

**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 CO<sub>2</sub> SUPERCRÍTICO.**

Gutiérrez D.<sup>1</sup>, Dovale-Rosabal G.<sup>1</sup>, Rodríguez A.<sup>1</sup>, Espinosa A.<sup>2</sup>, Romero N.<sup>1</sup>, Valenzuela R.<sup>3</sup>, Aubourg S.P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. arodrigm@uchile.cl. <sup>2</sup>Departamento de Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. <sup>3</sup>Departamento de Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC, Vigo, España.

**Antecedentes**

Existe evidencia consistente de que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL n-3) eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA), disminuyen el riesgo de enfermedades cardíacas, circulatorias e inflamatorias. El EPA presenta un relevante rol cardio protector, mientras que el DHA participa en el desarrollo del sistema nervioso central y visual, durante la vida intrauterina y los primeros años de vida. A diferencia de otras especies el hombre posee una limitada capacidad para producir EPA y DHA, por lo que la principal fuente de estos ácidos grasos sea a través de la dieta (FAO-FINUT, 2012; Akoh & Pande, 2020; Jacobson, 2008; Flachs *et al.*, 2009). Por otra parte, el Ácido Gálico (AG) es un fuerte antioxidante natural que actúa mediante la eliminación de radicales libres (Aruoma *et al.*, 1993; Dwibedy *et al.*, 1999). Este ha demostrado ser un fuerte antioxidante en emulsiones y matrices lipídicas (Asnaashari *et al.*, 2014). El uso de la enzima *Thermomyces lanuginosus* (TLL) resguarda el EPA y DHA ya presente naturalmente en posición sn-2 en el aceite marino, pero puede insertar nuevos AGPICL n-3 y ácidos fenólicos en las posiciones sn-1,3. Además, la utilización de CO<sub>2</sub> supercrítico como medio de biocatálisis tiene varias ventajas. De las cuales se incluyen altas difusividades, bajas viscosidades que mejoran las tasas de transferencia de masa de sustratos a sitios activos de enzimas, otorga un medio no oxidante y posee una temperatura crítica (31,05°C) adecuada para el tratamiento de aceites (Black, 1996; Knez, 2009). Por lo cual, la incorporación de ácido gálico a los TAGs puede producir nuevos lípidos fenólicos estructurados, con los potenciales beneficios de ambos compuestos.

