



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS.
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
TECNOLOGÍA QUÍMICA.

**“SÍNTESIS DE LÍPIDOS FENÓLICOS POR ACIDÓLISIS
ENZIMÁTICA (*Thermomyces lanuginosus*) DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA *n*-3 (EPA+DHA), ACEITE
DE SALMÓN y ÁCIDO GÁLICO BAJO CONDICIONES DE CO₂
SUPERCRÍTICO”.**

Memoria para optar al título profesional de Ingeniero en Alimentos.

DANIELA POLETTE GUTIÉRREZ TAPIA

Patrocinante y Directora

Dra. Alicia Rodríguez M.
Académico Departamento de
Ciencia de los Alimentos y
Tecnología Química.

Co-Director

Gretel Dovale R.
Ingeniero en Alimentos
Dr. Nutrición y Alimentos (c)
Universidad de Chile.

MEMORIA DE CIRCULACIÓN RESTRINGIDA

(Desde 2020-2022)

Santiago-Chile 2020



UNIVERSIDAD DE CHILE.
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS.
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
TECNOLOGÍA QUÍMICA

**“SÍNTESIS DE LÍPIDOS FENÓLICOS POR ACIDÓLISIS
ENZIMÁTICA (*Thermomyces lanuginosus*) DE ÁCIDOS
GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA *n-3*
(EPA+DHA), ACEITE DE SALMÓN y ÁCIDO GÁLICO BAJO
CONDICIONES DE CO₂ SUPERCRÍTICO”.**

Memoria para optar al título profesional de Ingeniero en Alimentos.

DANIELA POLETTE GUTIÉRREZ TAPIA

Patrocinante y Directora

Dra. Alicia Rodríguez M.
Académico Departamento de
Ciencia de los Alimentos y
Tecnología Química.

Co-Director

Gretel Dovale R.
Ingeniero en Alimentos
Dr. Nutrición y Alimentos (c)
Universidad de Chile.

MEMORIA DE CIRCULACIÓN RESTRINGIDA

(Desde 2020-2022)

Santiago-Chile 2020

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE ANEXOS.....	8
RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Antecedentes generales.....	13
1.1.1 Lípidos.....	13
1.1.2 Digestión y absorción de triglicéridos.....	13
1.1.3 Aceite de pescado.....	15
1.1.4 Ácido eicosapentaenoico (EPA) y Ácido Docosahexaenoico (DHA).....	15
1.1.5 Metabolismo EPA y DHA.....	16
1.1.6 Concentrados omega- 3.....	18
1.1.7 Biodisponibilidad.....	18
1.1.8 Ácido Gálico.....	19
1.1.9 Triacilglicéridos Estructurados (TEs).....	20
1.1.10 Biocatalizadores.....	21
1.1.11 Fluido Súper Crítico (FSC).....	22
1.1.12 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	23
1.1.13 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).....	24
2. HIPÓTESIS.....	25
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo general.....	25
3.2 Objetivo específico.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26

4.1 Materiales.....	26
4.2 Metodología.....	26
4.2.1 Caracterización química y física del aceite de salmón (AS).....	26
4.2.2 Análisis de composición y cuantificación de ácidos grasos del aceite de salmón (AS) y concentrado de aceite de salmón (C-AGPI).....	27
4.2.3 Diseño experimental.....	28
4.2.4 Acidólisis enzimática de ácido gálico con distintas proporciones de concentrado/aceite de salmónido.....	28
4.2.5 Caracterización de los productos lipídicos fenólicos mediante HPLC-UV.	29
4.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de los productos lipídicos fenólicos.....	30
4.2.7 Caracterización de los productos lipídicos fenólicos mediante TLC.....	31
4.2.8 Modelo estadístico.....	31
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
5.1 Caracterización del aceite refinado comercial de salmón mediante análisis físicos-químicos.....	32
5.2 Análisis de composición de ácidos grasos.....	33
5.2.1 Análisis de composición de ácidos grasos del aceite comercial de salmón refinado (AS).....	33
5.2.2 Análisis composición de ácidos grasos del concentrado de aceite comercial de salmón refinado (C-AGPI).....	35
5.3 Análisis y caracterización de productos lipídicos fenólicos.....	36
5.3.1 Análisis de los lípidos fenólicos mediante HPLC-UV.....	36
5.3.2 Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	38
5.3.3 Análisis de TLC.....	45

6. CONCLUSIONES.....	48
7. REFERENCIAS.....	49
8. ANEXOS.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño factorial de 2 ² de una acidólisis enzimática (Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i>) bajo condiciones CO ₂ SC para la obtención	28
---	----

de un nuevo lípido fenólico. Donde AS/C-AGPI: es la relación Aceite de Salmón / Concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga <i>n</i> -3 (EPA+DHA) de Aceite de Salmón (g/g) y P CO ₂ SC: Presión CO ₂ supercrítica expresada en bar.	
Tabla 2. Sistema de gradiente HPLC. Columna: C18 de 150×4.6 mm. 5 μm. Fase A: acetonitrilo/metanol 7/5 Fase B: isopropanol, Flujo: 1,0 mL/min. Longitud de onda: 215 y 280 nm. Inyección: 20 μL.	30
Tabla 3. Parámetros físico-químicos evaluados en el aceite de salmón (AS) de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente: Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA, 2019), <i>Codex Alimentarius</i> (CODEX, 2017), <i>Global Organization for EPA and DHA</i> (GOED, 2016) y European Food Safety Authority (EFSA, 2010).	32
Tabla 4. Composición inicial del aceite de salmón comercial refinado (AS).	34
Tabla 5. Composición de EPA, DHA y otros ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados de concentrado de aceite de salmón (C-AGPI).	36
Tabla 6. Rango de fusión determinado en AS, C-AGPI, las muestras de reacciones de acidólisis enzimática (E1-E6) y AG.	41
Tabla 7. Resumen de la presencia de <i>peaks</i> . PPFB: <i>Peak</i> de punto de fusión bajo. PPFM ₁₋₂₋₃₋₄ : <i>Peak</i> de punto de fusión medio. PPFA: <i>Peak</i> de punto de fusión alto.	42
Tabla 8a. Clasificación de <i>Peaks</i> de fusión determinados en AS, C-AGPI y las muestras de reacciones de acidólisis enzimática (E1-E6). PPFB: <i>Peak</i> de punto de fusión bajo. PPFM ₁₋₂ : <i>Peak</i> de punto de fusión medio.	43
Tabla 8b. Clasificación de <i>Peaks</i> de fusión determinados en AS, C-AGPI y las muestras de reacciones de acidólisis enzimática (E1-E6). PPFM ₃₋₄ : <i>Peak</i> de punto de fusión medio. PPFA: <i>Peak</i> de punto de fusión alto.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Digestión y absorción de triglicéridos. TAG: Triacilglicérido.	14
---	----

DAG: Diacilglicérido. MAG: Monoacilglicérido. AGL: Ácido graso libre. AGCC: Ácido graso de cadena corta. AGCM: Ácido graso de cadena media. AGCL: Ácido graso de cadena larga. TAG-CM: Triacilglicéridos con AGCM en posición <i>sn</i> -1, 2 y 3. TAG-CM/CL: Triacilglicéridos con AGCM en posición <i>sn</i> -1 y <i>sn</i> -3 y AGCL en posición <i>sn</i> -2. TAG-CL: Triacilglicéridos con AGCL en posición <i>sn</i> -1, 2 y 3. Fuente: Adaptación de Akoh & Pande, 2020.	
Figura 2. Metabolismo EPA y DHA. ALA: α -linolénico; SD: ácido estearidónico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; DPA, ácido docosapentaenoico; PG: prostaglandinas; TX: tromboxanos; LT: leucotrienos; RV: resolvinas; LX: lipoxinas; P: protectinas; COX: Ciclooxygenasa; LOX: lipooxygenasa. Fuente: modificado de Akoh & Pande, 2020.	17
Figura 3. Molécula de Ácido Gálico (AG). Fuente: Disponible en la web.	19
Figura 4. Mecanismo de acidólisis catalizado por lipasas. Fuente: Extraído de Adlercreutz, 1994.	21
Figura 5. Esterificación de ácidos grasos y glicerol, catalizada por la lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i> , específica para las posiciones <i>sn</i> -1,3. Fuente: Fernández-Lafuente, 2010.	22
Figura 6. Diagrama presión / temperatura. Esquema de los estados de la materia y región supercrítica correspondiente al CO ₂ . T _c : Temperatura crítica y P _c : Presión crítica. Fuente: Carrilho et al., 2001.	23
Figura 7. Esquema del equipo de CO ₂ supercrítico. Fuente: Elaboración propia.	29
Figura 8. Cromatogramas de HPLC a 280 y 215 nm de las muestras de reacción de acidólisis enzimática. Los <i>peaks</i> indicados en los cromatogramas correspondieron a: AG, <i>peak</i> 1; AS, <i>peaks</i> 4, 7, 8, 9, 10 y 11; AS/C-AGPI, <i>peaks</i> 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11; y lípidos fenólicos, <i>peaks</i> 4', 7', 8', 9' y 10'.	38
Figura 9. Termogramas del perfil de fusión por DSC. Los <i>peaks</i>	39-

<p>indentificados en los termogramas correspondieron a: 1, 2, 3, 4 y 5. <i>Onset</i>: inicio de fusión y <i>endset</i>: final de fusión.</p>	40
<p>Figura 10. Separación por cromatografía en capa fina de las reacciones de acidólisis enzimática. AS: Aceite de salmón. C-AGPI: Concentrado de aceite de salmón. AG: Ácido gálico. Lípidos estructurados: E1, E2, E3, E4, E5 y E6.</p>	46
<p>Figura 11. Esquema de las posibles reacciones de acidólisis enzimática de ácido gálico con aceite de salmón. La sustitución de un grupo -R en el glicerol. Acción de la lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) específica para la hidrólisis en las posiciones <i>sn</i>-1 y <i>sn</i>-3. Fuente: Modificado de Sabally, 2007.</p>	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición ácidos grasos para distintos tipos de aceites marinos. Determinados mediante cromatografía líquida-gaseosa. Expresados como porcentaje del total de ácidos grasos. Fuente: CODEX, 2017.	58
---	----

RESUMEN

El objetivo de esta memoria fue obtener lípidos fenólicos por acidólisis enzimática de aceite de salmón (AS), concentrados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (EPA+DHA) de aceite de salmón (C-AGPI) y ácido gálico (AG) catalizada por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) utilizando como medio de reacción dióxido de carbono en estado supercrítico (CO₂SC). Se utilizó un diseño factorial 2² con 2 repeticiones en el punto central variando la proporción de AS/C-AGPI (g/g) y Presión CO₂SC (bar). La caracterización de los productos lipídicos fenólicos formados fue analizada por calorimetría diferencial de barrido (DSC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV) y cromatografía de capa fina (TLC).

Los análisis fisicoquímicos de AS cumplieron con los estándares de calidad del Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA), *Codex Alimentarius* (CODEX) y *Global Organization for EPA and DHA* (GOED). La composición fue de 7,75 y 38,35 g de EPA + DHA /100 g de ácidos grasos totales para el AS y C-AGPI respectivamente. Los cromatogramas de HPLC para todas las muestras de reacción (E1-6), medidas a 280 nm y 215 nm, sugieren formación de lípidos fenólicos. En cuanto al DSC, las muestras E1-6 aumentaron su rango de fusión. Si bien no hubo diferencias significativas ($p \geq 0.05$) para el “*onset*”, sí hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las muestras para el “*endset*” atribuibles a los ácidos grasos libres del C-AGPI y a la incorporación de EPA y DHA a los lípidos estructurados. Además, las muestras de E1-6, comparadas con AS, disminuyeron la temperatura de su *peak* predominante (PPFM₂). Su disminución puede deberse a que se favoreció la unión de AGPICL *n*-3 a los nuevos lípidos estructurados. Respecto al TLC, el orden descendente de elusión en la placa cromatográfica fue: triacilglicéridos, diacilglicéridos, diacilglicéridos fenólicos, monoacilglicéridos, monoacilglicéridos fenólicos y ácido fenólico.

Por último, se formó un nuevo lípido fenólico, con EPA/DHA y ácido gálico en estructura, mediante una acidólisis enzimática catalizada por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* bajo condiciones de CO₂SC.

SUMMARY

The objective of this study was to obtain phenolic lipids by enzymatic acidolysis of salmon oil (AS), concentrates of long-chain polyunsaturated fatty acids *n*-3 (EPA + DHA) from salmon oil (C-AGPI) and gallic acid (AG) catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) using supercritical carbon dioxide (CO₂SC) as reaction medium. A 2² factorial design was used with 2 repetitions in the central point varying the proportion of AS/C-AGPI (g/g) and Pressure CO₂SC (bar). The characterization of the formed phenolic lipid products was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC), high performance liquid chromatography (HPLC-UV) and thin layer chromatography (TLC).

The physicochemical analyzes of AS complied with the quality standards of the Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA), *Codex Alimentarius* (CODEX) and Global Organization for EPA and DHA (GOED). The composition was 7.75 and 38.35 g of EPA + DHA /100 g of total fatty acids for AS and C-AGPI respectively. HPLC chromatograms for all reaction samples (E1-6), measured at 280 nm and 215 nm, suggest phenolic lipid formation. Regarding DSC, samples E1-6 increased their melting range. Although there were no significant differences ($p \geq 0.05$) for the “onset”, there were significant differences ($p \leq 0.05$) between the samples for the “endset” attributable to the free fatty acids of C-AGPI and the incorporation of EPA and DHA to structured lipids. In addition, the E1-6 samples, decreased the temperature of its predominant peak (PPFM₂) in comparison with AS. This decrease may be due to the fact that bind of AGPICL *n*-3 to the new structured lipids was favored. With respect to TLC, the elution order on the chromatographic plate from top to bottom was: triacylglycerides, diacylglycerides, phenolic diacylglycerides, monoacylglycerides, phenolic monoacylglycerides and phenolic acid.

Finally, a new phenolic lipid with EPA / DHA and gallic acid in its structure was formed by enzymatic acidolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase under conditions of CO₂SC.

1. INTRODUCCIÓN

El aceite marino es la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICL *n*-3). El aceite de pescado es particularmente rico en ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 *n*-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 *n*-3). Diversos estudios han relacionado estos compuestos con la disminución de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, algunos tipos de cáncer y juegan un papel importante en el desarrollo del cerebro y la visión del bebé (Valenzuela *et al.*, 2011; Calder, 2006; Mori & Beilin, 2004; FAO-FINUT, 2012; Simopoulos, 2009). Para obtener estos beneficios la industria ha elaborado alimentos enriquecidos y suplementos nutricionales con AGPICL *n*-3, provenientes de aceites de pescado, pero su biodisponibilidad depende de cómo sean suministrados estos ácidos grasos (Schuchardt & Hahn, 2013; Trautwein, 2001). Además, éstos resultan ser muy susceptibles a la oxidación lo que se traduce en la formación de peróxidos y sus subproductos, que pueden ser perjudiciales para los humanos perdiendo su valor biológico y calidad nutricional (Kolanowski, 2010; Kolanowski & Laufenberg, 2005).

Con el propósito de prevenir este deterioro, se le incorporan distintos tipos de antioxidantes. La preocupación por la seguridad de los antioxidantes sintéticos ha dado lugar a una creciente demanda de productos naturales. El ácido gálico es un antioxidante natural que actúa eliminando radicales libres y se encuentra entre los antioxidantes altamente potentes para mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites marinos (Danúbia, 2019; Rajan & Muraleedharan, 2017; Asnaashari, Farhoosh & Sharif, 2014). Pero su solubilidad es relativamente baja en el medio, lo que dificulta su aplicación a estos productos (Ju & Bramlage, 1999).

