinclair AJ, Li D. Effects of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation on metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of data from 33 randomized controlled trials. *Clin Nutr*. 2021 Jul;40(7):4538-4550. doi: 10.1016/j.clnu.2021.05.025. Epub 2021 Jun 5. PMID: 34229258.

Zhang Y, Zhuang P, He W, Chen JN, Wang WQ, Freedman ND, Abnet CC, Wang JB, Jiao JJ. Association of fish and long-chain omega-3 fatty acids intakes with total and cause-specific mortality: prospective analysis of 421 309 individuals. *J Intern Med*. 2018 Oct;284(4):399-417. doi: 10.1111/joim.12786. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30019399.

Zuta C, Simpson BK, Chan HM, Phillips L. Concentrating AGPICLCL from Mackerel Processing Waste. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2003; 80:933–936.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado del Comité Institucional de cuidado y uso de animales (CICUA)



Santiago, a 7 de mayo de 2018

Certificado n°: 18147-MED-UCH

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica y que en el Protocolo número CBA 1001 FMUCH del Proyecto de Investigación titulado: "Enzymatic reactions models in supercritical media for obtaining novel structured antioxidant triacylglycerides rich in EPA-DHA as bioactive lipids. Effects on the improvement of biochemical markers associated with obesity", de la Investigadora Responsable Dra. Berta Alejandra Espinosa Escalona, Profesor Asistente, del Departamento de Tecnología Médica, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas de Bioética de manejo y cuidado de animales, así mismo la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

La Dra. Espinosa se ha comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de 192 ratones *Mus musculus* (cepa C57BL/6J), provenientes, del Bioterio Central, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, desde el 01 de abril de 2018 hasta 01 de abril de 2021, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por Proyecto Fondecyt Regular Nro. 1181774.

El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales" después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.

Dr. Cristián Ugaz Ruiz
Director Ejecutivo
CICUA - VID
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla
Presidente
CICUA - VID
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile
www.uchile/cicua.cl email: coordinador.cicua@uchile.cl

Anexo 2. Certificado de la Unidad de prevención de Riesgos & Bioseguridad



Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 29 de Marzo 2018.-

Señores
Fondecyt Regular 2018
PRESENTE

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dra. Berta Alejandra Espinosa Escalona para su estudio el proyecto titulado *"Enzymatic reactions models in supercritical media for obtaining novel structured antioxidants triacylglycerides rich in EPA-DHA as bioactive lipids. Effects on the improvement of biochemical markers associated with obesity"* Laboratorio de Medicina Molecular, Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, el cual cumple con los requerimientos básicos de Bioseguridad para ser desarrollado, además se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT "Bioseguridad 1ra edición, 1994" y "Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4ª edición, Manual Bioseguridad en laboratorios, Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005, por tal motivo nuestra Unidad da el visto bueno para su realización.

El investigador responsable Dra. Berta Alejandra Espinosa Escalona, se compromete a cumplir con las normas de bioseguridad indicadas en los manuales antes mencionados y las establecidas en el Reglamento Interno del funcionamiento de los laboratorios, Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En concomitancia se hace responsable de que todos los participantes del proyecto cumplan con las normas de bioseguridad establecidas.

Tomé conocimiento: Dra. Berta Alejandra Espinosa Escalona

Doctor Rómulo Fuentes Flores
Director de Investigación y Tecnología

c.c.

- Decano, Dr. Manuel Kukuljan
- Investigador responsable, Dra. Berta Alejandra Espinosa Escalona
- Archivo

Anexo 3. Publicaciones de la estudiante

Dovale-Rosabal G, Espinosa A, Rodríguez A, Barriga A, Palomino-Calderón A, Aubourg SP. Enzymatic Synthesis Process of EPA- and DHA-Enriched Structured Acylglycerols at the *sn*-2 Position Starting from Commercial Salmon Oil and Concentrated by Response Surface Methodology under Supercritical Conditions. *Processes*. 2023; 11(2):537. <https://doi.org/10.3390/pr11020537>

Dovale-Rosabal G, Espinosa A, Rodríguez A, Barriga A, Palomino-Calderón A, Romero N, Troncoso RH, Aubourg SP. Effect of Structured Phenolic Lipids with EPA/DHA and Gallic Acid against Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) in Mice. *Molecules*. 2022 Nov 9;27(22):7702. doi: 10.3390/molecules27227702. PMID: 36431812; PMCID: PMC9696657.

Dovale-Rosabal G, Rodríguez A, Espinosa A, Barriga A, Aubourg SP. Synthesis of EPA- and DHA-Enriched Structured Acylglycerols at the *sn*-2 Position Starting from Commercial Salmon Oil by Enzymatic Lipase Catalysis under Supercritical Conditions. *Molecules*. 2021 May 22;26(11):3094. doi: 10.3390/molecules26113094. PMID: 34067234; PMCID: PMC8196811.

Espinosa A, Ross A, **Dovale-Rosabal G**, Pino-de la Fuente F, Uribe-Oporto E, Sacristán C, Ruiz P, Valenzuela R, Romero N, Aubourg SP, Rodríguez A. EPA/DHA Concentrate by Urea Complexation Decreases Hyperinsulinemia and Increases Plin5 in the Liver of Mice Fed a High-Fat Diet. *Molecules*. 2020 Jul 20;25(14):3289. doi: 10.3390/molecules25143289. PMID: 32698439; PMCID: PMC7397222.