**Objetivos**

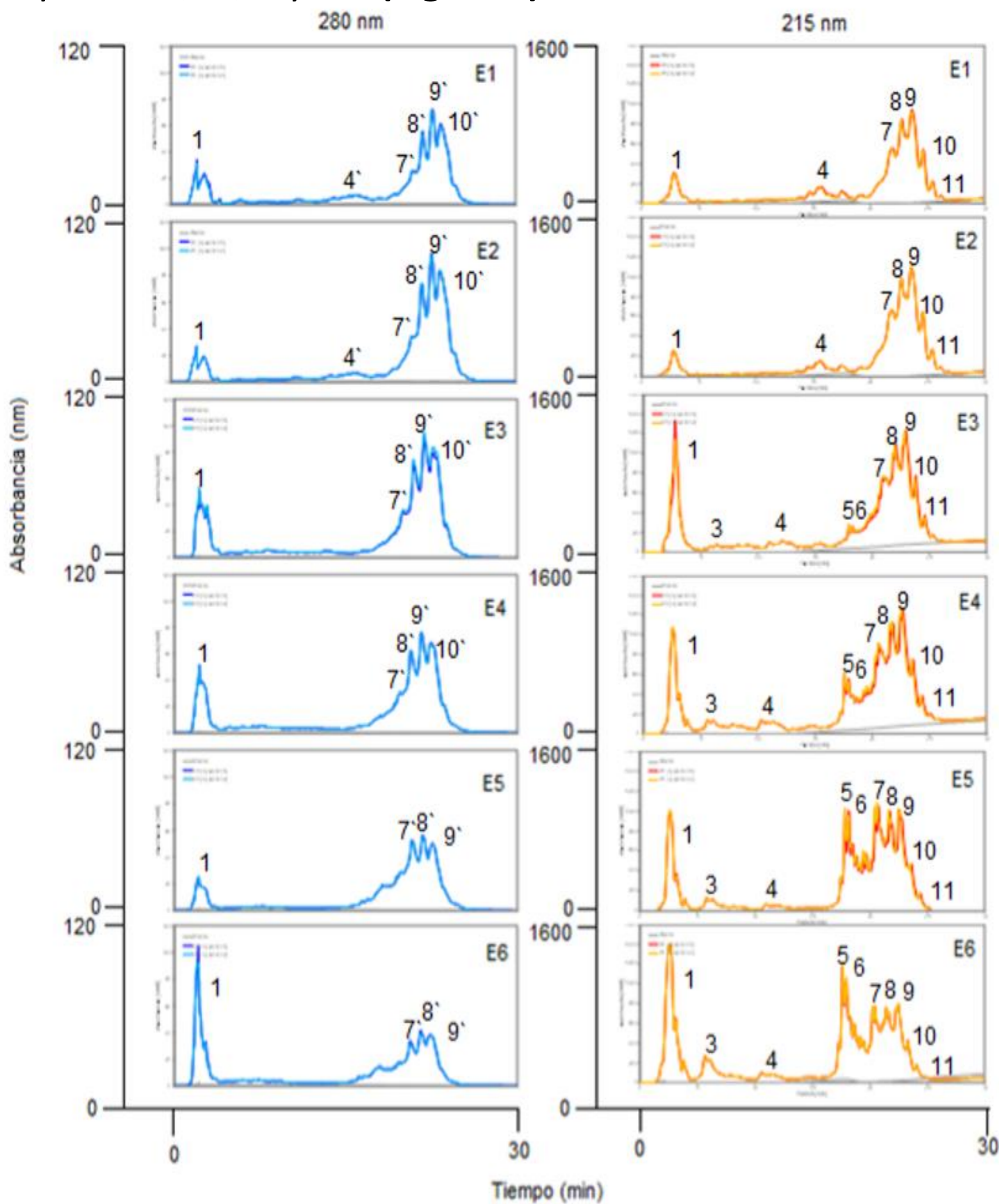
El objetivo de este estudio fue sintetizar lípidos fenólicos por acidólisis enzimática de aceite de salmón (AS), concentrados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 (EPA+DHA) de AS (y ácido gálico (AG) catalizada por la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) bajo dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>SC).

**Métodos**

Se utilizó un diseño factorial de cuatro corridas experimentales con dos repeticiones en el punto central variando la proporción de AS/C-AGPICL (g/g) y Presión CO<sub>2</sub>SC. La acidólisis enzimática se realizó en el equipo de CO<sub>2</sub>SC Spe-edTM SFE Applied Separation en una columna de acero inoxidable, donde se introdujeron los sustratos de la reacción y la enzima. La caracterización de los productos lipídicos formados fue analizada por: I. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV), II. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y III. Cromatografía de capa fina (TLC).

