

## SINTESIS DE ACIDO LINOLEICO CONJUGADO POR ISOMERIZACION ALCALINA USANDO PROPILENGLICOL COMO SOLVENTE

### SYNTHESIS OF LINOLEIC CONJUGATED ACID BY ALKALI ISOMERIZATION USING PROPYLENE GLYCOL AS SOLVENT

A. Rocha-Uribe <sup>1\*</sup> y E. Hernández <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Zona Universitaria, San Luis Potosí, S. L. P., 78210. México.

<sup>2</sup>Food Protein R&D Center, Texas A&M University, College Station, Texas 77843, E.U.A.

#### Resumen

La producción selectiva de los isómeros *cis*-9, *trans*-11- y *trans*-10, *cis*-12- del ácido linoleico conjugado (ALC) ha despertado gran interés debido a importantes propiedades biológicas que han sido reportadas para estos compuestos. De manera natural, el ALC está presente solo en grasas de ruminantes y a muy bajas concentraciones, por lo que se buscan fuentes alternativas de obtención. En este trabajo se estudió la síntesis química de ALC por isomerización alcalina del ácido linoleico presente en aceite de cártamo, modificando un proceso utilizado a nivel industrial, con la finalidad de aumentar la concentración de los isómeros de interés y hacer el producto apto para el consumo humano. Se utilizó propilenglicol como solvente en lugar de etilenglicol (que es tóxico). Sin embargo, el cambio de solvente generó un bajo rendimiento de ALC, de modo que la concentración de catalizador (NaOH) y el tiempo de reacción fueron ajustados para elevar la producción de ALC. Las condiciones encontradas como óptimas fueron: 7% de NaOH en propilenglicol y un tiempo de reacción de 2.15 h, con lo que se obtuvo una conversión de ácido linoleico a ALC de 97.65%, donde el 96% del ALC total estuvo formado por los isómeros de interés.

*Palabras clave:* ácido linoleico conjugado, aceite de cártamo, isomerización alcalina, propilenglicol.

#### Abstract

Methods of selective production of *cis*-9, *trans*-11- and *trans*-10, *cis*-12- isomers of conjugated linoleic acid (CLA) are of big interest due to the biological properties that have been reported for such compounds. Moreover, they naturally exist mainly in fats from ruminants at very low concentration. In this work, the chemical synthesis of CLA by alkali isomerization of linoleic acid contained in safflower oil was investigated, by modifying an actual industrial process in order to improve the concentration of the CLA isomers of interest, and make the product good for human consumption. Here, propylene glycol was used as solvent instead of ethylene glycol (a toxic solvent). The change in solvent resulted in a low conversion, as response, catalyst (NaOH) concentration and reaction time had to be adjusted in order to maximize the CLA production. The optimal conditions found here were: 7% NaOH in propylene glycol, and a reaction time of 2.15 h. Under such set of conditions a conversion of linoleic acid to CLA of 97.65% was reached, where 96% of total CLA consisted of the isomers of interest.

*Keywords:* conjugated linoleic acid, safflower oil, alkali isomerization, propylene glycol.

#### 1. Introducción

El ácido linoleico conjugado (ALC) ha sido adicionado recientemente a la lista de compuestos nutraceuticos, basándose en una creciente cantidad de resultados obtenidos de estudios en sistemas animales, en los cuales el ALC ha mostrado un amplio rango de efectos biológicos (García y col., 2000). El término ácido linoleico conjugado, o el acrónimo ALC, se refiere a una mezcla de

isómeros posicionales (C8, C10; C9, C11; C10, C12; y C11, C13) y/o isómeros geométricos (*cis, cis; cis, trans; trans, cis; y trans, trans*) del ácido octadecadienoico o ácido linoleico (Ha y col., 1987). De los cuales, los isómeros *cis*-9-, *trans*-11-, y *trans*-10, *cis*-12-ALC, son los que presentan actividad biológica. Algunos de los efectos fisiológicos que han sido reportados para éstos ácidos grasos incluyen: actividad

\*Autor para correspondencia. E-mail [arochau@uaslp.mx](mailto:arochau@uaslp.mx)  
Tel: (44) 48262440 Ext. 530. Fax (44) 48262372.