La incorporación de los ácidos fenólicos a los triacilglicéridos (TAG) puede producir nuevos lípidos fenólicos estructurados, con los potenciales beneficios de ambos compuestos (Sabally *et al.*, 2006 b). Los TAGs pueden ser modificados mediante reacciones de interesterificación química o enzimática para mejorar las propiedades funcionales y/o nutricionales. El uso de enzimas específicas ha permitido mediante técnicas biotecnológicas, la obtención de lípidos estructurados con una estereoquímica establecida (Valenzuela *et al.*, 2002). La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) es una de las lipasas más estudiadas y empleadas en la industria debido a su versatilidad, especificidad *sn*-1,3, termoestabilidad y acción a un amplio rango de pH (Fernández-Lafuente, 2010; Camacho *et al.*, 2014).

La descomposición o degradación de los compuestos termolábiles no se puede evitar en un método de interesterificación convencional con solventes orgánicos. Sin embargo, en un proceso de biocatálisis con dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC) ofrece ventajas potenciales ya que no es inflamable, no es tóxico, es barato y se puede usar en condiciones operativas suaves. Varios resultados experimentales han demostrado que el CO₂SC es un disolvente eficaz para las mezclas derivadas de aceites de pescado (Lin & Chen, 2008; Mariod *et al.*, 2010; Gironi & Maschietti, 2006). Además, esta tecnología tiene la ventaja de controlar las variables de proceso para una mejor reacción enzimática (Knez, 2009).

Por lo tanto, en el presente estudio, se pretende obtener lípidos fenólicos por acidólisis enzimática de lipasa (*Thermomyces lanuginosus*) de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (EPA+DHA), aceite de salmón y ácido gálico bajo condiciones de CO₂ supercrítico.

1.1 Antecedentes generales

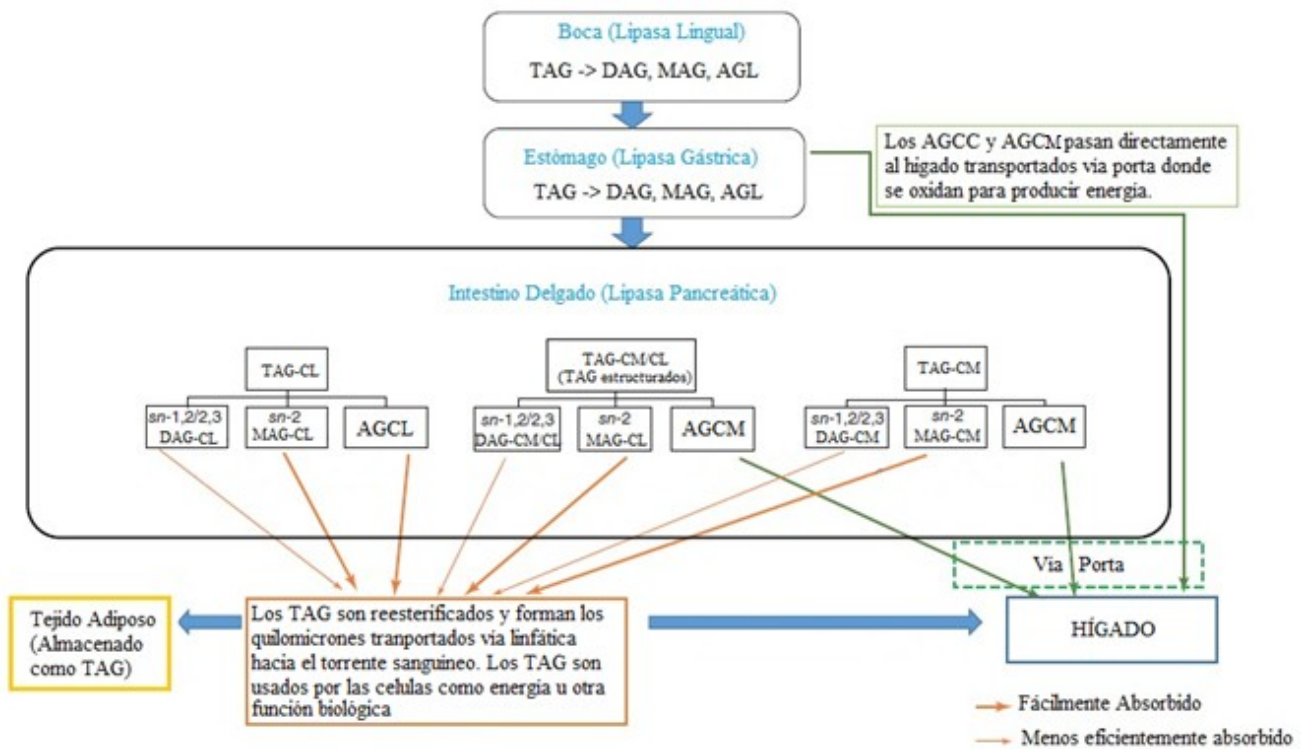
1.1.1 Lípidos

Los lípidos son macronutrientes importantes de la dieta humana. Éstos son los más densos energéticamente aportando 9 kcal/g. Los lípidos han sido clasificados vagamente como moléculas hidrófobas y en muchos casos solubles en solventes orgánicos. Otras clasificaciones apuntan a moléculas hidrófobas o anfipáticas que pueden originarse total o parcialmente por condensaciones de tioésteres o unidades de isopreno (Fahy *et al.*, 2005). Estos son clasificados, por sus propiedades físico-químicas y por su estructura molecular, en distintas categorías como: ácidos grasos, glicerolípidos, esteroides, etc. Que a su vez poseen subcategorías (FAO-FINUT, 2012). Más allá de su función nutricional, las investigaciones recientes relacionan a los lípidos funcionales con la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades. Un ejemplo son los siguientes lípidos funcionales: ácidos grasos omega-6 (ácido gamma linoleico (GLA) y ácido linoleico (LA)), ácidos grasos omega-3 (ácido alfa-linolénico (ALA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA)), ácido linoleico conjugado (CLA), aceites triglicéridos de cadena media y fitoesteroides (Alabdulkarim *et al.*, 2012).

1.1.2 Digestión y absorción de triglicéridos

Como indica la **figura 1** la digestión de los lípidos comienza en la boca con acción de la lipasa lingual, luego pasa al estómago seguida de la hidrólisis de la lipasa gástrica y finalmente la mayoría de la digestión ocurre en el intestino delgado por la lipasa pancreática. La lipasa gástrica prefiere TAGs con ácidos grasos de

cadena media (AGCM) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y también muestra especificidad posicional para ácidos grasos en la posición *sn*-3 del TAG. Luego en el intestino delgado, la grasa se mezcla con bilis y jugo pancreático. La bilis emulsiona los lípidos para una mayor acción enzimática. Principalmente la lipasa pancreática (hidroliza TAG y DAG a MAG, glicerol y ácidos grasos libres) la cual posee actividad en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del TAG da como resultado la liberación de 2-MAG y ácidos grasos libres (AGL). Los AGCM y AGCC son absorbidos por el intestino y son transportados al hígado vía vena porta donde experimentan β -oxidación para la producción de energía. Mientras que, los demás



productos hidrolizados se absorben a través de las células intestinales en forma de micelas. Luego los AGL y 2-MAG se reesterifican para formar quilomicrones y entran en los vasos linfáticos donde son transportados a la circulación y llevados a las células para su uso como energía o almacenado como tejido adiposo (Akoh & Pande, 2020; FAO-FINUT, 2012). Se ha estudiado ampliamente que los AGCL en la posición *sn*-2 en un TAG con AGCM en posición *sn*-1 y *sn*-3 son fácilmente absorbidos (Hita *et al.*, 2007).

Figura 1. Digestión y absorción de triglicéridos. TAG: Triacilglicérido. DAG: Diacilglicérido. MAG: Monoacilglicérido. AGL: Ácido graso libre. AGCC: Ácido graso de cadena corta. AGCM: Ácido graso de cadena media. AGCL: Ácido graso de cadena larga. TAG-CM: Triacilglicéridos con AGCM en posición sn-1, 2 y 3. TAG-CM/CL: Triacilglicéridos con AGCM en posición sn-1 y sn-3 y AGCL en posición sn-2. TAG-CL: Triacilglicéridos con AGCL en posición sn-1, 2 y 3. Fuente: Adaptación de Akoh & Pande, 2020.

1.1.3 Aceite de pescado

El contenido de grasa del pescado es único en sus cantidades de ácidos grasos omega-3 de cadena larga. Los aceites de pescado naturales contienen aproximadamente 18% de EPA y 12% de DHA, lo que significa que cada molécula de TAG contiene una de AGPICL *n*-3 (Schuchardt & Hahn, 2013). Las especies capturadas en América del Sur (Perú y Chile) y Norte (EE. UU.) tienen un alto contenido de AGPICL *n*-3 que puede alcanzar hasta el 35% de la grasa total. Pero, los aceites de pescado con un mayor contenido de AGPICL *n*-3 también tienen un mayor contenido de ácidos grasos saturados, como mirístico y palmítico (Pike & Jackson, 2010).

Estos ácidos omega-3 son producidos por algas marinas que primero son consumidas por el zooplancton y luego por los peces. Aproximadamente el 95% de la producción mundial de aceite de pescado es para alimentación animal mientras que, el 5% restante es para uso directo en alimentos, elaboración suplementos alimenticios o medicamentos (Lembke, 2012).

Estos aceites al poseer ácidos grasos insaturados son susceptibles a la oxidación. Por lo cual, para su almacenamiento, deben estar fuera de contacto con el aire y metales prooxidantes e incluso en algunos casos son tratados con un antioxidante, como el hidroxitolueno butilado (BHT) (Pike & Jackson, 2010).

1.1.4 Ácido Eicosapentaenoico (EPA) y Ácido Docosahexaenoico (DHA)

Son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la familia de los omega-3 se encuentran naturalmente en los alimentos provenientes del mar, especialmente en pescado azul (salmón, arenque, anchoa, eperlano y caballa) y suplementos de estos (FAO-FINUT, 2012). Se ha investigado extensamente sus beneficios para la salud mediante estudios con resultados convincentes. Dentro de sus roles importantes cabe destacar que forman parte de la materia gris y blanca del cerebro humano. DHA juega un papel importante en la estructura y función de las membranas celulares del cerebro ya que puede influir en los receptores de membrana y en la unión a la proteína (Sinclair *et al.*, 2007; Sastry, 1985). DHA es importante para garantizar funciones neuronales y visuales óptimas en niños (Birch *et al.*, 2007; Eilander *et al.*, 2007). Además, bajo el consumo recomendado por la FAO de 250 mg/d de EPA más DHA se ha demostrado beneficios en la presión arterial, mejoras en el metabolismo de los lípidos, aumento de la lipólisis, disminución de la lipogénesis y reducción en el riesgo de las enfermedades cardiovasculares (Alabdulkarim *et al.*, 2012; Jacobson, 2008; Mori & Beilin, 2004; Flachs *et al.*, 2009; FAO-FINUT, 2012).

La importancia de los ácidos grasos omega-3 en la alimentación es evidente. Sin embargo, a través del tiempo se han disminuido en las dietas occidentales debido a la agroindustria y el procesamiento de alimentos. Es por esto que surge la necesidad de volver a consumir los AGPICL *n*-3 y la industria ha aprovechado esta oportunidad para elaborar productos enriquecidos con estos ácidos grasos (Simopoulos, 2002). Se sabe que el humano no puede sintetizar LA y ALA ácidos grasos esenciales primarios para la formación de omega-6 y omega-3 respectivamente debido a la falta del mecanismo enzimático para introducir dobles enlaces en las posiciones anteriores al carbono nueve. Por lo que estos ácidos grasos esenciales se deben consumir de la dieta (Tapiero *et al.*, 2002).

1.1.5 Metabolismo EPA y DHA

Los humanos poseen el mecanismo de transformación de ALA en EPA y DHA mediante una serie de reacciones alternas de desaturación donde además se

compite por las enzimas con la transformación de LA en ácido araquidónico. Pero este mecanismo posee un bajo rendimiento de transformación siendo un 0,2% de ALA a EPA y 0,05% de ALA a DHA. Es decir, esta ruta no proporciona grandes niveles de EPA y DHA por lo cual su consumo en la dieta mediante pescados y/o aceites de pescado es fundamental (FAO-FINUT, 2012). El EPA tal como se muestra en la **figura 2** mediante una serie de reacciones sucesivas se puede producir DHA. Ambos AGPICL *n*-3 participan en diversas respuestas inflamatorias y mecanismos de señalización celular. El EPA produce prostaglandinas y tromboxanos de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5 que disminuyen la inflamación además de lipoxinas y resolvinas con efectos antiinflamatorios. Mientras que el DHA produce resolvinas y protectinas con actividades antiinflamatorias. Cabe recordar que la inflamación es un mecanismo complejo de respuesta fisiológica que da como resultado daño celular o tisular, y está involucrado en la patogénesis de muchas enfermedades.

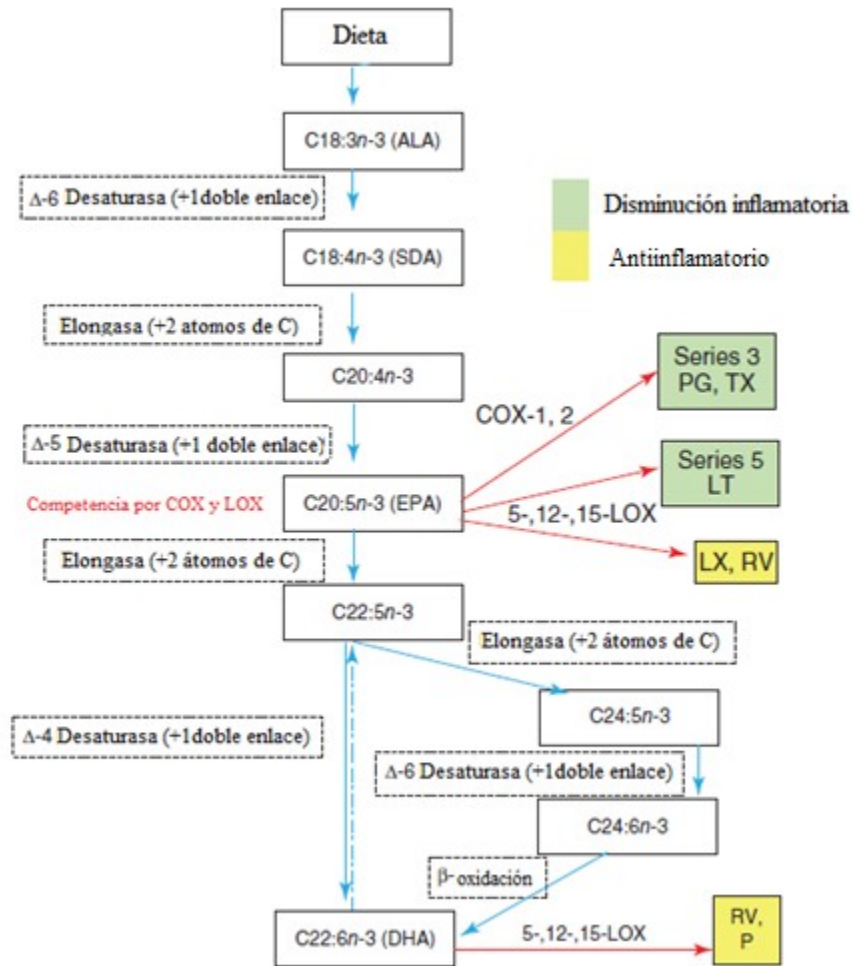


Figura 2. Metabolismo EPA y DHA. ALA: α -linolénico; SDA: ácido estearidónico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; DPA, ácido docosapentaenoico; PG: prostaglandinas; TX: tromboxanos; LT: leucotrienos; RV: resolvinas; LX: lipoxinas; P: protectinas; COX: Ciclooxygenasa; LOX: lipooxygenasa. Fuente: modificado de Akoh & Pande, 2020.