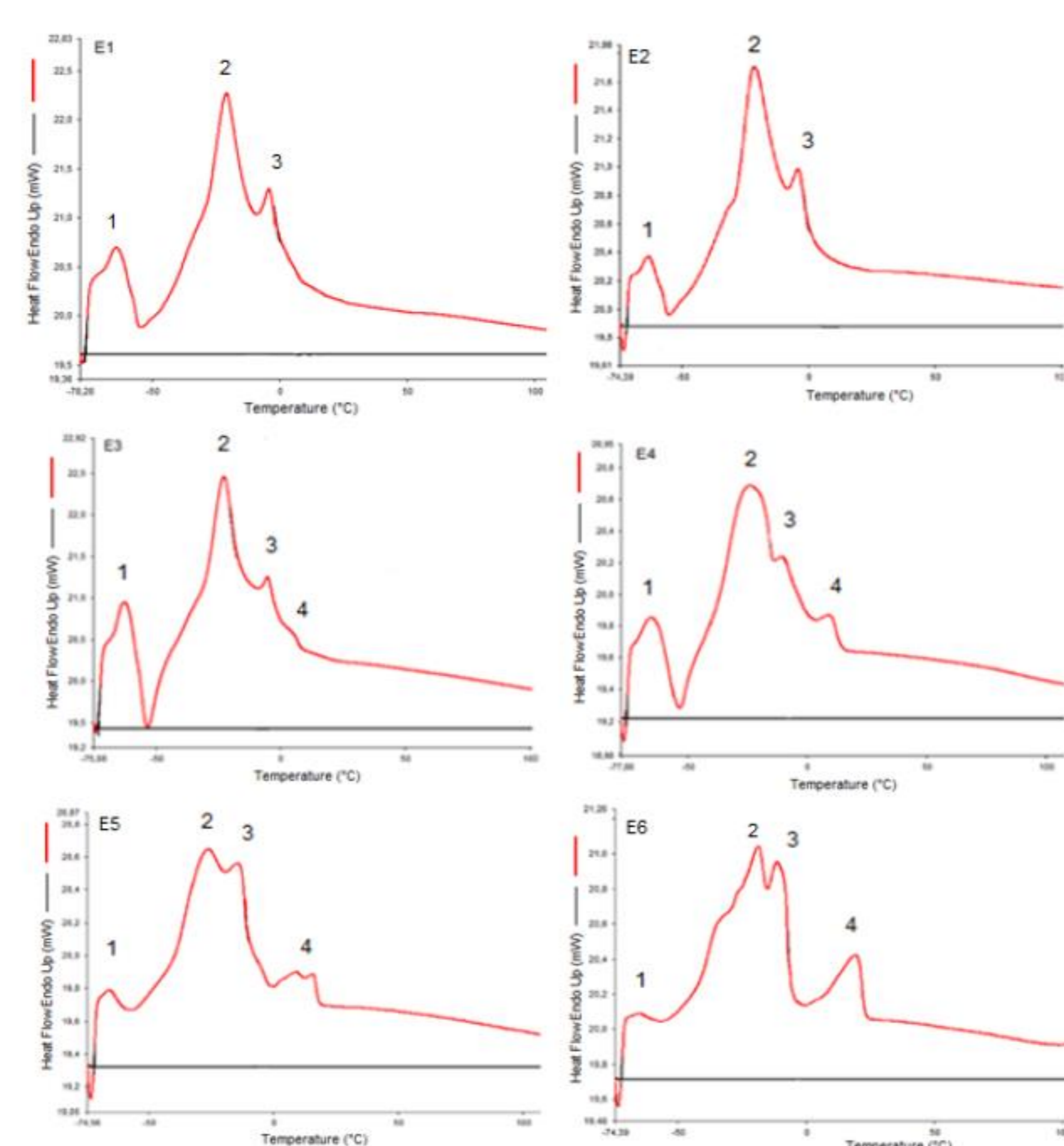
**Resultados**

**I. HPLC-UV.** Los peaks 7, 8, 9, 10 y 11 observados a 215 nm corresponderían a diferentes TAGs presentes en el aceite de salmón. La confirmación de la formación de acidólisis se estableció al comparar los cromatogramas obtenidos a 215 y 280 nm, puesto que la incorporación de AG proporciona la capacidad de absorción a 280 nm, de esta forma los peaks 7', 8', 9' y 10' (Figura 4).



**Figura 4.** Cromatogramas de HPLC a 280 y 215 nm de las muestras de reacción de acidólisis enzimática E1-6

**II. DSC.** Rango de fusión determinado en aceite de salmón (AS), concentrado de aceite de salmón (C-AGPI) y las muestras de reacciones de acidólisis enzimática E1-6.

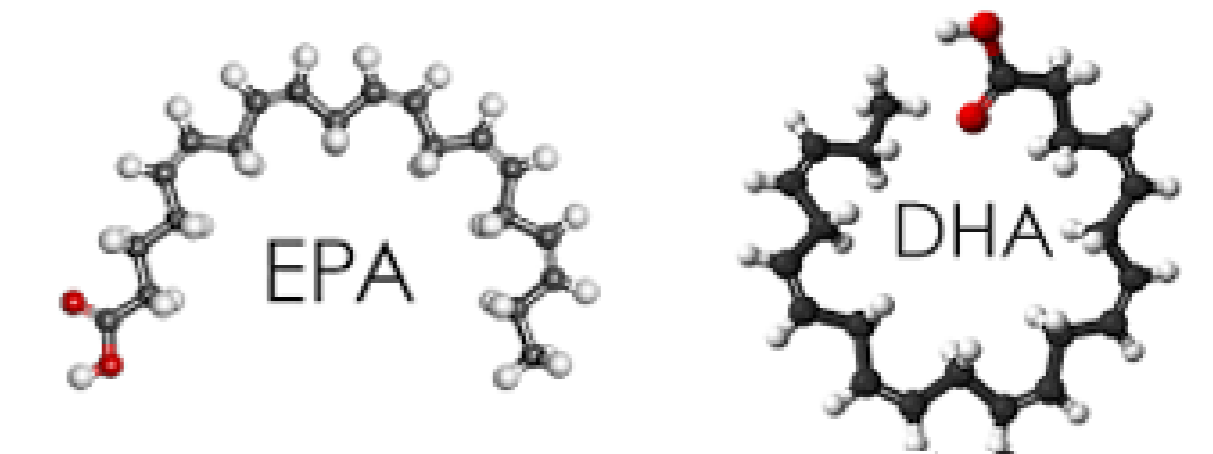


**Figura 5.** Termogramas de perfil de fusión por DSC de E1-E6. Los peaks indentificados en los termogramas correspondieron a: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