anticarcinogénica, antiaterogénica, modificación en el metabolismo de los lípidos (reduce grasa corporal y aumenta proteína), causa mejoras en la diabetes mellitus tipo II, y presencia de propiedades moduladoras del sistema inmunológico (Gnädig y col., 2001). Como consecuencia, el ALC está adquiriendo gran interés para ser un ingrediente con mayor presencia en la dieta del hombre. El ALC existe de manera natural casi exclusivamente en grasas de origen animal, principalmente rumiantes, debido a que dicho ácido graso es formado primordialmente durante la biohidrogenación de ácido linoleico por bacterias en el rumen de estos animales. Desafortunadamente la concentración de ALC en estos materiales es muy baja. Los productos más ricos en ALC que se han observado de manera natural son derivados lácteos como quesos y mantequillas que alcanzan niveles máximos de 8 mg de ALC/g grasa (Chin y col., 1992). Consecuentemente, muchos esfuerzos e investigaciones están siendo enfocados a estudiar y buscar mecanismos y/o procesos que permitan producir cantidades mayores de ALC y de sus isómeros de interés, para posteriormente incorporarlos en diferentes tipos de grasas comestibles y poder aprovechar los beneficios profilácticos y terapéuticos que presentan. Dentro de los métodos disponibles para la producción de ALC se tiene la isomerización de algún ácido relacionado al ALC por medios biológicos y/o químicos. Hasta la fecha, los procesos más eficientes y económicamente factibles involucran la síntesis química por isomerización en condiciones alcalinas, que permiten convertir el ácido linoleico a ALC (Reaney, 1999). Este método se usa actualmente a nivel industrial y fue desarrollado en las etapas iniciales de investigación que involucraban ALC, en las que fueron requeridas grandes cantidades de ALC para ser utilizadas en estudios con animales. Sin embargo, por dicho método se produce una mezcla de isómeros de los que

no todos presentan los efectos biológicos citados. Dado que recientemente han sido identificados los isómeros biológicamente activos, *cis-9-*, *trans-11-*, y *trans-10*, *cis-12-* ALC, se ha despertado un mayor interés por la producción selectiva de los mismos. La producción selectiva de diferentes isómeros puede lograrse en cierta medida mediante la manipulación de las condiciones del proceso como el tipo de catalizador, su concentración, solvente, temperatura, tiempo de reacción, etc. Reaney y col. (1999). Una propuesta sugerida por McNeill y col., 1999, fue el utilizar propilenglicol como solvente del catalizador con la finalidad de producir mayores concentraciones de los dos isómeros de interés con respecto a los isómeros que no lo son. Por otra parte, actualmente se busca evitar la presencia de residuos de los solventes más utilizados (ej., etilenglicol, dimetil sulfóxido, etc.) en el producto final debido a su toxicidad. En contraste, con dichos solventes la toxicidad del propilenglicol es mínima o nula, permitiendo que los productos puedan ser utilizados en alimentos para consumo humano (Reaney y col., 1999).

El objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones óptimas de reacción para obtener el mayor rendimiento de ALC total con el contenido máximo de los isómeros activos, a partir de la conversión del ácido linoleico presente en aceite de cártamo a ALC por isomerización en medio alcalino, utilizando propilenglicol como solvente en lugar de etilenglicol.

## 2 Metodología experimental

### 2.1 Producción de ALC

Aceite de cártamo obtenido comercialmente fue sujeto a un proceso de isomerización del ácido linoleico en condiciones alcalinas siguiendo el método reportado por Ip y col., 1991, que es el método que se describe a continuación, con la