1.1.6 Concentrados omega- 3

Una forma de consumir EPA y DHA para cumplir con sus requerimientos diarios son los concentrados de omega-3. Se desarrolló con el objetivo de eliminar la mayoría de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados y de esta manera alcanzar concentraciones de EPA + DHA de hasta 90%.

La industria farmacéutica y alimentaria ha desarrollado diferentes métodos para su desarrollo. Dentro de las técnicas más usadas para aumentar las cantidades de los AGPICL $n-3$ está la concentración por urea y la transesterificación. La concentración por urea se usa de manera más industrial por su escalabilidad y uso de solventes de bajo costo. 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 y monoinsaturados. Esta fracción es eliminada provocando un enriquecimiento de la fracción no complejada, ó sea, una concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (Dovale-Rosabal *et al.*, 2019). En cambio la concentración por transesterificación aumenta la cantidad de EPA y DHA mediante la unión de AGPICL $n-3$ al TAG. En las moléculas TAGs naturales, los AGPICL $n-3$ generalmente se unen en la posición $sn-2$, mientras que en los TAGs estructurados se unen por igual en las posiciones $sn-1,3$ y $sn-2$ (Schuchardt & Hahn, 2013).

1.1.7 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad es el grado en que un nutriente puede ser absorbido y transportado al sistema circulatorio o al sitio de actividad fisiológica. Ésta biodisponibilidad es determinada por múltiples factores, como la presencia o ausencia de otros compuestos que puedan afectar su absorción, la forma química en que se encuentran, su metabolización luego ser absorbido, el estado de salud de la persona, etc. (Schuchardt & Hahn, 2013). La mayoría de los estudios sobre la biodisponibilidad de los ácidos grasos omega-3 de cada larga se enfocan en su forma química. Habitualmente estos suplementos se venden en forma de cápsulas, los cuales se pueden encontrar en forma de TAGs esterificados, ésteres metílicos (EM), ésteres etílicos (EE) y ácidos grasos libres (AGL). Estos últimos se oxidan fácilmente produciendo una mayor cantidad radicales libres e hidroperóxidos, que pueden transformarse a aldehídos y cetonas, que conducen a la pérdida de vida útil, baja aceptabilidad del consumidor, pérdida del valor nutricional e inocuidad (Arab-Tehrany *et al.*, 2012). Por esto generalmente se conservan en forma de TAG o EE (Lin & Chen, 2008). Según Ghasemifard *et al.*

(2014) y Schuchardt *et al.* (2013) los estudios recopilados, que incluyen estudios a corto y largo plazo en humanos y una serie de estudios en animales, informaron que en general la absorción de AGPICL *n*-3 es mejor como TAG que como EE.

1.1.8 Ácido Gálico

Los polifenoles son altamente estudiados por su actividad biológica como antioxidante. El ácido gálico (AG) o ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (**figura 3**), y sus derivados, representan una gran familia de metabolitos polifenólicos secundarios que son fuertes antioxidantes naturales presentes en varias plantas, usados en las industrias farmacéutica y alimentaria. Actúa mediante la eliminación de radicales libres (Aruoma *et al.*, 1993; Dwibedy *et al.*, 1999), induce a las células cancerosas a una muerte programada (Serrano *et al.*, 1998; Saeki *et al.*, 2000) y posee propiedades neuroprotectivas (Lu *et al.*, 2006). Este polifenol ha demostrado ser un fuerte antioxidante en emulsiones y matrices lipídicas. En un estudio se observó la actividad antioxidante del ácido gálico y algunos derivados en aceite Kilka demostrando ser un potente antioxidante para mejorar la estabilidad oxidativa de los aceites marinos fuentes ricas de AGPICL *n*-3 (Asnaashari *et al.*, 2014). Karamac *et al.* (2005) reportó que de 14 ácidos fenólicos examinados por sus actividades de eliminación de radicales, el ácido gálico fue el más activo.

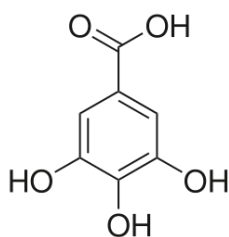


Figura 3. Molécula de Ácido Gálico (AG). Fuente: Disponible en la web.

1.1.9 Triacilglicéridos Estructurados (TEs)

El valor nutricional y las propiedades fisicoquímicas de un TAG no solo dependen de la composición de sus ácidos grasos sino también de su distribución. Los TEs se elaboran con el objetivo de mejorar o de disminuir la biodisponibilidad de uno o

de todos los componentes (Valenzuela & Sanhueza, 2008). Es posible diseñar TAGs de acuerdo a requerimientos especiales, a través de reacciones de interesterificación que a su vez pueden clasificarse como acidólisis (transferencia de un grupo acilo entre un ácido y un éster), alcoholólisis (transferencia de un grupo acilo entre un alcohol y un éster) y transesterificación (intercambio éster-éster) (Akoh & Pande, 2020).

Uno de los métodos más usados para la síntesis de TAGs estructurados se basa en la interesterificación catalizada por lipasas regio y estereoespecíficas para producir grasas o aceites con estructuras de TAGs definidas, ya que ofrece la ventaja de trabajar en condiciones de reacción más suaves que los catalizadores químicos y poseer un mejor control del producto final (Shieh *et al.*, 1995; Schmid *et al.*, 1998; Akoh & Pande, 2020).

Estudios recientes utilizan este método para insertar otros tipos de moléculas. La incorporación de ácidos fenólicos en TAGs puede dar como resultado nuevos lípidos fenólicos estructurados, con beneficios potenciales de ambas moléculas. Esta reacción corresponde a la acidólisis, transferencia de un grupo acilo entre un ácido y un éster, es una reacción compleja que cuenta con la formación de intermediarios. Como muestra la **figura 4** el TAG acila la enzima, formando una molécula de DAG y una acil-enzima. El intermediario enzima-acilo puede ser desacilada por agua u otro nucleófilo. El ácido a incorporar acila a otra enzima dando lugar a un segundo complejo "enzima-acilo". Luego al ser desacilado por un DAG, se forma un TAG con un nuevo ácido (Adlercreutz, 1994). Ya se han reportado investigaciones donde ha resultado con éxito la estructuración de distintos lípidos fenólicos (Sabally *et al.*, 2006 a; Sabally *et al.*, 2007; Ciftci & Saldaña, 2012; Karboune *et al.*, 2008). Los antecedentes sugieren que la incorporación de un antioxidante como el ácido gálico al TAG con EPA o DHA permitiría proteger de la oxidación a dicho triacilglicérido en el trayecto por el tracto digestivo. Además de brindar sus propiedades biológicas combinadas como potencial antioxidante y antiinflamatorio.

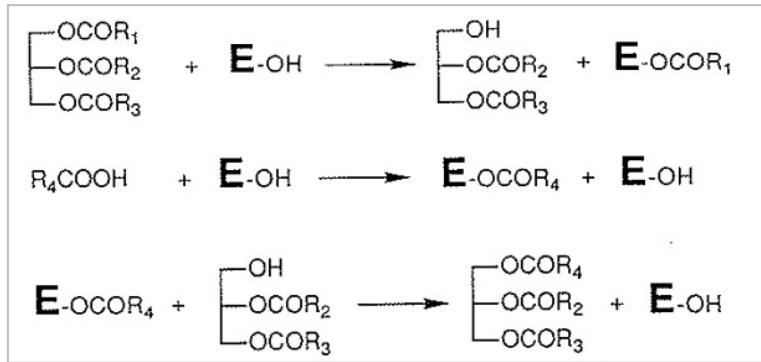


Figura 4. Mecanismo de acidólisis catalizado por lipasas. Fuente: Extraído de Adlercreutz, 1994.

1.1.10 Biocatalizadores

Diversos tipos de biocatalizadores, como las lipasas, esterases, y fosfolipasas pueden ser utilizados para la modificación de los lípidos. Pero las lipasas son las más usadas debido a su regioespecificidad. Una manera de enriquecer los aceites de pescado es liberar los ácidos grasos del esqueleto de glicerol con la ayuda de enzimas específicas de posición *sn*-1,3 ya que en su mayoría los aceites de pescado tienen sus ácidos grasos omega-3 de cadena larga (EPA y DHA) en la posición *sn*-2 (Lembke, 2012).

Las lipasas pueden catalizar tanto la hidrólisis como la reacción de esterificación de los aceites con una velocidad razonable, dependiendo de su origen biológico y condiciones de reacción, algunas usadas son: *Candida antarctica*, *Pseudomonas*, *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, etc. (Chandler, 2001). La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) es una lipasa específica para la hidrólisis en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, esto quiere decir que con las reacciones que implican TAGs, la lipasa TLL selecciona las posiciones del acil *sn*-1,3 del esqueleto de glicerol, teniendo también la habilidad de seleccionar ciertos sustratos y sus estereoisómeros, es decir, es regio-selectiva. La TLL es bastante estable, mantiene la actividad a 50-75°C, con una actividad optima de pH de 6-8 (Fernández-Lafuente, 2010). El uso de esta enzima resguarda el EPA y DHA ya presente naturalmente en posición *sn*-

2 en el aceite de pescado, pero puede insertar nuevos AGPICL *n*-3 y ácidos fenólicos en las posiciones *sn*-1,3 como se muestra en la **figura 5**.

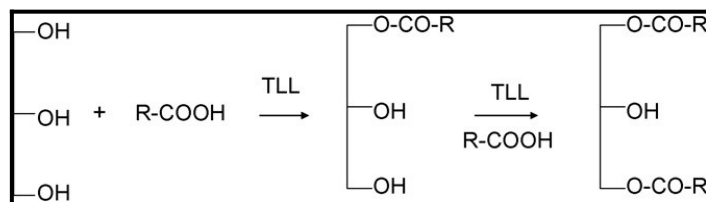


Figura 5. Esterificación de ácidos grasos y glicerol, catalizada por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, específica para las posiciones *sn*-1,3. Fuente: Fernández-Lafuente, 2010.

1.1.11 Fluido Súper Crítico (FSC)

Un Fluido Supercrítico 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 es compresible, se comporta como un gas, llena y toma la forma de su contenedor. Pero, tiene la densidad de un líquido (0,1-1g/mL), por lo tanto, el poder disolvente de éste. Es decir, posee propiedades de transferencia masa tipo gas y las características de solvatación de un líquido. Es una forma de la materia en la que los estados líquido y gaseoso son indistinguibles entre sí (Demirbaş, 2000).

La tecnología de los FSCs se ha aplicado en procesos de extracción, fraccionamiento, cromatografía y reacciones químicas. Estudios han mostrado con éxito que la síntesis enzimática bajo condiciones súper críticas es una alternativa para el no uso de solventes orgánicos. Específicamente el uso de CO₂ (**figura 6**) como fluido súper crítico es ventajoso debido a que no es tóxico, no es inflamable, no es costoso y no amenaza la capa de ozono al igual que los clorofluorocarbonos, reemplaza los solventes tóxicos y posee una temperatura crítica (31,05°C) adecuada para el tratamiento de materiales termosensibles. (Black, 1996).

En la industria oleoquímica se ha estudiado el uso de fluidos supercríticos en reacciones catalizadas por enzimas y reacciones de hidrogenación. Gracias a esta tecnología es posible realizar reacciones a bajas temperaturas en un entorno no oxidativo. Por esto, es especialmente útil para la elaboración de productos altamente concentrados de EPA o DHA, debido a sus condiciones de separación muy suaves y alta selectividad (Lembke, 2012; King, 2004).

El uso de FSC como medio de proceso en biocatálisis tiene varias ventajas. De las cuales se incluyen propiedades de transporte únicas, altas difusividades y bajas viscosidades que mejoran las tasas de transferencia de masa de sustratos a sitios activos de enzimas. También, a altas presiones, las interacciones soluto-disolvente aumentan, lo que resulta en una mayor capacidad de disolución. Por último, el medio del proceso es fácil de separar y no implica procesos físicos (Knez, 2009).

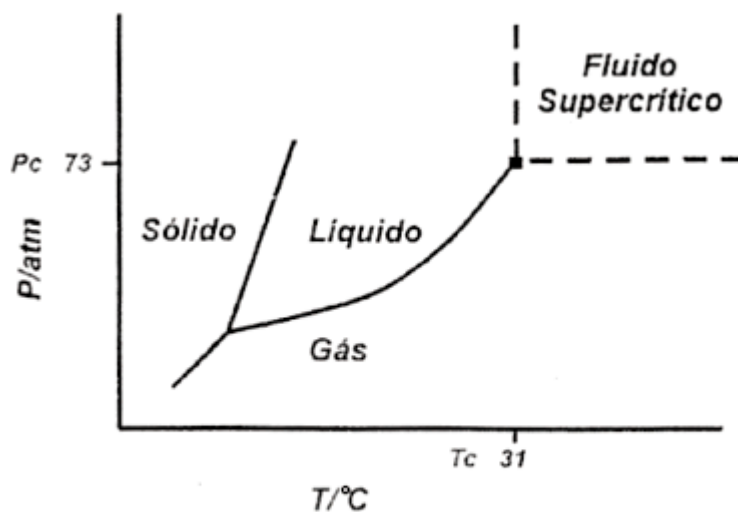


Figura 6. Diagrama presión / temperatura. Esquema de los estados de la materia y región supercrítica correspondiente al CO₂. T_c: Temperatura crítica y P_c: Presión crítica. Fuente: Carrilho et al., 2001.

1.1.12 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Es una de las técnicas más usadas que estudia las propiedades térmicas, a través de métodos termoanalíticos, para las investigaciones en grasas y aceites (Rojas,

2013). DSC ofrece un método sencillo para investigar las características de punto de fusión y congelación de grasas, la transición de fases, conductividad térmica, calor específico, entre otros (Sathivel, 2005).

La distribución de los ácidos grasos se mide a menudo pero no es fácil relacionarlo con sus propiedades fisicoquímicas. Una razón es que los aceites son mezclas de TAGs, cada uno de ellos portando tres ácidos grasos, por lo que cada TAG puede cristalizar en varias formas polimórficas, cada una con su propio punto de fusión. Por esta razón, en lípidos estructurados, nos permite evaluar cómo la estructura molecular y la composición de la mezcla afectan las propiedades finales como los perfiles de fusión (Rousseau *et al.*, 1996; Dos Santos *et al.*, 2010).

1.1.13 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

El MSR es una herramienta estadística simple que sirve para la investigación de procesos complejos y se ha utilizado ampliamente en alimentos (Shieh *et al.*, 1995). Éste se utiliza para evaluar el efecto de varias variables sobre algún proceso o producto. Se pueden realizar gráficas de contorno, estudiar la respuesta y encontrar el óptimo. Por lo que puede ser un método eficaz para optimizar las condiciones del CO₂SC (Jiao *et al.*, 2008).

Para esta investigación la reacción de acidólisis depende de múltiples factores, como el tiempo, presión y la temperatura de reacción, así como las concentraciones de enzimas y sustratos. Ciftci & Saldaña (2012) reportaron para la síntesis enzimática de lípidos fenólicos bajo condiciones de CO₂SC el estudio de las variables de temperatura, presión, tiempo y la relación molar de sustrato. Cedano *et al.* (2016) estudiaron las variables de temperatura, presión, tiempo, cantidad de enzima y relación AGPICL /aceite para maximizar el contenido de EPA y DHA mediante acidólisis enzimática del aceite de canola y AGPICL concentrado.

2. HIPÓTESIS

Es posible la incorporación de ácido gálico (AG) en lípidos estructurados obtenidos mediante la acidólisis enzimática con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico (CO₂SC).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Obtener lípidos fenólicos por acidólisis enzimática de lipasa (*Thermomyces lanuginosus*) de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (EPA+DHA), aceite de salmón y ácido gálico bajo condiciones de CO₂ supercrítico.