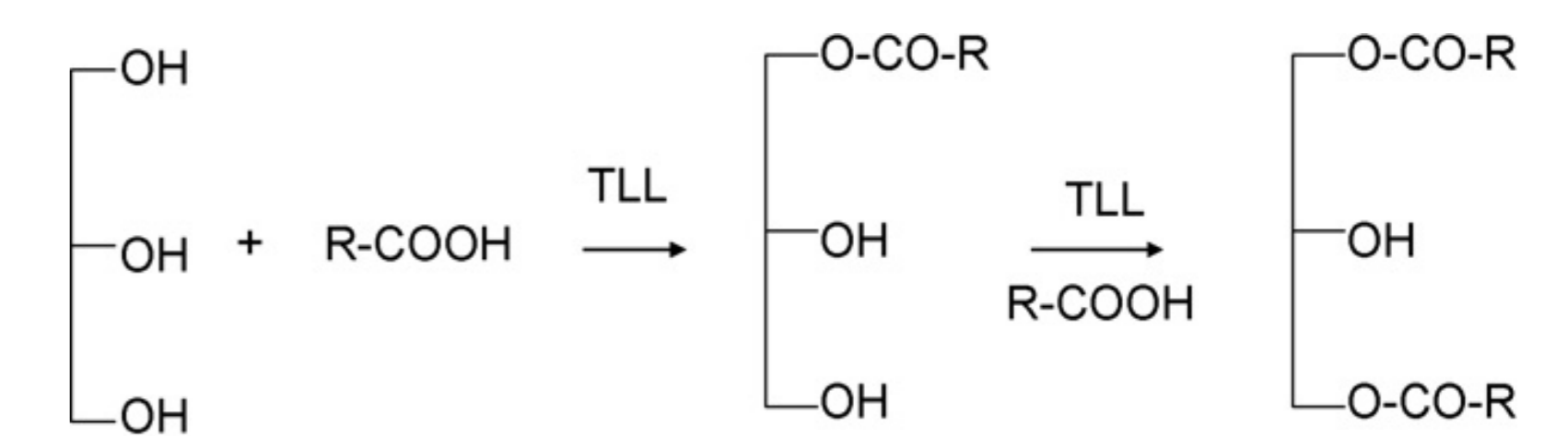
**ONSET:** en todas las curvas de fusión comenzaron a fundir a temperaturas bajo los -70 °C, sin diferencias significativas  $p \geq 0.05$ . Fue levemente mejor a lo reportado por otros estudios. **ENDSET:** lípidos estructurados E1-6, aumentaron respecto al AS. Dos Santos *et al.*, (2010) que observó en lípidos estructurados que el EPA, DHA y AA expanden el rango de fusión en ambos sentidos. 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 CO<sub>2</sub>SC (bar) influyeron. **C-AGPI** posee un rango de fusión más amplio de 33,4 °C que se le atribuye a la formación de AGL después de su C. con urea, como: **11-Eicosanoico**

