

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

**Esterificación Enzimática del Ácido Linoleico n-6 y
Linolénico n-3 del Aceite de Canola para Obtener
Acilgliceroles con AGPI**

TESIS

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Especialidad Análisis Clínicos

Presenta **1942**

Aurora Onofre Sestiaga

H. CABORCA, SONORA

JUNIO 2010

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por proveer de equipos y reactivos necesarios para este proyecto.

Al Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, por dirigirme y encaminarme a terminar este trabajo, por confiar en mí, por todas sus enseñanzas.

Al Maestro en Ciencias Ramón Efraín Lugo Sepúlveda, por su dedicación y entrega en clases, por compartir su sabiduría y ser paciente conmigo y por su comprensión.

Al Maestro en Ciencias José Jesús García Nogales por sus útiles consejos en este trabajo.

Al Dr. César Márquez Beltrán, por su disposición para solucionar problemas, aportando su valioso tiempo y conocimientos a este trabajo.

A todos los maestros que me impartieron clases en esta institución Humberto Leyva, Rafael de la Rosa, Eligio Espinoza Ojeda, Elvia Janeth Martínez, Carmelita García Moraga, Axel Moraga, Idalia Sotelo, Jesús Ortega, Luis Arturo Ortega, Carmelita Sotelo, Germán Arias, Epifanio Fox, Leticia León Godínez, que sigan enriqueciendo sus conocimientos y fomenten el interés académico en sus estudiantes.

DEDICATORIA

Al hombre más maravilloso que conozco, mi padre César Guadalupe, por dedicarnos su vida a mí y a mis hermanos, por aconsejarme con sus sabias palabras, educarme de una manera tan inteligente, apoyarme en todas mis decisiones y por la confianza que depositó en mí. Por enseñarme a luchar para lograr mis metas en la vida.

A mi madre María Rita por apoyarme en cualquier momento y por demostrarme su cariño siempre a pesar de la distancia.

A Isabel por ocupar un lugar tan importante en mi vida durante mi infancia, por su paciencia, cuidados y tiempo.

A mis hermanos: César Guadalupe, Hortensia Guadalupe y Víctor Edgardo, por alegrarme con su inocencia, por su cariño y por hacerme saber que siempre contaré con ellos.

A mi abuela Aurora, mis tíos y tías; Eleazar, Francisco, Esther, Juan Manuel, Isauro y su esposa Araceli, Isabel, Felipe por estar en todos los momentos importantes de mi vida, por demostrarme que nunca estuve sola siempre los tuve a ellos, muy en especial a mi tía María Jesús que con sus regaños, correcciones y consejos me enseñó a mejorar mis acciones y actitudes.

A mis primas y primos por compartir grandes momentos conmigo.

A Lis Yerania y José Adrián Villanes, así como Diana Espinoza Gámez por ser tan perseverantes, por nuestra amistad.

CONTENIDO

| | Página |
|-------------------------------------|---------------|
| CONTENIDO..... | iii |
| LISTA DE TABLAS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS..... | ix |
| NOMENCLATURA..... | x |
| ABREVIATURAS..... | xi |
| RESUMEN..... | xiii |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| OBJETIVOS..... | 4 |
| Objetivo general..... | 4 |
| Objetivos particulares..... | 4 |
| ANTECEDENTES..... | 5 |
| Lípidos..... | 6 |
| Clasificación..... | 8 |
| Acilgliceroles..... | 11 |
| Ácidos grasos..... | 11 |
| Ácidos grasos esenciales (AGE)..... | 13 |

| | |
|--|----|
| Ácido linoleico (AL n-6)..... | 15 |
| Ácido linolénico (ALN n-3)..... | 16 |
| Metabolismo de triacilgliceroles y ácidos grasos..... | 18 |
| Digestión y absorción de TAG..... | 18 |
| Metabolismo endógeno de ácidos grasos libres..... | 20 |
| Biosíntesis de osmoreguladores..... | 24 |
| Síntesis de eicosanoides..... | 25 |
| Ciclooxygenasas..... | 27 |
| Lipooxigenasa..... | 28 |
| Prostaglandinas..... | 28 |
| Tromboxanos..... | 29 |
| Leucotrienos..... | 30 |
| Prostaciclina..... | 30 |
| Efectos en la salud de AGPI y derivados eicosanoides..... | 33 |
| Presión sanguínea..... | 33 |
| Inflamación..... | 33 |
| Trombosis..... | 35 |
| Cáncer..... | 35 |
| Triacilgliceroles y lipoproteínas en suero y plasma..... | 36 |
| Obesidad..... | 36 |
| Enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares..... | 38 |
| Participación de AA y DHA en la formación del sistema nervioso y visual..... | 38 |
| Ingesta de ácidos grasos esenciales..... | 40 |
| Requerimientos nutrimentales y relación de las familias n-6 y n-3.... | 40 |

| | |
|--|----|
| Fuentes de ácidos grasos esenciales..... | 43 |
| Marinas..... | 43 |
| Microalgas..... | 43 |
| Pescado..... | 44 |
| Vegetales..... | 44 |
| Canola..... | 45 |
| Biotecnológicas..... | 48 |
| Bacterias..... | 48 |
| Hongos..... | 48 |
| Operaciones químicas unitarias..... | 49 |
| Aislamiento e identificación de ácidos grasos..... | 49 |
| Hidrólisis química alcalina..... | 50 |
| Cristalización con urea..... | 50 |
| Esterificación..... | 53 |
| Lípidos estructurados..... | 53 |
| Biocatálisis enzimática..... | 54 |
| Lipasas..... | 55 |
| Esterificación enzimática..... | 57 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 58 |
| Materiales..... | 58 |
| Materia prima..... | 58 |
| Enzima..... | 58 |
| Reactivos..... | 59 |
| Equipos..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Procedimientos experimentales..... | 60 |
| Obtención de ácidos grasos por Hidrólisis química alcalina..... | 60 |
| Concentración de AGPI por Cristalización con urea..... | 61 |
| Esterificación enzimática..... | 62 |
| Análisis de materia prima y productos..... | 64 |
| Rendimiento en la obtención de AGPI..... | 64 |
| Grado de esterificación (GE)..... | 65 |
| Cromatografía en placa HPTLC..... | 65 |
| Diseño de experimentos..... | 67 |
| Efecto de las variables en esterificación enzimática..... | 67 |
| Optimización de variables para esterificación enzimática..... | 70 |
| Cinética de esterificación..... | 70 |
| Formación de acil-gliceroles..... | 71 |
| RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 72 |
| Aislamiento y concentración de AGPI..... | 72 |
| Aislamiento Ácidos grasos..... | 72 |
| Concentración de AGPI..... | 72 |
| Grado de esterificación..... | 76 |
| Efecto de las variables en el grado de esterificación..... | 78 |
| Efecto de proporción molar..... | 78 |
| Efecto de temperatura..... | 78 |
| Efecto del tiempo..... | 79 |
| Cinética de esterificación..... | 79 |
| Formación de acilgliceroles..... | 81 |

| | |
|--|----|
| Formación de monoacilgliceroles (MAG)..... | 81 |
| Formación de diacilgliceroles (DAG)..... | 81 |
| Formación de triacilgliceroles (TAG)..... | 82 |
| Optimización de la esterificación..... | 85 |
| Análisis de superficie de respuesta..... | 85 |
| Condiciones óptimas de reacción..... | 88 |
| CONCLUSIONES..... | 90 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 91 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| 1 | Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de ácidos grasos esenciales..... | 42 |
| 2 | Distribución porcentual de ácidos grasos en aceites de consumo..... | 46 |
| 3 | Arreglo general para el diseño de composición central rotatable (DCC)..... | 68 |
| 4 | Variables y niveles para DCC..... | 69 |
| 5 | Balance de materiales en el proceso de hidrólisis química alcalina..... | 73 |
| 6 | Balance de materiales en el proceso de concentración de AGPI por exclusión en la cristalización con urea..... | 74 |
| 7 | Resultados obtenidos en los procesos previos a esterificación enzimática..... | 75 |
| 8 | Variables y respuestas del grado de esterificación (GE)..... | 77 |
| 9 | parámetros por regresión para cada producto formado durante la esterificación enzimática..... | 86 |
| 10 | Condiciones óptimas de las variables en el grado de esterificación enzimática del aceite de canola..... | 89 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Clasificación de lípidos..... | 10 |
| 2 | Fórmula condensada de acilgliceroles..... | 12 |
| 3 | Estructura molecular de AGE linoleico n-6 y linolénico n-3..... | 14 |
| 4 | Proceso de transformación de ácido linoleico y ácido linolénico en AGPICL..... | 17 |
| 5 | Digestión, absorción y movilización de lípidos en el ser humano.... | 21 |
| 6 | Resumen de las rutas de biosíntesis que conducen a la formación de las principales prostagandinas y del tromboxano A ₂ | 26 |
| 7 | Síntesis de eicosanoides de la serie n-6 | 31 |
| 8 | Síntesis de eicosanoides de la serie n-3..... | 32 |
| 9 | Formación de compuestos de urea por atrapamiento de AGS..... | 52 |
| 10 | Imágenes de montaje experimental..... | 63 |
| 11 | Cinética de la esterificación enzimática de los AGPI del aceite de canola..... | 80 |
| 12 | Desarrollo cromatográfico en cinética de esterificación..... | 83 |
| 13 | Cromatograma del análisis por densitocolorimetría..... | 84 |
| 14 | Superficie de respuesta para el grado de esterificación..... | 87 |

NOMENCLATURA

| | |
|----------|---|
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación |
| mg | Gravedades |
| Glicerol | 1,2,3 propanotriol |
| M | Molar |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OTAN | Organización del Tratado Atlántico Norte |
| G.E. | Grado de Esterificación |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| AA | Ácido Araquidónico |
| AG | Ácidos Grasos |
| AGE | Ácidos grasos esenciales |
| AGL | Ácidos Grasos Libres |
| AGPI | Ácidos Grasos Poliinsaturados |
| AGPICL | Ácidos Grasos Poliinsaturados de Cadena Larga |
| AGS | Ácidos Grasos saturados |
| AINES | Antiinflamatorios no Esteroides |
| AL | Ácido linoleico |
| ALN | Ácido Linolénico |
| ASA | Ácido Acetilsalicílico |
| COX | Ciclooxigenasa |
| DHA | Ácido Docosahexaenoico |
| EPA | Ácido Eicosapentaenoico |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad (por sus siglas en inglés) |
| HTG | Hipertrigliceridemia |
| LB ₄ | Leucotrieno B ₄ |
| LB ₅ | Leucotrieno B ₅ |
| LDL | Lipoproteínas de baja densidad |

| | |
|------------------|---|
| LPRTG | Lipoproteínas ricas en triacilglicéoles |
| n-3 | Familia de ácido linolénico |
| n-6 | Familia de ácido linoleico |
| PGE ₁ | Prostaglandina E |
| PGE ₃ | Prostaglandina E ₃ |
| PGG | Prostaglandina G |
| PGI | Prostaglandina I |
| PGI ₂ | Prostaglandina I ₂ |
| TBHQ | <i>Ter</i> -butil-hidroquinona |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TAG | Triacilglicerol |
| TXA ₂ | Tromboxano A ₂ |
| VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |

RESUMEN

El ácido linoleico (C18:2) de la familia n-6 y ácido linolénico (C18:3) de la familia n-3 tienen importancia clínica, ya que participan en la morfogénesis del feto, la producción de moléculas osmorreguladoras y en los procesos neurológicos. El aceite de canola tiene la relación de n-6/n-3 más aproximada a la proporción de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) recomendados por instituciones internacionales de la nutrición. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue obtener lípidos estructurados conteniendo ácidos grasos n-6 y n-3. Los AGPI (82.0%) fueron aislados por cristalización con Urea a partir de un hidrolizado de aceite de canola. La esterificación de los AGPI al glicerol se llevó a cabo en un reactor intermitente usando una lipasa inmovilizada NV-435 (*Candida antarctica*). Los acilglicérols formados fueron separados por cromatografía de capa fina (HPTLC) y cuantificados por densitocolorimetría de imagen. Las mejores condiciones de proporción molar, temperatura y tiempo en la esterificación fueron determinadas por análisis de superficie de respuesta. El aumento del tiempo y la temperatura favorecieron el grado de esterificación (GE). Para lograr un máximo GE (83%); se utilizaron 2.0 mol AGPI /mol glicerol, 62 °C y 200 min. Al aumentar la proporción molar se favoreció la formación de monoacilglicérols, mientras que a menor temperatura se obtuvo mayor formación de diacilglicérols. Los lípidos estructurados obtenidos por esterificación enzimática contenían AGPI en una proporción cercana a la recomendada, que pueden ser usados como una alternativa para prevención y tratamiento de algunas enfermedades provocadas por un desbalance de ácidos grasos esenciales.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el índice de mortalidad por problemas cardiovasculares y cerebrovasculares ha aumentado tanto en el mundo como en México, ubicándose durante los últimos años dentro de las primeras tres causas de muerte después de la Diabetes mellitus. En México durante el año 2007, poco más de 87 mil personas fallecieron a causa de alguna enfermedad del corazón. En el mundo, las enfermedades cardiovasculares causan 17.5 millones de muertes al año. Estos padecimientos están apareciendo con más frecuencia no sólo en la población adulta, sino también en los adolescentes y niños, como consecuencia de hábitos alimenticios inadecuados principalmente de la ingesta de diferentes tipos de lípidos, los cuales son los principales factores de riesgo así como también lo son hipertensión, altos niveles de triacilgliceroles, tabaquismo, entre otros, siendo estos factores influenciados por la dieta (Valenzuela, 2005).

Dentro de la diversidad de lípidos, los ácidos grasos son moléculas de gran relevancia debido a que dentro de su clasificación existen algunos que no pueden sintetizarse en el organismo; los ácidos grasos se clasifican en saturados e insaturados y estos en monoinsaturados y poliinsaturados, son los saturados en ocasiones perjudiciales para la salud debido a que si se consumen en exceso favorecen la aparición de algunos

padecimientos como el aumento de lípidos plasmáticos, que producen la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, mientras que los poliinsaturados favorecen el control de dichas enfermedades, a estos pertenecen las familias de ácido linoleico n-6 y el ácido linolénico n-3.

Los ácidos grasos de las familias n-6 y n-3 son esenciales debido a que el organismo no posee el sistema enzimático para introducir dobles ligaduras en las posiciones anteriores al carbono 9 contando a partir del metilo final de la cadena hidrocarbonada por lo tanto se tienen que consumir. En la mayoría de los países no se consumen los nutrientes en la proporción recomendada, mucho menos se mantiene una relación adecuada en la ingesta de ácidos grasos esenciales (AGE). Los AGE tienen las mismas rutas metabólicas y compiten por las mismas enzimas elongasas y desaturasas prefiriendo estas, a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la familia n-3, y por eso se deben consumir en una relación de 4 (n-6): 1 (n-3), sin embargo en países como México se consume la relación hasta de 40:1 la cual es muy elevada con respecto a las recomendaciones. El aumento del consumo de linoleico n-6 es debido a que es más abundante en productos elaborados así como en vegetales.

Los AGE han tomado importancia a lo largo de los años, por ser constituyentes de los lípidos más abundantes (triacilgliceroles). Además por sus atribuciones al mantenimiento de la salud, siendo precursores de otros lípidos como ácido araquidónico, docosahexaenoico y eicosapentaenoico, que se incorporan en los fosfolípidos de las membranas del cerebro y la retina, y estos a su vez son precursores de lípidos llamados

eicosanoides; prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos y tromboxanos, los cuales ejercen funciones, sobre la respuesta inflamatoria e inmunológica y antitrombóticas.

El consumo de AGE determina los tipos y cantidades de eicosanoides en el organismo, esto influye en todos los procesos en los que intervienen. Es necesario tener en cuenta alternativas de ingesta de ácidos grasos ya que su deficiencia puede provocar graves afecciones en la salud. Existen alimentos que contienen estos ácidos grasos de fuentes vegetales; semillas oleaginosas y hojas verdes, así como marinas; algas y peces, también existen suplementos alimenticios en el mercado con concentrados. Estas fuentes contienen los ácidos grasos en forma de triacilglicerol.

El incremento de las patologías por el consumo de ácidos grasos saturados (AGS) ha llevado al desarrollo de investigaciones para elaborar productos que no contengan o tengan un contenido muy bajo de estos, por medio de diferentes procesos es posible modificar el contenido de ácidos grasos de un aceite esto es llamado estructuración de lípidos, y se puede realizar por métodos químicos o enzimáticos, utilizándose principalmente los últimos para catalizar reacciones de esterificación, hidrólisis etc. Al usar enzimas se debe optimizar las condiciones para aumentar la actividad enzimática; tiempo, temperatura, proporción molar.

OBJETIVOS

Objetivo general

Esterificar enzimáticamente el ácido linoleico n-6 y linolénico n-3 aislados del aceite de canola para obtener lípidos estructurados con ácidos grasos esenciales.

Objetivos particulares

- Preparar un concentrado de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y α -linolénico) a partir del aceite de canola.
- Evaluar las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de sustrato para la esterificación enzimática de los ácidos grasos.
- Analizar la composición de acilgliceroles formados en el producto obtenido.

ANTECEDENTES

Kromann y Green en 1980, hicieron las primeras observaciones de la relación entre n-3 y las enfermedades cardiovasculares al notar que estos ácidos grasos, presentes en el pescado, eran la principal causa de la ausencia de afecciones cardiovasculares entre los esquimales. Observaron en los esquimales que viven en Groenlandia, grandes consumidores de ácidos grasos derivados de ácido linoleico (ALN-3) (a través de la carne de pescado, focas y ballenas), no padecían ataques cardíacos, mientras los que emigraban y alteraban sus hábitos alimenticios terminaban padeciendo el mismo tipo de problemas cardiovasculares que las personas de las sociedades a donde estos emigraban.

Los suecos Bergstrom y Samuelsson (1982) y la investigadora británica Vane: Premio Nobel, explicaron los mecanismos que convierten una deficiencia de ácidos grasos esenciales en problemas clínicos (El papel como mediadores celulares de los eicosanoides: prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos). En recientes investigaciones, Muro (2006); Burr y Gilbert (1989); Marchioli y Bomba (1999); De Logeril (1994) y Salem (2001) han estudiado los beneficios de los AGPI n-3, primero en el caso de enfermedades cardiovasculares y después en caso de otras patologías como las enfermedades mentales y neurodegenerativas.

Lípidos

Los lípidos se constituyen por una variedad de moléculas que pueden no estar relacionados entre sí respecto a su fórmula estructural, es por eso que no se puede dar una definición en cuanto a su composición. Se componen de Carbono (C) Hidrogeno (H) y Oxigeno (O) principalmente, pero también algunos de ellos pueden contener los elementos Nitrógeno (N), Fósforo (P). Las sustancias incluidas en esta categoría se caracterizan por su solubilidad en solventes orgánicos (cloroformo-metanol 2:1, etanol-éter 3:1 y éter de petróleo) y por su insolubilidad en agua, estas características no son únicamente de los lípidos.

El manejo tecnológico de lípidos tiene mayor complejidad que otros nutrientes, debido a su insolubilidad o escasa solubilidad en agua y han sido muy estudiadas sus moléculas constituyentes debido a las funciones que presentan:

Estructural. Los fosfolípidos son compuestos anfipáticos, lo que les permite tener un papel estructural muy importante pues son los constituyentes de las membranas celulares ya que forman la bicapa lipídica que está formada por una doble capa de fosfolípidos en la que están integradas otras sustancias como colesterol y proteínas.

Energética. Son la mejor reserva energética para el organismo, ya que proporcionan (9.4 kcal/g), más del doble de energía que un gramo de carbohidratos (3.75 kcal/g).

Protectora. Las ceras recubren e impermeabilizan las estructuras de los vegetales (hojas), y también tienen funciones de protección en los insectos, invertebrados y vertebrados (plumas, pelo, piel).

Transportadora. Ayudan a transportar vitaminas liposolubles (A, D, E y K).