3.2 Objetivo específico

1. Caracterizar el aceite refinado comercial de salmón y su concentrado mediante análisis físicos-químicos.
2. Obtener los cromatogramas de elución de las muestras de acidólisis enzimáticas de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (EPA+DHA), aceite de salmónidos y ácido gálico mediante HPLC-UV.
3. Obtener el perfil, rango y *peaks* de fusión para el aceite de salmón, concentrado de aceite de salmón, ácido gálico y lípidos fenólicos mediante DSC.
4. Determinar los lípidos fenólicos producidos (monoacilglicéridos y diacilglicéridos fenólicos) mediante cromatografía de capa fina (TLC).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Se utilizó aceite de salmón (AS) refinado y desodorizado comercial de la empresa Fiordo Austral, Av. Esq Blanca 1117, Maipú, Región Metropolitana, Chile. El concentrado de aceite de salmón (C-AGPI) se obtuvo por inclusión (complejación) con urea a partir del aceite inicial. Las muestras se almacenaron en botellas color ámbar a -80°C para su posterior análisis. La enzima utilizada fue la lipasa Lipozyme TL IM® originaria del hongo *Thermomyces lanuginosus* e inmovilizada en un soporte de gel de sílice, proporcionada por la empresa Blumos S.A. (Santiago, Chile). El ácido gálico (anhidro) se adquirió de la empresa Sigma Aldrich, de Merck, Germany. El estándar interno que se utilizó es metiltricosanoato (23:0), CAS 2433-97-8, NU-CHEK, Inc (Elysian, MN, USA). Los solventes utilizados como el etanol absoluto, n-hexano, isopropanol, sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), cloruro de sodio (NaCl), metilato de sodio, isooctano, ácido acético glacial, ácido sulfúrico, provienen del laboratorio Merck (Santiago, Chile). Por último, los gases CO_2 , N_2 , aire ultra 0 y H_2 fueron comprados a la empresa Gaslab-Linde (Santiago, Chile). Placa para cromatografía de placa fina (Thin-Layer Chromatography, TLC) obtenidas de Merck, Germany.

4.2 Metodología

5.

6.

7.

7.1

7.2

4.2.1 Caracterización química y física del aceite de salmón (AS).

Los parámetros de calidad para la caracterización del aceite refinado comercial de salmón fueron analizados según el método oficial AOCS (Official Methods and Recommended Practices de American Oil Chemists Society, 1993). Se realizó determinación de la acidez libre (AOCS Ca 5a-40), índice de peróxidos (AOCS Cd 8b-90), humedad y compuestos volátiles (AOCS Ca 2b-38), impurezas insolubles

(AOCS Ca 3a-46), Índice de *p*-anisidina (AOCS Cd 18-90) y determinación de dienos y trienos conjugados (AOCS Ti 1a-64).

4.2.2 Análisis de composición de ácidos grasos del aceite de salmón (AS) y concentrado de aceite de salmón (C-AGPI).

La identificación de los ácidos grasos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención con estándares analíticos por cromatografía gaseosa. Se utilizó un cromatógrafo HP 5890 serie II, equipado con detector de ionización de llama, sistema de inyección split, y columna capilar SPTM-2560 de 100m x 0,25mm x 0,2µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), donde se utilizó hidrógeno como gas transportador. El estándar utilizado para la identificación de los perfiles de ácidos grasos será NU-CHEK GCL-463 y se usó el software DataApex Clarity™ para el análisis de los cromatogramas. La estandarización se realizó por triplicado de acuerdo al método oficial de la AOCS Ce 1j-07 (2009). El programa utilizado fue: temperatura del inyector y del detector 250°C, temperatura inicial: 100°C, velocidad de la rampla 1: 3°C/min hasta una temperatura de 140°C, velocidad de la rampla 2: 0,5°C/min hasta una temperatura de 170°C, velocidad de la rampla 3: 4°C/min hasta una temperatura final de 220°C que se mantuvo por 30min.

4.2.2.1 Metilación de las muestras.

Los perfiles de ácidos grasos se determinaron mediante la preparación de ésteres metílicos como se describe por IUPAC (Paquot & Hanuntfenne, 1987). Este paso es previo para la identificación del perfil de los ácidos grasos por CG. Para esto se pesó 100mg de muestra en un matraz aforado de 50mL. Se agregó al matraz 10mL de metilato de sodio 0,2N alcalino y 3 perlas de ebullición. El sistema se insertó en una varilla de vidrio en la parte superior del matraz y se calentó a reflujo por 10min en un agitador magnético, se enfrió hasta aproximadamente 50°C y luego, en el mismo matraz se adicionó una gota de fenolftaleína al 1% en etanol al 95%. Se agregó ácido sulfúrico al 3% en metanol hasta la desaparición del color

rosado, más una gota en exceso para asegurarnos que se está trabajando en medio ácido. Se insertó nuevamente la varilla de vidrio en la parte superior del matraz y se calentó a reflujo por 30min, al enfriarlo se añadió de 2 a 5mL de hexano y se aforó agregando solución de NaCl saturado. A la muestra metilada se le agregó 2,5mg de estándar interno de cuantificación metil-tricosanoato (23:0 NU-CHEK) disueltos en 500mL de tolueno y se dejó reposar a 4°C por 30min.

4.2.3 Diseño experimental

Se realizó un diseño factorial basado en la metodología superficie de respuesta (MSR) de 2^2 , de 2 factores: presión CO₂SC y relación aceite de salmónido/ concentrado ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (AS/C-AGPI). Con 6 corridas experimentales en total, dentro de las cuales dos corridas corresponden al punto central, lo que permite estimar el error experimental. Las variables independientes fueron presión CO₂SC: 78, 189, 300 bar y la relación aceite/ concentrado (g/g): 9,75/0,00, 7,25:2,50 y 4,75:5,00 como se muestra en la **tabla 1**.

Tabla 1. Diseño factorial de 2^2 de una acidólisis enzimática (Lipasa de *Thermomyces lanuginosus*) bajo condiciones CO₂SC para la obtención de un nuevo lípido fenólico. Donde AS/C-AGPI: es la relación Aceite de Salmón / Concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (EPA+DHA) de Aceite de Salmón (g/g) y P CO₂SC: Presión CO₂ supercrítica expresada en bar.

Experimento N°	AS/C-AGPI (g/g)	P CO ₂ SC (bar)
1	9,75:0,00	78
2	9,75:0,00	300
3	7,25:2,50	189
4	7,25:2,50	189
5	4,75:5,00	300
6	4,75:5,00	78

Las muestras obtenidas de cada experimento se codificaron como: E1, E2, E3, E4, E5 y E6 (ej. Experimento N°1: E1).

4.2.4 Acidólisis enzimática de ácido gálico con distintas proporciones de concentrado/aceite de salmónido

La acidólisis enzimática se realizó en el equipo de CO₂SC Spe-ed™ SFE Applied Separation (**figura 7**). Para llevar a cabo estas reacciones se utilizó una columna de acero inoxidable con capacidad para 10g, donde se introdujeron los sustratos de la reacción y la enzima. Posteriormente, se procedió a la preparación de las muestras de acuerdo a la **tabla 1**. Se consideró una cantidad constante de ácido gálico de 250 mg. La enzima fue el 10% del total de los sustratos y actuó a una temperatura de 60°C durante 6 horas (Lin *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008).

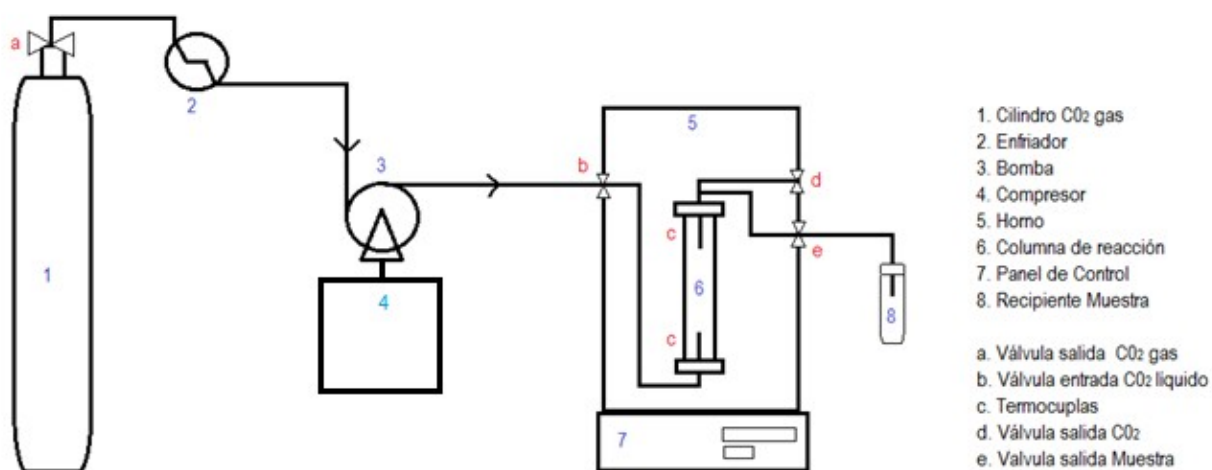


Figura 7. Esquema del equipo de CO₂ supercrítico. Fuente: Elaboración propia.

4.2.5 Caracterización de los productos lipídicos fenólicos mediante HPLC-UV.

Las muestras se prepararon a una concentración de 50 mg/mL en isopropanol. Estas se examinaron en un cromatógrafo HPLC HP 1100 (Agilent Technologies Inc. CA-USA). 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 (**tabla 2**). El caudal se ajustó a 1 mL/min y la detección se realizó a 215 y 280 nm. Adaptado de Sabally *et al.*, (2006 b) y Andrikopoulos *et al.*, (1991).

Tabla 2. Sistema de gradiente HPLC. Columna: C18 de 150×4.6 mm. 5 µm. Fase A: acetonitrilo/metanol 7/5. Fase B: isopropanol, Flujo: 1,0 mL/min. Longitud de onda: 215 y 280 nm Inyección: 20 µL.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
10	100	0
20	40	60
30	0	100

Para la determinación de las áreas totales de las muestras y blancos se utilizó el programa SpecManager de ACDLabs 6, para lo cual primero se ajustó la línea base manualmente. Luego se realizó la selección de *peaks* ajustando todos los parámetros a cero y activando la detección de hombros y finalmente se realizó la integración automática.

4.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de los productos lipídicos fenólicos.

Las evaluaciones calorimétricas se realizaron sobre el AS, C-AGPI, AG y lípidos fenólicos estructurados mediante DSC. Se obtuvo termogramas de fusión con la entalpía de fusión (ΔH) expresada como J/g. Los peaks máximos de fusión fueron evaluados en un equipo PerkinElmer modelo DSC 6000, con modelación de temperatura MT-DSC y principio Heat flux. El calorímetro fue previamente calibrado con Indio (punto de fusión= 156,61°C, ΔH de fusión=28,45 J/g).

Las muestras almacenadas a -80°C fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 1 hora previa al análisis. Las muestras (9-10 mg) se cargaron en cápsulas de aluminio para compuestos volátiles (N°219-0062) herméticamente selladas mediante una prensa de cápsula. Se utilizó nitrógeno (99,999% de pureza) como gas purga a flujo de 20 mL/min. Tanto la muestra como la referencia (cápsula vacía) se sometieron al siguiente programa de temperatura:

1. Enfriar desde 30°C a -80°C a una velocidad de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
2. Mantener por 5 min a -80°C
3. Calentar desde -80°C a 200°C a una velocidad de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

El tratamiento de datos se realizó con el programa computacional Software Pyris Player. Para la curva de fusión, se determinó el rango de fusión como: “*onset*”, inicio de la menor temperatura, hasta “*endset*” punto donde el borde extrapolado de la última endoterma se cruza con la línea de base (Tan & Che Man, 2002). Los *peaks* de fusión fueron agrupados de acuerdo sus temperaturas, como: *Peak* de punto de fusión bajo (PPFB), *peak* de punto de fusión medio (PPFM) y *peak* de punto de fusión alto (PPFA) (Rodríguez *et al.*, 2001; Rojas, 2013). Todos los valores de DSC informados son el promedio de dos repeticiones.

4.2.7 Caracterización de los productos lipídicos fenólicos mediante TLC.

Se analizaron por TLC en placas de Sílica gel 60 F254 (Merck). La migración por TLC se realizó con una mezcla de solvente saturado de cloroformo/ acetona/ ácido acético (96:4:1, v/v/v) (Adaptado de Sabally *et al.*, 2007). Como estándar de TG se utilizó el aceite de salmón refinado desodorizado. Las placas fueron teñidas con solución de yodo para la observación de: triacilglicéridos, diacilglicéridos, diacilglicéridos fenólicos, monoacilglicéridos, monoacilglicéridos fenólicos y ácido fenólico (ácido gálico).

4.2.8 Modelo estadístico.

Se realizó un ANOVA de los parámetros con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Método (LSD) de Fisher, nivel de confianza del 95,0%. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI-2011 (Stat Point Technologies, Inc., Rockville, USA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del aceite refinado comercial de salmón mediante análisis físico-químicos.

Tanto las características organolépticas como la producción de compuestos dañinos para la salud deben ser controladas mediante análisis de calidad. Estos criterios han sido establecidos por diversos organismos internacionales y nacionales. En la **tabla 3** se muestran los parámetros evaluados en el aceite comercial de salmón (AS): acidez libre, valor de peróxidos, índice de *p*-anisidina, impurezas insolubles, humedad, dienos y trienos conjugados.

Tabla 3. Parámetros físico-químicos evaluados en el aceite de salmón (AS) de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente: Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA, 2019), *Codex Alimentarius* (CODEX, 2017), *Global Organization for EPA and DHA* (GOED, 2016) y European Food Safety Authority (EFSA, 2010).

Parámetros de calidad	Aceite refinado de pescado				
	RSA 2019	CODEX 2017	GOED 2016	EFSA 2010	Resultados AS
Ácidos grasos libres (g ácido oleico/100 g aceite)	<0,25 %	<1,51%	<0,25%	<0,1%	0,20 ± 0,00
Valor de Peróxidos (meq de O ₂ activo /kg de aceite)	<10	<5	<5	<0,1	0,40 ± 0,00
Valor <i>p</i> -anisidina		<20	<20		1,13 ± 0,02
Impurezas insolubles %				<0,05%	0,00 ± 0,00
Humedad y compuestos volátiles %	<0,2%			<0,2%	0,04 ± 0,00
Dienos conjugados					0,01 ± 0,00

Trienos conjugados	0,04 ± 0,00
--------------------	-------------

En cuanto a la acidez libre, que indica la alteración de los TAGs ya sea enzimática o por hidrólisis química, fue de 0,20 g ácido oleico/100 g aceite. Lo cual, es baja y cumple con lo establecido por el RSA, CODEX y GOED. Pero, es levemente superior a lo establecido por el EFSA. Por otro lado, el índice de peróxido, que determina los hidroperóxidos acumulados correspondientes al primer indicio de rancidez oxidativa (oxidación primaria), fue de 0,4 meq oxígeno activo /kg por lo que cumple con lo establecido en el RSA, CODEX y GOED. Sin embargo, no cumple con el requisito de EFSA ya que es mayor a 0,1 meq oxígeno activo /kg. Mientras que, el valor de *p*-anisidina, medida de la formación de compuestos secundarios de oxidación, fue de 1,13 ± 0,02 muy por debajo de lo indicado en el CODEX y GOED con un límite <20 (Heller *et al.*, 2019). Así como también las impurezas insolubles fueron menor a 0,05% tal como se establece en el EFSA. En cuanto al contenido de humedad y materias volátiles, según el RSA y EFSA, no debe ser mayor a 0,2% por lo que este aceite de salmón cumple con lo establecido con un 0,04%. En general, el AS cumple con lo señalado en el RSA, CODEX y GOED, pero no con todos los límites establecidos por la European Food Safety Authority (EFSA) que tiene los estándares más exigentes para este tipo de aceite.