**Conclusiones**

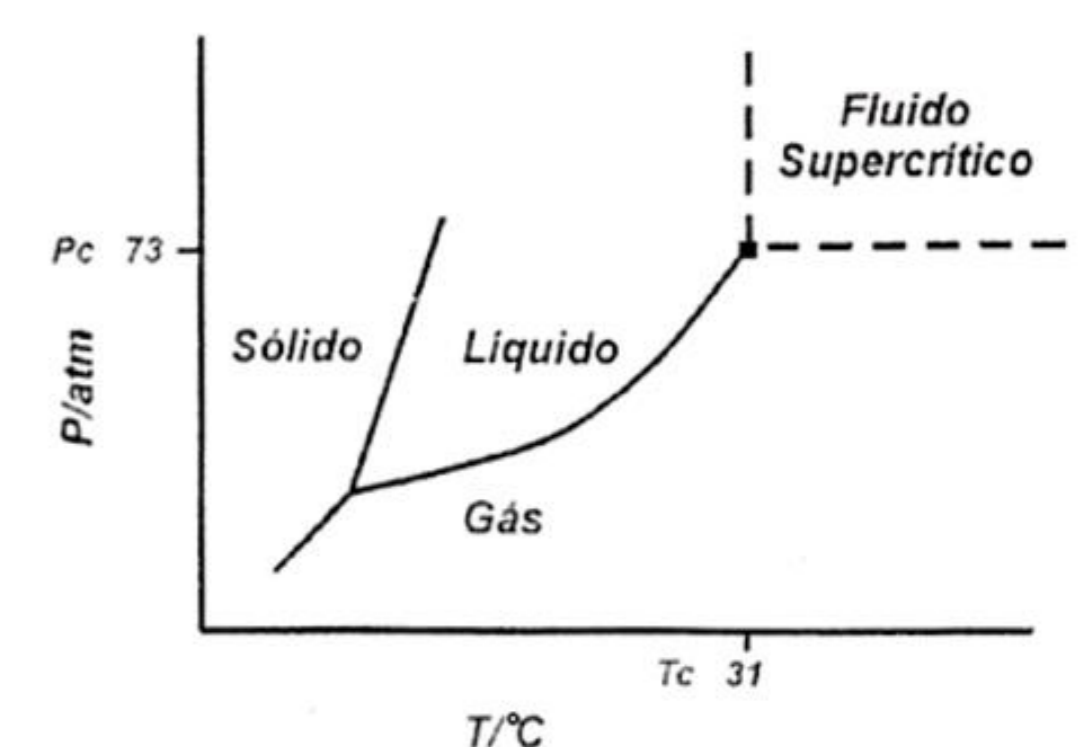
Los cromatogramas de HPLC para todas las muestras de reacción sugirieron formación de lípidos fenólicos. En cuanto al DSC, las muestras aumentaron su rango de fusión y presentaron diferencias significativas entre las muestras para el "endset" ( $p \leq 0.05$ ) atribuibles a los ácidos grasos del C-AGPICL y a la incorporación de EPA y DHA a los lípidos estructurados. Además, las muestras, comparadas con el aceite de salmón 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. Se pudo separar cualitativamente los lípidos fenólicos producidos (monoacilglicéridos y diacilglicéridos fenólicos) mediante TLC. Estos hallazgos evidenciaron la formación de un nuevo lípido con EPA/DHA y ácido gálico en su estructura, mediante una acidólisis enzimática catalizada por la lipasa de TLL bajo condiciones CO<sub>2</sub>SC.



**Figura 1.** Consumo recomendado por la FAO para adultos: 250 mg/d de EPA + DHA



**Figura 2.** Reacción de acidólisis enzimática. Lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, específica para las posiciones sn-1,3. Fuente: Fernández-Lafuente, 2010.