Precusores de hormonas. Contribuyen a la formación de hormonas (andrógeno, progesterona y estrógeno) derivadas de colesterol (Sastry P, 1985).

Precusores de eicosanoides; Proveen de ácidos grasos esenciales para la síntesis de eicosanoides que tienden a funcionar como hormonas en el organismo (Valenzuela y Nieto, 2003).

Además forman los ácidos biliares a partir del colesterol (Sastry, 1985) y organolépticamente son los componentes más importantes de la saciedad postprandial (Maragoni y Roseau, 1995).

Clasificación

Existen diferentes formas de clasificar a los lípidos, una de las clasificaciones más aceptadas es, dependiendo de la presencia de ácidos grasos, por presentar o no reacción de saponificación, (Figura1).

Dentro de los lípidos saponificables se encuentran los triacilgliceroles, las ceras, los fosfoglicéridos [(formados por el alcohol glicerol, ácidos grasos, ácido fosfatídico y alcoholes aminados o bases nitrogenadas (colina, etanolamina o serina)] dentro de los fosfoglicéridos se encuentran plasmalógenos que contienen un éter insaturado, otro tipo de lípidos son los fosfoesfingosidos (formados por el alcohol llamado esfingosina, un ácido graso y ácido fosfatídico unido a una amina). Si al hidroxilo terminal de una esfingosina se une un ácido graso resultará una ceramida fosfato. También existen lípidos unidos con carbohidratos llamados glucoesfingosidos.

En los lípidos no saponificables se encuentran esteroides, los cuales comprenden un grupo de moléculas que tienen en común su derivación del núcleo perhidro-ciclopentano-fenantreno, donde puede o no existir una cadena lineal hidrocarbonada que parte del carbono 17 (esteroles como colesterol y ácidos biliares); corticoides que tienen un núcleo común llamado pregnano estos son llamados también hormonas y dentro de ellos se encuentra la progesterona (hormonas femeninas); andrógenos (hormonas masculinas) cuyo núcleo común es androstano; estrógenos (hormonas femeninas) cuyo núcleo es estrano; terpenos los cuales tienen una unidad isopreno; y hormonas

eicosanoides o prostanoïdes que derivan de ácidos grasos de 20 carbonos, dentro de estos se encuentran tromboxanos, leucotrienos, prostaglandinas y prostaciclina. (Garcilaso y Vejar, 2004; Holum, 2008).

Otra clasificación común es en lípidos sencillos que comprende ceras y acilglicérols, constituidos por un alcohol y ácidos grasos, y en lípidos compuestos (glucolípidos, fosfolípidos, esfingolípidos, proteolípidos (lipoproteínas), sulfolípidos, cerebrósidos, plasmalógenos, gangliósidos) constituidos por moléculas diferentes a alcohol y ácidos grasos (Garcilaso y Vejar, 2004).

Los lípidos a estudiar en este trabajo son los acilglicérols que se clasifican de acuerdo al tipo de ácidos grasos contenidos; en homoacilglicérols (si son iguales) y heteroacilglicérols (si son diferentes), los ácidos unidos al glicerol pueden ser tres iguales, dos iguales o los tres diferentes, si los tres ácidos grasos son iguales se nombra el ácido graso sustituyendo la terminación ico por la terminación ina, si son dos ácidos iguales se nombra primero el ácido graso distinto terminado en il y después el ácido graso con el prefijo di y con terminación ina.

De acuerdo al grado de esterificación (GE) en monoacilglicérols, diacilglicérols y triacilglicérols (Figura 1), también se clasifican según el grado de insaturación en saturados o insaturados; según el estado físico, si son líquidos en aceites y si son sólidos en grasas.

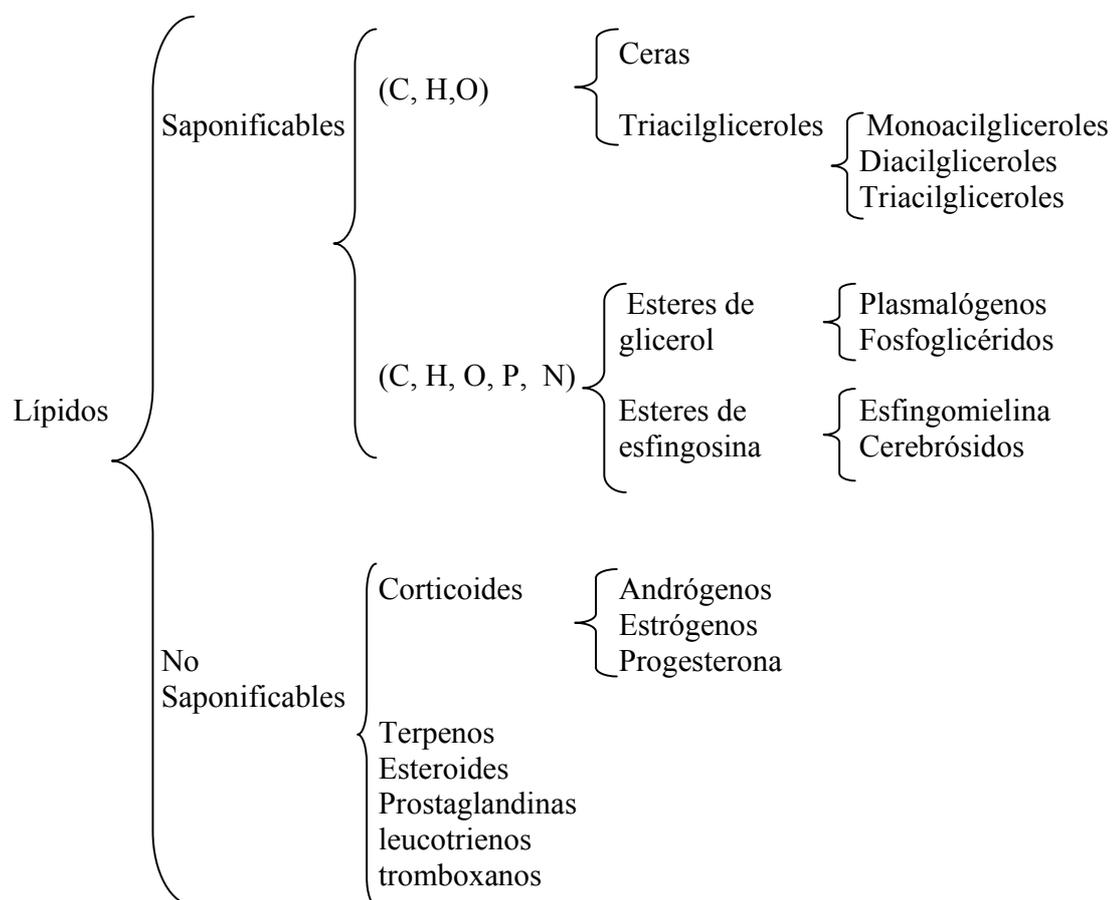


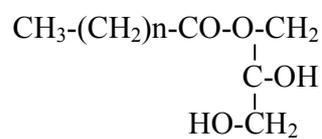
Figura 1. Clasificación de lípidos.
Fuente. Garcilaso, 2004; Holum, 2008

Acilgliceroles

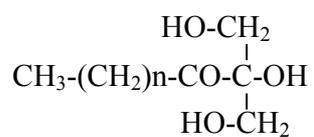
Los acilgliceroles constituidos por una molécula de glicerol unida a uno, dos o tres ácidos grasos (AG), son llamados mono-acilgliceroles, di-acilgliceroles y tri-acilgliceroles respectivamente, como se muestra en la Figura 2. El glicerol (1, 2, 3 propanotriol) es un alcohol trihídrico que contiene tres grupos oxidrilo (OH), uno en cada átomo de carbono de la molécula. Los triacilgliceroles (TAG) son los lípidos más abundantes en la naturaleza, representan gran reserva de material energético para las células, se encuentran fundamentalmente en las células grasas (adipocitos). Cada unidad de acilo de una molécula de TAG proviene de tres AG diferentes, dos iguales y uno diferente o de tres AG iguales. Por lo que las grasas y aceites son mezclas de moléculas diferentes con estructuras comunes y se denominan grasas neutras.

Ácidos Grasos

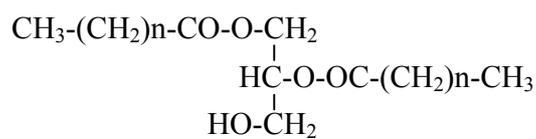
Los AG están formados por una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxilo (formado por un hidrogeno, un grupo alquilo o un grupo arilo) (Thornton y Nelson; Azevedo y col., 1999), generalmente no se encuentran libres en el interior de las células, la mayor parte de ellos está en forma de triacilgliceroles y fosfolípidos en las membranas celulares (Garcilaso y Vejar, 2004).



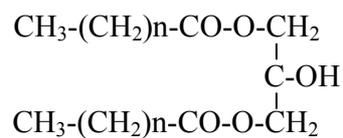
a) 1-monoacilglicerol



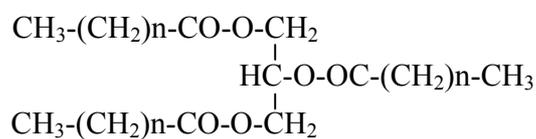
b) 2-monoacilglicerol



c) 1,2 diacilglicerol



d) 1,3 diacilglicerol



e) triacilglicerol

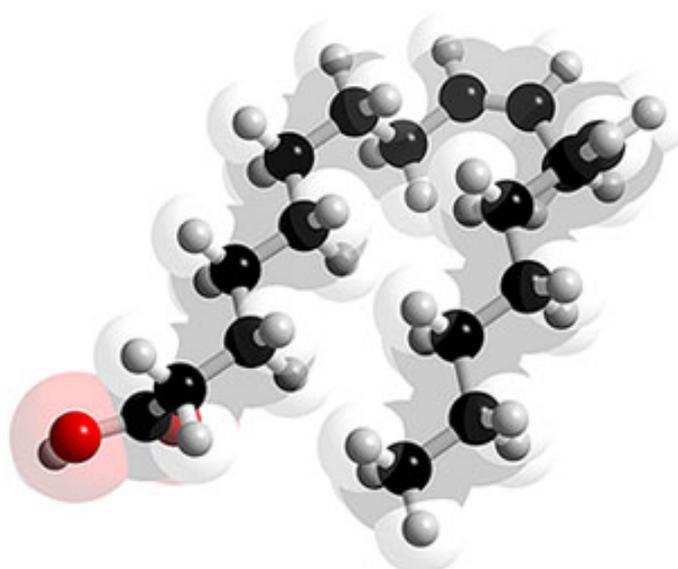
Figura 2. Fórmula condensada de acilgliceroles.

Los ácidos grasos se dividen en dos grupos; los ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos insaturados (AGI). Los ácidos grasos insaturados se dividen en Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI).

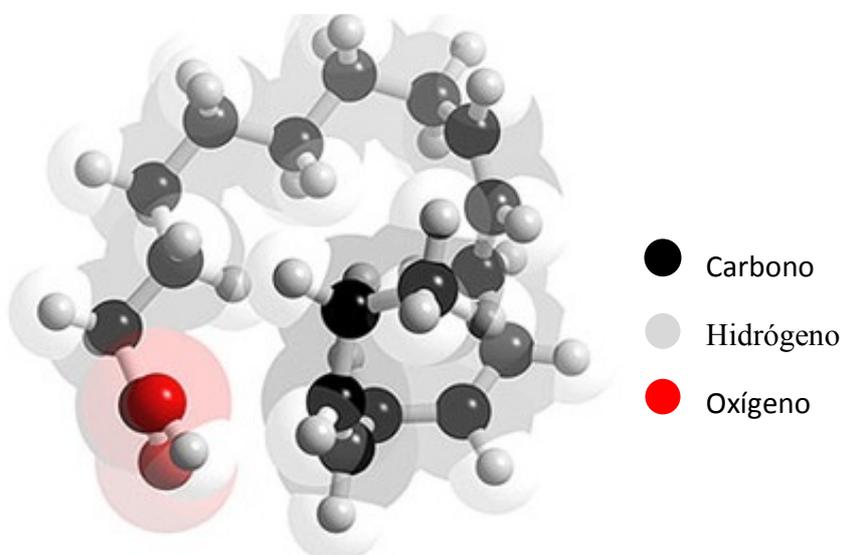
Dependiendo de la posición del primer doble enlace a partir del grupo metilo terminal, los AGMI y los AGPI se dividen en tres principales familias: la familia del ácido oleico (C18:1) n-9 con una doble ligadura en el carbono 9; la familia del ácido linoleico (C18:2) n-6 molécula de 18 carbonos, con 2 tres dobles ligaduras en total la primer doble ligadura en el carbono 6; y la familia del ácido linolénico (C18:3) n-3 con su primer doble ligadura en el carbono 3 y con dos dobles ligaduras en total (Figura 3) (Brenner y Peluffo, 1969).

Ácidos Grasos Esenciales (AGE)

Dentro de esta última clasificación el ácido oleico es considerado no esencial ya que nuestro organismo puede sintetizar una insaturación en la posición del carbono número 9. En cambio los ácidos linoleico y linolénico (Figura 3) requieren ser ingeridos en la dieta debido a que el organismo no puede sintetizarlos a partir de AGS ya que no puede introducir una doble ligadura en la posición 3 y 6, porque no posee el sistema enzimático necesario por lo que son considerados AGE. Por ser poliinsaturados tienen un punto de fusión más bajo que los saturados y son líquidos a temperatura ambiente.



Ácido linoleico C₁₈:2 (n-6) ó ácido 9,12- octadecadienoico



Ácido 9,12,15-octadecatrienoico ó ácido linolénico (C₁₈:3) n-3.

Figura 3. Estructura molecular de AGE linoleico n-6 y linolénico n-3.

Ácido Linoleico (AL n-6)

El ácido linoleico n-6 se transforma en sus respectivos compuestos por medio de enzimas desaturadas y elongadas. Los compuestos resultantes son ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), gamma-linoleico (C20:3 n-6), ácido docosapentaenoico (22:5 n-6), ácido docosadienoico (C22:2 n-6). El ácido linoleico puede convertirse también en ácido Araquidónico AA. (C20:4 n-6), que tiene gran importancia en el desarrollo neonatal (Sellmalyer y Koletzco, 1999; Horrobin, 1993).

El ácido linoleico (AL n-6) tiene una efectividad limitada y debe ser transformado para ejercer sus efectos funcionales; sin embargo hay múltiples factores que pueden bloquear la función de las enzimas participantes así como envejecimiento, diabetes, consumo elevado de alcohol, inmadurez en caso de un feto humano. Los ácidos grasos n-6 son esenciales, pero tienden a consumirse en exceso, sobre todo por incluirlos en productos elaborados y por ser más abundantes en la naturaleza. Por esto el riesgo de tener un déficit ALN n-3 es mayor que el de AL n-6, por lo que se debe consumir una proporción variable de peso. Las dietas altas en n-6 se asocian con enfermedades cardiovasculares, desordenes inflamatorios, así como artritis (Jewett, 2002). Los AGE inician a partir 18 carbonos y son llamados ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). En el organismo sufren cambios al transformarse en compuestos de 20 carbonos o más (eicosanoides) y son considerados dentro de cadena larga (AGPICL). En la Figura 4 se muestra el proceso de elongación y desaturación de los AGPI.

Ácido linolénico (ALN n-3)

Una vez ingerido el ácido graso linolénico (n-3), se elonga y desatura a compuestos que también pertenecen a la familia n-3, pero con un mayor número de carbonos e insaturaciones, estos compuestos son ácido estearidónico 18:4 (n-3), ácido eicosatetraenoico 20:4 (n-3), eicosapentaenoico 20:5 (n-3) y ácido docosahexaenoico 22:6 (n-3), los cuales son considerados AGPICL (Figura 4). Ahora se sabe que el hecho de que los esquimales (habitantes de Inuit en Groenlandia) tengan incidencias bajas en enfermedades cardiacas a pesar del alto consumo de aceites; esto ocurre por las concentraciones altas de ácidos grasos omega-3 contenidas en los aceites de origen marino que protegen contra dichas enfermedades (Holum, 2008; Bang y col., 1980).

Gracias a esta observación se han realizado varios estudios en personas que consumen pescado regularmente y se han demostrado efectos benéficos en la salud cardiaca (Kris-Etherton, 2002). Von y col. (1999) documentaron un estudio clínico en el que se observó a pacientes que consumieron concentrado de aceite de pescado durante dos años y estos registraron niveles de triacilgliceroles más bajos que los que recibieron un placebo. Los resultados demostraron que consumir AGPI n-3 puede reducir el riesgo de engrosamiento anormal de las arterias debido a depósitos de grasa en las paredes internas de las arterias (arteriosclerosis) (Von y col. 1999).

Metabolismo de Triacilgliceroles y Ácidos Grasos

Digestión y Absorción de TAG

Los lípidos son ingeridos mayoritariamente en forma de triacilgliceroles, los cuales proceden de tres orígenes; la alimentación, la biosíntesis de novo, en especial en el hígado y de las reservas existentes en los adipocitos. Los TAG en el estomago se ven sujetos a la acción de lipasas del jugo gástrico pero el mayor movimiento metabólico de digestión es en el intestino, donde por acción de la bilis (producción de ácidos biliares) se emulsifican y solubilizan los lípidos, promoviendo el contacto entre los componentes solubles en agua y los insolubles en agua, por acción de lipasa pancreática se hidrolizan en la luz del intestino, en las posiciones sn-1 y sn-3 del glicerol, generando 2-monoacilgliceroles y AG que son posteriormente absorbidos en la pared intestinal (Ikeda y col., 1991).

Al atravesar la barrera intestinal se regeneran en su mayor parte a triacilgliceroles que pasan a la circulación formando parte de quilomicrones (Holum, 2008). Este proceso solubiliza los lípidos y permite su transporte a través de la sangre y la linfa. Los TAG sintetizados en el hígado se recombinan con apoproteínas para formar las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su transporte.

Las lipoproteínas transportadas a los tejidos periféricos se hidrolizan en las superficies internas de los capilares. Los productos de la hidrólisis que llegan a las

células se catabolizan para producir energía o se recombinan en triacilgliceroles para almacenarse. Los procesos de digestión y absorción se resumen en la Figura 5.

El transporte de los lípidos entre los lugares de absorción, depósito, utilización y eliminación puede agruparse en dos vías, la exógena y la endógena (Carmena y Ordovás, 1999; Havel y Kane, 1995). La vía exógena transporta los TAG ingeridos en forma de quilomicrones desde el intestino a los tejidos periféricos y al hígado durante los períodos posprandiales. La lipoproteinlipasa (LPL), localizada en el endotelio capilar, hidroliza los TAG de los quilomicrones y permite la captación de los ácidos grasos libres resultantes por las células musculares y los adipocitos. Los remanentes de los quilomicrones, que contienen el colesterol de origen intestinal, son captados por receptores hepáticos.

La vía endógena proporciona la energía necesaria a los tejidos en forma de TAG durante los períodos ínter digestivos y depende de la secreción hepática de lipoproteínas ricas en TAG, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que también son deslipidadas por la LPL y eventualmente se convierten en lipoproteínas de baja densidad (LDL), las partículas que transportan el colesterol a los tejidos. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) regresan el colesterol desde los tejidos al hígado para su eliminación por la bilis (transporte reverso del colesterol). La síntesis hepática de VLDL por ensamblaje de TAG y colesterol es muy variable y depende de la cantidad de ácidos grasos de que dispone el hígado, suma los de síntesis propia (lipogénesis) y los procedentes del tejido adiposo (lipólisis). En la circulación, las VLDL son objeto de la

acción de la proteína encargada de transferir ésteres de colesterol, lo que permite el intercambio de TAG por esteres de colesterol con las LDL y las HDL. Este intercambio de lípidos ocurre también entre las propias VLDL, proceso que en conjunto con la LPL, permite la disminución progresiva del tamaño de estas partículas y su conversión en LDL.