Por último, los dienos y trienos están relacionados con la descomposición lipídica durante su almacenamiento. Los dienos conjugados se correlacionan con el bajo valor de peróxidos ya que son componentes de la oxidación primaria. Mientras que oxidación secundaria es representada por los valores de *p*-anisidina y trienos conjugados (Landines & Zambrano, 2009). Lo obtenido para el aceite de salmón refinado de 0,01 y 0,04 para dienos y trienos conjugados respectivamente, fue inferior a lo reportado por Hamilton (1998) que informó valores de 0,19 y 0,08, para dienos y trienos conjugados, en aceite refinado de anchoa de origen chileno. Ambos valores son cercanos a cero por lo que la estabilidad oxidativa del aceite de salmón comercial refinado es buena.

5.2 Análisis de composición de ácidos grasos

5.2.1 Análisis de composición de ácidos grasos del aceite comercial de salmón refinado (AS).

La composición en ácidos grasos para el AS se muestra en la **tabla 4**. En su totalidad el aceite analizado reportó un 20,26% de ácidos grasos saturados, 47,05% de ácidos grasos monoinsaturados y 32,49% de ácidos grasos polinsaturados.

Tabla 4. Composición inicial del aceite de salmón comercial (AS).

Ácido graso o grupo AGL	g/100g AGT
<i>Láurico</i> C12:0	0,06 ± 0,00
<i>Mirístico</i> C14:0	2,90 ± 0,01
<i>Palmítico</i> C16:0	12,76 ± 0,03
<i>Palmitelaídico</i> C16:1 9t	0,07 ± 0,00
<i>Palmitoleico</i> C16:1 9c	3,74 ± 0,01
<i>Heptadecanoico</i> C17:0	0,22 ± 0,00
<i>Heptadecenoico</i> C 17:1 10c	0,13 ± 0,00
<i>Esteárico</i> C18:0	3,64 ± 0,01
<i>Oleico</i> C18:1 9c	36,95 ± 0,08
<i>Cis-vaccénico</i> C18:1 11c	3,32 ± 0,00
<i>Linoelaidico</i> C18:2 9t, 12t	0,06 ± 0,00
<i>Linoleico</i> C18:2 9c, 12c	15,7 ± 70,07
<i>Araquidónico</i> C20:0	0,32 ± 0,00
<i>γ-linolénico</i> C18:3 6c, 9c, 12c	0,22 ± 0,00
<i>8-Eicosaenoico</i> C 20:1 8c	0,44 ± 0,01
<i>11-Eicosaenoico</i> C 20:1 11c	1,84 ± 0,04
<i>α-linolénico</i> C 18:3 9c, 12c, 15c	4,91 ± 0,00
<i>Eicosadienoico</i> C 20:2 11c 14c	1,34 ± 0,01
<i>Behenoico</i> C 22:0	0,36 ± 0,00
<i>Eicosatrienoico</i> C 20:3 11c, 14c, 17c	0,33 ± 0,00
<i>Erúcico</i> C 22:1	0,29 ± 0,01
<i>Araquidónico</i> C 20:4 5c, 8c, 11c, 14c	0,35 ± 0,04
<i>Docosadienoico</i> C 22:2	0,12 ± 0,01
<i>Eicosapentaenoico (EPA)</i> C 20:5 5c, 8c, 11c, 14c, 17c	3,92 ± 0,04
<i>Nervónico</i> C 24:1	0,27 ± 0,03
<i>Docosatetraenoico</i> C 22:4	0,15 ± 0,03

<i>Docosapentaenoico</i>	C 22:5 7c, 10c, 13c, 16c, 19c	1,68 ± 0.05
<i>Docosahexaenoico</i>	C 22:6	3,83 ± 0.04
(DHA)	4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c	
<i>Total ácidos grasos saturados</i>		20,26
<i>Total ácidos grasos monoinsaturados</i>		47,05
<i>Total ácidos grasos poliinsaturados</i>		32,49
<i>Total EPA+DHA</i>		7,75

AGL: ácidos grasos libre. AGT: ácidos grasos totales. Estándar interno metiltricosanoato (23:0). Promedio ± desviación estándar de triplicados de la medición de AGL expresados en g de ácido graso/100g de AGT.

Los ácidos grasos predominantes del aceite ordenados de forma descendente fueron (expresado en g ácidos grasos/100 g de ácidos grasos totales): 18:1 *n*-9c o ácido oleico (36,95), 18:2 *n*-6 o ácido linoleico (15,77), 16:0 o ácido palmítico (12,76), 18:3 *n*-3 o ácido α -linolénico (4,91), EPA (3,92), DHA (3,83), 16:1 o palmitoleico (3,74), 18:0 o ácido esteárico (3,64), 18:1 *n*-7 o cis-ácido vaccénico (3,32) y por último el 14:0 o ácido mirístico (2,90). Estos resultados fueron similares a los rangos establecidos por el CODEX (**anexo 1**) para un aceite de salmón de cultivo, que si bien solo considera 23 ácidos grasos, los mayoritarios también fueron 18:1 *n*-9c o ácido oleico (30-47), 18:2 *n*-9c, 12c o ácido linoleico (8-15) y 16:0 o ácido palmítico (6,5-12).

Respecto a los ácidos grasos EPA y DHA se encuentran en el límite inferior de los rangos establecidos para este tipo de aceite con 3,92 EPA (dentro de un rango de 2-6) y 3,83 DHA (dentro de un rango de 3-10) (CODEX, 2017). Lo anterior, tiene directa relación con que el nivel de estos ácidos grasos dependerá de cuál sea la alimentación de estos peces y una manera de evaluar esto es el nivel de ácido linoleico 18:2 *n*-6 presente en el aceite. Un individuo salvaje normal tendrá valores del 1,5-2,5% de este ácido graso, mientras que los individuos de cultivo pueden llegar a valores tan altos como 8-15%, este aceite presentó un 15,7g ácido linoleico lo que indica que una parte importante de su alimentación fue una fuente de aceite vegetal (Tocher *et al.*, 2019). Esto a su vez influiría en la disminución de EPA y DHA, ya que los AGPICL *n*-3 son mayores en dietas cuyo aporte energético proviene de aceite de pescado (Nanton *et al.*, 2007).

5.2.2 Análisis composición de ácidos grasos del concentrado de aceite comercial de salmón (C-AGPI).

En la **tabla 5** se muestra la cuantificación de los ácidos grasos identificados en el concentrado de aceite de salmón, medidos como el porcentaje del ácido graso en 100g de los ácidos grasos totales, dio como resultado una composición de 15,8 de 20:5 *n*-3 (EPA) y 22,55 de 22:6 *n*-3 (DHA) siendo éste el más abundante.

Según el CODEX (2017) un concentrado de aceite de pescado contiene entre un 30 a 50% de EPA+DHA y un aceite de pescado altamente concentrado contiene más de 50% de EPA+DHA. La suma total de estos ácidos grasos fue de 38,35%, por lo que cae dentro de la categoría de concentrado. Aun así, el contenido es bajo en comparación con el estudio realizado por Pando *et al.* (2018), cuya meta fue maximizar la concentración de DHA y EPA en aceite de trucha arcoíris mediante complejación con urea, que dio como resultado un 71.52 % de EPA+DHA. Así también lo informa Dovale-Rosabal *et al.* (2019) que maximizó el contenido de EPA y/o DHA mediante la optimización de las variables en el proceso de inclusión de urea alcanzando un 80,51% EPA+DHA.

Tabla 5. Composición de EPA, DHA y otros ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados del concentrado de aceite de salmón (C-AGPI).

Ácido graso o grupo AGL		g/100g AGT
<i>Mirístico</i>	C14:0	0,032
<i>Palmítico</i>	C16:0	0,25
<i>Esteárico</i>	C18:0	0,14
<i>Oleico</i>	C18:1 9c	1,7
<i>Linoleico</i>	C18:2 9c,12c	19,08
<i>α-linolénico</i>	C 18:3 9c,12c,15c	8,58
Eicosapentaenoico (EPA)	C 20:5 5c,8c,11c,14c,17c	15,8
Docosahexaenoico (DHA)	C 22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c	22,55
Total EPA+DHA		38,35

posterior reacción de estructuración de lípidos ya que los AGPICL *n*-3 al ser mayoritarios podrán tener más opciones de unión a los TAGs estructurados.

5.3 Análisis y caracterización de productos lipídicos fenólicos.

5.3.1 Análisis de los lípidos fenólicos mediante HPLC-UV.

En la **figura 8** se muestran los cromatogramas UV obtenidos a 215 y 280 nm de las reacciones de acidólisis enzimática mediada por TLL para distintas concentraciones de AS y C-AGPI, bajo condiciones de CO₂SC (E1 a E6). Los TAGs sin modificar del aceite de pescado absorben a 215 nm mientras los lípidos fenólicos absorben tanto a 215 como a 280 nm (Sabally et. al., 2006 a; Sabally et. al., 2007).

Basado en el análisis de datos de Sabally *et al.*, (2007) quienes realizaron la síntesis de lípidos fenólicos a partir de aceite de hígado de pescado y ácido dihidrocafeico, el *peak* 1 observado en los diferentes cromatogramas obtenidos a 215 y 280 nm correspondería al ácido fenólico sin reaccionar (**figura 8**). Siguiendo el mismo análisis como referencia, los *peaks* 7, 8, 9, 10 y 11 observados a 215 nm corresponderían a diferentes TAGs presentes en el aceite de salmón. Mientras los *peaks* 3, 4, 5 y 6 corresponderían a ácidos grasos libres propios del C-AGPI o alternativamente a ácidos grasos libres formados como producto de la reacción enzimática. La confirmación de la formación de lípidos fenólicos se estableció al comparar los cromatogramas obtenidos a 215 y 280 nm, puesto que la incorporación del compuesto fenólico proporciona la capacidad de absorción a 280 nm, de esta forma los *peaks* 7', 8', 9' y 10' corresponderían a TAGs modificados con compuesto fenólico. Adicionalmente, en las muestras E1 y E2 se observó el *peak* 4' no detectado en las otras reacciones y que correspondería a otro tipo de lípido fenólico.

La incorporación de ácidos fenólicos a los TAGs da como resultado nuevos lípidos fenólicos estructurados. Durante la reacción enzimática, la enzima TLL removería de los TAGs del aceite de salmón uno de los acilos formando como producto una

molécula de DAG y el intermediario acil-enzima. En forma paralela, el ácido gálico sería unido por la enzima para formar también un intermediario acil-enzima. Esta última interaccionaría con un DAG para formar finalmente un lípido fenólico que contendría dos ácidos grasos y un ácido fenólico. El ácido fenólico, en este caso, el ácido gálico, estaría unido en las posiciones *sn*-1 o *sn*-3 ya que la enzima TLL tiene preferencia por estas posiciones y que por otra parte permitiría la no remoción de los ácidos grasos omega-3 de cadena larga (EPA y DHA) que se encuentran mayoritariamente en la posición *sn*-2 (Lembke, 2012).

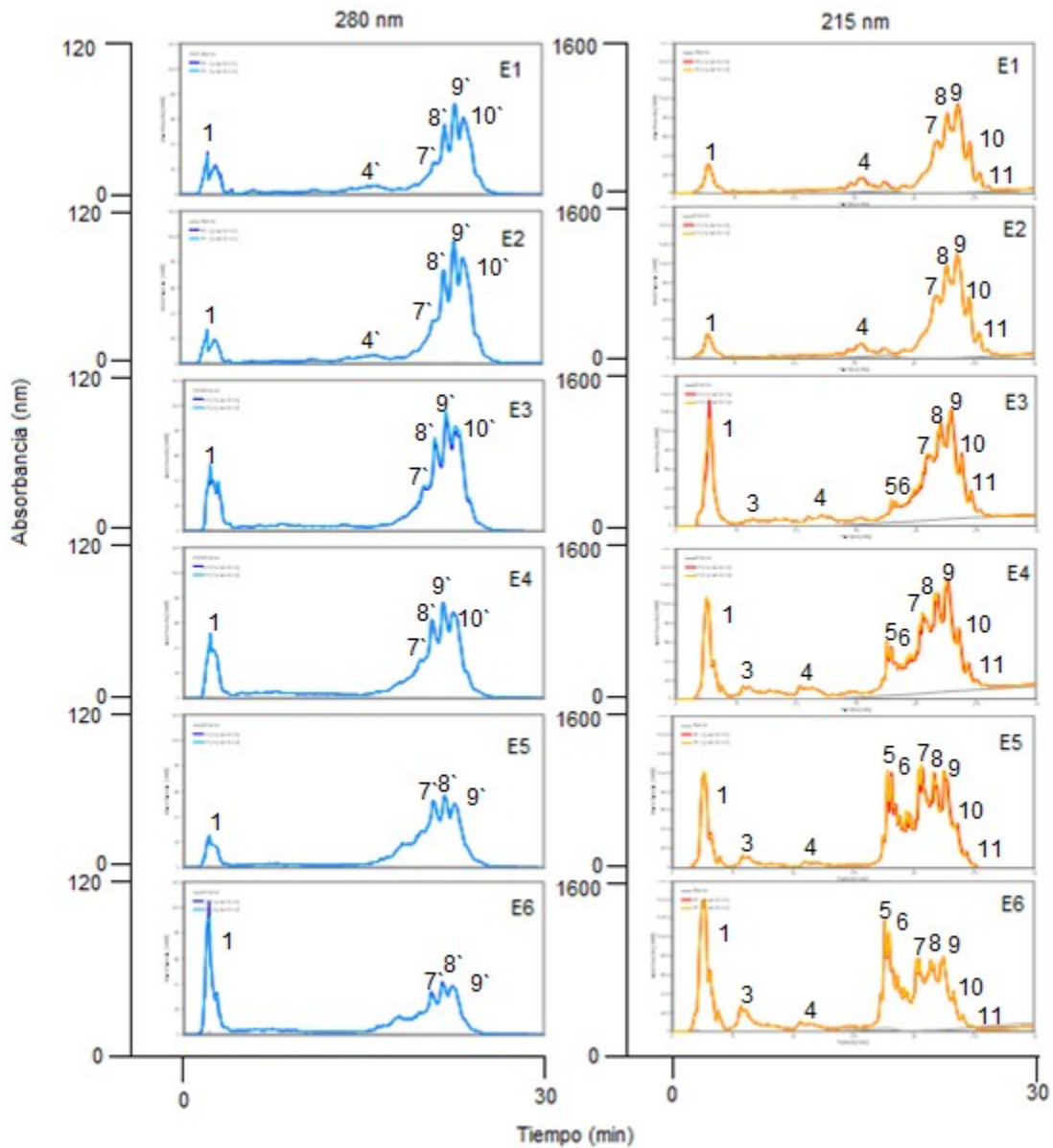


Figura 8. Cromatogramas de HPLC a 280 y 215 nm de las muestras de reacción

de acidólisis enzimática. Los peaks indicados en los cromatogramas correspondieron a: AG, peak 1; AS, peaks 4, 7, 8, 9, 10 y 11; AS/C-AGPI, peaks 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11; y lípidos fenólicos, peaks 4', 7', 8', 9' y 10'.

5.3.2 Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Todas las curvas de fusión pueden observarse en las **figuras 9 a y b**. Y los datos resumidos de los termogramas en las **tablas 6, 7, 8a y 8b**.