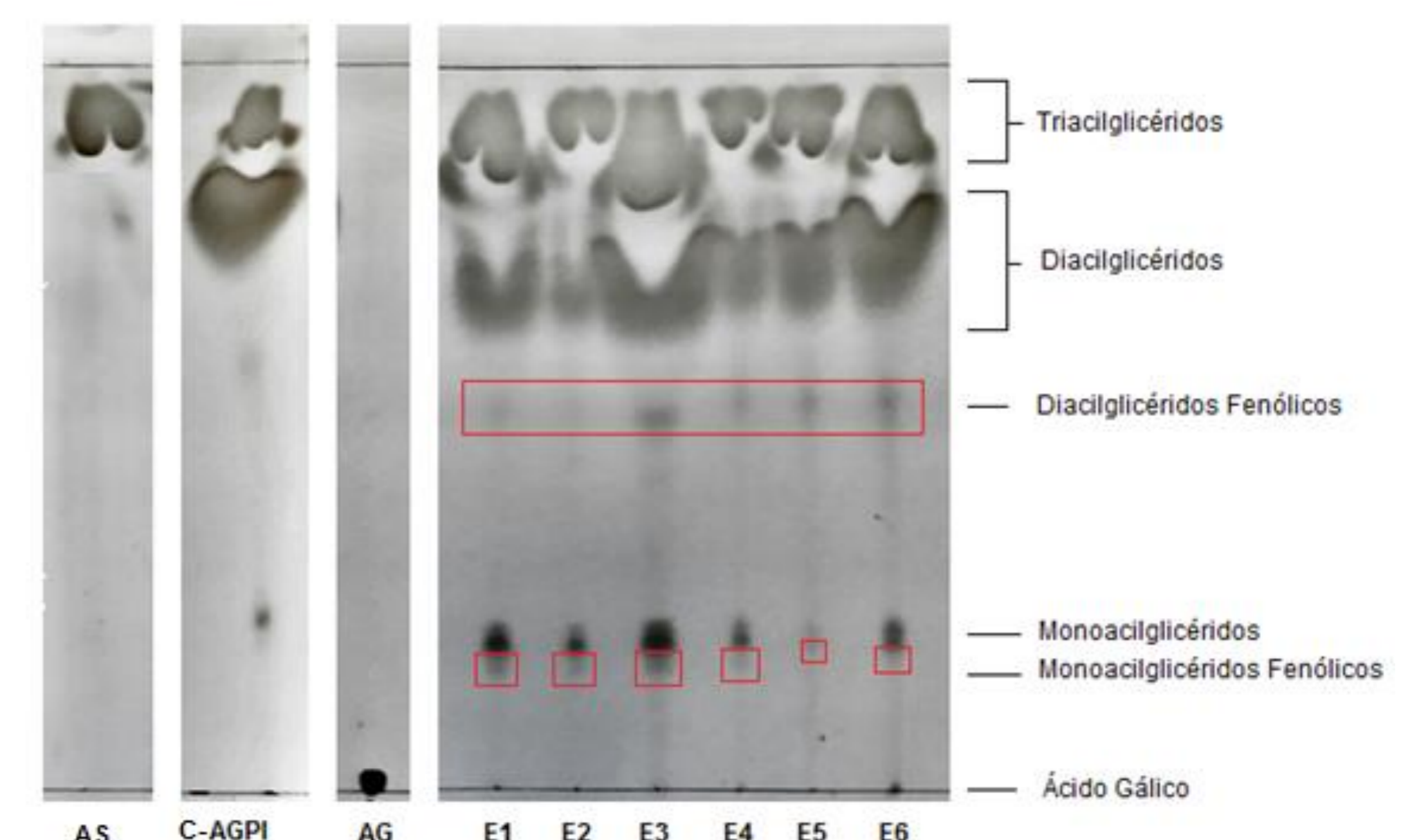
**Figura 3.** Diagrama presión / temperatura CO<sub>2</sub>. T<sub>c</sub>: Temperatura crítica y P<sub>c</sub>: Presión crítica. Fuente: Carrilho *et al.*, 2001.

C20:1 11c (24 a 25 °C), **Palmitelaídico** C16:1 9t (32,2 °C) o **8-Eicosanoico** C20:1 8c (34,1 a 35,1 °C).

**Tabla 1.** Rango de fusión determinado en aceite de salmón (AS), concentrado de aceite de salmón (C-AGPI), las muestras de reacciones de acidólisis enzimática.

Exp	Rango de Fusión (°C)	
	Onset de Fusión (°C)	Endset de Fusión (°C)
E1	-74,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	6,3 ± 0,0 <sup>b</sup>
E2	-73,4 ± 2,2 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,4 <sup>ab</sup>
E3	-75,2 ± 2,7 <sup>a</sup>	19,9 ± 1,2 <sup>c</sup>
E4	-73,1 ± 2,7 <sup>a</sup>	20,0 ± 1,3 <sup>c</sup>
E5	-74,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	20,0 ± 0,5 <sup>c</sup>
E6	-72,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	23,4 ± 0,4 <sup>d</sup>
AS	-72,5 ± 2,5 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,5 <sup>a</sup>
C-AGPI	-75,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	33,4 ± 0,0 <sup>e</sup>

**III. TLC.** Al igual que Sabally *et al.*, (2007), el orden de elusión de arriba hacia abajo fue: triacilglicéridos, diacilglicéridos, diacilglicéridos fenólicos, monoacilglicéridos, monoacilglicéridos fenólicos y ácido fenólico. Los resultados mostraron que los monoacilglicéridos y diacilglicéridos fenólicos migraron más lentamente que sus correspondientes acilgliceroles, que podría deberse la mayor polaridad de los lípidos.



**Figura 6.** 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.

