

SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ACIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS A PARTIR DE ACEITE DE PESCADO.

A. Villalpando-Laureán^a, M. A. Armendáriz-Ruiz^a, J. A. Rodríguez-González^a, R.M. Camacho-Ruiz^a, M. Arellano-Plaza^a, A. Asaff-Torres^b, J. C. Mateos-Díaz^a

^aUnidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Camino Arenero No.1227 Colonia El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, 45019, MÉXICO. ^bUnidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Carretera a la Victoria Km 0.6, Hermosillo, Sonora, 83304, MÉXICO.
jcmateos@ciatej.mx

Resumen: El aceite de pescado es una fuente rica en ácidos grasos poli-insaturados (AGP) de valor en la industria de los alimentos, EPA y DHA. Usualmente una estrategia para estabilizarlos y obtenerlos es mediante esterificación. Sin embargo, no existen estrategias que correlacionen la calidad del aceite y la vía de esterificación con la integridad del EPA/DHA. Por lo tanto, en este trabajo se realizó la esterificación con etanol por vía química y quimioenzimática de aceites de atún y sardina con diferente porcentaje de acidez, para obtener una mezcla de ésteres etílicos (EE). La proporción de AGP en los aceites de estudio fue del 26 al 38 %. Por la vía quimioenzimática se alcanzó un rendimiento superior al 94 % con todos los aceites, siendo mayor que la vía química hasta en un 6 %. Sin embargo, solamente con el aceite de alta acidez (22 % de acidez) se observó un incremento en la proporción de EE de EPA/DHA. Por el contrario, con el aceite de atún (4.1 % de acidez) se observó una disminución de éstos. El análisis de composición indica que se debe a que el contenido de etil EPA en los EE-alta acidez (9.1 %) es 3 veces mayor que en los EE-atún (3.1 %). Demostrando que en función del grado de acidez del aceite de pescado se puede seleccionar una estrategia de síntesis adecuada para la obtención de EE de EPA y DHA, permitiendo valorizar este tipo de aceites de gran interés para la industria alimentaria.

Introducción:

Los ácidos grasos poli-insaturados como el ácido eicosapentaenoico C20:5n-3 (EPA) y el ácido docosahexaenoico C22:6n-3 (DHA) tienen un alto valor económico en la industria de los alimentos por sus beneficios a la salud humana. Una fuente importante de EPA y DHA es el aceite de pescado, ya que constituyen hasta un 30 % de sus ácidos grasos [1]. En particular, la calidad del aceite de pescado se determina por diferentes parámetros, siendo el principal, el porcentaje de acidez. En los aceites de primera calidad, el EPA y DHA se encuentran esterificados al glicerol formando diferentes glicéridos, lo cual les confiere estabilidad y evita su oxidación. Sin embargo, en los de segunda calidad (porcentaje de acidez mayor al 2 %) se pueden encontrar en forma libre, haciéndolos inestables y susceptibles a la oxidación. No obstante, su contenido en EPA y DHA los convierte en una materia prima adecuada para obtener ésteres de mayor valor en el mercado. Para ello, se requiere implementar estrategias de esterificación que permitan estabilizar y recuperar a dichos ácidos. La esterificación se puede llevar a cabo por vía química con catalizadores inorgánicos ácidos o básicos, o bien, por vía enzimática empleando lipasas. Las lipasas son carboxil éster hidrolasas (EC. 3.1.1.3) que hidrolizan triglicéridos, y tienen la capacidad de realizar diversas reacciones de síntesis en medio orgánico (e.g. esterificación, alcoholisis, acidólisis). Actualmente, la mayoría de las investigaciones se han enfocado a desarrollar estrategias químicas o enzimáticas para la síntesis de metil ésteres. Para la generación de éstos, es necesario el uso de metanol, un alcohol tóxico y prohibido para el consumo humano. Además, dichos trabajos no consideran que la integridad del EPA y DHA dependen tanto de la calidad del aceite de pescado como de la vía de esterificación. Por lo tanto, en el presente trabajo se implementó una estrategia quimioenzimática para sintetizar EE de EPA y DHA a partir de aceites de atún y sardina con diferente porcentaje de acidez, lo que permite valorizar a este tipo de aceites y en un futuro obtener

concentrados de EE de EPA y DHA con mayor grado de pureza, los cuales son de gran interés para la industria alimentaria.