Cuando el proceso de deslipidación de LPRTG (lipoproteína ricas en TAG) (VLDL de origen hepático y quilomicrones de origen intestinal) es eficiente, se mantienen una triacilgliceridemia y HDL normales, además unas LDL con una composición adecuada para su captación por los receptores celulares específicos. Sin embargo, en condiciones de aumento de lipogénesis (exceso de AGS) o aporte excesivo de AG al hígado por una lipólisis periférica acentuada (obesidad), la síntesis y la secreción de VLDL aumentan, lo que puede causar hipertrigliceridemia (HTG).

Metabolismo Endógeno de Ácidos Grasos Libres

Una vez en la célula los AG no esterificados, dependiendo del camino que tomen, se ven sometidos a varios procesos: catabolizarse para producción de energía, o formar parte de reservas metabólicas si se almacenan en forma de triacilgliceroles o bien formar parte de las membranas celulares y posteriormente ser transformados a eicosanoides como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaciclina (Spector, 1999).

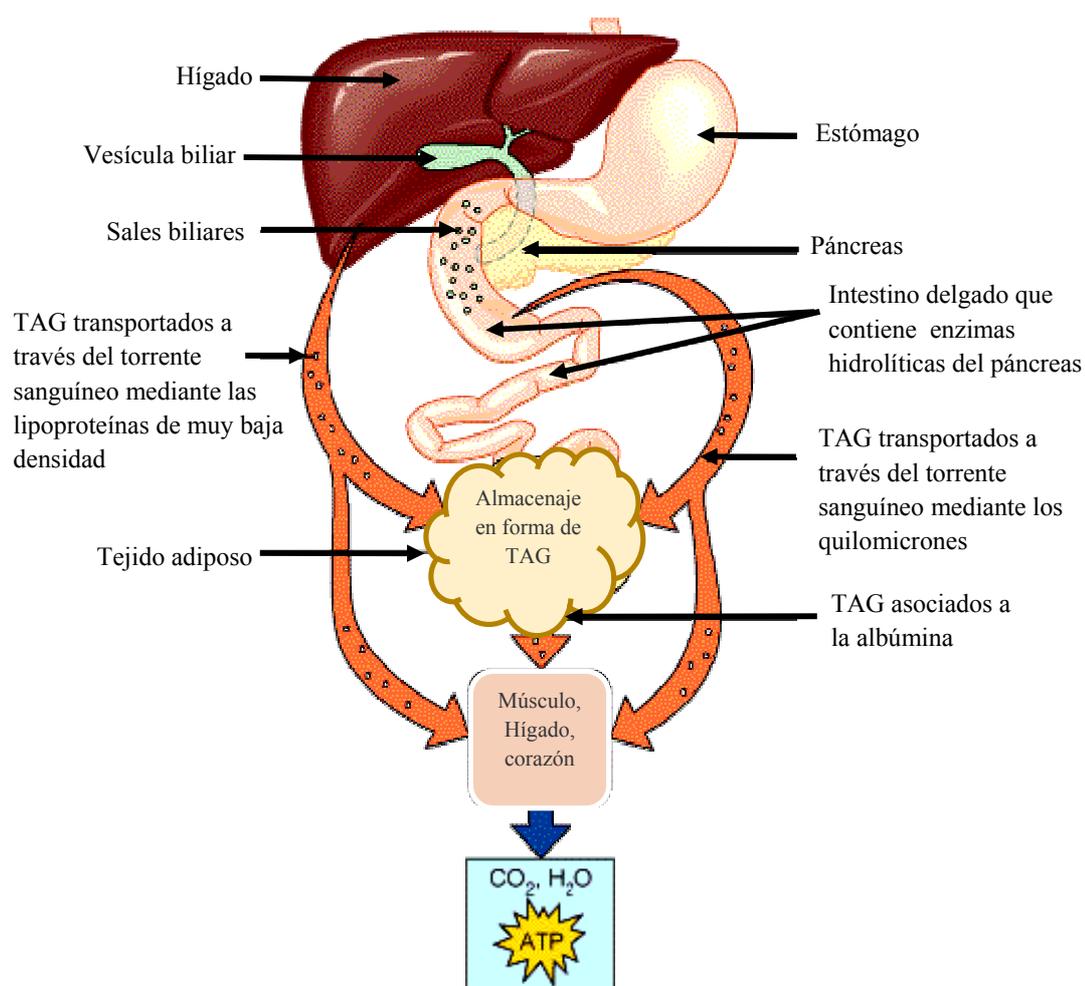


Figura 5. Digestión, absorción y movilización de lípidos en el ser humano.
Fuente. Mathews, 2002

Activación de ácidos grasos. Es la conversión del ácido graso al derivado acil de CoA por medio de enzimas ya que los ácidos grasos tienen que estar en forma libre antes de activarse para oxidarse.

Transporte de ácidos grasos. La activación de los ácidos grasos se efectúa sobre la membrana mitocondrial exterior. Pero la oxidación ocurre en la matriz mitocondrial, por lo que el AG activado tiene que transportarse. La membrana interna mitocondrial es impermeable a los ácidos grasos de cadena larga aun activados por lo que así no pueden atravesar. Ocurre un intercambio del derivado acil-CoA al derivado acil-carnitina (necesaria para transferencia de AG).

Beta oxidación. La Beta oxidación se da en la mitocondria; es el proceso de oxidación de acetil-coenzima de un ácido graso que inicia en el carbono beta, para producir grupos acetilo que se incorporan al ciclo del ácido cítrico y a la cadena respiratoria, al iniciar la beta oxidación el ácido graso debe unirse a la coenzima A y ser sometido a diferentes procesos y así lograr el desprendimiento de dos carbonos del ácido graso (Holum, 2005). Por ejemplo un mol de palmitoil-CoA, procedente de un ácido graso de 16 carbonos, sufre siete ciclos de oxidación, para dar ocho moles acetil-CoA. Cada ciclo libera una unidad de dos carbonos al mismo tiempo que se realizan dos reacciones de oxidación de dos electrones. Cada paso se inicia en el carbono β por eso es llamada β -oxidación.

Fosfolípidos. Los fosfolípidos más abundantes son los derivados del glicerol. Estos se encuentran como componentes de las membranas, también son precursores metabólicos de diversos elementos reguladores de las rutas de transducción de la señal, también participan en el transporte de TAG y colesterol, mediante la formación de la superficie de las lipoproteínas.

La formación de la mayoría de los fosfolípidos se inicia en la mitocondria a partir del glicerol-3-fostato. El ácido fosfatídico constituye un punto de ramificación entre la formación de TAG y de los fosfolípidos. El ácido fosfatídico se sintetiza mediante dos acilaciones sucesivas del glicerol-3-fostato.

A partir de los fosfolípidos se sintetizan eicosanoides. Cada tipo de ácido graso unido al fosfolípidos (AA o EPA) origina diferentes tipos de series eicosanoides; El ácido linoleico es precursor AA se transforma en prostaglandinas, tromboxano A₂ que causa agregación plaquetaria, formación de coágulo y vasoconstricción (Figura 6).

En contraste, el ácido graso linolénico que es precursor del EPA favorece la formación de compuestos que tienen efectos similares pero en menor intensidad o bien efectos opuestos, estos previenen la formación de coágulos y causan vasodilatación. (Bjerve, 1993; Li, 2002). El balance de ingestión de ácidos grasos n-3 y n-6 determinará el tipo y cantidad de eicosanoides disponibles en el organismo (Sayanova y Napier, 2004).

Biosíntesis de Osmorreguladores

Otro destino metabólico de AG es la biosíntesis de eicosanoides o icosanoides nombre general que se le da a un grupo de moléculas lipídicas producidas por la oxigenación de los AGE de 20 carbonos de las familias n-6 y n-3. Los eicosanoides se caracterizan por sus propiedades fisiológicas, baja concentración en tejidos y su origen común. Los eicosanoides se agrupan en prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. (Simopoulos, 1991; Mathews, 2002). Desde el punto de vista fisiológico, una de las funciones más importantes de los AGPI es la de ser precursores de los eicosanoides.

Los AGPI sufren desaturaciones en su cadena, procesos en los que intervienen las enzimas $\Delta 6$, $\Delta 5$ y $\Delta 4$ desaturasas para llegar hasta ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácidos araquidónico (AA) que se sintetizan en el retículo endoplasmático. También intervienen elongasas para la elongación de la cadena que se lleva a cabo cuando dos átomos de carbono pasan desde el donador (acetil CoA o malonil CoA) a la cadena del ácido graso (Qiu, 2003). Los eicosanoides derivados de los AGPI omega-3 que son antiinflamatorios, tienen propiedades fisiológicas diferentes a aquellos que se originan de los AGPI n-6 los cuales tienen propiedades inflamatorias.

Síntesis de Eicosanoides

La biosíntesis de eicosanoides ocurre cuando la célula es activada por lesión celular, citocinas, u otros estímulos que provocan la liberación de fosfolipasa en la membrana celular que viaja a la membrana del núcleo celular donde se produce hidrólisis del enlace fosfodiéster de los fosfolípidos (por la fosfolipasa A₂, lipasa específica para fosfolípidos que contengan AA o EPA) o del diacilglicerol (por fosfolipasa C), la finalidad de esta hidrólisis es liberar un ácido graso esencial de 20 carbonos, siendo la reacción más regulada en la formación de eicosanoides. En la figura 6 se muestra las rutas de la biosíntesis que tienen lugar en el retículo endoplásmico. Estas rutas se producen en tres fases; la primera, liberación del AA; la segunda, oxigenación del araquidónico para producir PGH₂, un endoperóxido que actúa como precursor de otras prostaglandinas; y la tercera en función de las enzimas existentes en una célula, la conversión de la PGH₂ en otras prostaglandinas o tromboxanos TXA₂ (Wamer y col., 2002).

Una vez liberado el AA o EPA es necesaria la ciclooxygenación de ácidos grasos para la producción de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) y esto ocurre gracias a dos familias de enzimas: la de ciclooxygenasa y lipooxygenas. En la Figura 7 se muestra la síntesis de eicosanoides de la serie n-6 y en la Figura 8 la síntesis de eicosanoides de la serie n-3.

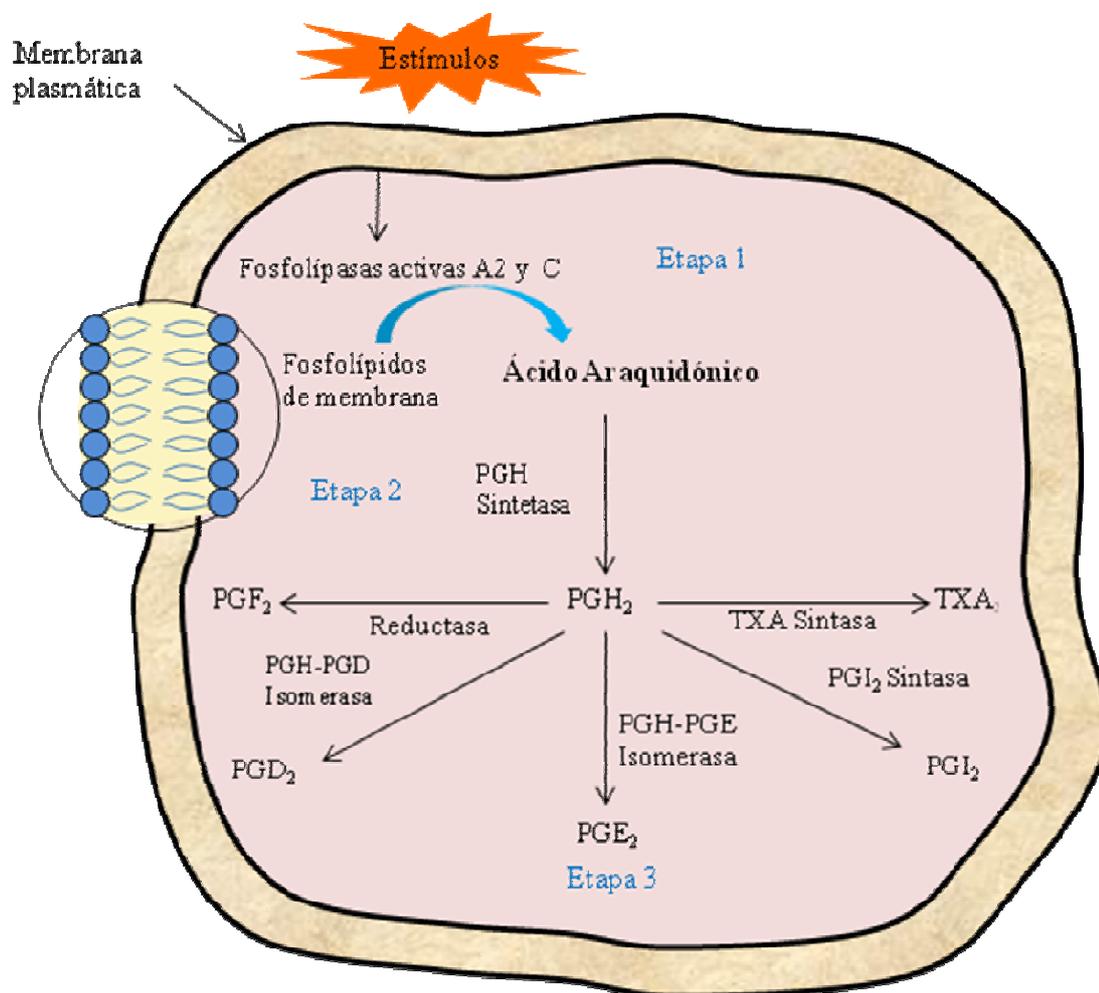


Figura 6. Resumen de las rutas de biosíntesis que conducen a la formación de las principales prostaglandinas y del tromboxano A₂

Ciclooxigenasas

Son enzimas señaladas como responsables de la síntesis de prostaglandinas. Existen dos isoformas de la enzima, reconocidas por sus iniciales COX-1 y COX-2. (Pérez y col., 1998). La identificación de estas enzimas ha permitido corroborar el mecanismo de la biosíntesis en mamíferos y en diferentes microorganismos (Metz y col., 2001; Qiu, 2003). Las enzimas COX-I y COX-2, son proteínas que tienen un origen común y son muy parecidas en su estructura, están presentes en todos los mamíferos y se localizan en las membranas celulares. La COX-1 es una enzima constitutiva que se encuentra en el tracto digestivo, endotelios, músculos lisos.

La COX-2 se encuentra en el cerebro, el corazón, los ovarios, músculos estriados y otros órganos; sin embargo, frente a una amplia gama de estímulos, incrementa su expresión, por eso se considera de naturaleza inducible (Fitz, 2003; Pérez y col., 1998). La COX-2 puede ser inducida por varios factores: la interleucina 1, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento de transformación, el factor de necrosis tumoral, los lipopolisacáridos. El ion calcio Ca^{+2} participa en la síntesis de eicosanoides, provocando hidrólisis en los lípidos de la membrana para liberar el precursor de eicosanoides. Las COX primero son ensambladas y transportadas en el retículo endoplasmático y después se insertan en la membrana. Cada proteína de este complejo cuenta con un canal de acceso por donde entra el ácido araquidónico. El sustrato pasa mediante un canal de acceso hacia el sitio catalítico de la enzima, en éste se llevan a cabo las peroxidaciones que lo transforman en prostaglandina₂ (PPG₂).

Lipooxigenasa

La lipooxigenasa (LOX) es una enzima que cataliza la oxigenación de AGPI hasta originar los leucotrienos. El ácido araquidónico es su sustrato, el cual es metabolizado hasta dar diversos productos con el grupo hidrox-peroxi en distintas posiciones. Existen diferentes tipos de lipooxigenasas: La 5-lipooxigenasa es una de las enzimas más importantes de este grupo, pues a partir de ellas se sintetizan los leucotrienos. Cuando se incrementan las cantidades de Ca^{+2} intracelular, la 5-lipooxigenasa se une con la proteína que la activa y dicha unión aumenta la síntesis de leucotrienos (Siso, 1991).

Prostaglandinas

Las prostaglandinas son producto del enrollamiento y oxidación de ácidos grasos de 20 carbonos como el AA y EPA, la oxidación es catalizada por enzimas ciclooxigenasas generando un ciclo con oxígeno y además dos cadenas alifáticas (Holum, 2008).

Las prostaglandinas son moléculas de señalización de vida media corta, que actúan como mensajeros y tienen efectos de acción local. Sus principales funciones fisiológicas en el sistema nervioso central (SNC) son la regulación de la memoria, el sueño, la fiebre y el dolor; también se considera que están muy relacionadas junto con la vitamina E con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

Las prostaglandinas en el cerebro son esencialmente producidas por la COX-2, esta enzima se expresa por influencia de citoquinas en las neuronas. La expresión de dicha enzima tiene como consecuencia un aumento en las cantidades de prostaglandinas, las cuales actúan como señales inflamatorias.

Cuando existe un estado inflamatorio, un problema de hipoxia o exposición a agentes tóxicos, las prostaglandinas se producen en cantidades inusuales y provocan daños oxidativos sobre las propias neuronas, tales como; peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y de ácidos nucleicos; también pueden activar la muerte celular apoptótica de las neuronas.

Por todas estas razones, las prostaglandinas se han vuelto importantes en las terapias farmacológicas, que involucran tanto la inhibición de su producción por el ácido acetil salicílico (ASA) y otros antiinflamatorios no esteroideos, así como importante materia de interés en el estudio de la regulación fisiológica del cerebro. Las prostaglandinas regulan funciones secretoras, digestivas, reproductivas, procesos inmunológicos y de circulación sanguínea. Se sintetizan por medio de la oxidación de ácido araquidónico C20:4 n-6, AA, (Figura 7) y eicosapentaenoico n-3 EPA (Figura 8).

Tromboxanos

Son moléculas que resultan de la ciclación de seis carbonos ó de cinco carbonos con un oxígeno, formando éste último un pequeño anillo de oxano (un anillo que contiene cinco átomos de carbono y un átomo de oxígeno). Tienen estructuras parecidas

a las prostaglandinas, constan de un anillo y dos colas. Se encontraron primeramente en los trombocitos (plaquetas), de allí su nombre tromboxano.

Leucotrienos

La producción de leucotrienos en el cuerpo forma parte de una compleja secuencia metabólica que incluye la producción de histamina. Se identificaron en leucocitos y por ello se les conoce como leucotrieno, existen varios tipos de leucotrienos que se generan gracias a la intervención de enzimas (Johnson y col., 1994; Kazzy y col., 2000). Los leucotrienos son los productos de la lipooxigenasa, estos están implicados en los trastornos inflamatorios, el tiempo de permanencia en el cuerpo es aproximadamente cuatro horas debido a que se catabolizan por oxidación (Nishizuka, 1995).

Prostaciclina

Las prostaciclina son sintetizadas por las células endoteliales a partir de prostaglandinas, actúan previniendo la formación y agregación plaquetarias en relación con la coagulación. Es también un vasodilatador eficaz. Las interacciones de la prostaciclina, sugieren un mecanismo de homeostasis cardiovascular entre las dos hormonas en los que se refiere al daño vascular (Nishizuka, 1995).