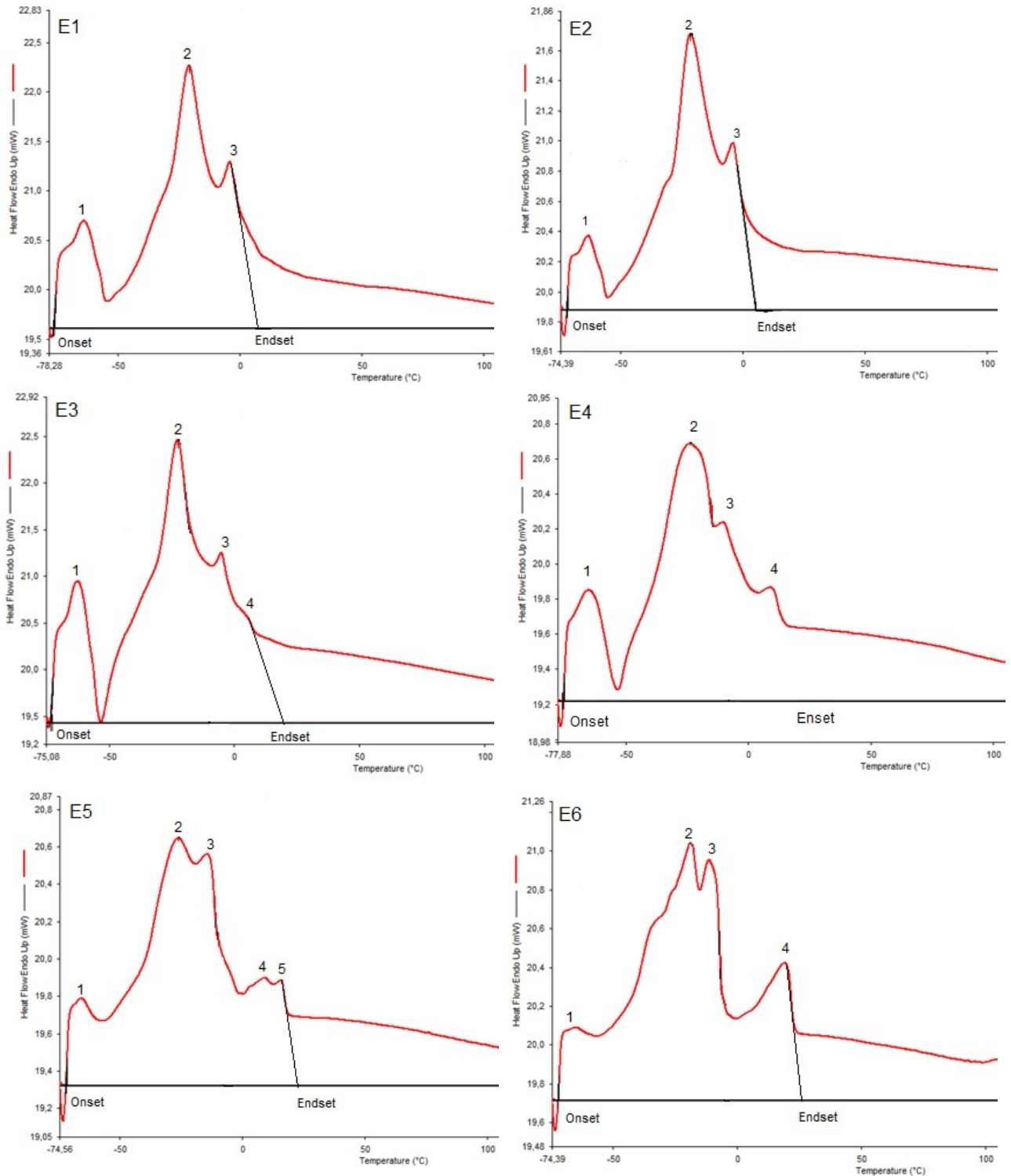


Figura 9a. Termogramas de perfil de fusión por DSC de E1-E6. Los peaks indentificados en los termogramas correspondieron a: 1, 2, 3, 4 y 5. Onset: inicio de fusión y endset: final de fusión.

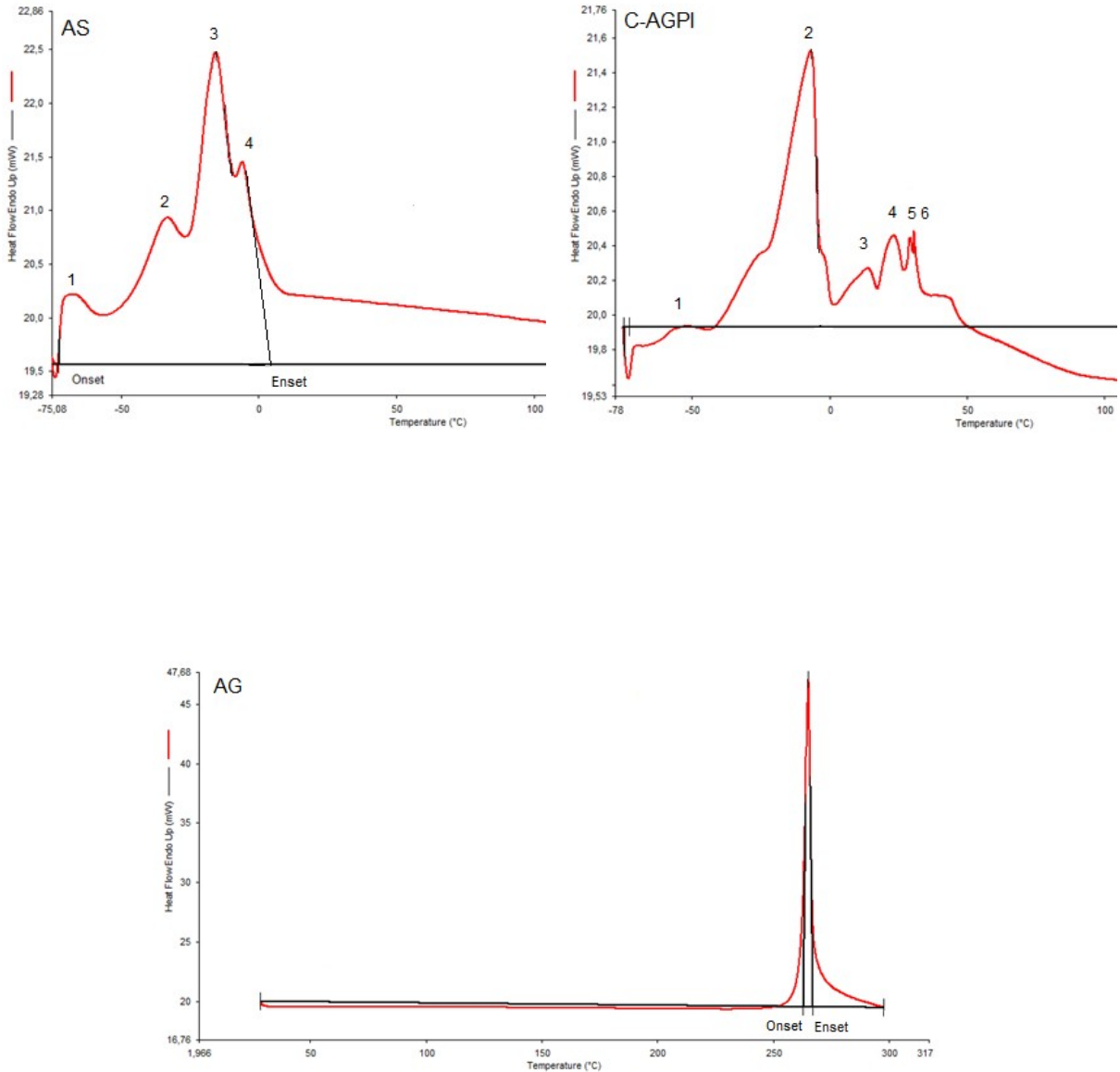


Figura 9b. Termogramas de perfil de fusión por DSC de AS, C-AGPI y AG. Los peaks indentificados en los termogramas correspondieron a: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Onset: inicio de fusión y endset: final de fusión.

Sathivel (2005) menciona que los aceites de pescados refinados muestran *peaks* altos y estrechos en los termogramas de DSC y estos se van haciendo más afilados después de cada paso de purificación. Como muestra la **figura 9a**, para las muestras de aceite de pescado con adición de concentrado (E3, E4, E5 y E6) los *peaks* fueron menos afilados lo que podría indicar formación de impurezas del

aceite (formación de ácidos grasos libres). Que es evidentemente posible ya que una molécula de ácido graso está siendo reemplazada por ácido gálico para la formación del lípido fenólico, dando como producto un ácido graso libre. Lo cual también nos indica que con una purificación de las muestras se visualizarían mejor los *peaks*.

En cuanto al rango de fusión (**tabla 6**), temperatura de inicio de fusión (*onset*) y temperatura de final de fusión (*endset*) (**figura 9a**), en todas las curvas de fusión comenzaron a fundir a temperaturas bajo los -70°C , sin diferencias significativas $p \geq 0.05$, que difiere discretamente con Huang & Sathivel (2008) que reportaron un rango de fusión del aceite de salmón sin purificar de $-61,3$ a $31,2^{\circ}\text{C}$ y Sathivel (2005) que informó un rango de fusión para el aceite de salmón rojo de -69.6 a -0.36°C y -64.7 a 20.8°C para el salmón rosado.

Tabla 6. Rango de fusión determinado en AS, C-AGPI, las muestras de reacciones de acidólisis enzimática (E1-E6) y AG.

Exp	Rango de Fusión ($^{\circ}\text{C}$)			
	Onset de Fusión ($^{\circ}\text{C}$)		Endset de Fusión ($^{\circ}\text{C}$)	
E1	-74,5	$\pm 2,6^a$	6,3	$\pm 0,0^b$
E2	-73,4	$\pm 2,2^a$	5,1	$\pm 0,4^{ab}$
E3	-75,2	$\pm 2,7^a$	19,9	$\pm 1,2^c$
E4	-73,1	$\pm 2,7^a$	20,0	$\pm 1,3^c$
E5	-74,5	$\pm 2,6^a$	20,0	$\pm 0,5^c$
E6	-72,5	$\pm 0,9^a$	23,4	$\pm 0,4^d$
AS	-72,5	$\pm 2,5^a$	4,3	$\pm 0,5^a$
C-AGPI	-75,1	$\pm 0,0^a$	33,4	$\pm 0,0^e$
AG	262,8	$\pm 0,0^b$	267,0	$\pm 0,0^f$

-Los valores fueron expresados como el promedio de duplicados a excepción de C-AGPI y AG. La comparación fue hecha entre cada columna. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes entre las muestras ($p \leq 0.05$). Método (LSD) de Fisher, nivel de confianza del 95,0%. STATGRAPHICS centurión.

En cuanto al fin de fusión (*endset*), las muestras de lípidos estructurados E1-6, aumentaron respecto al AS. Esto explica Dos Santos *et al.*, (2010) que observó

en lípidos estructurados que el EPA, DHA y AA expanden el rango de fusión en ambos sentidos. Cabe mencionar que C-AGPI posee un rango de fusión más amplio, comparado con AS, con un final de fusión en 33,4°C que se le atribuye a la formación de ácidos grasos libres después de su complejación con urea, como: C20:1 11c (24 a 25°C), C16:1 9t (32,22°C) o C20:1 8c (34,09 a 35,13°C) (Dos Santos *et al.*, 2010). Lo cual provocó que las muestras E3-6 con una fracción de C-AGPI también aumentarían su final de fusión (*endset*).

En general, hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre todas las temperaturas finales de fusión. Por lo que las variables de AS/C-AGPI (g/g) y P CO₂SC (bar) influyeron sobre este parámetro. Esto puede ser debido a que el producto formado, lípidos fenólicos y TAGs estructurados, cada uno de ellos con dos o tres ácidos grasos, pueden cristalizar en varias formas polimórficas cada una con su propio punto de fusión. El aceite de salmón es un material químicamente complejo y aún más los lípidos fenólicos estructurados, por lo tanto, es esperable que el rango de fusión se produzca en un amplio rango de temperaturas (Dos Santos *et al.*, 2010).

Finalmente, para el AG puro se observó solo 1 *peak*, muy marcado, con un rango de fusión 262,8 a 267,0°C. A esta temperatura el aceite y las muestras ya están descompuestas por lo que solo se llegó hasta 200 °C para fines de la evaluación térmica.

Tabla 7. Resumen de la presencia de *peaks*. PPFB: *Peak* de punto de fusión bajo. PPFM₁₋₂₋₃₋₄: *Peak* de punto de fusión medio. PPFA: *Peak* de punto de fusión alto.

Exp	PPF B	PPFM 1	PPFM 2	PPFM 3	PPFM 4	PPF A	Total <i>peaks</i>
AS	x	x	x	x			4
C-AGPI	x		x		x	xxx	6
E1	x		x	x			3
E2	x		x	x			3

E3	X	X	X	X		4
E4	X	X	X	X		4
E5	X	X	X	X	X	5
E6	X	X	X		X	4

X: indica la presencia del *peak*.

En la **Tabla 7**, se resumió la presencia de todos los *peaks* identificados en la **figura 9 a y b**. En general, se visualizaron 4 *peaks* endotérmicos distintos para el AS. Así, también informó Rojas (2013) quien identificó 4 *peaks* bien marcados para un aceite marino. Todas las muestras, de E1 a E6, perdieron el *peak* PPFM₁ que está presente solo en AS. Específicamente las muestras E1 y E2, lípidos estructurados ambos compuestos de AS y AG, mostraron solo 3 *peaks*. Esto demuestra que la reacción de provocó cambios conformacionales, ya sea por interesterificación entre ácidos grasos y/o acidólisis enzimática por adición de ácido gálico dentro de los experimentos, aún más allá de la adición o no de concentrado. Mientras que las muestras E3, E4, E5 y E6, compuestas por AS/C-AGPI y AG, reportaron 4 o más *peaks*, perdiendo el *peak* PPFM₁ y adicionando un *peak* PPFM₄ y/o PPF_A al final del termograma adoptando características del C-AGPI quien tuvo más de 4 *peaks*.

Tabla 8a. Clasificación de *Peaks* de fusión determinados en AS, C-AGPI y las muestras de reacciones de acidólisis enzimática (E1-E6). PPFB: *Peak* de punto de fusión bajo. PPFM_{1,2}: *Peak* de punto de fusión medio.

Exp	PPFB	PPFM₁	PPFM₂
E1	-64,33 ± 0,00 ^{de}		20,95 ± 0,00 ^d
E2	-63,66 ± 0,35 ^e		21,32 ± 0,05 ^d
E3	-63,18 ± 0,94 ^e		22,92 ± 0,42 ^c
E4	-65,27 ± 0,51 ^{cd}		23,59 ± 0,51 ^b
E5	-66,50 ± 0,23 ^c		26,44 ± 0,15 ^a
E6	-70,04 ± 0,30 ^b		18,27 ± 0,23 ^e

AS	-69,44 ± 1,33 ^b	- ± 0,29	- ± 0,38 ^f
C-AGPI	-75,14 ± 0,00 ^a	34,64	15,91
			-6,68 ± 0,00 ^g

-Los valores fueron expresados como el promedio de duplicados a excepción de C-AGPI y AG. La comparación fue hecha entre cada columna. Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes entre las muestras ($p \leq 0.05$). Método (LSD) de Fisher, nivel de confianza del 95,0%. STATGRAPHICS centurión.

En la **tabla 8a** se muestran los PPFB, PPFM₁ y PPFM₂. Los PPFB, con temperaturas entre -75,14 y -63,18°C, se pueden atribuir a los AGPICL como el EPA, DHA y AA que tienen cinco, seis y cuatro dobles enlaces, respectivamente, lo que da como resultado puntos de fusión muy bajos (Dos Santos *et al.*, 2010). Y que también concuerda con Sathivel (2001) que determinó los rangos de fusión, con AGL en muestras comerciales, para el C22: 6 y C20:4 que arrojaron rangos de fusión de -47,4 a -42.2°C y -43.4 a -38.4°C respectivamente. El PPFB con una temperatura menor (-75,14°C) fue para el C-AGPI, lo cual era esperable ya que posee una concentración más alta de AGPICL *n*-3 con temperaturas de fusiones bajas.