Metodología:

Materia prima y determinación del porcentaje de acidez: El aceite de atún, sardina y alta acidez de atún fueron donados por Maz Industrial S.A. de C.V. El porcentaje de acidez en equivalentes de ácido oleico se determinó de acuerdo con Kwon *et al.* (1986) [2].

Síntesis química de EE: A 5 ml de aceite se le agregaron 1.5 ml de etóxido (KOH en etanol anhidro 6.7 %, p/v) y se mantuvo a 60 °C y 1,500 rpm por 1 h. Al término de la reacción, se realizaron 4 lavados con agua, tres con un volumen de 150 µl y uno de 3 ml.

Síntesis quimioenzimática de EE: La esterificación de ácidos grasos libres se realizó con 100 mg de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), 5 ml de aceite y 0.5 ml de etanol anhidro a 45 °C y 650 rpm por 20 h. Posteriormente la transesterificación de los glicéridos se realizó con la vía química.

Determinación de la conversión: La conversión se cuantificó por HPTLC, (85/15/1; hexano/éter etílico/ácido acético; v/v/v) a 500 nm.

Determinación de la proporción de ácidos grasos por GC-MS: 1 µl de una solución de los EE en hexano 10 mg/ml se inyectó empleando un Split de 30:1 (250 °C temperatura del inyector), a una columna capilar DB-23 (60 m x 0.25 mm DI, 0.25 µm; J&W marca Agilent) usando He como acarreador. El programa de separación con rampas de temperatura de 80 a 220°C se generó con base a lo reportado por Dodds *et al.* (2005) [3] y Nascimento *et al.* (2015) [4]. La concentración de etil -EPA y etil -DHA se determinó empleando una curva de calibración de 10 a 100 mg/l.

Resultados:

En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de ácidos grasos saturados (AGS), mono-insaturados (AGM) y poli-insaturados (AGP), presentes en los aceites de estudio (atún, sardina y alta acidez), así como el aceite de arenque de primera calidad que se usó como control.

Tabla 1. Porcentaje de área integrada de AGS, AGM y AGP en los distintos aceites de pescado.

Ácidos grasos*	Atún (%)	Sardina (%)	Alta acidez (%)	Arenque (%)
AGS	37.8	49.1	37.4	43.2
AGM	26.8	23.0	24.9	30.5
AGP	35.4	28.0	37.6	26.3

Porcentajes expresados respecto al área total de ácidos grasos. *AGS: ácidos grasos saturados, AGM: mono-insaturados y AGP: poli-insaturados.

Con respecto al aceite de arenque, el contenido de AGS en los aceites de atún (Atún y Alta acidez) es 6 % menor y el de sardina es 6 % mayor. Mientras que el contenido de AGM es inferior aproximadamente en un 5 % para todos los casos con respecto al de arenque (30.5 %). Sorprendentemente, el contenido de AGP en los aceites de segunda calidad (atún: 35.4 %; alta acidez: 28.0 % y sardina: 37.6%) fue del 2 hasta el 12 % mayor que el aceite de primera calidad (arenque; 26.3 %). Cabe resaltar, que a pesar de la

diferencia del porcentaje de acidez entre los aceites de atún (atún: 4.1 %; alta acidez: 22.0 %) los porcentajes de AGS, AGM y AGP es prácticamente la misma, esto sugiere que los AGP del aceite de alta acidez posiblemente no presentan degradación. El porcentaje de AGP de los tres aceites de estudio son similares a los reportados por Nascimiento *et al.* [4] y Gruger *et al.* [5]. Por lo tanto, se consideran una materia prima adecuada para llevar a cabo la síntesis de EE de EPA y DHA.