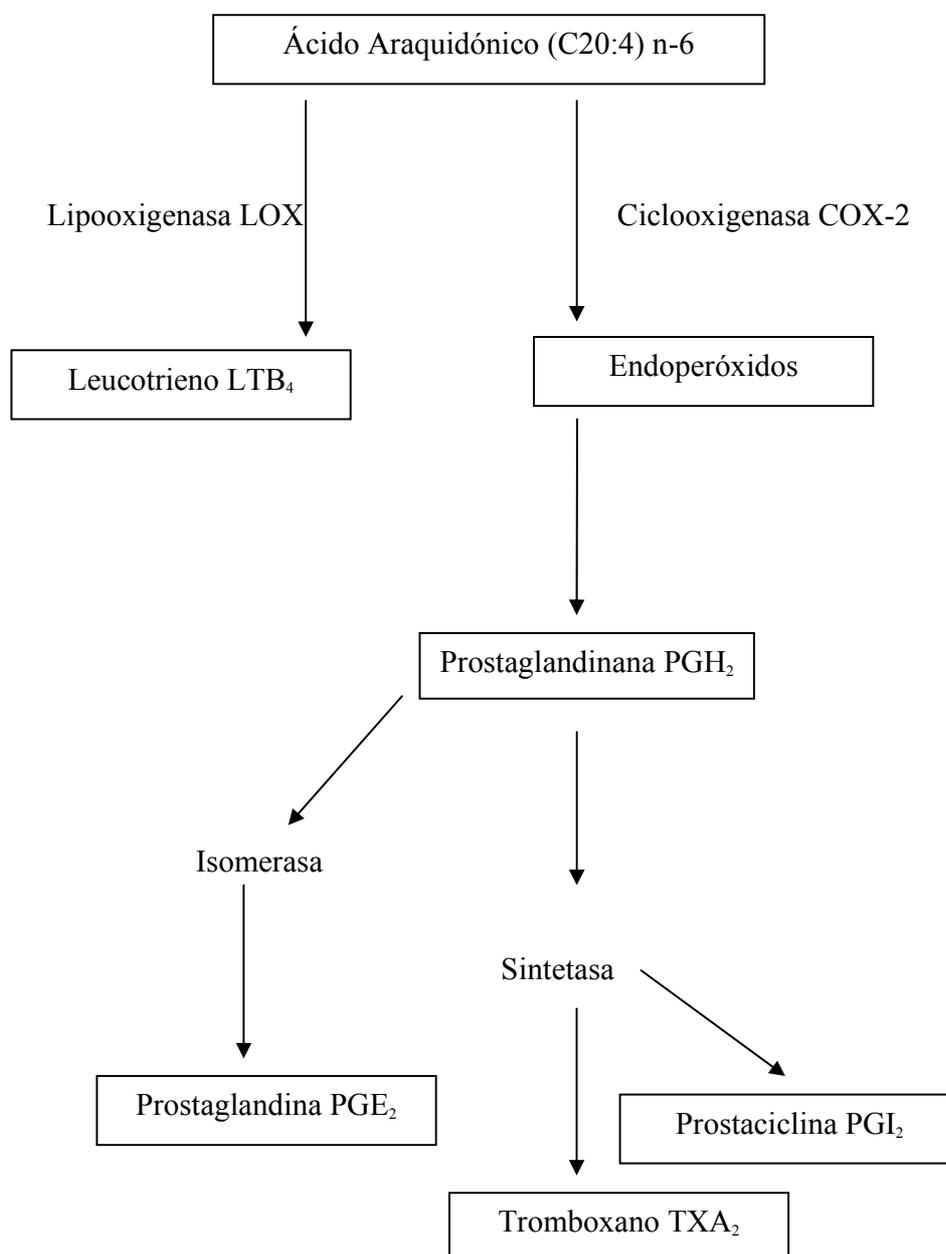


Figura 7. Síntesis de eicosanoides de la serie n-6.
Fuente Akho, 1998

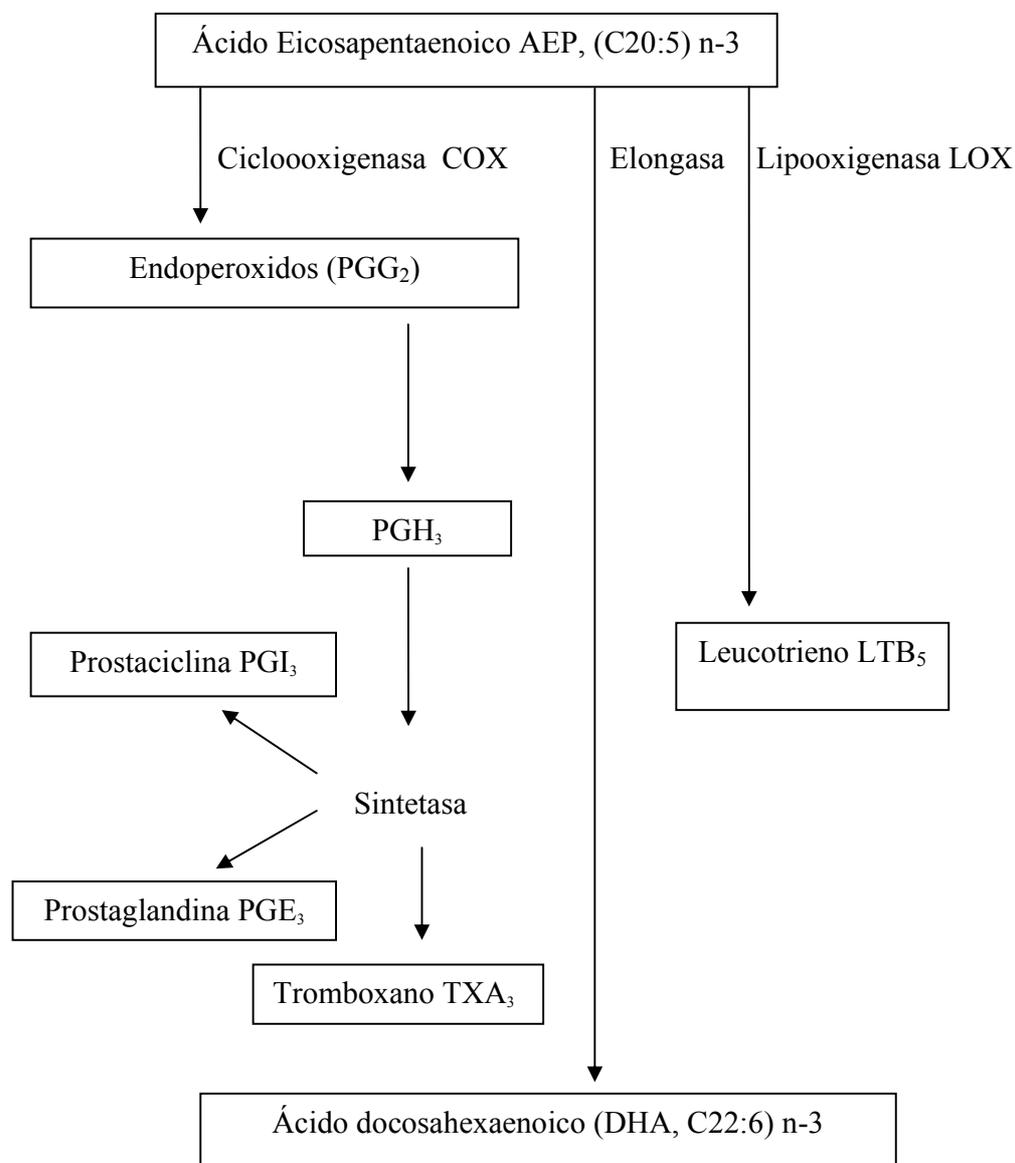


Figura 8. Síntesis de eicosanoides la serie n-3
Fuente: Gunstone, 2003

Efectos en la Salud de AGPI y Derivados Eicosanoides

Presión Sanguínea

La presión es la fuerza con que la sangre se empuja hacia las arterias, es medida en mm Hg, llamada sistólica cuando el corazón se contrae y diastólica cuando el corazón se expande, si la presión es alta, el corazón se esfuerza más de lo que debería, y esto provoca una debilitación. Al dilatar las arterias la prostaciclina PGI_3 aumenta el área o luz, y disminuye la presión. La PGI_3 , prostaglandina PGH_3 y el tromboxano TXA_3 también ayudan a disminuir la presión arterial evitando la formación de coágulos sanguíneos que pudieran obstruir y posteriormente romper las arterias.

La hipertensión arterial es un problema de salud pública mundial, esta enfermedad generalmente es asintomática y fácil de detectar, en la mayoría de los casos de tratar, pero cuando la enfermedad evoluciona sin tratamiento se producen complicaciones que llegan a ser mortales para el individuo. (Instituto nacional de salud pública, 2000).

Inflamación

El leucotrieno LTB_5 derivado de EPA es un eicosanoide proinflamatorio pero menos efectivo que LTB_4 de la serie n-6. Los eicosanoides pueden actuar como

mediadores en todos los pasos de la inflamación aguda, la prostaglandina PGI_2 derivada de AA, produce vasodilatación e inhibe la agregación plaquetaria, también potencia de forma importante el efecto de incremento de la permeabilidad vascular, función que también ejerce la prostaglandina PGE_2 derivada del AA. Las acciones de la PGI_2 vienen mediadas por la estimulación de la adenilato ciclasa, enzima que produce aumento de los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) en las plaquetas y en la musculatura lisa vascular, favorece, la proliferación y permeabilidad de células endoteliales, interacciona con las citocinas interleucina (IL-1) y factor de necrosis tisular (FNT) para producir la fiebre que se observa en las respuestas inflamatorias que aparecen en las infecciones.

El leucotrieno B_4 induce la adhesión y agregación leucocitarias en el endotelio venular (aumenta la permeabilidad vascular). Los metabolitos del ácido araquidónico, tanto de la vía de la ciclooxigenasa como de la lipooxigenasa, tienen una definida e importante participación en las diversas etapas del proceso inflamatorio, hiperalgesia también es producida por LTB_4 y prostaglandinas, y los leucotrienos en el proceso inflamatorio se tornan en un sistema de amplificación del mecanismo del dolor (Robins, 1995). Diversos fármacos contribuyen a mejorar el proceso inflamatorio al inhibir enzimas específicas, tiene efectos en la contracción muscular.

Trombosis

La trombosis arterial juega un papel importante en la estabilización de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. La agregación de plaquetas es un evento que sucede en el desarrollo de trombosis. Esto es iniciado por TXA₂ de AA un potente agente de agregación plaquetaria. El cual es producido del AA en las membranas de las plaquetas.

El EPA es liberado de los fosfolípidos de las plaquetas que compiten con AA para acceder a COX produciendo una forma alternativa de tromboxano TXA₃ el cual es relativamente inactivo en la agregación de las plaquetas y vasoconstricción. Esta situación puede conducir a la reducción de la producción de TXA₂, así como disminuir la tendencia a trombosis. Una dieta alta en n-6 respecto a n-3 puede causar la producción de TXA₂ conduciendo al incremento de la tendencia a trombosis (Kinsella y col., 1990). Estudios de intervención dietaria sugieren que la producción de TXA₂ se reduce por AGPI n-3 en humanos (Ferretti y col., 1998) y en animales (Ikeda y col., 1998).

Cáncer

Numerosos estudios han investigado los efectos de los ácidos grasos en cáncer, en general el alto consumo de AGPI n-6 favorece el desarrollo de tumor, mientras que los niveles AGPI n-3 reducen o protegen contra el desarrollo de tumores.

Un estudio realizado por Igarashi y Miyazawa (2000), comparaba los efectos de ácido linoléico y el ácido linolénico en células tumorales humanas: encontraron que el ALN fue más tóxico para las células tumorales humanas que el ácido linoléico conjugado (CLA).

El DHA fue más efectivo que el EPA para inhibir la transcripción del factor activador de proteína 1 (AP-1), el cual ha sido implicado en el desarrollo de cáncer (Liu y col., 2001).

Triacilgliceroles y Lipoproteínas en Suero y Plasma

El alto contenido de TAG y colesterol en la sangre causan depósitos grasos que se acumulan en las arterias conduciendo a arteroesclerosis (endurecimiento y estrechamiento de las arterias). Los AGPI n-6 y n-3 disminuyen los niveles de colesterol LDL en plasma. Además los n-3 disminuyen los niveles de TAG. Esto es considerado importante por ser un factor de riesgo de las enfermedades coronarias (Frontini y col., 2001).

Obesidad

La obesidad se refiere a un exceso de peso corporal con respecto a la altura y se define como el peso que supera hasta en un 20% al peso normal. Existen diferentes

causas que provocan la obesidad, como trastornos endocrinos (hipotiroidismo) también los factores genéticos, por ejemplo el 80% de los niños con los dos padres obesos serán obesos, mientras que si los padres tienen un peso normal esta cifra se reduce (McGarry y Brown, 1997). El mecanismo principal para ganar peso es el consumo de un exceso de calorías.

El tratamiento para a obesidad consiste en hacer restricciones en la dieta, incrementar actividad física (Bray, 1995). El problema es modificar los patrones nutricionales a largo plazo ya que el peso perdido suele recuperarse. Actualmente se ha sugerido que el consumir n-3 y n-6 en proporciones adecuadas puede producir beneficios en la composición de grasa corporal. Según Simopoulos (2001), un consumo balanceado entre n-3 y n-6 puede favorecer un descenso de peso en personas obesas. Cuando se realiza una dieta para perder grasas y se la acompaña con una rutina de ejercicios se aclara que es necesario perder estas grasas y no masa muscular, y que el peso de la masa muscular es mayor que el de la grasa. Lo ideal es consumir alimentos ricos en n-3 una o dos veces por semana.

Un estudio en humanos encontró que quienes consumieron AGPI en forma de DAG tuvieron una significativa reducción en el área visceral, los autores Katsugary y col. (2001), concluyeron que la reducción en el área visceral fue resultado de la disminución de TAG.

Enfermedades Cardiovasculares (ECV) y Cerebrovasculares.

Algunos de los factores anteriores (presión sanguínea, obesidad, inflamación etc.) afectan directamente la función del corazón y del cerebro. Desde que se estableció una relación entre la ingesta de AGPI n-3 y el riesgo de padecer ECV al estudiar el patrón dietético de la población esquimal en Groenlandia, entonces se han publicado más de 6000 trabajos científicos sobre los efectos de los n-3 en dicha enfermedad, que indican que el consumo de AGPI n-3 de cadena larga produce efectos beneficiosos en ECV y cerebrovasculares.

Las ECV son un problema de salud pública debido a su elevada incidencia en los últimos años. Los ataques al corazón son principalmente causados por el bloqueo de la irrigación de la sangre, provocado por depósitos grasos que se desprenden y forman coágulos sanguíneos que obstruyen la luz arterial. Si el corazón no tiene suficiente irrigación no recibe el oxígeno y los nutrientes necesarios para su buen funcionamiento. Los infartos ocurren de igual manera pero en el cerebro (OMS).

Participación de AA y DHA en la Formación del Sistema Nervioso y Visual

El ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3, DHA) proveniente de ALN, es reconocido como un componente importante de la leche materna (Nettleton, 1993; Uauy y col., 1996; Sinclair, 2001), también se le ha atribuido como participe en la función retiniana (Sayanova, 2004) y en el desarrollo cerebral (Simpoulos, 1991).

El AA y DHA forman parte de los fosfolípidos que componen las membranas de las células de retina y cerebro (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina). Por ser poliinsaturados aportan gran fluidez a la membrana y esto permite el paso de nutrientes a través de esta hacia el interior o exterior de la célula. La formación del tejido nervioso y del cerebro ocurre críticamente desde los últimos tres meses de gestación en el humano hasta dos años después del nacimiento (Van Houwelingen y col., 1992).

La formación del tejido visual el cual es derivación del sistema nervioso también requiere de AGPICL, en especial DHA, ya que las membranas de los conos y bastones de la retina acumulan gran cantidad de estos. La fluidez de las membranas es muy importante para los procesos de transducción de la señal lumínica, su conversión en una señal eléctrica y en la movilización de las vesículas que contienen los neurotransmisores.

Para que se lleven a cabo estos procesos es necesaria una alimentación con un aporte extra de AGPICL (AA y DHA) de la mujer durante y después de la gestación (lactancia) ya que el feto y recién nacido no tiene capacidad suficiente de formar estos ácidos grasos a partir de precursores (Uauy y col., 2001). La elongación y desaturación de AGPI en el hígado es ineficiente por la inmadurez fisiológica de este órgano.

El feto obtiene el aporte por medio de la placenta que es permeable a los AGPICL, este aporte puede provenir de reservas de la madre (tejido adiposo), actividad biosintética (elongación y desaturación de precursores) y del aporte nutricional de AGPICL preformados. Por estas necesidades se ha sugerido el consumo de APIL ó ALA por parte de la madre (Simopoulos y col., 1999).

Ingesta de Ácidos Grasos Esenciales

Los aceites alimenticios varían en sus constituyentes en una gran proporción de acuerdo a la disponibilidad del país y la región. En los últimos años se ha incrementado el consumo de lípidos, ya que hay países donde se consume hasta el 43% de lípidos en la dieta diaria, siendo recomendado el 30% del total de los nutrientes, y de estos la mayoría son de deficiente calidad (exceso de ácidos grasos saturados y colesterol)

Requerimientos Nutrimientales y Relación de las familias n-6/ n-3

Los Comités Internacionales de Nutrición y Alimentación convocados por FAO/OMS han establecido que las grasas no deberían aportar más de un 30% de las calorías totales que consume un adulto. Pero van más allá aún, estos recomiendan que la distribución de consumo de los distintos tipos de ácidos grasos corresponda, dentro del 30%, a un aporte del 10% por parte de los ácidos grasos saturados (AGS), de un 10% de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y de un 10% de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Esto es una relación 1:1:1 entre AGS, AGMI y AGPI.

Los ácidos AL y ALN compiten por las mismas enzimas en los procesos de elongación y desaturación. Las desaturasas prefieren a los ácidos grasos n-3. El ácido linolénico n-3 puede dar origen a los ácidos AEP y ADH, pero si el consumo de γ -

linolénico n-6 aumenta la conversión es limitada. Es por ello que se requiere de un balance adecuado en el consumo de AGPI n-6 y n-3 (Singer, 1986).

Además, de acuerdo a estudios realizados se ha determinado que la relación de AGPI n-6 y de AGPI n-3 debería estar en el rango de 5:1 a 10:1 como máximo (Fats and Oils in Human Nutrition, 1994; De Dekere y col., 1998). Una relación 4:1 similar al estudio cardiaco de Lyon según Simopoulos (2001) sería óptima. Por último Saglik e Imre (2001) y Mataix (2002) indican que la proporción encontrada en la leche materna contiene una relación de 4:1 lo que corrobora las recomendaciones del estudio de Lyon. Actualmente, la alimentación no aporta las cantidades y proporciones de ácidos grasos establecidas por los comités de expertos.

Algunos especialistas, consideran más importante que la cantidad de grasa consumida, la calidad de esta, particularmente en relación a su aporte de ácidos grasos n-6 y o n-3 (Hu y col., 2001). La falta de estos AGE, durante un período de tiempo, tiene como resultado síntomas clínicos adversos (Campa, 2002), debido a esto algunas asociaciones se han dado a la tarea de investigar y recomendar las cantidades de ácidos grasos necesarias (Kris-Etherton y col., 2002). En la Tabla 1 se resumen algunas de estas recomendaciones.

Tabla 1. Ingesta diaria recomendada (IDR) de ácidos grasos esenciales.

| Recomendada por | Ácido graso | Cantidad g/día | Referencia |
|---|--------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Instituto de Medicina /Health Canadá | ALA | 1.3 - 1.7 | Kris-Etherton y col., 2002. |
| OMS-OTAN | EPA + DHA | 0.3 – 0.5 | Kris-Etherton y col., 2002. |
| Asociación Cardíaca Americana | EPA + DHA ALA | 0.5 – 1.8 1.3– 1.5 | Rees y col.,1994 |
| Estudio GISSI-Prevenzione | ALA | 1 | Marchioli y col., 2002 |

OMS organización mundial de la salud, OTAN organización del tratado atlántico ALN n-6, ácido alfa linolénico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosaheptaenoico.

Las cantidades de referencia recomiendan ingestas de ácido ALA n-6 de entre 1.3 y 2.7 g/día. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (1994) y la Organización del Tratado del Atlántico Norte (OTAN), recomiendan consumir de 0.3 a 0.5 g por día de ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (Kris-Etherton y col., 2002).

Fuentes de Ácidos Grasos Esenciales

Marinas

Microalgas. Son un amplio grupo de microorganismos fotosintéticos y heterotróficos que incluye al fitoplancton, fuente primaria en la cadena alimenticia del océano. De las aproximadamente 30 mil especies conocidas, sólo un número limitado han sido estudiadas y analizadas para la producción de lípidos.