única modificación del tipo de solvente; ya que en este estudio fue usado propilenglicol en lugar de etilenglicol. Una muestra de 500 g de aceite de cártamo fueron adicionados a un matraz redondo de tres bocas de 5 L que contenía 150 g de hidróxido de sodio (NaOH) previamente disueltos en 2900 g de propilenglicol, dando una concentración de NaOH en propilenglicol de 4.9% (p/p). El matraz de reacción fue equipado con un agitador mecánico, un termómetro, un condensador de reflujo y alimentación de nitrógeno mediante burbujeo. La mezcla se calentó a 180°C bajo la atmósfera inerte durante 2 horas. Después del tiempo de reacción, se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 500 mL de una solución concentrada de ácido clorhídrico (HCl) y se mezcló durante 15 minutos. Posteriormente, el pH de la mezcla se ajustó a 3 con HCl adicional. Se adicionaron 200 mL de agua destilada y después de mezclar rigurosamente, la mezcla fue transferida a un embudo de separación. La fracción lipídica (ácidos grasos) fue extraída con 2 porciones de 500 mL de hexano y lavada en otro embudo de separación con 3 alícuotas de 250 mL de una solución al 5% de cloruro de sodio (NaCl) y 2 porciones de 250 mL de agua desionizada y fue secada durante la noche con la adición de aproximadamente 5% de sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>). Finalmente, la solución de los ácidos grasos en hexano fue filtrada con papel Watman No. 41, y colocada en un rotavapor a 60°C en condiciones de vacío para remover el solvente. Inmediatamente después, la mezcla de ácidos grasos fue enfriada en baño de hielo antes de eliminar el vacío del sistema. La mezcla resultante de ácidos grasos, incluyendo el ALC formado de la isomerización del ácido linoleico, fue colocada en recipientes de plástico cerrados herméticamente en atmósfera inerte (con nitrógeno) y almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Debido a que el cambio de solvente causó que el rendimiento de ALC fuera muy bajo, fue necesario el modificar las condiciones del proceso original. Por lo que el siguiente paso de este estudio consistió en buscar las condiciones óptimas para generar los mayores rendimientos, tanto de ALC como de los isómeros de interés. Iniciando con la determinación de la concentración óptima de catalizador (NaOH) y posteriormente del tiempo óptimo de reacción.

### 2.2 Concentración óptima de catalizador

Para determinar la concentración óptima de catalizador se realizó un experimento monofactorial con 4 niveles de concentración de NaOH en propilenglicol (5.5, 6.0, 7.0 y 8.0% p/p), siguiendo el mismo protocolo citado anteriormente (Ip y col., 1991) y manteniendo constante la cantidad de propilenglicol (2900 g) así como todas las demás condiciones. Dos réplicas del proceso de isomerización alcalina fueron realizadas para cada concentración de NaOH. Se reporta el rendimiento promedio y desviación estándar de las dos réplicas para cada nivel de catalizador.

### 2.3 Tiempo óptimo de reacción

Utilizando la concentración de NaOH determinada como óptima, se corrieron dos réplicas del proceso de isomerización por un periodo de reacción de 3.25 h, durante el cual se tomaron muestras de 50 mL del reactor a los tiempos: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.75, 3.0 y 3.25 h. Donde, el tiempo inicial o tiempo "cero" se definió como aquel en que el sistema alcanzó la temperatura de reacción (180°C). En cada muestra se determinó la concentración total de ALC y de sus isómeros activos, así como de ácido linoleico.

Con lo cual se obtuvo el perfil de concentraciones de tales ácidos grasos a través del tiempo y se reporta en forma gráfica. Dicha gráfica fue utilizada para determinar el tiempo óptimo de reacción. Definiendo éste último, como el tiempo que debe mantenerse la temperatura a 180°C para obtener la máxima concentración de ALC con el mayor contenido de los isómeros activos (*cis*-9-, *trans*-11-, y *trans*-10, *cis*-12-ALC) en el producto final.

#### 2.4 Perfil de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos de los diferentes materiales fue determinada por Cromatografía de Gases de los metil-ésteres derivados de los ácidos grasos de las muestras. El proceso de metilación para el aceite de cártamo se realizó mezclando 10 mg de muestra con 0.5 mL de una solución al 5% (p/v) de metóxido de sodio en metanol y calentando a 65°C durante 30 min. La reacción de metilación se detuvo con la adición de 0.5 mL de una solución saturada de NaCl. Mientras que la metilación de las muestras de ácidos grasos en estado libre, generadas del proceso de isomerización, fue desarrollada por la adición de 3 mL de una solución al 0.5% (p/v) de HCL en metanol a 10 mg de muestra, calentando a 70°C durante 2 min. Los metil-ésteres, tanto del aceite como de la mezcla de ácidos grasos libres, fueron extraídos con 1 mL de hexano (grado HPLC). Se inyectó 1 µL de cada solución de metil-ésteres a un cromatógrafo de gases Varian (modelo 3400) equipado con un sistema de inyección con *split* ajustado a 250°C y un detector de ionización de flama ajustado a 300°C, usando hidrógeno como gas acarreador. Se usó una columna capilar Stabilwax (Restek Corp) de 60 m de longitud x 0.25 mm d. i. y película de fase estacionaria de 0.25 µm, la cual fue calentada de 150 a 200°C a una velocidad de 10°C/min, después a 250°C a una velocidad de 3°C/min y finalmente se mantuvo a 250°C por 20 min.