La síntesis de EE de ácidos grasos de los aceites de pescado de estudio se realizó por vía química y quimioenzimática (Figura 1). En general, con todos los aceites se alcanzó una conversión superior al 87 % con ambas vías, no obstante, con la vía quimioenzimática el rendimiento incrementó de un 3 a 6 % respecto a la vía química. En particular, con el aceite de alta acidez (porcentaje de acidez 22 %) la síntesis de EE de EPA y DHA fue mayor al emplear la vía quimioenzimática (Figura 1 E-EPA y E-DHA). Lo anterior sugiere que los ácidos grasos libres contenidos en esta materia prima posiblemente son en su mayoría EPA y DHA. En la primera etapa de la vía quimioenzimática, las condiciones suaves de reacción empleadas durante la esterificación del EPA y DHA, permiten que las moléculas no se degraden por efecto de temperatura u oxidación. Por lo tanto, en la segunda etapa, la conversión a EE de los glicéridos por transesterificación alcalina se puede realizar sin comprometer la integridad de los EE de EPA y DHA.

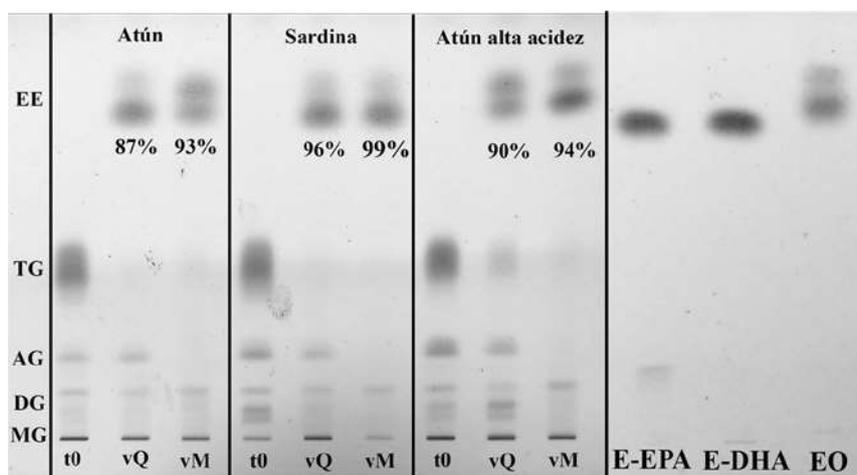


Figura 1. Cromatografía de capa fina de la síntesis de ésteres etílicos de ácidos grasos de aceite de pescado. **t0**: tiempo inicial de reacción; **Q**: síntesis química de ésteres etílicos; **QE**: síntesis quimioenzimática de ésteres etílicos; **MG**: monoglicéridos; **DG**: diglicéridos; **AG**: ácidos grasos; **TG**: triglicéridos; **EE**: ésteres etílicos; **E-EPA**: Etil EPA; **E-DHA**: Etil DHA y **EO**: Etil oleato.

Por otro lado, con los aceites de atún y sardina, que presentaron un menor porcentaje de acidez (4.1 % y 10.7 %, respectivamente), se sintetizó una menor cantidad de EE de EPA y DHA con respecto al aceite de alta acidez cuando se emplea la vía quimioenzimática. En el caso particular del aceite de atún, se observó una disminución en la concentración de EE de EPA y DHA. De este modo se demuestra que en función del grado de acidez del aceite de pescado se puede seleccionar una estrategia de síntesis adecuada para la obtención de EE de EPA y DHA.

Finalmente, se determinó el contenido de E-EPA y E-DHA en los EE de los aceites de pescado obtenidos por vía quimioenzimática y los del aceite de arenque por vía química (Figura 3). La relación E-DHA/E-EPA en los EE de atún, sardina y alta acidez fue 2.7, 1.1 y 2.8 y 0.3, respectivamente. Lo anterior indica que los aceites de atún son la mejor fuente para obtener DHA (de 8 al 11 %, Figura 3), mientras que del aceite de sardina se pueden obtener tanto el DHA (10 %) como el EPA (9 %). La vía

quimioenzimática permitió obtener EE cuya concentración de E-EPA es semejante a lo reportado en la literatura (2.8-4.7 %), mientras que la concentración obtenida de E-DHA es hasta el doble que la reportada empleando una vía enzimática usando las lipasas de *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas fluorescens* (3.6-3-7 %) [6]. A pesar de que la concentración de E-EPA en los EE del aceite de sardina (9 %) es 60 % menor a la contenida en los EE de arenque (15 %), tanto el aceite de sardina como los de atún representa una fuente prometedora para la obtención de concentrados de gran valor para la industria farmacéutica y de alimentos a partir de una materia prima económica empleando la vía quimioenzimática.