El producto obtenido no posee el olor y sabor característicos del aceite de pescado. Los aceites producidos por las microalgas contienen una alta proporción de DHA y EPA, y son más estables a la degradación oxidativa que aquellos obtenidos de otras fuentes (Barclay y col., 1998). La producción comercial de algas posee algunos obstáculos entre los que se encuentra la necesidad de procesar grandes volúmenes de agua (Barclay, 2001), además, la producción de biomasa en estanques y piscinas

depende de la estación del año. En cultivos de microalgas realizados en fermentadores, para la producción de ácidos grasos, se obtienen bajos rendimientos principalmente debido a que la producción de biomasa es limitada por el suministro de luz y oxígeno (Barbosa, 2003).

Pescado. La principal fuente de AGPI n-3 son los aceites de pescado de origen marino. La composición y cantidad dependerá no solo de la especie sino también de la época del año y del lugar geográfico donde se produce la captura. Se ha sugerido que la síntesis de AGPI es una adaptación necesaria para contrarrestar el efecto de las adversas condiciones ambientales sobre la fluidez de las membranas (Nichols y col., 1993). Los organismos marinos obtienen los AGPI n-3 desde el fitoplancton, bacterias autotróficas marinas y componentes del zooplancton (Iwamoto y Sato, 1986; Gámez Meza y col., 2003, Noriega Rodríguez y col, 2009).

Vegetales

Los AGPI n-6 como el ácido linoleico, se encuentran en semillas oleaginosas como soya, maíz, cártamo. El AGPI n-3 como el ácido ALA está presente en las semillas oleaginosas de linaza, canola y soya, hay cantidades moderadas en nuez, maíz, oliva, girasol, ajonjolí y cacahuete (Gunstone y col., 2003) y se encuentra también en algunos vegetales verdes como; hierbabuena (menta), berro, espinaca, perejil, brócoli y lechuga (Pereira y col., 2001).

Canola. Es un vegetal que se obtuvo a través del mejoramiento de la colza, planta que forma parte de las crucíferas y el género *brassica* junto con la col, coliflor, brócoli, nabo y rábano. Se llamó canola de la frase Canadian oil low acid (aceite canadiense bajo en ácidos). Las especies más importantes son *Brassica Napus*, *B. Rapa*, *B. Juncea* y *Hyola*. Muñoz Valenzuela y col. (2006) realizaron un estudio en el cual sembraron variedades de canola en el Valle del Yaqui, Bácum, Sonora (lugar donde canola se adapta a las condiciones ambientales), obteniendo un mayor rendimiento en la producción de grano en la variedad híbrida canola *Hyola* 3040 kg/ha.

Canadá es una de las naciones de mayor producción de este vegetal, fue ahí donde se inició su mejora; pues así como contiene ácidos grasos poliinsaturados también contiene otras sustancias de sabor desagradable y que se relacionan con desordenes metabólicos. El ácido erúcico es el principal componente no deseable del aceite de canola debido a que es un ácido graso amargo y dañino para la salud. El aceite de canola ha sido utilizado para cocinar y lubricar piezas metálicas (Castro, 2002), la pasta que resulta después de extraer el aceite es un excelente alimento con el que se ha alimentado el ganado porcino y bovino. El interés que se tiene en el aceite de canola últimamente es debido al contenido de AG ya que presenta una excelente relación de ácidos grasos n6/n3 (Calvani, 2003). Este aceite es el único que se aproxima a las recomendaciones de FAO/OMS (Valenzuela. y col., 2003). En Tabla 2 se presenta la cantidad y proporción de ácidos grasos contenida en algunos aceites vegetales, donde puede observarse la producción de n-6/ n-3 del aceite de canola comparado con otros aceites vegetales.

Tabla 2. Distribución porcentual de ácidos grasos en aceites de consumo.

| Aceite | Saturados | Mono insaturados | n-6 | n-3 | Relación n-6/ n-3 |
|---------|-----------|------------------|-----|-----|-------------------|
| Canola | 6 | 58 | 26 | 10 | 2.6 |
| Soya | 15 | 24 | 54 | 7 | 7.7 |
| linaza | 9 | 20 | 18 | 53 | 0.339 |
| Maíz | 13 | 25 | 61 | 1 | 61 |
| Cártamo | 11 | 20 | 69 | - | - |
| Oliva | 14 | 77 | 8 | 1 | 8 |

Fuente: Laboratorio de lípidos y antioxidantes Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos Universidad de Chile; McKeivith B. (2005).

Producción nacional de canola. En el año 2006 el consumo nacional aparente de semillas oleaginosas fue mucho mayor al de las oleaginosas que se produjeron en el país por esta razón se importaron 5 millones de toneladas. Del total de las importaciones realizadas, el 91% (5 millones de toneladas) correspondió a soya y canola. De esta última oleaginosa se importaron 1.2 millones de toneladas, lo que indica el tamaño del mercado interno actual para este producto y una gran oportunidad para fomentar su producción.

En los últimos años se han impulsado siembras comerciales de canola en condiciones de temporada y riego, en estados como: Sonora, Tamaulipas, Jalisco, Tlaxcala y Puebla, entre 2004 y 2005 se establecieron alrededor de 8,000 hectáreas en Tamaulipas, Sonora, Tlaxcala, Estado de México y Puebla con una producción de 12,000 toneladas aproximadamente. La superficie sembrada con canola en el año 2006 fue de 4,359 ha, de las cuales 1,290 ha en el ciclo Otoño-Invierno en los estados de Sonora (100 ha), Tamaulipas (1000 ha) y Michoacán (180 ha); y 3,069 ha en el ciclo primavera-verano en los estados de Tlaxcala (1,179 ha), Hidalgo (780 ha), México (930 ha), Puebla (130 ha) y Michoacán (50 ha).

Biotechnológicas

Bacterias. La síntesis de AGPI n-3 por bacterias depende no solo del microorganismo sino también de las condiciones ambientales en las que se desarrollan. Debido a que la producción bajo condiciones de crecimiento controladas permite obtener productos consistentes y reproducibles, la producción de AGPI a través de bacterias es atractiva ya que algunas especies sintetizan sólo un ácido graso, a diferencia de la compleja mezcla producida por microalgas o acumulada en los peces (Russell y Nichols, 1999). Sin embargo, en muchos sistemas la concentración de lípidos es baja (Nichols y col., 2002). Estas especies marinas se encuentran en ambientes donde prevalecen altas presiones y bajas temperaturas. Se ha sugerido que la síntesis de AGPI es una consecuencia de la adaptación necesaria para contrarrestar el efecto de las adversas condiciones ambientales sobre la fluidez de la membrana (Nichols y col., 2002). A temperaturas de (24 °C) crecimiento se ha observado que el contenido de EPA se encuentra en el intervalo de 10 a 23.6% del total de ácidos grasos (Skerratt y col., 2002). Las productividades alcanzadas en cultivos de bacterias son muy bajas para ser consideradas en producción industrial.

Hongos. Se han estudiado diversos hongos para la producción de ácidos grasos de cadena larga que son productores de AL; otros se caracterizan por ser productores de EPA (Certik y Shimizu, 1999).

Producir ácidos grasos a partir de hongos presenta rendimientos de 1 a 2 órdenes de magnitud inferiores a las que se obtienen en los procesos basados en todo tipo de microalgas. Esto se debe al lento crecimiento de los hongos y en algunos casos, a la necesidad de producir algún tipo de estrés en el microorganismo para inducir la síntesis del metabolito deseado (Barclay, 2001).

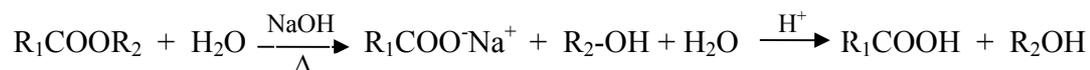
El sistema de producción utilizado para el cultivo de hongos es en la mayoría de casos la fermentación sólida, la que se caracteriza por bajas velocidades de transferencia de masa y calor (Certik y Shimizu, 1999). Las variables que determinan el crecimiento de hongos en estas operaciones, son la humedad inicial del sustrato sólido, pH, temperatura, tiempo de incubación, suplemento de nitrógeno y de aceite (Bajpai y Bajpai, 1993).

Operaciones Químicas Unitarias

Aislamiento e identificación de ácidos grasos. Clásicamente se utiliza primero la solubilización por medio de la formación de las sales de sodio o potasio y después la precipitación con ácido mineral. La mezcla de AG se sujeta a destilación o evaporación al vacío para separar los ácidos grasos volátiles, y el resto se separa por la formación de sales alcalinas. Hoy en día se usan métodos cromatográficos. Cromatografía de gas, líquido y de capa fina han sido las mejores para la separación e identificación de lípidos en particular de ácidos grasos.

Hidrólisis química alcalina. La hidrólisis química, en este trabajo consiste en calentar un éster carboxílico (triacilglicerol) con una base que actuará como catalizador y este se hidrolizará a ácidos correspondientes y un alcohol (glicerol) para obtener el ácido en forma de sal, que posteriormente será purificado. La reacción consume una molécula de agua.

Es más frecuente utilizar una base debido a que promueve la hidrólisis de ésteres por que proporciona el reactivo fuertemente nucleofílico OH^-



El alcohol más utilizado es el glicerol y respecto a bases se puede hacer uso de hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de sodio (NaOH), como catalizadores, siendo el NaOH utilizado en la producción de jabones de polvo por ser un poco más agresivo, en cambio el KOH es utilizado en la producción de jabones líquidos así como en fines alimenticios en la industria.

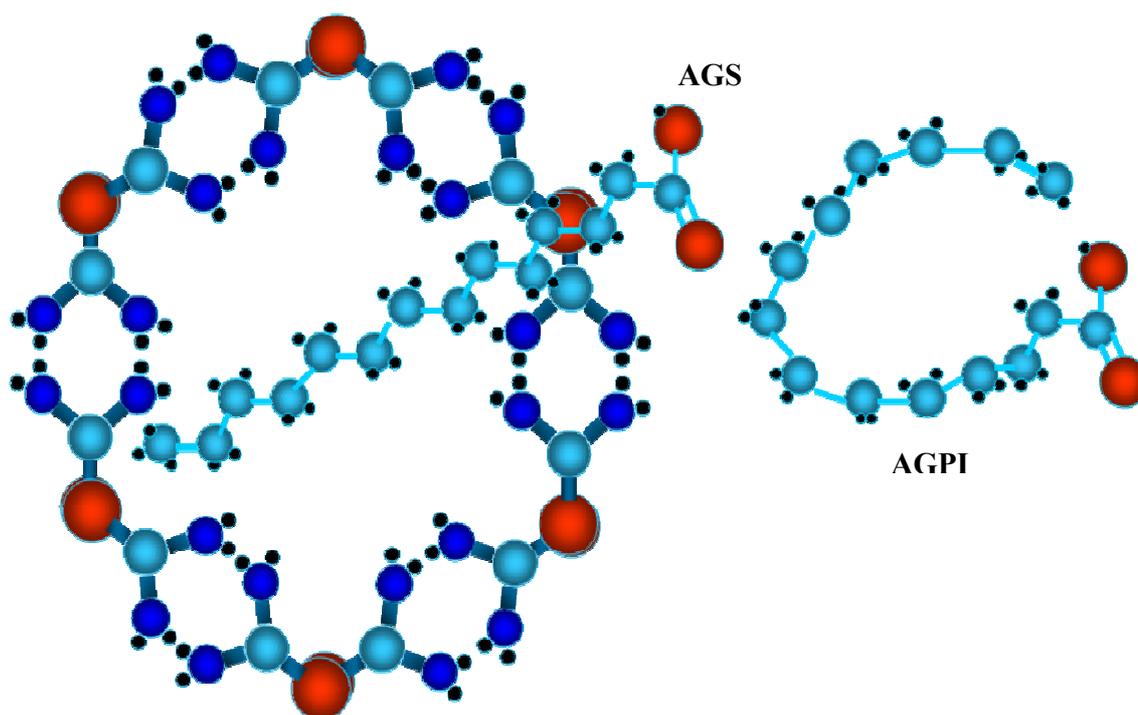
Cristalización con urea. La urea es la diamida del ácido carbónico, conocida también como carbamida, cuya fórmula química es $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Es un compuesto nitrogenado producido por mamíferos como medio de eliminación del amoníaco, el cuál es altamente tóxico. La urea es sólida, cristalina y blanca, es una sustancia higroscópica y presenta un

ligero olor a amoníaco. La urea es utilizada en procesos de purificación de sustancias. Una técnica efectiva en la purificación de lípidos es la cristalización con urea, donde al ser atrapados los AGS, son separados de los AGPI.

La urea sola cristaliza formando estructuras cerradas tetragonales con canales de 5.7Å de diámetro, sin embargo en presencia de moléculas con cadenas largas rectas esta cristaliza en una estructura hexagonal con canales de 8 a 12 Å. En presencia de cadenas no ramificadas la formación de canales es suficientemente larga para acomodar cadenas alifáticas como se muestra en la figura 9. La presencia de dobles enlaces en los carbonos de las cadenas incrementa el volumen de las moléculas y reduciendo la probabilidad de que estos formen complejos de urea.

De esta manera es más probable que los monodienos formen compuestos de urea que los dienos y estos que los trienos (Shahidi y Wanasundara, 1998; Zhu y col., 2000). Las cadenas cortas no pueden ser atrapadas en cristalización con urea.

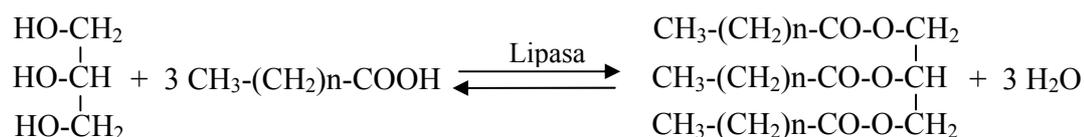
Todo esto explica porque los AGS y AGM son incorporados en los cristales hexagonales de urea. Con este método se han obtenido rendimientos de 78.0 % a 90.0 % según Gamez y col. (2003) y de 63.7 % a 81.7 % en investigación realizada por Mendes y col. (2006).



● Carbono ● Oxígeno ● Hidrógeno ● Nitrógeno

Figura 9. Formación de compuestos con urea, por atrapamiento de AGS

Esterificación. La esterificación resulta de la interacción entre un ácido y un alcohol en presencia de un catalizador que puede ser un ácido ó catalizadores básicos tales como KOH o NaOH a elevadas temperaturas. Los ácidos grasos tienen un grupo carboxilo por medio del cual pueden unirse a un alcohol, para formar el éster correspondiente, el alcohol mas empleado para esto es el glicerol. La reacción genera una molécula de agua por cada ácido graso esterificado, como se muestra a continuación.



Lípidos Estructurados

Un lípido estructurado es una molécula hecha para una función nutricional o tecnológica específica (Valenzuela y col., 2002). El conocimiento de los procesos metabólicos de los lípidos ha llevado al desarrollo de una tecnología de estructuración de los mismos, siendo posible decidir los tipos de ácidos grasos contenidos en los triacilgliceroles que se deseen estructurar (Valenzuela, 1994).

El proceso químico más utilizado de estructuración de lípidos es utilizado en mezclas de aceites en un proceso conocido como transesterificación, (Shimada Y. 2006) que permite el intercambio de ácidos grasos entre triacilgliceroles para obtener un producto con una nueva composición de ellos que, aunque al azar puede modificar sus características (Marangoni y Roseau, 1995).

En nutrición los lípidos estructurados están siendo utilizados en la formación de productos con los que es posible direccionar el destino metabólico de los ácidos grasos dependiendo del tamaño de la cadena y la posición que ocupe un ácido graso en la estructura del TAG.

Con el uso de lípidos estructurados, no solo se logran beneficios nutricionales, sino también es posible prevenir el riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedades de gran incidencia (cardiovasculares), a través del consumo de aceites diseñados con una estereoquímica específica (Hunter, 2001; Meroli, 1997).

Biocatálisis Enzimática

Las enzimas son sustancias que retardan o aceleran una reacción, llamadas también catalizadores, la mayoría son de origen proteico a excepción de las ribozimas. La catálisis es necesaria para que una gran cantidad de reacciones químicas y biológicas de importancia se lleven a cabo a velocidades favorables (Matheus, 2002). La biocatálisis enzimática ha sido estudiada en procesos de conversión de ácidos grasos a

ésteres, siendo una buena opción para la obtención de monoacilgliceroles, diacilgliceroles y triacilgliceroles (Haraldsson, 1997).

Lipasas

Las lipasas son un tipo de enzimas que pueden obtenerse de plantas, animales y microorganismos ya que las producen para sus propios requerimientos (Quinlan y More, 1993). Las lipasas son enzimas lipolíticas, cuya denominación bioquímica es acil-éster-hidrolasas, son enzimas relativamente específicas en su actividad catalítica y algunas de ellas se distinguen por su alta estereoespecificidad (Carey y Small, 1983), y destacan por su versatilidad para llevar a cabo reacciones de hidrólisis, esterificación e interesterificación con una alta calidad del producto final y altas conversiones (De Olivera y Alves, 2002).

Los triacilgliceroles son moléculas estructuralmente asimétricas, de modo que cada unión del glicerol con un ácido graso particular es diferente de otra, dependiendo de la posición de unión del ácido graso con el respectivo grupo hidroxilo del glicerol. De esta forma, cada unión se designa mediante una letra (alfa , beta , o gamma , en la nomenclatura antigua) o más específicamente como sn-1, sn-2 y sn-3 (sn = enumeración estereoespecífica), de esta forma la estereoespecificidad de las lipasas se refiere a la capacidad de estas enzimas para distinguir e hidrolizar en forma específica una o algunas

de las uniones éster del ácido graso con el glicerol en las posiciones sn-1, sn-2 o sn-3 (Bracco. 1994).

Las enzimas lipolíticas actualmente están siendo muy estudiadas ya que constituyen un importante grupo de biocatalizadores enzimáticos por su potencial biotecnológico (Benjamin y Pandey, 1998). Las lipasas pueden ser de origen bacteriano, fúngico, vegetal y animal y pueden ser purificadas (Saxena y col., 2003).

Usar enzimas estereotípicas permite mediante técnicas biotecnológicas crear lípidos estructurados. Existen trabajos de investigación en los que se demuestra que la lipasa *Candida antarctica* es eficiente en la conversión de AG a acil-gliceroles. Wiede y col (2008), prepararon diacilgliceroles a partir de subproductos de aceites vegetales refinados, el aceite de coco y mezclas de ácidos grasos de aceite de girasol fueron utilizados como materia prima obteniendo mejor rendimiento de esterificación con el uso de lipasa *Candida antarctica* (NOVOZIM 435) 52% de diacilgliceroles, aumentando a 62-72% cuando la materia prima se sometió a hidrólisis como paso previo a la esterificación. Robles y col., (1999), describen el uso de lipasa *Candida antarctica* para la alta producción de síntesis de TAG ricos en PUFA por esterificación del glicerol y un concentrado de PUFA.

Esterificación Enzimática

La aplicación de enzimas es muy elevada en los procesos de biotransformación. Varios estudios realizados han demostrado la potencialidad de las enzimas en los procesos que tienen como fin la producción de ésteres, los cuales presentan características nutraceuticas adecuadas para el consumo humano y para la industria. Es necesario realizar una selección de enzimas, ya que existen específicas para los diferentes tipos de ácidos grasos, así también existen inespecíficas.

En un estudio realizado por un grupo de investigadores encabezados por Martínez de Tuxtepec, Oaxaca, México se llevó a cabo una esterificación de ácido CLA al glicerol, con lipasa *Rhizomucor miehei* la cual dio un alto grado de esterificación (80%) en 8 h a 50 °C y 15% p/p. de enzima. Se utilizó un sistema que contenía una proporción molar de 1:2 de AGL a glicerol. Los niveles de esterificación fueron mayores al 80%, obtenido en 8 h a 40 °C con 15% de *Candida antarctica* y la misma proporción molar de reactantes. Ambas enzimas incorporaron el CLA al glicerol como acilglicerol principalmente en la forma de 1,3-diacilglicerol and 1-monoacilglicerol. Ellos sugirieron que el CLA rico en acilgliceroles puede ser empleado como sustituto de grasas y aceites naturales. (Martínez y col., 2005)

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación del Departamento de Ciencias Químico, Biológicas y Agropecuarias en la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte Campus Caborca.