Para todas las muestras, incluyendo el C-AGPI y AS, el PPFM₂ fue el predominante. Para las muestras de E1 a E6 correspondió a su segundo *peak* mientras que para el AS fue su tercero ya que su termograma arrojó un *peak* anterior (PPFM₁) que solo fue posible observar en esta muestra. El PPFM₂, *peak* máximo, fue de -15,91°C para AS; mientras que para las muestras de E1 a E6 fueron menores a los -18°C. Su disminución puede deberse a la aleatorización de la estructura de los TAGs en la reacción enzimática que favoreció la unión de AGPICL *n*-3 a los nuevos TAGs estructurados. Esto coincide con lo reportado por Dos Santos *et al.*, (2010) quienes hicieron estudios térmicos a diferentes lípidos estructurados, en donde aquellos TAGs estructurados con EPA, DHA y AA presentaron puntos de fusión a -20°C. Según Rousseau. *et al.*, (1996), existe una directa relación entre la composición del TAG y sus propiedades físicas. Los tipos de AGL dictan el comportamiento de fusión de un TAG. Es por esto que las

propiedades físicas de los TAGs son más complejas que la de los AGL por sí solos.

En la **tabla 8b** se muestra el PPFM₃ que cubre el rango de -4 a -13°C y se encuentra en todas las muestras menos en C-AGPI, esto se puede asociar a la presencia de α -linolénico (C18:3 *n*-3) y ácido linoleico (C18:2) que funden a -11,5 y -7,15°C (Knothe & Dunn, 2009). El C-AGPI no reportó este *peak* ya que tiene disminuida la cantidad de estos ácidos grasos.

Por último el PPFM₄ (rango de 7,34 a 13,26°C) y PPFA (rango de 15,73 a 23°C), solo presente en las muestras que contienen AS/C-AGPI y AG, es de decir, de E3 a E6 y obviamente en C-AGPI, podrían corresponder a los ácidos grasos C18:1 *11c* (13 a 15°C), C18:1 *9c* (-5.7 a 15.2°C) y C20:1 *11c* (24 a 25°C) que fueron determinados por Knothe & Dunn (2009) quienes hicieron una evaluación completa de los puntos de fusión de ácidos grasos determinados por calorimetría diferencial de barrido.

Tabla 8b. Clasificación de *Peaks* de fusión determinados en AS, C-AGPI y las muestras de reacciones de acidólisis enzimática (E1-E6). PPFM₃₋₄: *Peak* de punto de fusión medio. PPFA: *Peak* de punto de fusión alto.

Exp	PPFM ₃	PPFM ₄	PPFA
E1	-4,10 ± 0,00 ^e		
E2	-4,17 ± 0,59 ^e		
E3	-5,02 ± 0,11 ^d	8,08 ± 0,93 ^a	
E4	-9,33 ± 0,43 ^b	10,3 ± 0,24 ^b	
		7	
E5	- ± 0,20 ^a	7,34 ± 0,60 ^a	15,73 ± 0,39 ^a
E6	-8,85 ± 0,59 ^b		19,71 ± 0,17 ^b
AS	-5,81 ± 0,24 ^c		
C-AGPI		13,2 ± 0,00 ^c	23,00 ± 0,00 ^c
		6	

-Los valores fueron expresados como el promedio de duplicados a excepción de C-AGPI y AG. La comparación fue hecha entre cada columna. Los valores con letras diferentes son significativamente

diferentes entre las muestras ($p \leq 0.05$). Método (LSD) de Fisher, nivel de confianza del 95,0%. STATGRAPHICS centurión.

5.3.3 Análisis TLC

Las reacciones de acidólisis enzimática mediada por TLL (E1 a E6), AS, C-AGPI y AG, se analizaron cualitativamente por cromatografía de capa fina y los resultados se muestran en la **figura 10**.

Basado en el análisis de Sabally *et al.*, (2007), quienes elaboraron lípidos fenólicos a partir de aceite de hígado de pescado y ácido dihidrocafeico, los TAGs en la parte superior adoptaron formas de pliegues “ ω ”, característico para los TAGs aceites marinos. El orden de elusión en la placa cromatográfica de arriba hacia abajo fue como se esperaba. De acuerdo a su polaridad creciente fue: triacilglicéridos, diacilglicéridos, diacilglicéridos fenólicos, monoacilglicéridos, monoacilglicéridos fenólicos y ácido fenólico. Los resultados experimentales mostraron que los monoacilglicéridos y diacilglicéridos fenólicos migraron más lentamente que sus correspondientes acilgliceroles, que podría deberse la mayor polaridad de los lípidos fenólicos tal como se indica en Sabally *et. al.* (2007) y Sabally *et. al.* (2006 a).

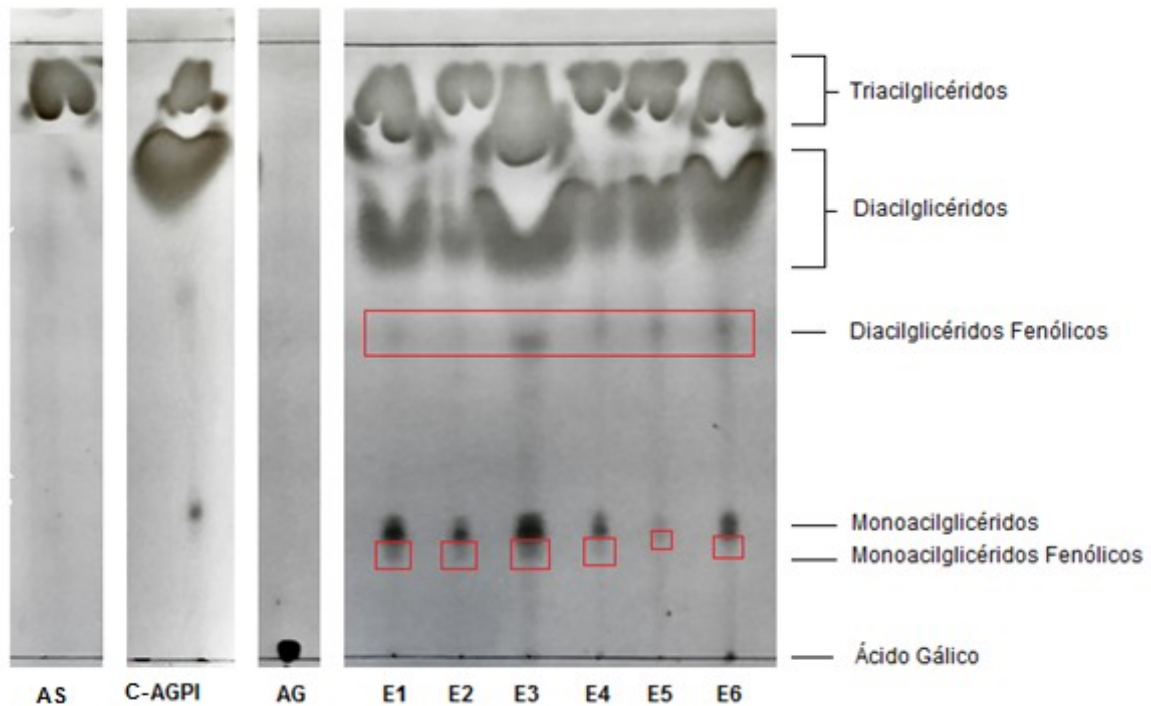


Figura 10. Separación por cromatografía en capa fina de las reacciones de acidólisis enzimática. AS: Aceite de salmón. C-AGPI: Concentrado de aceite de salmón. AG: Ácido gálico. Lípidos estructurados: E1, E2, E3, E4, E5 y E6.

Estos lípidos fenólicos estructurados se esquematizan en la **figura 11** donde “R₁” puede ser cualquier ácido graso del aceite de salmón formando parte de la estructura de sus triacilglicéridos y “R₂” el ácido gálico. La reacción de acidólisis ocurre por la acción de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) quien actúa insertando ácido gálico de manera específica para las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 dando como productos mono o diacilglicéridos fenólicos que se observan de manera cualitativa en el TLC.

Cabe mencionar que a su vez también la enzima puede intercambiar un ácido graso por otro, por lo que hay múltiples reacciones simultáneas que compiten entre sí.

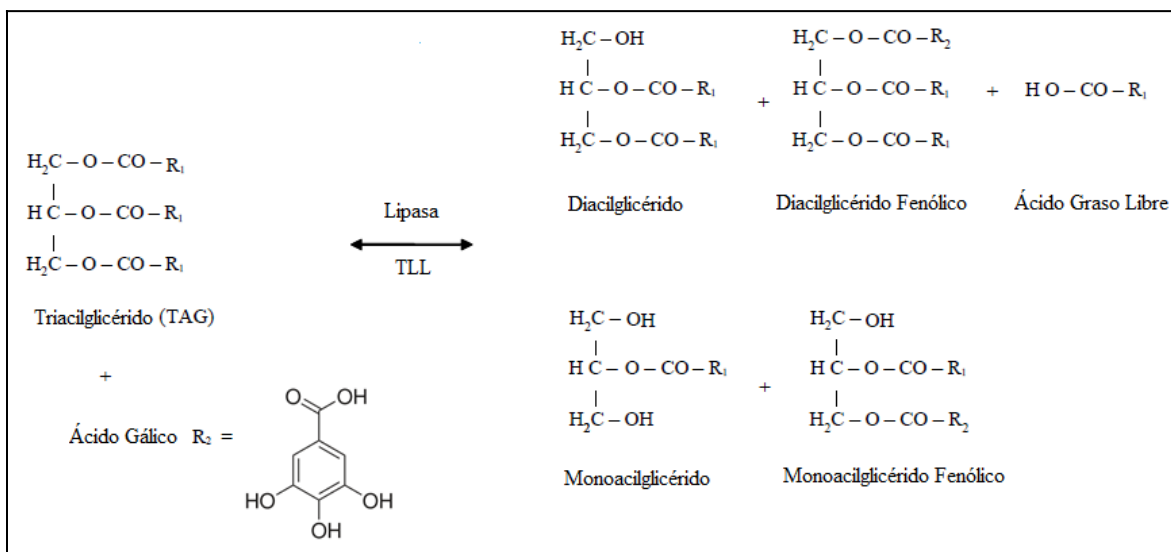


Figura 11. Esquema de las posibles reacciones de acidólisis enzimática de ácido gálico con aceite de salmón. La sustitución de un grupo $-\text{R}_1$ en el glicerol. Acción de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) específica para la hidrólisis en las posiciones sn-1 y sn-3. Fuente: Modificado de Sabally et al., 2007.

6. CONCLUSIONES

La caracterización del AS, a través de los análisis de estabilidad oxidativa como acidez libre, índice de peróxidos, valor de *p*-anisidina, entre otros, mostró valores experimentales dentro de los límites establecidos por el RSA, el CODEX y el GOED; esto indica que es apto para ser utilizado.

Los cromatogramas de elución obtenidos mediante HPLC-UV mostraron *peaks* que presentaron absorbancia a 215 y 280 nm lo que indicaría la formación de productos fenólicos lípidos en todas las reacciones examinadas (E1-E6).

En cuanto al DSC, las muestras E1-6 aumentaron su rango de fusión. Si bien no hubo diferencias significativas ($p \geq 0.05$) para el “*onset*”, sí hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las muestras para el “*endset*” atribuibles a los ácidos grasos libres del C-AGPI y a la incorporación de EPA y DHA a los lípidos estructurados. Además, las muestras de E1-6, comparadas con AS, disminuyeron la temperatura de su *peak* predominante (PPFM₂). Su disminución puede deberse a que se favoreció la unión de AGPICL *n*-3 a los nuevos lípidos estructurados. Todas las muestras, de E1 a E6, perdieron el *peak* PPFM₁, presente solo en AS, lo que indica que hubo reacción de interesterificación (acidólisis y/o transesterificación).

Por otra parte, se pudo separar cualitativamente los lípidos fenólicos producidos (monoacilglicéridos y diacilglicéridos fenólicos), por la reacción de acidólisis enzimática con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico, mediante TLC.

Por último, es posible la incorporación de ácido gálico en lípidos estructurados obtenidos mediante la acidólisis enzimática con la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico.

7. REFERENCIAS

- **Adlercreutz P. (1994).** *Enzyme-catalysed Lipid Modification. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 12:231-254.
- **Akoh C. & Pande G. (2020).** *Structured Lipids and Health. Bailey's Industrial Oil and Fat Products,* 1–17.
- **Alabdulkarim B., Bakeet Z. & Arzoo S. (2012).** *Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health. Journal of King Saud University - Science,* 24(4), 319–329.
- **Andrikopoulos N., Brueschweiler H., Felber H. & Taeschler C. (1991).** *HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. Journal of the American Oil Chemists' Society,* 68(6), 359–364.
- **AOCS. (1993).** *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, 4th edition by AOCS, Champaign, IL. USA.*
- **AOCS. (2009).** *Determination of cis-, trans-, saturated, mono-unsaturated, and polyunsaturated fatty acids in extracted fats by capillary GLC. AOCS Official Method Ce 1j-7. Sampling and analysis of commercial fats and oils.*
- **Arab-Tehrany E., Jacquot M., Gaiani C., Imran M., Desobry S. & Linder M. (2012).** *Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. Trends in Food Science & Technology,* 25(1), 24–33.
- **Aruoma O., Murcia A., Butler J. & Halliwell B. (1993).** *Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 41(11), 1880–1885.
- **Asnaashari M., Farhoosh R. & Sharif A. (2014).** *Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. Food Chemistry,* 159, 439–444.
- **Birch E., Garfield S., Castañeda Y., Highbanks-Wheato, D., Uauy R. & Hoffman D. (2007).** *Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age*

- in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula. Early Human Development, 83(5), 279–284.*
- **Black, H. (1996).** *Supercritical Carbon Dioxide: The “Greener” Solvent. Environmental Science & Technology, 30(3), 124A–127A.*
 - **Calder P. C. (2006).** *n–3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. The American Journal of Clinical Nutrition, 83(6), 1505S–1519S.*
 - **Camacho M., Camacho M. A., Campo M., Gutierrez A., Martín del R. Mateos J., Rodríguez J. (2014).** *Mejoramiento de la producción de la lipasa de Thermomyces lanuginosus en Pichia pastoris empleando el péptido señal j de Saccharomyces cerevisiae. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. Puerto Vallarta, Jalisco, México, pp, 1591.*
 - **Carrilho E., Tavares M. & Lanças F. (2001).** *Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. Química Nova, 24(4), 509-515.*
 - **Cedano J., Rodríguez A. & Siche R. (2016).** *Maximizing content of Omega-3 (EPA and DHA) in the process of enzymatic acidolysis of canola oil and concentrated of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in supercritical CO₂ conditions Scientia Agropecuaria 6: 313–323.*
 - **Chandler I. C. (2001).** *Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. Journal of the American Oil Chemists’ Society, 78(7), 737–742.*
 - **Ciftci D. & Saldaña M. (2012).** *Enzymatic synthesis of phenolic lipids using flaxseed oil and ferulic acid in supercritical carbon dioxide media. The Journal of Supercritical Fluids, 72, 255–262.*
 - **Codex Alimentarius. (2017).** *Codex Draft Standard for Fish Oil. 40th Session of the Codex Alimentarius Committee (CAC40) held in Geneva 17 – 21 July 2017.*

- **Danúbia A., Macedo W., Silva G., Lopes L. & Jaimes E. (2019).** Aplicación y efecto antioxidante del ácido gálico sobre la calidad de semillas de trigo. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(1), 21-30.
- **Demirbaş A. (2000).** *Liquefaction of olive husk by supercritical fluid extraction. Energy Conversion and Management*, 41(17), 1875–1883.
- **Dos Santos M. T., Le Roux G. & Gerbaud V. (2010).** *Phase Equilibrium and Optimization Tools: Application for Enhanced Structured Lipids for Foods. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(2), 223–233.
- **Dovale-Rosabal G., Rodríguez A., Contreras E., Ortiz-Viedma J., Muñoz M., Trigo M., Espinosa A. (2019).** *Concentration of EPA and DHA from Refined Salmon Oil by Optimizing the Urea–Fatty Acid Adduction Reaction Conditions Using Response Surface Methodology. Molecules*, 24(9), 1642.
- **Dwibedy P., Dey G. R., Naik D. B., Kishore, K. & Moorthy, P. N. (1999).** *Pulse radiolysis studies on redox reactions of gallic acid: one electron oxidation of gallic acid by gallic acid–OH adduct. Physical Chemistry Chemical Physics*, 1(8), 1915–1918.
- **EFSA. European Food Safety Authority. (2010).** “*Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including Rancidity*” Parma, Italy. *EFSA Journal* 8(10): 1874
- **Eilander A., Hundscheid D. C., Osendarp S. J., Transler C. & Zock P. L. (2007).** *Effects of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation on visual and cognitive development throughout childhood: A review of human studies. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76(4), 189–203.
- **Fahy E., Subramaniam S., Brown H. A., Glass C. K., Merrill A. H., Murphy R. C. & Dennis E. A. (2005).** *A comprehensive classification system for lipids. European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(5), 337–364.
- **FAO-FINUT. (2012).** *Grasa y ácidos grasos en nutrición humana, consulta de expertos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la*

Agricultura (FAO); Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT).
Publicación reeditada; Granada, España.