Cada muestra fue analizada por duplicado. Los ácidos grasos fueron identificados por los tiempos de retención de estándares y cuantificados como el porcentaje del área del pico correspondiente con respecto a la suma de las áreas de todos los picos.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Producción de ALC

La composición de ácidos grasos del aceite de cártamo inicial y de la mezcla resultante del proceso de isomerización se muestra en la Tabla 1. Cabe señalar que en el proceso de isomerización se llevan a cabo primero reacciones de hidrólisis de los ácidos grasos antes de la isomerización, de modo que lo obtenido de este proceso consiste de una mezcla de ácidos grasos en estado libre. La composición obtenida para el aceite de cártamo fue similar a la reportada en la literatura (Mc Neill y *col.*, 1999). Sin embargo, la conversión de ácido linoleico a ALC en este experimento fue de tan solo el 61.5 %, mientras que la conversión reportada por Ip y *col.*, 1991, fue de 92% usando etilenglicol como solvente.

Es conocido que el tipo de solvente tiene un efecto importante sobre la isomerización (Reaney, 1999), lo que puede explicar las diferencias observadas al modificar el solvente. Por su parte, la concentración de los dos isómeros de interés, *cis*-9-, *trans*-11-, y *trans*-10, *cis*-12-ALC, en su conjunto fue el 94% del ALC total, en concentraciones prácticamente iguales, el resto fue una mezcla de isómeros menores. Debido a que el rendimiento en la producción de ALC fue bajo en este experimento, se buscó el modificar las condiciones de proceso para obtener mayores niveles de conversión. Primero se determinó la concentración de NaOH que permitiera la mayor conversión de ácido linoleico a ALC, y posteriormente se obtuvo el tiempo óptimo de reacción para obtener las mayores concentraciones de los isómeros de interés.

Tabla 1. Composición<sup>a</sup> de ácidos grasos del aceite de cártamo antes y después del proceso de somerización (pruebas iniciales).

Acido graso	Composición de ácidos grasos (% p/p)	
	Aceite de cártamo <sup>b</sup>	Mezcla de isomerización <sup>c</sup>
Mirístico (C14:0)	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.03
Palmítico (C16:0)	6.72 ± 0.05	6.71 ± 0
Estearico (C18:0)	2.55 ± 0.04	2.55 ± 0.03
Oleico (C18:1)	15.51 ± 0.021	15.52 ± 0.2
Linoleico (C18:2)	74.53 ± 0.061	28.67 ± 0.22
ALC <sup>d</sup> (C18:2)	0	45.86 ± 0.32
Otros	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.03

<sup>a</sup>Media ± desviación estándar de dos muestras.<sup>b</sup>Aceite original.<sup>c</sup>Mezcla de ácidos grasos resultante del proceso de isomerización.<sup>d</sup>Acido linoleico conjugado totalTabla 2. Concentración<sup>a</sup> de ácido linoleico conjugado (ALC) y grado de conversión de ácido linoleico a ALC, por isomerización alcalina a diferentes concentraciones de catalizador (NaOH) en propilenglicol.

NaOH (% p/p)	ALC <sup>b</sup> (%)	Conversión <sup>c</sup> (%)
5.0	45.86 ± 0.32	61.5
5.5	50.15 ± 0.28	67.3
6.0	62.46 ± 0.49	83.8
7.0	70.35 ± 0.53	94.4
8.0	70.41 ± 0.06	94.6

<sup>a</sup>Promedio ± desviación estándar de n = 2 réplicas analizadas por duplicado.<sup>b</sup>ALC- ácido linoleico conjugado total.<sup>c</sup>Conversión de ácido linoleico a ALC, con respecto a la cantidad original.