Materiales

Materia Prima

La materia prima fue aceite puro de canola refinado (0.005% de *Ter*-butil hidroquinona, TBHQ) extraído por medio de prensado mecánico sin uso de solventes, producido por Proteínas y Oleicos, S.A. de C.V. en Mérida Yucatán, México.

Enzima

La enzima que se utilizó fue lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada en resina acrílica macroporosa Novozym-435 (Novo Nordisk Biochem Nort America, Inc.).

Reactivos

Se usó TBHQ como antioxidante, KOH para saponificar y hexano para extracción 95% de J.T. Baker, HCl Merck para acidificar, se utilizaron tiras reactivas pH 0-14 Merck, y sulfato de sodio anhidro J.T. Baker grado reactivo como desecante. Para llevar a cabo cristalización con urea se usó urea grado reactivo de J.T. Baker. Además, para esterificación enzimática se usó glicerol Sigma 99.8% de pureza, así como mallas moleculares (silicato de aluminio y sodio) con diámetro de poro de 4 Å, 1.6 mm de grosor.

Para el análisis de las muestras esterificadas por HPTLC; se utilizó una mezcla de solventes de cloroformo-metanol grado reactivo J.T. Baker. La fase móvil fue de una mezcla de solventes: hexano-éter dietílico-ácido fórmico, el reactivo revelador se conformó de Iodo y alcohol etílico al 99%, Sigma. También se utilizaron estándares comerciales sigma (mono-olein, 1-3 dioleina, 1-2-dioleil-glicerol, gliceril-trioleato).

Equipos

Se utilizó una balanza digital de la marca Adam (250 g), plancha Corning, para la evaporación de solventes un rotavapor de la marca Buchi Swertzerland con baño refrigerado Poliscience. En la separación de cristalización con urea de los ácidos grasos

se usó una centrifuga refrigerada Thermo Eletron Corporation. Los tubos de centrifuga fueron equilibrados en una balanza de doble plato Ohaus. Un refrigerador de la marca Torrey y un congelador de la misma marca.

El análisis de acilgliceroles se llevó a cabo con un Equipo HPTLC (CAMAG) provisto de placas para HPTLC sílica gel 60 F₂₅₄ 10x10 cm, una cámara para el desarrollo cromatográfico, también capilares, dispensador de capilares, pluma para tomar el capilar, nivelador de cámara de desarrollo y base para colocar la placa y ajustarla para aplicación de las muestras así como un dispensador de yodo y una cámara de luz UV (240 nm).

Procedimientos Experimentales

Obtención de Ácidos Grasos por Hidrólisis Química Alcalina

Se pesaron 100 g de aceite de canola comercial en un vaso de precipitado agregando 0.02% de THBQ como antioxidante. El aceite fue saponificado usando 200 mL de KOH 7 M al 70% en etanol y calentado a reflujo por 1 h (figura 10 a). Se adicionaron 240 mL de agua destilada para extraer la materia saponificable y la materia insaponificable fue extraída con hexano 2x350 y descartada. La capa acuosa que contenía la materia saponificable fue acidificada a pH =1.0 con HCl 3M. La mezcla se

transfirió a un embudo de separación y se extrajeron los ácidos grasos con 400 mL de hexano. El hexano conteniendo los ácidos grasos libres (AGL) se secó con sulfato de sodio anhidro, el solvente se removió en un rotavapor a 40 °C vacío parcial de 26 mmHg y baño de recirculación a 7 °C (Gámez y col., 2003). Los AGL se colocaron en un vial y se mantuvieron en congelador a -30°C para usarse en cristalización con urea.

Concentración de AGPI por Cristalización con Urea

15 g de AGL se mezclaron con 25 g de urea en etanol al 95% (100 mL). La mezcla se calentó hasta que se tornó en un color claro homogéneo (Figura 10 b) y fue transferida a tubos de centrifuga previamente tarados y enfriada rápidamente en baño de agua con hielo para guardarse en el refrigerador a 4 °C por 8 h. Se separaron los cristales por centrifugación a 6000 xg; 15 min a 0 °C. El sobrenadante fue una solución de urea con AGPI, mientras que la capa inferior fue una solución de complejos de urea y AGS, la cual fue descartada. El sobrenadante se mantuvo a -30 °C por 12 h, se repitió el proceso de centrifugación con las condiciones descritas anteriormente con excepción de la temperatura (-10 °C). Un volumen (donde se encontraban los AGPI), se acidificó con HCl 3 N a pH=4, posteriormente se adicionó un volumen de agua y un volumen de hexano. La mezcla se transfirió a un embudo de separación, agitándose por 30 min, posteriormente se dejó reposar por 30 min, la fase orgánica (hexano) fue separada y se evaporó en un rotavapor a 40 rpm, 40 °C, a un vacío parcial de 26 mm Hg. La masa de

AGL obtenida fue determinada gravimetricamente para el cálculo del rendimiento de los AGPI.

Esterificación Enzimática

La esterificación se llevó a cabo colocando en un reactor enchaquetado (Figura 10 c) (≈ 1000 mg) una determinada proporción molar de AGL (1.32, 2, 3, 4, y 4.68) al glicerol. Para evitar la oxidación de los AG se agregó 0.02% (p/p ácidos grasos) de TBHQ a la mezcla de reacción. El frasco de reacción fue colocado sobre una placa agitadora e introducido en un reactor conectado a un baño termostático a temperatura (35, 42, 52, 62, y 69 °C) y tiempo (40, 80, 140, 200 y 240 min) experimentales y con agitación constante (280 rpm). Después de agitar la mezcla de reactantes por 5 min, se adicionaron 50 mg de enzima (5% p/p) para iniciar la reacción de esterificación de los ácidos grasos al glicerol. Para eliminar el agua producida, se agregaron 20% de mallas moleculares p/p de reactantes después de transcurrir 45 min de reacción (Noriega, 2002).

Para monitorear el curso de la esterificación se tomaron dos muestras: una de 50 μL para determinar el grado de esterificación y otra de 100 μL para analizar la composición de acilgliceroles, el vial fue almacenado en congelador a -30 °C para su análisis posterior por HPTLC. En los experimentos de cinética de esterificación se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo y se analizaron de la misma manera.

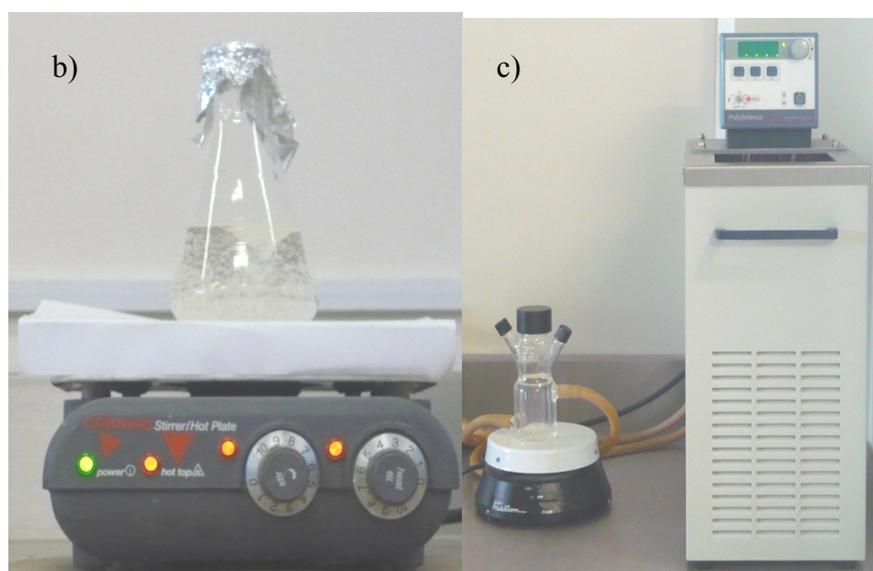


Figura 9. Imagen del montaje experimental. a) saponificación en baño María a reflujo, b) disolución de AGL en solución de urea c) esterificación enzimática en reactor intermitente enchaquetado.

Análisis de Materia Prima y Productos

Rendimiento en la Obtención de AGPI

El aceite de canola fue sometido a dos procesos previos a la esterificación enzimática, primero el aislamiento de AGL del glicerol por hidrólisis química alcalina y extracción con solventes, posteriormente a la técnica de concentración por cristalización con urea.

El aislamiento fue determinado por hidrólisis química alcalina y por extracción con solventes (agua-hexano) donde fueron obtenidos los ácidos grasos saturados e insaturados en su forma libre. Posteriormente se realizó el proceso de concentración por cristalización con urea para la separación de los AGS de los AGPI, en este proceso se excluyeron los AGS en forma de complejos de urea, mientras que los AGPI fueron recuperados en el solvente para después ser extraídos por evaporación.

El rendimiento de AGS más AGPI fue calculado gravimetricamente al igual que el rendimiento de AGPI, calculando la diferencia entre el solvente más los AGPI antes y los AGPI después de someter al rotavapor para remover el solvente.

Grado de Esterificación (GE)

Para la determinación del GE, los ácidos grasos libres de cada muestra esterificada se titularon con NaOH 0.01 M, usando fenoftaleína como indicador. Se calculó el grado de esterificación de acuerdo a la relación inicial de ácidos grasos libres y los ácidos grasos libres finales en la reacción con la ecuación para el porcentaje de esterificación (Ec.1).

$$GE (\%) = \frac{AGL_i - AGL_f}{AGL_i} \times 100 \quad Ec. (1)$$

Donde:

GE = Grado de esterificación

AGL_i = Ácidos grasos libres al inicio de la reacción

AGL_f = Ácidos grasos libres al final de la reacción

Cromatografía en Placa (HPTLC)

Para determinar el porcentaje de formación de monoacilglicérol, diacilglicérol y triacilglicérol formados se analizó el producto obtenido por HPTLC (High performance thin layer chromatography, por sus siglas en inglés). Al iniciar con el análisis por HPTLC, una alícuota de 1.0 μ L de cada una de las muestras de lípidos esterificados se colocó en un vial de 2 mL, se agregó 1 mL de una mezcla de solventes

de cloroformo-metanol 2:1 para la extracción y dilución de lípidos. En cada vial se introdujo un tubo capilar (capacidad de 1.0 μ L) para su llenado (5 s). Posteriormente sobre la Placa de 10x10 cm sílica gel 60 (F₂₅₄) se aplicaron las muestras por duplicado ajustando el aplicador a una distancia de 2.5 mm del borde de la placa con una separación de 5 mm entre cada muestra. Para el desarrollo cromatográfico, se agregó a cada canal de la cámara de desarrollo, 2 mL de solvente de elución compuesto por hexano-éter dietílico-ácido fórmico 80:20:1. Después de colocar la placa hacia abajo, las tiras de vidrio se empujaron hasta hacer contacto con ella y provocar por capilaridad que el solvente eluyera por la fase estacionaria. El recorrido total se estableció a 4.5 cm de distancia desde el extremo hasta el centro de la placa por cada lado, para evitar el cruce de ambas corridas, con una duración de aproximadamente 5 min.

Para el revelado, la placa se extrajo de la cámara y se permitió la evaporación del solvente en frío (5 min). Colocando la placa dentro de la campana de extracción sobre una base de plástico en posición vertical, se roció una solución de Iodo alcohólico (0.5% p/v) con el atomizador eléctrico, hasta lograr una coloración amarillo claro del fondo de la placa. Después de evaporar el solvente se visualizaron las bandas de color café correspondientes a los acil-glicéridos formados durante la esterificación. Para mejor apreciación se utilizó una cámara de revelado CAMAG con lámpara luz UV (254 nm).

Diseño de Experimentos

Se utilizó un diseño de composición central rotatable (DCC) tipo Box Wilson compuesto por 18 corridas en total, de las cuales los primeros 8 correspondieron al diseño factorial 2^3 , los siguientes 6 fueron experimentos axiales y los últimos 4 repeticiones al centro. Se estudiaron las siguientes variables: proporción molar de AG al glicerol (X_1), tiempo en minutos (X_2) y temperatura de reacción en grados centígrados (X_3), cada variable se componía de 5 niveles (Tabla 3), los niveles de cada variable fueron elegidos de acuerdo a la literatura (Hernández, 2002), y experimentación preliminar (Tabla 4).

Las variables de respuesta fueron: grado de esterificación (GE), porcentaje de formación de MAG, DAG y TAG respectivamente. Cada experimento fue realizado por duplicado.

Efecto de las Variables en Esterificación Enzimática

Para conocer el efecto de las variables se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), una regresión polinomial para el establecimiento del modelo matemático, utilizando el paquete estadístico JMPin 4.0.1. (SAS, 2001).

Tabla 3. Arreglo general para el diseño de composición central rotatable (DCC).

| Corrida | Variable | | |
|---------|----------------|----------------|----------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ |
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | -1.68 | 0 | 0 |
| 10 | 1.68 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | -1.68 | 0 |
| 12 | 0 | 1.68 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | -1.68 |
| 14 | 0 | 0 | 1.68 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | 0 | 0 |

X₁=Proporción molar de ácidos grasos libres/glicerol, X₂=Tiempo (min), X₃=Temperatura (°C).
Fuente: Montgomery, 2008.

Tabla 4.- Variables y niveles para el diseño de composición central rotatable (DCC).

| Variable | Nivel codificado de variables y su significado | | | | | |
|---------------------------------|--|------|----|-----|-----|------|
| | Símbolo | -168 | -1 | 0 | 1 | 1.68 |
| Relación AGL/glicerol (mol/mol) | X_1 | 1.32 | 2 | 3 | 4 | 4.68 |
| Tiempo de reacción (min) | X_2 | 40 | 80 | 140 | 200 | 240 |
| Temperatura de reacción (°C) | X_3 | 35 | 42 | 52 | 62 | 69 |

Optimización de variables para Esterificación Enzimática

La optimización de las condiciones más adecuadas, se obtuvo a través del análisis del GE, realizando un análisis de superficie de respuesta con el paquete estadístico JMPin 4.0.1 (SAS Inc.) en el cual se establecieron las condiciones óptimas de esterificación; proporción molar, tiempo y temperatura utilizando un modelo de segundo orden para la predicción de las variables con el siguiente modelo matemático de segundo orden (Montgomery, 2008):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde: β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} , son respectivamente el efecto combinado, efecto lineal, efecto cuadrático y la interacción en la regresión.

Cinética de Esterificación

Se llevó a cabo una cinética de esterificación para monitorear la velocidad del porcentaje de formación de acilgliceroles a partir de los AGPI concentrados con urea más glicerol. La cinética fue llevada a cabo a una temperatura de 52° C, una relación molar de 3 mol AGL/mol glicerol, las cuales correspondían a los niveles centrales de los factores, proporción molar y temperatura. Se tomaron muestras a los tiempos elegidos en el DCC (0, 40, 140 y 240 min).

Formación de Acil-gliceroles

Para cuantificar los mono di y tri-acilgliceroles formados en el transcurso de esterificación, las placas HPTLC CAMAG F₂₅₄ desarrolladas y reveladas fueron escaneadas y se sometieron al programa Scion image 4.0.3.2 (Scion Corp.), donde fue trazada una línea transversal a los componentes de cada una de las muestras de la imagen, con el objetivo de obtener un cromatograma. El programa determinó la intensidad del color (densitocolorimetría) dando una serie de datos expresados en pixeles. Posteriormente, se exportaron los datos al programa Excel para calcular el porcentaje de acilgliceroles integrando el área de cada componente por el método del trapecio, con la siguiente expresión matemática:

$$A_T = n Y_M - \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} (y_i + y_{i+1}) \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

A_T = Área total de un pico integrado.

Y_M = coordenada de inicio de la base menor.

n = es el tamaño del diferencial dado por $X_F - X_0$,

y_i = coordenada final de la base menor.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Aislamiento y Concentración de AGPI

Aislamiento de Ácidos Grasos

La Tabla 5 describe el balance de cantidades obtenidas en cada una de las etapas del proceso de hidrólisis química alcalina. Para el aislamiento de ácidos grasos se logró un producto de AGL total de 179 g a partir de 200 g de aceite de canola. Esto es equivalente a un rendimiento del 89.5% para el proceso de aislamiento de AG (Tabla 7).

Concentración de AGPI

En la Tabla 6 se describen cantidades aproximadas obtenidas en cada etapa del proceso de concentración con urea. En promedio se obtuvieron 3.5 g de AGPI cuando se utilizaron 15 g de AG aislados del aceite de canola. Esto equivale a un rendimiento del 23%, y debido a que la composición de AGPI en el aceite de canola corresponde a un 30% como máximo, la eficiencia en esta etapa equivale a un 82% (Tabla 7).

Tabla 5. Balance de materiales en el proceso de hidrólisis química alcalina.

| | | Cantidad g |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Extracto lipídico | | |
| | aceite de Canola | 200 |
| | KOH 7 N en 70% Etanol | 400 |
| | | 600 |
| Extracción con solventes | | |
| | Extracto lipídico | 600 |
| | H ₂ O agregada | 480 |
| | Hexano | 700 |
| | | 1780 |
| Materia descartada | | |
| | Hexano + materia no saponificable | 700 |
| | | 700 |
| Materia saponificable | | |
| | H ₂ O agregada | 480 |
| | H ₂ O (antes en KOH 7N) | 400 |
| | Glicerol + sales ácidos grasos | ≈ 200 |
| | | 1080 |
| Acidificación de saponificado | | |
| | HCl 3N agregado | Gota a gota |
| | Materia saponificable (acuosa) | 1080 |
| | | 1080 |
| Separación | | |
| Superior | ácidos grasos libres | 179 |
| Inferior | H ₂ O agregada | 480 |
| (descartada) | H ₂ O antes de KOH 7 N | 400 901 |
| | Glicerol | 21 |
| | | 1080 |
| Hexano (lavado) | | |
| | Capa superior hexano | 179 400 |
| | | 579 |
| Evaporación Rotavapor | | |
| | AGL | 179 |

Tabla 6. Balance de materiales en el proceso de concentración de AGPI por exclusión en la cristalización con urea.

| Solución urea AGL | | ≈ Cantidad g |
|---------------------------------|-------------------|---------------------|
| | AGL | 15gr |
| | Urea | 25 gr |
| | Etanol 95% | 100ml |
| | | 140 |
| Centrifugación 1(5 °C) | | |
| | Solución | 105.99 gr |
| | Sobrenadante | 42.60 gr |
| Centrifugación 2 (-9 °C) | | |
| | Sobrenadante | 38.219 |
| Acidificación pH=4 | | |
| | Gotas | |
| | sobrenadante | 38.219 |
| | H ₂ O | 40 |
| | Hexano | 40 |
| Separación de fases | | |
| | Agua (descartada) | 40 |
| | Hexano + AGPI | 43.45 |
| Evaporación de hexano | | |
| | AGPI | 3.22 |
| | | 3.45 |

Tabla 7. Resultados obtenidos en los procesos previos a esterificación enzimática.

| Proceso | Inicio (g) | Producto (g) | Rendimiento (%) | Máximo (%) | Eficiencia (%) |
|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Hidrolizado | 200.0 | 179.0 | 89.0 | 90.2 | 98.6 |
| Concentración de AGPI | 15.0 | 3.7 | 24.6 | 30.0 | 82.0 |

Grado de Esterificación

En este trabajo las condiciones experimentales más apropiadas para un mayor grado de esterificación de acuerdo al diseño elegido experimentalmente fueron; una proporción molar de 2.0 mol AGL/mol glicerol en un tiempo de 200 min y una temperatura de 62 °C obteniendo un 83.01% de esterificación. El menor rendimiento fue de un 12.38%, el cual se obtuvo con proporción molar de 1.32 mol AGL/mol glicerol en un tiempo 140 min y temperatura de 52 °C (Tabla 8).