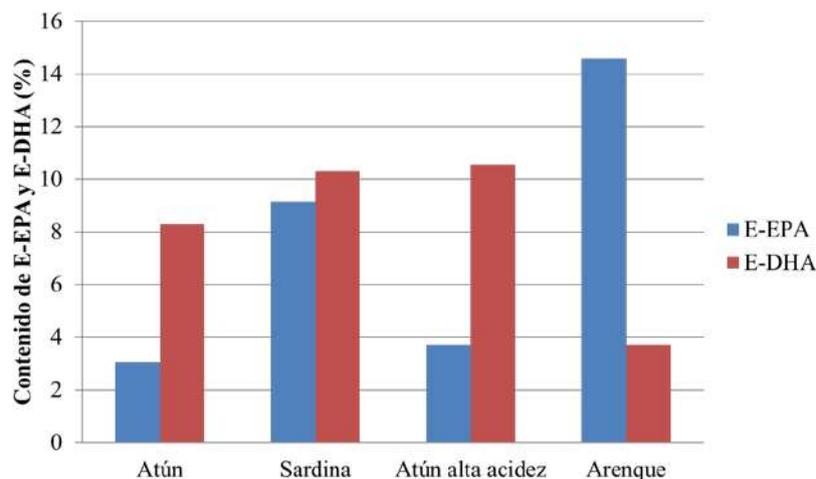


Figura 3. Contenido de E-EPA y E-DHA obtenido mediante la estrategia quimioenzimática de síntesis de ésteres etílicos, a partir del contenido original de ácidos grasos (AG) EPA y DHA en los distintos aceites de pescado. Especies de etil ésteres: etil éster del ácido eicosapentaenóico (EPA) C20:6n-3, etil éster del ácido docosahexaenoico (DHA) C22:5n-3.

Conclusiones:

La síntesis quimioenzimática implementada ha demostrado que es posible conservar la integridad del EPA y DHA presentes en los aceites de pescado con alto porcentaje de acidez, aprovechando de manera racional su contenido de AGP, para la obtención de sus EE. Actualmente se tiene como perspectiva el desarrollo e implementación de protocolos de destilación molecular y/o intercambio iónico para la obtención de concentrados con mayor pureza en EE de EPA y DHA de gran interés biotecnológico y comercial.

Agradecimientos:

Los autores agradecen al fondo SAGARPA de la convocatoria S0026-2015-02 por el financiamiento otorgado al proyecto 260235. Se agradece a la empresa Maz Industrial, S.A. de C.V. por la donación de los aceites. Así como al CONACyT la beca de maestría otorgada a Andrea Villalpando.

Referencias:

1. Pike, I. H. et al. "Fish oil : production and use now and in the future". *Lipid Technol.* 22, 59–61 (2010).
2. Kwon, D. Y. & Rhee, J. S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63, 89–92 (1986).
3. Dodds, E. D. et al., "Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: Flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry". *Lipids.* 40, 419–428 (2005).
4. Nascimento, V. L. et al., "Characterization of a hydrolyzed oil obtained from fish waste for nutraceutical application".

Food Sci. Technol. 35, 321–325 (2015).

5. Gruger, E. H. "Fatty acid composition of fish oils". United States. Dep. Inter. Fish Wildl. Serv. Bur. Commer. Fish. 276, 23–30 (1967).
6. Haraldsson, G. G. et al., "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 (1997).
7. Swanson, D., et al., "Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life". *Adv. Nutr. An.* 1–7 (2012).
8. Singh, M. "Essential fatty acids, DHA and human brain". *Indian J. Pediatr.* 72, 239–242 (2005).