### 3.2 Concentración óptima de catalizador

La conversión de ácido linoléico a ALC se incrementó con el aumento en la concentración de catalizador en propilenglicol (Tabla 2), alcanzando un nivel máximo de 94.6% cuando se usó 8% de NaOH. Sin embargo, el aumento en la conversión cuando la concentración de catalizador se incrementó de 7 a 8% fue muy pequeño (0.2%). De modo que, para fines

prácticos, se consideró que la conversión fue equivalente para ambas concentraciones y que la conversión se mantiene constante a partir de 7% NaOH. Por lo que ésta última concentración (7%) se consideró como la óptima.

### 3.3 Tiempo óptimo de reacción

El perfil de concentraciones en función del tiempo, de los ácidos grasos involucrados

en la isomerización del ácido linoleico a ALC, cuando se usó la concentración de 7% NaOH en propilenglicol, se representa en la Fig. 1. Es importante aclarar que el tiempo 0 (inicial) es aquel en que el sistema alcanzó 180°C y que, mientras el sistema se calentaba a tal temperatura, hubo cierto desarrollo de reacciones de isomerización. Es por ello que para el tiempo inicial en la curva de la Fig. 1 las concentraciones de los compuestos involucrados no corresponden a los del aceite de cártamo. Una concentración de ALC total de 73.94% se tiene en 2.75 h, lo que indica una conversión de aproximadamente 99% del ácido linoleico a ALC. Sin embargo, la concentración conjunta de los isómeros activos (*cis*-9-, *trans*-11-, y *trans*-10, *cis*-12-ALC) alcanza su valor máximo en 2.25 h; pero a partir de éste momento su valor comienza a disminuir debido a la conversión de los isómeros activos de ALC a otros compuestos, también isómeros del ALC, que no son activos y que se denominan isómeros menores. Tomando en cuenta que, durante el

tiempo de enfriamiento, las reacciones de isomerización siguen desarrollándose, aunque con mas lentitud, el momento en que debe dejar de calentarse el sistema y comenzar su enfriamiento debe ser menor a 2.25 h. Así, el tiempo de reacción considerado como óptimo fue 2.15 h.

#### 3.4. Perfil de ácidos grasos

En la Tabla 3 se muestra el perfil de ácidos grasos del aceite cártamo y de la mezcla de ácidos grasos obtenida del proceso de isomerización bajo las condiciones determinadas como óptimas en este estudio. Se observa el efecto global del proceso de isomerización donde prácticamente el único cambio en el perfil de ácidos grasos fue la conversión de ácido linoleico a ALC. La conversión lograda fue de 97.6%. Los dos isómeros mayores constituyeron el 96% del ALC total, en cantidades equivalentes, lo que es bastante aceptable.