Tabla 8. Variables y respuestas del grado de esterificación (GE)

| Corrida | Variable | | | Respuestas | | | |
|---------|----------------|----------------|----------------|------------|--------|--------|--------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | GE (%) | MAG(%) | DAG(%) | TAG(%) |
| 1 | 2 | 80 | 42 | 38.67 | 16.8 | 21.8 | 0.0 |
| 2 | 4 | 80 | 42 | 17.09 | 8.6 | 6.9 | 0.0 |
| 3 | 2 | 200 | 42 | 50.00 | 21.4 | 23.0 | 0.0 |
| 4 | 4 | 200 | 42 | 43.58 | 20.8 | 17.3 | 0.0 |
| 5 | 2 | 80 | 62 | 29.24 | 14.5 | 10.1 | 0.0 |
| 6 | 4 | 80 | 62 | 27.35 | 11.7 | 11.5 | 0.0 |
| 7 | 2 | 200 | 62 | 83.01 | 31.5 | 22.2 | 23.8 |
| 8 | 4 | 200 | 62 | 52.99 | 29.6 | 13.5 | 0.0 |
| 9 | 1.32 | 140 | 52 | 12.38 | 6.7 | 2.8 | 0.0 |
| 10 | 4.68 | 140 | 52 | 27.64 | 16.7 | 7.5 | 0.0 |
| 11 | 3 | 40 | 52 | 26.41 | 13.6 | 9.1 | 0.0 |
| 12 | 3 | 240 | 52 | 66.03 | 34.9 | 24.0 | 0.0 |
| 13 | 3 | 140 | 35 | 14.16 | 6.6 | 6.2 | 0.0 |
| 14 | 3 | 140 | 69 | 64.46 | 19.3 | 24.3 | 15.4 |
| 15 | 3 | 140 | 52 | 42.45 | 22.7 | 15.0 | 0.0 |
| 16 | 3 | 140 | 52 | 40.56 | 21.6 | 14.3 | 0.0 |
| 17 | 3 | 140 | 52 | 43.92 | 23.4 | 15.5 | 0.0 |
| 18 | 3 | 140 | 52 | 41.50 | 22.1 | 14.6 | 0.0 |

X₁=Proporción molar, X₂=Tiempo, X₃=Temperatura, G.E.=Grado de Esterificación,
MAG=Monoacilglicerol, DAG=Diacilglicerol, TAG=Triacilglicerol

Efecto de las Variables en el Grado de Esterificación

Efecto de Proporción Molar

A una relación molar de 2.0 se obtuvo el mayor grado de esterificación, mientras que a una relación molar de 1.32 se obtuvo el menor rendimiento, por lo cual se puede pensar que a mayor relación molar se obtiene mayor rendimiento, sin embargo, a una relación molar de 4.0 se obtuvieron porcentajes bajos (17.09%). Es decir, los valores óptimos para la esterificación se encontraron cerca de los valores centrales en la experimentación. Cerdan y col. (1998) obtuvieron mayor grado de esterificación (90%) cuando las proporciones molares son bajas (0.6-1.0) proporción mol AGL/mol GLI.

Efecto de la Temperatura

A una temperatura de 35 °C se obtuvo 14.16% de esterificación, mientras que a temperatura de 69 °C se obtuvo el 64.46% de esterificación esto ocurrió a tiempo y proporción molar constante. Con esto se deduce que al aumentar la temperatura también aumenta el grado de esterificación. Como regla, el aumento de la temperatura aumenta la actividad enzimática, lo cual explica el fenómeno observado.

Efecto del Tiempo

A un tiempo de 35 min se obtuvo 26.41% de esterificación y al tiempo de 200 min se obtuvo el más alto rendimiento (83%) experimentalmente. Esto indica que a mayor tiempo de reacción, se puede lograr una mayor esterificación. Datos que fueron confirmados al realizar el experimento de cinética, donde se monitoreó el GE en el transcurso del tiempo.

Cinética de Esterificación

La cinética de esterificación se llevó a cabo experimentalmente para observar la velocidad de formación del producto esterificado utilizando las siguientes condiciones; temperatura de 52 °C, proporción molar 3 mol AGL/mol glicerol y tiempos de 40, 80, 140, 200 y 240 min. Las variables temperatura y proporción molar utilizadas correspondían a los experimentos centrales del diseño de composición rotatable Box Wilson. En la Figura 11 se muestra el transcurso de la reacción de esterificación con respecto al tiempo. Observando que al inicio de la reacción, la velocidad de formación de acilglicérol es alta y al transcurrir el tiempo, la velocidad disminuye, presentando un decaimiento aproximadamente a 80 min del inicio de la reacción. También se observa que a partir de 140 min la velocidad aumenta de nuevo mostrando que a un tiempo de 240 min se obtiene un porcentaje de esterificación enzimática de aceite de canola del 66%, con tendencia a aumentar si se aumentara el tiempo de reacción.

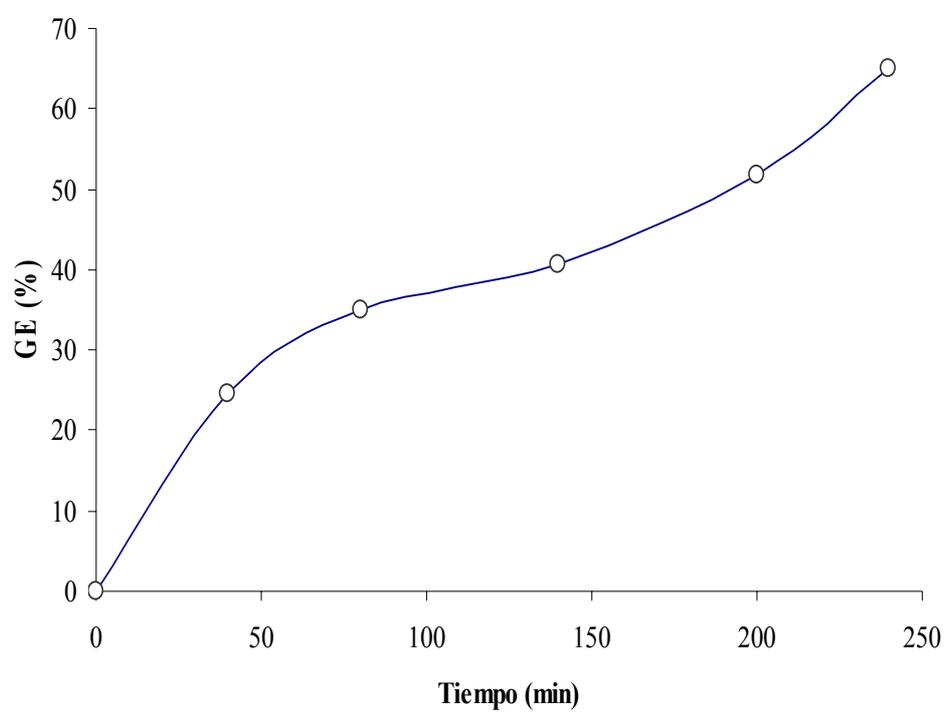


Figura 11. Cinética de la esterificación enzimática de los AGPI del aceite de canola.

Formación de Acilglicerol

Formación de Monoacilglicerol (MAG)

El análisis de las placas fue útil para cuantificar los acilglicerol formados en múltiples muestras. La Figura 12 muestra el desarrollo cromatográfico (HPTLC) para la cinética de esterificación en una placa coloreada y escaneada, donde puede observarse las bandas correspondientes a los acilglicerol formados en esterificación. Se muestra la formación de monoacilglicerol, la cual alcanzó un máximo de 34.9% a una proporción molar de 3 mol AGL/mol glicerol, en un tiempo de 240 min y a temperatura de 52 °C. La velocidad formación de MAG es más rápida, esto implica que los monoacilglicerol se forman al iniciar la reacción y ó disminuyen en la medida que se van formando DAG y TAG conforme transcurre el tiempo.

Formación de Diacilglicerol (DAG)

El porcentaje de esterificación máximo de DAG en este trabajo fue de 24.3% a una proporción molar de 3.0 mol AGL/mol Glicerol, un tiempo de 240 min y a 69 °C. La Figura 12 muestra los acilglicerol formados en esterificación donde puede apreciarse la aparición de los DAG a partir de los 40 min y se encuentran presentes a lo largo de la reacción.

Formación de Triacilgliceroles (TAG)

Se alcanzó un 23% de TAG formados en la esterificación enzimática del aceite de canola a una proporción molar de 2 mol AGL/mol Glicerol, un tiempo de 200 min y a temperatura de 62 °C. Los resultados obtenidos podrían ser mayores posiblemente debido a que el tiempo de formación de TAG es más elevado.

En la Figura 13 se muestra el cromatograma obtenido por el análisis de densitocolorimetría, una vez integrados los picos por medio de un programa (Scion image), se puede obtener la concentración de acilgliceroles en cada experimento. También se muestra la comparación con los estándares utilizados (1-3 dioleina, 1-2-dioleil-glicerol, gliceril-trioleato, mono-olein).

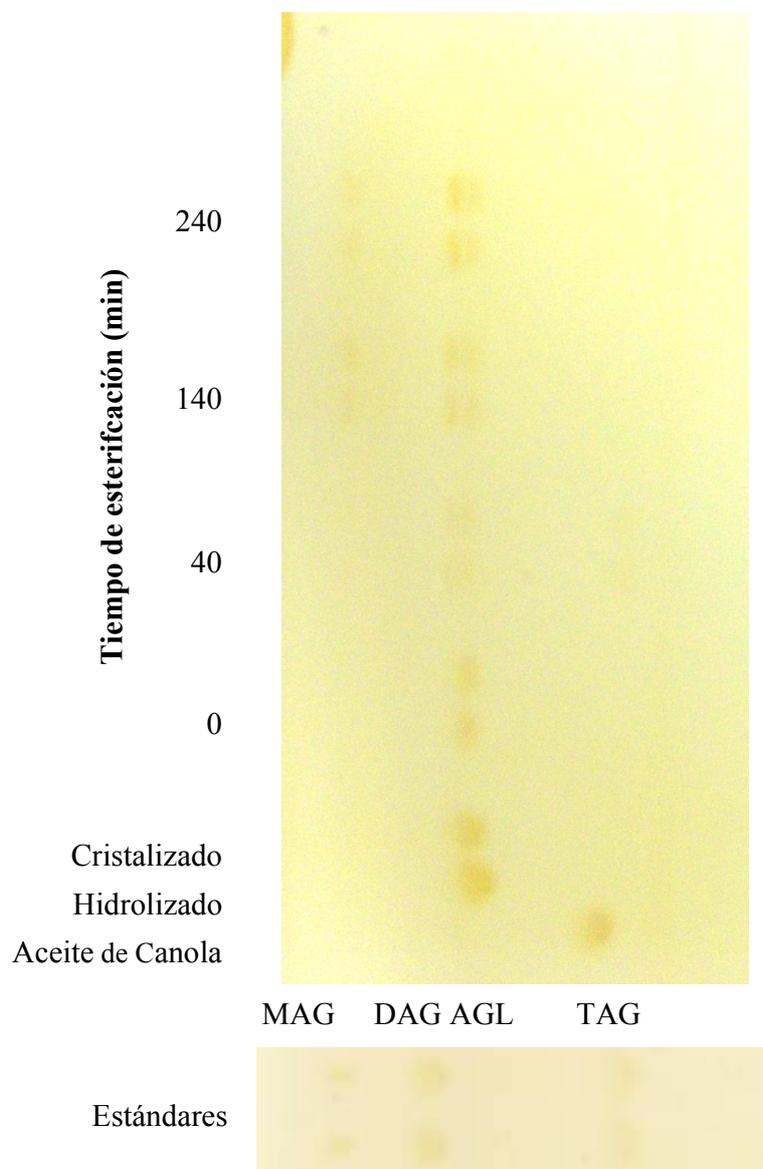


Figura 12. Desarrollo cromatográfico de cinética de esterificación. Las muestras fueron aplicadas por duplicado

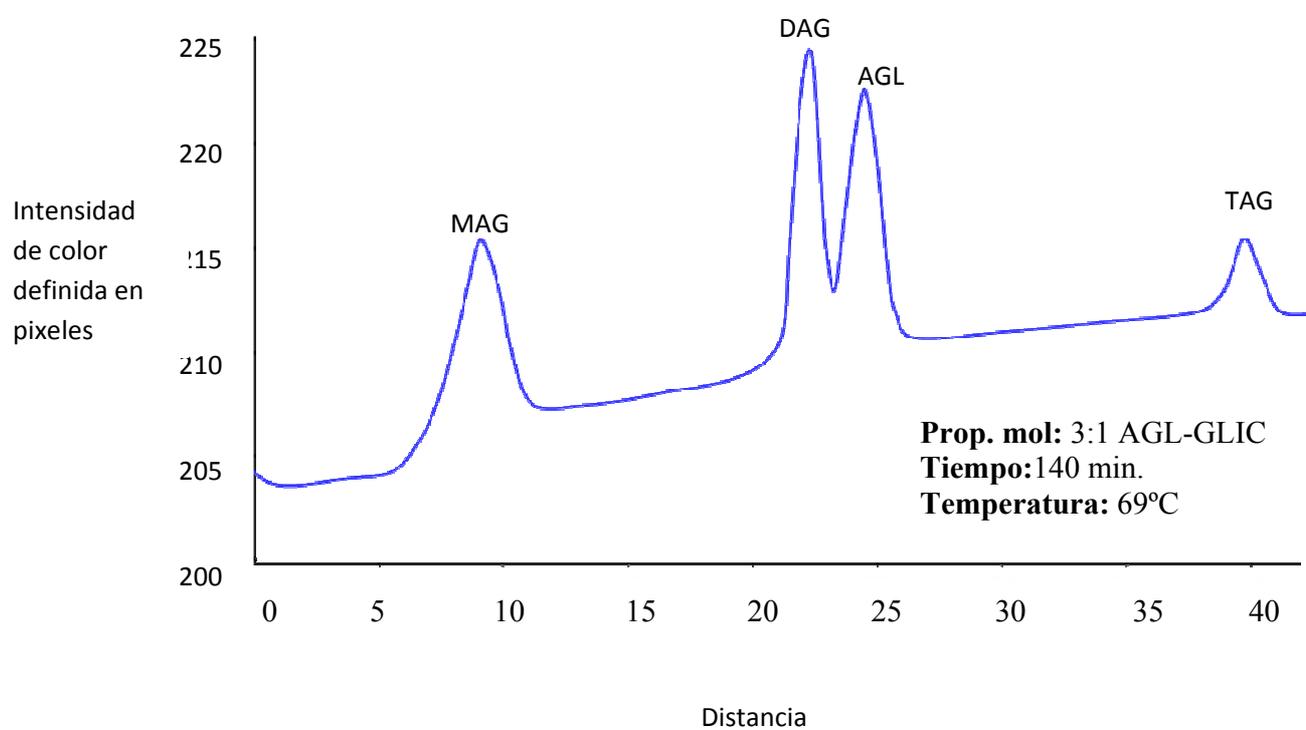


Figura 13. Cromatograma del análisis por densitocolorimetría

Optimización de la Esterificación

Análisis de Superficie de Respuesta

El análisis de superficie de respuesta fue realizado con la Ec 4. Resultado de un análisis de regresión. El análisis estadístico da los valores del grado de esterificación para cada variable y sus intervalos. El mejor modelo para el ajuste de los datos experimentales es el siguiente:

$$\begin{aligned} \text{GE (\%)} = & 26.06 - 0.875 T + 0.283 t - 12.49 P_M + 0.007 T^2 - 0.001 t^2 + 3.21 P_M^2 \\ & + 0.008 T t - 0.027 t P_M - 0.048 T P_M \end{aligned} \quad \text{ec. (4)}$$

Donde: t es el tiempo, min.

T es la temperatura, °C.

P_M es la proporción molar, mol AGL/mol glicerol

La Tabla 9 muestra los parámetros estimados así como su probabilidad de ajuste. A partir de la ec. 4 se graficaron los datos de cada variable para obtener como respuesta el porcentaje del grado de esterificación. En la Figura 14 se grafican todos los valores de esterificación, que se pueden obtener si se realizara una corrida en cualquier punto dentro del intervalo de los niveles seleccionados en DCC. También muestra como al incrementar el tiempo y la temperatura se favorece el grado de esterificación, esto ocurre a una proporción molar constante.

Tabla 9. Parámetros por regresión para cada producto formado durante la esterificación enzimática.

| Variable | Parámetros estimados | Probabilidad |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Intercepción | 26.064231 | 0.8964 |
| Temperatura (°C) | -0.874991 | 0.8754 |
| Tiempo (min) | 0.2834419 | 0.7016 |
| Proporción molar (mol/mol) | -12.49448 | 0.7879 |
| Temperatura x tiempo | 0.0086646 | 0.4119 |
| Tiempo x proporción molar | -0.027021 | 0.7940 |
| Temperatura x proporción molar | -0.048875 | 0.9371 |

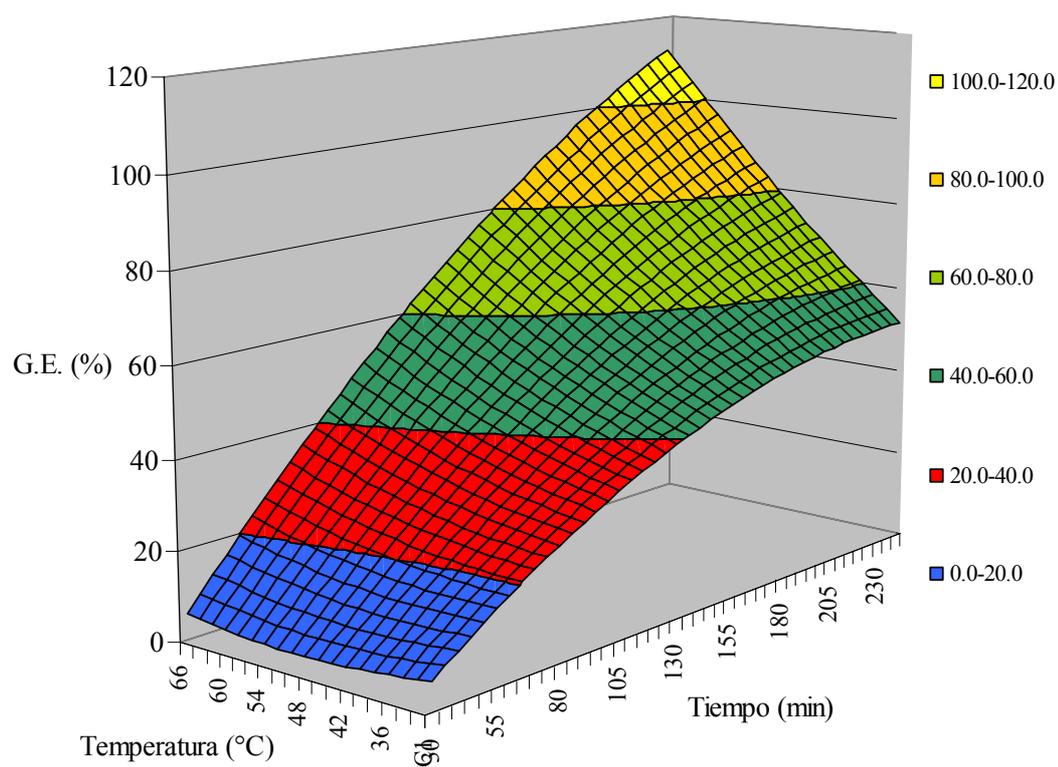


Figura 14. Superficie de respuesta para el grado de esterificación.

Condiciones Óptimas de Reacción

Las condiciones óptimas en una reacción indican el favorecimiento de la formación de productos deseados para alguna investigación. Al conocerlas permite un mayor rendimiento de producción. La Tabla 10 muestra los valores arrojados por el programa estadístico J.M.P.in 4.0.1. (SAS, Inc.), que indica las condiciones más adecuadas para la esterificación enzimática de AGPI al glicerol con la enzima NV-435, también se muestra el mayor GE obtenido experimentalmente, observándose un ligero aumento en el rendimiento de los valores ajustados por J.M.P. in. 4.0.1., así como en los valores de los niveles de cada variable en comparación con los experimentales.

Los resultados del modelo son altos al igual que los resultados experimentales por lo que se puede decir que existe un buen ajuste y que la esterificación enzimática con NV-435 es una buena opción para la formación de acilglicerol.