Dovale-Rosabal G, Rodríguez A, Contreras E, Ortiz-Viedma J, Muñoz M, Trigo M, Aubourg SP, Espinosa A. Concentration of EPA and DHA from Refined Salmon Oil by Optimizing the Urea-Fatty Acid Adduction Reaction Conditions Using Response Surface Methodology. *Molecules*. 2019 Apr 26;24(9):1642. doi: 10.3390/molecules24091642. PMID: 31027319; PMCID: PMC6539647.

Anexo 4. Asistencia a congresos nacionales e internacionales

Primer Congreso de la RED IBEROAMERICANA DE INVESTIGACIÓN POR LA REVALORIZACIÓN Y VALIDACIÓN BIOLÓGICA DE MATERIAS PRIMAS Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA EL DESARROLLO DE INGREDIENTES FUNCIONALES. Enero 2023. Dovale-Rosabal G, Espinosa A, Rodríguez A, Barriga A, Palomino-Calderón A, Romero N, Troncoso RH, Aubourg SP. Effect of Structured Phenolic Lipids with EPA/DHA and Gallic Acid against Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) in Mice.

VII CUMBRE INOFOOD, VI EXPO y II Muestra de Posters. Noviembre 2022, Chile. Yessenia Reinoso Rojas, Alejandra Quintriqueo, Paz Robert, Leyla Sanhuesa, Gretel Dovale-Rosabal, Jaime Ortiz, Andrés Bustamante Pezoa. Revalorización del orujo de arándano (*Vaccinium corymbosum. cv. legacy*) utilizando extracción asistida por ultrasonido y extracción acelerada con solventes: optimización de métodos.

21st IUFOST World Congress of Food Science and Technology. November 2022, Singapore. Reinoso, Y, Robert, P., Quintriqueo, A, Dovale-Rosabal, G., Ortiz, J, Echeverría, F., Bustamante, A. Recovery of bioactive compounds from blueberry (*Vaccinium corymbosum. cv. legacy*) pomace by conventional and accelerated solvent extraction for the development of a food additive with potential use in the food industry.

Conference of the Western European Fish Technologists' Association (50th WEFTA Conference) Octubre 2022, Países Bajos. Santiago P. Aubourg, Gretel Dovale-Rosabal, Alejandra Espinosa Escalona, Andrés Barriga, Alan Palomino-Calderón, Daniela Gutiérrez, Dayana Apaza, Camila Sanchez, Francisca Reinoso and Alicia Rodríguez Melis. Enzymatic synthesis of EPA- and DHA-enriched structured acylglycerols at the *sn-2* position starting from commercial salmon oil and concentrated by response surface methodology under supercritical conditions.

XXIII Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Octubre de 2021. Y. Reinoso; J. Ortiz; F. Echeverría; G. Dovale-Rosabal; A. Bustamante. Optimización del proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de residuos (pomasa) de

arándanos (*Vaccinium corymbosum* l. cv. *legacy*) mediante extracción con CO₂ supercrítico y solventes convencionales.

XXIII Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Octubre de 2021. Gutiérrez D., Dovale-Rosabal G., Rodríguez A., Espinosa A., Romero N., Valenzuela R., Aubourg S.P. Síntesis de lípidos fenólicos por acidólisis enzimática (*Thermomyces lanuginosus*) de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (EPA+DHA) y ácido gálico bajo condiciones de CO₂ supercrítico.

17 th Euro Fed Lipid Congress. Oils, Fats and Lipids: Driving Science and Technology to new Horizons. October 2019, Seville, Spain. Gretel Dovale-Rosabal, Santiago Aubourg, Andrés Barriga, Alicia Rodríguez, Alejandra Espinosa, Francisco Pino, Camila Sacristán, Ernesto Uribe, Daniela Gutierrez. Synthesis of structured triacylglycerides starting from commercial salmon oil by lipase catalysis under supercritical conditions.

XXII Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Octubre 2019. Gretel Dovale-Rosabal, Santiago Aubourg, Andrés Barriga, Alicia Rodríguez, Alejandra Espinosa. La administración de ácido gálico y aceite de salmón previene el aumento de la insulina en ratones obesos, sin alterar el perfil de ácidos grasos del hígado.

XXII Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Octubre 2019. Gretel Dovale-Rosabal, Santiago Aubourg, Andrés Barriga, Nalda Romero, Alejandra Espinosa, Alicia Rodríguez. Evaluación del efecto de la estructuración de lípidos por fraccionamiento enzimático en CO₂ supercrítico, sobre la posición en el glicerol del EPA y el DHA utilizando espectrometría de masa (MALDI-TOF).

Anexo 5. Premios

Mejor presentación oral. Primer Congreso de la RED IBEROAMERICANA DE INVESTIGACIÓN POR LA REVALORIZACIÓN Y VALIDACIÓN BIOLÓGICA DE MATERIAS PRIMAS Y RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA EL DESARROLLO DE INGREDIENTES FUNCIONALES. **Enero 2023.** Dovale-Rosabal G, Espinosa A, Rodríguez A, Barriga A, Palomino-Calderón A, Romero N, Troncoso RH, Aubourg SP. Effect of Structured Phenolic Lipids with EPA/DHA and Gallic Acid against Metabolic-Associated Fatty Liver Disease (MAFLD) in Mice.

1er LUGAR en modalidad póster. XXII Congreso Chileno de Ciencia y Tecnología de Alimentos. **Octubre 2019.** Gretel Dovale-Rosabal, Santiago Aalborg, Andrés Barriga, Alicia Rodríguez, Alejandra Espinosa. La administración de ácido gálico y aceite de salmón previene el aumento de la insulina en ratones obesos, sin alterar el perfil de ácidos grasos del hígado.