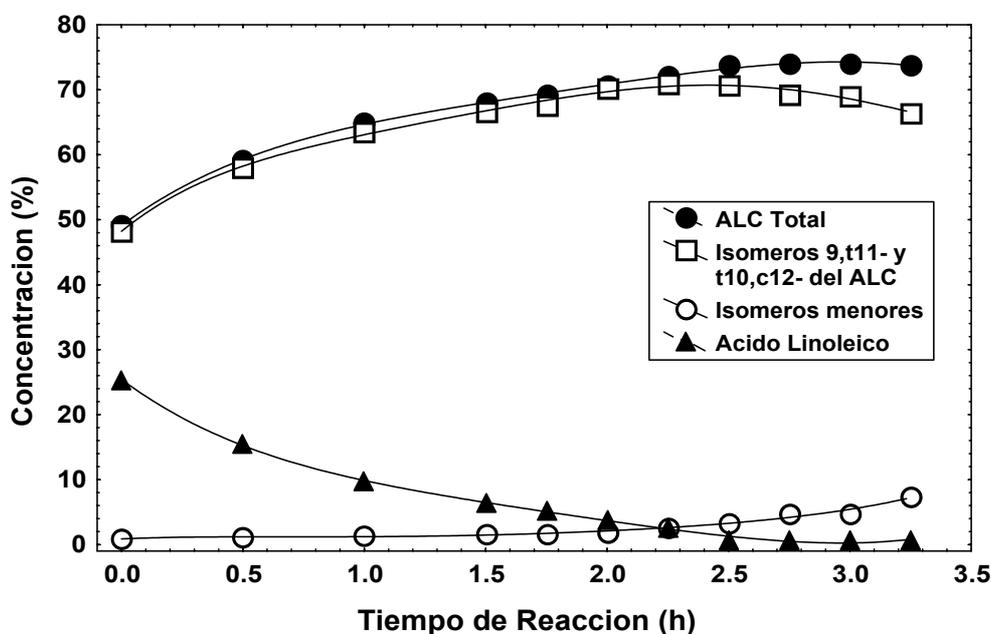


Fig. 1. Conversión de ácido linoleico a ácido linoleico conjugado *versus* tiempo de reacción durante el proceso de isomerización alcalina de aceite de cártamo con 7% de catalizador (NaOH) en propilenglicol, a 180°C.

Tabla 3. Composición<sup>a</sup> de ácidos grasos del aceite de cártamo antes y después del proceso de isomerización, desarrollado con 7 % NaOH en propilenglicol, y calentando 2.15 horas a 180 °C.

Composición de ácidos grasos (% p/p)		
Acido graso	Aceite de cártamo	Mezcla de isomerización
C16:0	6.72 ± 0.35	6.70 ± 0.29
C18:0	2.55 ± 0.42	2.53 ± 0.12
C18:1	15.41 ± 0.52	15.35 ± 0.98
C18:2	74.53 ± 1.31	1.72 ± 0.31
ALC <sup>b</sup>	n.d. <sup>c</sup>	72.78 ± 1.09
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-ALC	n.d.	35.01 ± 0.62
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-ALC	n.d.	35.88 ± 1.01
Isómeros menores	n.d.	1.89 ± 0.12
Otros	0.78 ± 0.06	0.9 ± 0.11

<sup>a</sup>Media ± desviación estándar de n=3 replicas con análisis por duplicado.

<sup>b</sup>Acido linoleico conjugado total.

<sup>c</sup>n.d.- no detectado.

## Conclusiones

El cambio de solvente, de etilenglicol a propilenglicol, en el proceso de isomerización alcalina afectó considerablemente la conversión de ácido linoleico a ALC, lo que confirma que, cuando alguna de las condiciones de proceso cambia (ej. solvente, tipo de catalizador, temperatura, tiempo de reacción, etc.) deben realizarse ajustes en las condiciones restantes para optimizar la conversión. Las condiciones óptimas encontradas en este estudio cuando se usa propilenglicol como solvente y NaOH, como catalizador, a 180°C, fueron 7% de catalizador y 2.15 h de reacción. Bajo tales condiciones se obtuvo una mezcla de ácidos grasos con una concentración de 73% de ALC, de la cual 96% estuvo formado de los isómeros de interés en concentraciones aproximadamente iguales.

## Agradecimientos

Al CONACYT por la beca proporcionada (no. de registro 62117) y al

FAI de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por su apoyo para gastos de publicación (convenio C03-FAI-11-15.50).

## Referencias

- Chin, S.F., Liu, W. Storkson, J. M., Ha, Y .L. y Pariza, M. W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a new recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Compositional Analysis* 5, 185-197.
- García, H.S., Arcos, J. A., Ward, D. J. y Hill, C. G. (2000). Synthesis of glycerides containing n-3 fatty acids and conjugated linoleic acid by solvent free acidolysis of fish oil. *Biotechnology and Bioengineering* 70, 587-591.
- Gäding, S., Rickert, R., Sébedio J. L. y Steinhart, H. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA): physiological effects and production. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 56-61.
- Ha, Y.L., Grimm, N. K. y Pariza, M. W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: heat altered conjugated linoleic acid. *Carcinogenesis* 8, 1881-1887.

- Ip, C., Chin, S. F., Scimeca, J. A., y Pariza, M. W. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research* 51, 6118-6124.
- McNeill, G. P., Rawlins, C. y Peilow A. C. (1999). Enzymatic enrichment of conjugated linoleic acid isomers and incorporation into triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76, 443-450.
- Reaney, M. J. T., Liu, Y. D. y Westcott, N. D. (1999). Commercial production of conjugated linoleic acid. En: *Advances in Conjugated Linoleic Research, Vol 1*. (M.P. Yurawecs, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, y G. J. Nelson, eds.). Pp 39-54. AOCS Press, Champaign, IL.