Tabla 10. Condiciones óptimas de las variables en el grado de esterificación enzimática de AGPI.

| | G.E. (%) | Proporción molar (mol AGL/mol glic.) | Tiempo (min) | Temperatura (°C) |
|---------------------|-------------|---|-----------------|---------------------|
| Modelo de regresión | 85.5 | 1.4 | 236.0 | 67.8 |
| Experimental | 83.0 | 2.0 | 200.0 | 62.0 |

CONCLUSIONES

Se obtuvo un concentrado de AGPI a partir de aceite de canola, excluyéndolos en la etapa de cristalización con urea, con un rendimiento del 22%.

Experimentalmente se logró 83% de esterificación global de los AGPI aislados del aceite de canola.

Es posible dirigir la reacción controlando las variables de proporción molar, tiempo y temperatura.

El aumento de tiempo y temperatura de reacción favorecen el grado de esterificación global. Al aumentar la proporción molar se forma mayor cantidad de monoacilgliceroles, mientras que al disminuir la temperatura se favorece la formación de diacilgliceroles.

Se confirma la utilidad de la lipasa de *Candida antactica* para la esterificación enzimática de AGPI.

Los lípidos estructurados obtenidos en este trabajo contienen AGPI en una proporción cercana a la recomendada, que pueden ser usados como una alternativa para la prevención y tratamiento de enfermedades crónico degenerativas provocadas por un desbalance de ácidos grasos esenciales.

BIBLIOGRAFÍA

- Akoh C. C. y Moussata C. O. 1998. Lipasa-catalized modification of borage oil: incorporation of capric and eicosapentaenoic acids to form lipids structured lipids. *J. Am. Oil Chem Soc.* 75: 697-701.
- Azevedo A, Ramos E, von Hafe P. y Barros H. 1999. Upper-body adiposity and risk of myocardial infarction. *J Cardiovasc Risk*, 6: 321-325.
- Bajpai P, Bajpai P. K. 1993. Eicosapentaenoic acid production of microorganisms. A review. *J. Biotechnol*, 30: 161-183.
- Bang H. O., Dyerberg J, Sinclair H. M. 1980. La composición de los alimentos de los esquimales en groenlandia. *Am J Clin Nutr*. Diciembre, 33: 2651-2657
- Barbosa M. J., G.V. 2003. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimization. Ph. D. Thesis. *Wageningen University. Wageningen. The Netherlands*.
- Barclay W., Abril R., Abril P., Weaver C., Ashford A. 1998. Production of docosahexaenoic acid microalgae and its benefits for use in animal feeds. *World Rev Nutr Diet*, 83: 61-76.
- Barclay W. R. 2001. Eggs containing high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids and methods for producing the same. US Patent no. 20010000151.
- Bray G. A. The syndromes of obesity: an endocrin approach. En L. J. De Groot (Ed.) *endocrinology*, vol 3 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1995 pp 2624.
- Benjamin S., Pandey A. 1998. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14: 1069-1087.
- Bjerve, K. S. 1993 Omega-3 fatty acids essential whit important biological effects and serum phospholipids fatty acids as merkes of dietary omega-3 fatty acid in take. *Am J. Clin. Nutr*, 57:8015.
- Bracco U. Effect of triglyceride structure on fat absorption. 1994. *Am. J Clin Nutr*, 60:1002-1009.

Brenner R., Peluffo R. O. 1969. Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 176: 471-479.

Calvani M. and Benatti P. (2003). Polyunsaturated fatty acids (PUFA), *Sigma-Tau*, S.P.A., 43 pp.

Campa Madrid Pablo. 2002. Ingesta Dietaria de Referencia para Energía, Carbohidratos, Fibras, Grasas, Ácidos Grasos, Colesterol, Proteínas y Aminoácidos. *Instituto de Medicina*.

Carey M. S., Mall D. M. 1983. Lipid Digestion and absorption. *Ann Rev. Physiol.* 45: 461-467.

Castro González M. 2002, "Ácidos grasos omega-3: Beneficios y fuentes", en : *Interciencia*, Vol, 27, No.3, Marzo, Caracas, Venezuela, 23 pp.

Carmena R., Ordovás J. M. 1999. Hiperlipoproteinemias. Clínica y tratamiento. Barcelona: *Doyma*

Certik M., Shimizu S. 1999 Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci Boeng*, 87: 1-14.

De Dekere E. A. M., Korver O., Verschuren, P. M., Katan M. B. 1998. Aspectos médicos del pescado y de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de origen vegetal y marino. *Eur J Clin Nutr*; 52: 749-753.

De Logeril M. 1994. Mediterranean alpha linolenic acid rich diet in secondary prevention coronary heart diseases *lancet*; 1455-1459.

De Olivera P., Alves G., De Castro H. 2002. Immobilization studies and catalic properties of microbial lipase onto styrene divinyl benzene copolymer. *Biochemical Engineering* Vol. 5:36-71.

OMS/FAO/. 1994. Fats and Oils in Human Nutrition. Report of a Joint Expert Consultation OMS/ FAO. FAO Food and Nutrition Paper N° 57.

Ferretti A, Nelson G. J., Schmidt P. C., Bartolini G., Kelley D. S. and Flanagan, V. P. 1998. Dietary docosahexaenoic acid reduces the thromboxane/ prostaglandin synthetic ratio in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 9, 88-92.

Fitz Gerald G. A. 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discover*; 2: 879-890.

Frontini M. G., Srinivasan, S. R., Elkasabany A. and Berenson G. S. 2001. Distributions and cardiovascular risk correlates of serum triglycerides in young adults from a biracial community: the boga lusa heart study. *Atherosclerosis*, 155, 201-209.

Gámez-Meza Nohemi, Noriega-Rodríguez J. A., Medina-Juarez L. A., Ortega-García J., Monroy-Rivera J., Toro-Vazquez F. J., Garcia H. S., Angulo-Guerrero O. 2003. Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. *Food Research International*, 36: 721-727.

Garcilaso Pérez Jesús Rubén, Vejar Rivera Eva Irma. 2004. *Bioquímica Descriptiva*. 4ta Edición, Editorial Unison. Pág: 61-98.

Gunstone Frank D. 2003. Lipids for functional foods and nutraceuticals. Vol. 13 the oily press lipid library. pag 234 o 322 Copyright 2003 PJ. Barnes

Gunstone Frank D, Harwood J. L., and Padley F.B. 1994. *The lipid handbook* 2da edn. Chapman & Hall London.

Haraldsson. G. G., B. Kristinsson, R. Siguardollir, G. G. Gudmunsson y H. Breivik. 1997. The preparation of concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by lipase catalyzed transesterification of fish oil with ethanol. *J. Am. oil Chem Soc*, 74; 1419-1424.

Havel R.J, Kane J.P. 1995. Structure and metabolism of plasma lipoproteins. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic bases of inherited disease*. 7th Ed. New York: *McGraw-Hill*, p. 1841-1851.

Hernandez Zazueta Sandra Luz, 2002. Esterificación enzimática de ácidos grasos poliinsaturados n-3 del aceite de sardina. *Tesis de licenciatura*, Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora México.

Holum John R. 2008. Lípidos. En *Fundamentos de Química General Orgánica y Bioquímica para Ciencias de la Salud*. Editorial Limusa S.A. de C.V. México D.F. pp 571- 586.

Horrobin D. F. 1993. Fatty acid metabolism in healthy and disease the role of delta-6-desaturase, *Am J. Clin Nutr.* 57 (suppl; 7325).

Hu F., Manson J. E., Willett W. 2001. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Am. J. Col Nutr*; 20: 5-19.

Hunter J. E. 2001. Studies on Effect of Dietary Fatty Acids as Related to their positions on tryglicerides. *Lipids*; **36**: 665-668.

Igarashi M. and Miyazawa T. 2000 Newly recognized cytotoxic of effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Letts*, 148:173-179.

Ikeda I., Yoshida H., Tomooka M., Yosef A., Imaizumi K., Tsuji H. and Seto A. 1998. Effects of long term feeding of marine oils with different positional distribution of eicosapentaenoic and docosahexenoic acids on lipid metabolism, eicosanoids production and platelets aggregation in hipercolesterolemic rats. *33*, 897-904.

Ikeda, I., Y Tomari M. Sigano, S. Watanabe y J. Nagata 1991. Lymphatic Absorption of Structured glicerolipids Contain Medium-Chain Fatty Acid end Linoleic Acid and their Effect on the cholesterol Absorption in Rats. *Lipids* 26: 369-373

Iwamoto H, Sato G. 1986. Production of EPA by freshwater unicellular algae. *J Am Oil Chem Soc* 63,434-438.

Instituto nacional de salud pública. 2000. La salud de los adultos. Encuesta nacional de salud (ENSA). *Secretaria de salud pública*, México.

Jewett Barbara 2002. MUFA versus PUFA Scientists disagree on nutritional importance of these fatty acids. *Health & Nutrition* Vol: 13. Pp 376-379.

Johnson D. R., Bhatnager R. S., Knoll L.J., y Gordon J. I. 1994. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem*, 63: 869.

Katsugari Y., Takeda Y., Abe C., Mpri k., Toi T., Takey A., shimasaki H. and Itakura H. 2001. Effects of dietary alpha- linolénico acid-rich in DAG on body fat in man. *J. Oleo. Sci*, 50, 747-752.

Kazzy S. N., Schurch S., Mklaughlin K. L., Romero R. y Janisse J. 2000. Surfactant phospholipids and surface activity among preterm infants with respiratory distress syndrome who develop bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr*, 89: 1218.

Kinsella J. E., lokesh B. and Stone R. A. 1990. Dietary n-3 poliinsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms *Am J Clin Nutr*, 52, 1-28

Kris-Etherton P., Harris W. S., Appel L. J. 2002. El consumo de pescado, Aceite de pescado, ácidos grasos omega-3 y la enfermedad cardiovascular. *Am. Heart Assoc Sci Statement*: 2747-2757.

Li L., Prabhakaran K., Shou Y., Borowitz J. L., Isom G. E. 2002. Oxidative stress and cyclooxygenase induction mediate cyanide-induced apoptosis of cortical cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 185: 55-63.

Liu G., Bibus D. M., Bode A. M., Ma Wy, Holfman R. T., and Dong Z. 2001. Omega 3 but not omega 6 fatty acids inhibit AP-I activity and cell transformation in JB6 CALL. *Proc. Natl Acad. Sci*, 98: 7510-7515.

Marchioli R., Barzi F. y Bomba. 2002. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*.105: 1897-1903.

Marangoni A., Rousseau D. 1995 Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends Food Sci & Technol*, 6:329-335.

Martinez C. E., Vinay J. C., Brieva R., Hill C., G. Jr., Garcia H. S. 2005. Preparation of mono- and diacylglycerols by enzymatic esterification of glycerol with conjugated linoleic acid in hexane. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125(1): 63-75.

Mataix J., 2002. Los ácidos grasos omega-3, *Mundo científico* 235: 46 – 51.

Mathews C. K., Van Holdek K. E., Ahern K. G. 2002. *Bioquímica de Matheus*. Editorial Pearson Addison Wesley. Tercera Edición. Madrid, España. pág: 353-395, 701-788.

McGarry J. D. y Brown N. F. 1997. The mitochondrial carnitine palmitoil transferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem*, 244.

McKevith B. 2005. Nutritional aspects of oil seeds. *Nutrition Bulletin* 30; 13–26

Mendes Ana, Lopes da Silva Teresa, Reis Alberto. 2006. DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *cryptocodium cohnii* CCMP 316 by Winterization and Urea Complexation. *Lisboa, Portugal*. 22, P-1649-038

Meroli A. 1997. Medium-chain lipids: New sources and uses. *Inform*; 8: 597-603.

Metz J. G., Roessler P., Facciotti D., Levering C., Ditrich F., Lasner M., Valentine R., Lardizadal K., Domergue F., Yamada A., Yazawa K., Knauf V., Browse J. 2001. Production of polyunsaturated fatty acids by poliketide synthases in both procaryotas and eucariotas. *Science* 293, 291-293.

Montgomery Douglas C. 2008. Métodos de superficie de respuesta y otros enfoques para la optimización de procesos. En *Diseño y Análisis de Experimentos*, segunda edición editorial Limusa Wiley. México D.F. Pág: 427-510.

Muñoz Valenzuela Sergio, Rigoberto Avalos Pérez, Francisco Javier Wong Corral, Ana Lourdes Romero Baranzini y Jesus Borboa Flores, 2006. Evaluación de rendimiento y composición de ácidos grasos en variedades de canola *Biotecnia* Vol. VIII, No. 3.

Muro Antonio F. 2006. D Salud Ediciones MK3 S.L. C/ Puerto de los Leones 2, 2,^a Planta Oficina 9, 28220 Majadahonda Madrid TF: 91 638 27 28 FAX: 91 638 40 43.

Nettleton J. A. 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J. Am. Dietetic Assoc*, 93, 58-64.

Nichols D. S., Nichols P. D., Mc Meekin T. A. 1993. Polyunsaturated fatty acids in antarctic bacteria. *Antarctic Sci* 5, 149-160.

Nichols P. D., Nichols D. S., McMeekin T. A. 2002. Jabour-Green, J. & Haward, M. (Eds) En "Bioprospecting and Biotechnology in Antarctica" in The Antarctic: Past, Present and Future. *Antarctic CRC Research Report #28. Hobart*, 85-103.

Nishizuka Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses *The FASEB Journal*, Vol 9: 484-496, Copyright © by The Federation of American Societies for Experimental Biology Biosignal Research Center, Kobe University, Japan.

Noriega Rodríguez Juan Antonio. 2002. Cinética de esterificación del ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico del aceite de sardina (*sardinops vagax caeruleus*). *Tesis de Maestría*, Universidad de Sonora. Hermosillo Sonora, México.

Noriega Rodríguez J. A., Ortega García J., Angulo Guerrero O., García H. S., Medina Juárez L. A., Gámez-Meza N. 2009. Oil production from sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *CyTA - Journal of Food*, 7:3, 173-179.

Pérez Ruiz O. Andrés, Cartaya Padrón Liulia, Valencia Fernández Víctor, Sanjurjo Gámez Vivian e Ilisástigui Ortueta Teresita. 1998 Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. Facultad de Estomatología. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana *Rev. Cubana Estomatología*. 1998; 35(2):56-61.

Pereira C., Li and Sinclair A J., 2001. The alpha-linolenic acid content of green vegetables commonly available in Australia. *Int. J. Vitamin Nutr. Res.*, 71, 223-228.

- Qiu X. 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA,22:6-4,7, 10, 13, 16, 19): Two distinct pathways Prostaglandins, Leucotrienes and Essential fatty acids 68, 181-186.
- Quinlan, P., y S. More. 1993 Modificación de triglicéridos por lipasas: Tecnología de proceso y su aplicación a la producción de grasas nutricionalmente mejoradas. *Inform* 4: 580-585.
- Rees J. F., Cure K., Piyatiratitivoracul S., Sorgelos P., Menasveta P. 1994. High levels of unsaturated fatty acid requirements of penaeus monodon postlarvae, -an experimental approach based on artemia enrichment. *Aquaculture*. 122, 193 – 207.
- Robins St. 1995. Patología estructural y funcional. Quinta edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill, 57-102.
- Robles, M. A., Esteban C. L., Giménez G. A., Camacho P.B., Ibáñez M.J. y G. E. Molina. 1999. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin. Sci.* 64: 91-99.
- Russell N. J., Nichols D. S. 1999. Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria- a dogma rewritten. *Microbiol.* 145, 767-779.
- Saglik S., Imre S. 2001. ω -3 fatty acids in some fish species from Turkey, *J Food Sci*, 66: 210-212.
- Salem N., Litman B., Kim H. K. and Grawrisk K. 2001. Mechanism of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*, 36: 945-959.
- SAS. 2001. JMP. Versión 4.0.1 user's manual SAS institute INC, Cary, N. C. U. S. A.
- Sastry P. 1985. Lipids in the nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res*, 24: 69-176.
- Saxena R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson W. S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol Meth*, 52: 1-18
- Sayanova O.V., Napier J. A. 2004. Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. *Phytochem* 65,147-158.
- Sellmayer A. Koletzko B. 1999. Long chain polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in infants: Physiological and pathophysiological aspects, an open question. *Lipids*, 34: 199-205.

Shahidi, F. y Wanasundara, U. N. 1998. Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production technologies, *Trends Food Sci. Technol.* 9; 230–240.

Shimada Y. 2006. Enzymatic modification of lipid for functional lipids. en *Hand book of functional lipids* Casimir C. Acko. Editor; Taylor & Francis. Pág 436-455.

Simopoulos A. P. 1991. Omega-3 fatty acid in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* 54; 438-463.

Simopoulos A. P. 2001. Omega-3 fatty acids and the human health: for the public politic. *Lipids*, 36; Suppl: S83-S89.

Simopoulos A. P., Leaf A., Salem N. 1999. Essentiality and recommended dietary intakes of omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr. Metabo*, 43: 127-30

Sinclair A. J., Abedin L. 2001. The effect of alpha-linolenic acid on retinal function in mammals. Chapter 7 Shahidi F & Finley JW Omega 3 fatty acids: Chemistry, *Nutrition & Health*, 79-90. *American Chemical Society Washington*.

Singer P., Berger I., Godicke W., Jaeger W., Voigh S. 1986. Slow desaturation and elongation of linoleic and alfa-linolenic acids as a rationale of eicosapentaenoic acid-rich diet to lower blood pressure and serum lipids in normal, hypertensive and hyperlipemic subject's prostaglandins Leukot. *Med*, 24:173-193.

Siso E. 1991 The molecular biology of mammalian arachidonic and metabolism. *Am. J Physical*, 260: 13- 28.

Skerratt. 2002. *Shewanella Olleyana* sp. nov., a marine species isolated from a temperature estuary which produces high levels of polyunsaturated fatty acids. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52: 2102-2106.

Spector A. 1999. Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34:1-3.

Thornton Morrison Robert y Neilson Boyd Morrison. 1998. *Morrison y Boyd Química Orgánica*. 5ta Ed. Addison Wesley Iberoamericana S.A. 1241-1256.

Uauy R., Hofman D., Peirano P., Birch D., Birch E. 2001. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids*; 36: 885-95.

Uauy R., Peyrano P., Hoffmann, Mena P., Birch D., Birch E. 1996. Role of essential fatty acids in the function on the development nervous system. *Lipids*, 31,167-176.

Valenzuela A., Nieto S. 1994. Biotechnology of lipids. The use of lipases for the structural modification of fats and oils. *Grasas & Aceites*, 45: 337-343.

Valenzuela B. Alfonso, Nieto K. Susana. 2003. Ácidos grasos omega 3 y omega 6 en la nutrición perinatal: su importancia en el sistema nervioso central. *Rev. Chilena de pediatría*. 74: 149-157.

Valenzuela B. Alfonso, Nora Morgado. 2005. T. Fats and oils in the human nutrition: an historical overview. *Rev Chil Nutr*, Vol. 32. N° 2.

Valenzuela B. Alfonso, Sanhueza C. Julio, Nieto K. Susana. 2002. El uso de lípidos estructurados en la nutrición; una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. *Rev. Chil. Nutr*, 29: 106-114.

Van Houwelingen, A. C. Puls J. y Hornstra G. 1992. Essential fatty acids status during early human development. *Early Human Develop*, 31: 97-111.

Von Schacky C., Angere P., Kothny W., Thiesen K., Mudra H. 1999. El efecto de los ácidos grasos dietarios n-3 en la arterioesclerosis coronaria. *Ann Intern Med*, 130: 564-562.

Wamer, Timothy D., Mitchell, Jane A. 2002. Cyclooxygenase-3 (COX-3) *PNAS* 99 (21): 13371-13373.

Wiege Berthold, Weber Nikolaus, Tangkam, Kamol. 2008. Solvent - free lipase - catalyzed preparation of diglycerides from co-products of vegetable oil refining. *Grasas y aceites*. 59; 245-253.

Zhu M., Zhou P. P., Yu L. J. 2000. Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids, *Bioresour. Technol*, 84: 93-95.