- **Fernandez-Lafuente, R. (2010).** *Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(3-4), 197–212.
- **Flachs P., Rossmeisl M., Bryhn M., Kopecky J. (2009).** *Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. Clin Sci (Lond)*, 116 (1): 1–16.
- **Ghasemifard S., Turchini G. M. & Sinclair A. J. (2014).** *Omega-3 long chain fatty acid “bioavailability”: A review of evidence and methodological considerations. Progress in Lipid Research*, 56, 92–108.
- **Gironi F. & Maschietti M. (2006).** *Separation of fish oils ethyl esters by means of supercritical carbon dioxide: Thermodynamic analysis and process modelling. Chemical Engineering Science*, 61(15), 5114–5126.
- **GOED. (2016).** Global Organization for EPA and DHA Omega 3. “Voluntary Monograph”.
- **Hamilton R., Kalu C., McNeill G., Padley F. & Pierce J. (1998).** *Effects of tocopherols, ascorbyl palmitate, and lecithin on autoxidation of fish oil. Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 75(7), 813–822.
- **Heller M., Gemming L., Tung C. & Grant R. (2019).** *Oxidation of fish oil supplements in Australia. International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1–11.
- **Hita E., Robles A., Camacho B., Ramírez A., Esteban L., Jiménez M. J. & Molina E. (2007).** *Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases. Process Biochemistry*, 42(3), 415–422.
- **Huang J. & Sathivel S. (2008).** *Thermal and rheological properties and the effects of temperature on the viscosity and oxidation rate of unpurified salmon oil. Journal of Food Engineering*, 89(2), 105–111.

- **Jacobson T. A. (2008).** *Role of n-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. The American Journal of Clinical Nutrition, 87(6), 1981S–1990S.*
- **Jiao S., Li D., Huang Z., Zhang Z., Bhandari B., Chen X. D. & Mao Z. (2008).** *Optimization of Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Flaxseed Oil Using Response Surface Methodology. International Journal of Food Engineering, 4(4).*
- **Ju Z. & Bramlage W. J. (1999).** *Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. Postharvest Biology and Technology, 16(2), 107–118.*
- **Karamac M., Kosinska A. & Pegg R. B. (2005).** *Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 55(14), 165-169.*
- **Karboune S., St-Louis R. & Kermasha S. (2008).** *Enzymatic synthesis of structured phenolic lipids by acidolysis of flaxseed oil with selected phenolic acids. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 52-53, 96–105.*
- **King J. W. (2004).** *Critical fluid technology for the processing of lipid-related natural products. Comptes Rendus Chimie, 7(6-7), 647–659.*
- **Knez Ž. (2009).** *Enzymatic reactions in dense gases. The Journal of Supercritical Fluids, 47(3), 357–372.*
- **Knothe G. & Dunn R. O. (2009).** *A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. Journal of the American Oil Chemists' Society, 86(9), 843–856.*
- **Kolanowski W. & Laufenberg G. (2005).** *Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. European Food Research and Technology, 222(3-4), 472–477.*
- **Kolanowski W. (2010).** *Omega-3 LC PUFA Contents and Oxidative Stability of Encapsulated Fish Oil Dietary Supplements. International Journal of Food Properties, 13(3), 498–511.*

- **Landines P. & Zambrano N. (2009).** La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental. RIAA* 0(1)2009: 13-22.
- **Lembke P. (2012).** *Production Techniques for Omega-3 Concentrates. Omega-6/3 Fatty Acids*, 353–364.
- **Lin T.-J., Chen S.-W. & Chang A.-C. (2006).** *Enrichment of n-3 PUFA contents on triglycerides of fish oil by lipase-catalyzed trans-esterification under supercritical conditions. Biochemical Engineering Journal*, 29(1-2), 27–34.
- **Lin, T.-J. & Chen S.-W. (2008).** *Enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids into acylglycerols of borage oil via lipase-catalyzed reactions under supercritical conditions. Chemical Engineering Journal*, 141(1-3), 318–326.
- **Lu Z., Nie G., Belton P. S., Tang H. & Zhao B. (2006).** *Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. Neurochemistry International*, 48(4), 263–274.
- **Mariod A. A., Abdelwahab S. I., Gedi M. A. & Solati Z. (2010).** *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Sorghum Bug (Agonoscelis Pubescens) Oil Using Response Surface Methodology. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(8), 849–856.
- **Mori T. A. & Beilin L. J. (2004).** *Omega-3 fatty acids and inflammation. Current Atherosclerosis Reports*, 6(6), 461–467.
- **Nanton D. A., Vegusdal A., Rørå A. M. B., Ruyter B., Baeverfjord G. & Torstensen B. E. (2007).** *Muscle lipid storage pattern, composition, and adipocyte distribution in different parts of Atlantic salmon (Salmon Salar) fed fish oil and vegetable oil. Aquaculture*, 265(1-4), 230–243.
- **Pando M. (2017).** “Síntesis de triacilglicerol a partir de AGPICL n-3 EPA y DHA de belly de trucha arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) y ácido caprílico catalizado por la lipasa de *Thermomyces Lanuginosus* bajo CO₂ supercrítico”. Tesis para optar al grado de Doctor en Nutrición y Alimentos. 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, Universidad de Chile. 41-42.

- **Pando M., Rodríguez A., Galdames A., Berríos M.M., Rivera M., Romero N., Valenzuela M.A., Ortiz J., Aubourg S. (2018)** *Maximization of the docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids content in concentrates obtained from a by-product of rainbow trout (Oncorhynchus Mykiss) processing. Eur. Food Res. Technol. 2018, 244, 937–948.*
- **Paquot C. & Hanuntfenne A. (1987).** *IUPAC standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. Blackwell Scientific Publication Ltd., pp. 143–148.*
- **Pike I. H. & Jackson A. (2010).** *Fish oil: production and use now and in the future. Lipid Technology, 22(3), 59–61.*
- **Rajan V. K. & Muraleedharan K. (2017).** *A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. Food Chemistry, 220, 93–99.*
- **Rojas C. (2013).** Calorimetría diferencial de barrido en concentrados de ω -3 EPA y DHA de aceite de *belly*. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 42-43.
- **Rodríguez A., Castro E., Salinas M.C., López R. & Miranda M. (2001)** *Interesterification tallow and sunflower oil Journal of the American Oil Chemists' Society, 78(4), 431–436.*
- **Rousseau D., Forestière K., Hill A. R. & Marangoni A. G. (1996).** *Restructing butterfat through blending and chemical interesterification. 1. Melting behavior and triacylglycerol modifications. Journal of the American Oil Chemists' Society, 73(8), 963–972.*
- **RSA. (2019).** Reglamento sanitario de los alimentos. Ministerio de Salud, Chile. Mayo 2019. 128-129.
- **Sabally K., Karboune S., St-Louis R. & Kermasha S. (2007).** *Lipase-catalyzed synthesis of phenolic lipids from fish liver oil and dihydrocaffeic acid. Biocatalysis and Biotransformation, 25(2-4), 211–218.*

- **Sabally K., Karboune S., St-Louis R. & Kermasha, S. (2006) a.** *Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids. Journal of Biotechnology, 127(1), 167–176.*
- **Sabally K., Karboune S., St-Louis R., & Kermasha S. (2006) b.** *Lipase-catalyzed transesterification of trilinolein or trilinolenin with selected phenolic acids. Journal of the American Oil Chemists' Society, 83(2), 101–107.*
- **Saeki K., Yuo A., Isemura M., Abe I., Seki T. & Noguchi H. (2000).** *Apoptosis-Inducing Activity of Lipid Derivatives of Gallic Acid. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 23(11), 1391–1394.*
- **Sastry P. S. (1985).** *Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. Progress in Lipid Research, 24(2), 69–176.*
- **Sathivel S. (2001).** *Production, Process Design and Quality Characterization of Catfish Visceral Oil. Ph.D. Dissertation, Louisiana State University, Baton Rouge.143.*
- **Sathivel S. (2005).** *Thermal and flow properties of oils from salmon heads. Journal of the American Oil Chemists' Society, 82(2), 147–152.*
- **Schmid U., Bornscheuer U. T., Soumanou M. M., McNeill G. P. & Schmid R. D. (1998).** *Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75(11), 1527–1531.*
- **Schuchardt J. P. & Hahn A. (2013).** *Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 89(1), 1–8.*
- **Serrano A., Palacios C., Roy G., Cespón C., Villar M. L., Nocito M. & González-Porqué P. (1998).** *Derivatives of Gallic Acid Induce Apoptosis in Tumoral Cell Lines and Inhibit Lymphocyte Proliferation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 350(1), 49–54.*
- **Shieh C.-J., Akoh C. C. & Koehler P. E. (1995).** *Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids. Journal of the American Oil Chemists' Society, 72(6), 619–623.*

- **Simopoulos A. P. (2002).** *Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. Journal of the American College of Nutrition, 21(6), 495–505.*
- **Simopoulos A. P. (2009).** *Evolutionary Aspects of the Dietary Omega–6: Omega–3 Fatty Acid Ratio: Medical Implications. A Balanced Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio, Cholesterol and Coronary Heart Disease, 1–21.*
- **Sinclair A., Begg D., Mathai M. & Weisinger R. (2007).** *Omega 3 fatty acids and the brain: review of studies in depression, Asia Pacific journal of clinical nutrition, vol. 16, no. S1, pp. S391-S397.*
- **Tan C. & Che Man Y. (2002).** *Differential scanning calorimetric analysis of palm oil, palm oil based products and coconut oil: effects of scanning rate variation. Food Chemistry, 76(1), 89–102.*
- **Tapiero H., Nguyen Ba G., Couvreur P. & Tew K. (2002).** *Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. Biomedicine & Pharmacotherapy, 56(5), 215–222.*
- **Tocher D., Betancor M., Sprague M., Olsen R. & Napier J. (2019).** *Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids, EPA and DHA: Bridging the Gap between Supply and Demand. Nutrients, 11(1), 89.*
- **Trautwein E. (2001).** *n-3 Fatty acids — physiological and technical aspects for their use in food. European Journal of Lipid Science and Technology, 103(1), 45–55.*
- **Valenzuela A. & Sanhueza J. (2008).** *Estructuración de lípidos y sustitutos de grasas, ¿lípidos del futuro? Revista Chilena de Nutrición, 35(4).*
- **Valenzuela A., Sanhueza J. & Nieto S. (2002).** *El uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. Revista Chilena de Nutrición; 29(2):106-114.*
- **Valenzuela B. R., Tapia G., González M. & Valenzuela B. A. (2011).** *Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. Revista Chilena de Nutrición, 38(3), 356–367.*

8. ANEXOS

Anexo 1. Composición ácidos grasos para distintos tipos de aceites marinos. Determinados mediante cromatografía líquida-gaseosa. Expresados como porcentaje del total de ácidos grasos. Fuente: CODEX, 2017.

Fatty acids	Anchovy (Section 2.1.1)	Tuna (Section 2.1.2)	Krill (Section 2.1.3)	Menhaden (Section 2.1.4)	Salmon (Section 2.1.5)		Cod Liver (Section 2.3.1)
					Wild	Farmed	
C14:0 myristic acid	2.7-11.5	ND-5.0	5.0-13.0	8.0-11.0	2.0-5.0	1.5-5.5	2.0-5.0
C15:0 pentadecanoic acid	ND-1.5	ND-2.0	NA	ND-1.0	ND-1.0	ND-0.5	ND-0.5
C16:0 palmitic acid	13.0-22.0	14.0-24.0	17.0-24.6	18.0-20.0	10.0-16.0	6.5-12.0	7.0-14.0
C16:1 (n-7) palmitoleic acid	4.0-12.6	ND-12.5	2.5-9.0	9.0-13.0	4.0-6.0	2.0-5.0	4.5-11.5
C17:0 heptadecanoic acid	ND-2.0	ND-3.0	NA	ND-1.0	ND-1.0	ND-0.5	NA
C18:0 stearic acid	1.0-7.0	ND-7.5	NA	2.5-4.0	2.0-5.0	2.0-5.0	1.0-4.0
C18:1 (n-7) vaccenic acid	1.7-3.7	ND- 7.0	4.7-8.1	2.5-3.5	1.5-2.5	NA	2.0-7.0
C18:1 (n-9) oleic acid	3.6-17.0	10.0-25.0	6.0-14.5	5.5-8.5	8.0-16.0	30.0-47.0	12.0-21.0
C18:2 (n-6) linoleic acid	ND-3.5	ND-3.0	ND-3.0	2.0-3.5	1.5-2.5	8.0-15.0	0.5-3.0
C18:3 (n-3) linolenic acid	ND-7.0	ND-2.0	0.1-4.7	ND-2.0	ND-2.0	3.0-6.0	ND-2.0
C18:3 (n-6) γ-linolenic acid	ND-5.0	ND-4.0	NA	ND-2.5	ND-2.0	ND-0.5	NA
C18:4 (n-3) stearidonic acid	ND-5.0	ND-2.0	1.0-8.1	1.5-3.0	1.0-4.0	0.5-1.5	0.5-4.5
C20:0 arachidic acid	ND-1.8	ND-2.5	NA	0.1-0.5	ND-0.5	0.1-0.5	NA
C20:1 (n-9) eicosenoic acid	ND-4.0	ND-2.5	NA	ND-0.5	2.0-10.0	1.5-7.0	5.0-17.0
C20:1 (n-11) eicosenoic acid	ND-4.0	ND-3.0	NA	0.5-2.0	NA	NA	1.0-5.5
C20:4 (n-6) arachidonic acid	ND-2.5	ND-3.0	NA	ND-2.0	0.5-2.5	ND-1.2	ND-1.5
C20:4 (n-3) eicosatetraenoic acid	ND-2.0	ND-1.0	NA	NA	1.0-3.0	0.5-1.0	ND-2.0
C20:5 (n-3) eicosapentaenoic acid	5.0-26.0	2.5-9.0	14.3-28.0	12.5-19.0	6.5-11.5	2.0-6.0	7.0-16.0
C21:5 (n-3) heneicosapentaenoic acid	ND-4.0	ND-1.0	NA	0.5-1.0	ND-4.0	NA	ND-1.5
C22:1 (n-9) erucic acid	ND-2.3	ND-2.0	ND-1.5	0.1-0.5	ND-1.5	3.0-7.0	ND-1.5
C22:1 (n-11) cetoleic acid	ND-5.6	ND-1.0	NA	ND-0.1	1.0-1.5	NA	5.0-12.0
C22:5 (n-3) docosapentaenoic acid	ND-4.0	ND-3.0	ND-0.7	2.0-3.0	1.5-3.0	1.0-2.5	0.5-3.0
C22:6 (n-3) docosahexaenoic acid	4.0-26.5	21.0-42.5	7.1-15.7	5.0-11.5	6.0-14.0	3.0-10.0	6.0-18.0

ND = non-detect, defined as $\leq 0.05\%$
NA = not applicable or available