

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



ENRIQUECIMIENTO DE HELADO CON TRIACILGLICÉRIDOS ESTRUCTURADOS DE EPA, DHA Y ÁCIDO CAPRÍLICO, DE ACIDÓLISIS ENZIMÁTICA (*Candida antarctica*) DE AGPICL *n*-3 Y ACEITE REFINADO COMERCIAL DE SALMÓNIDOS

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad
de los Alimentos por:

ELIZABETH SUSANA CONTRERAS CERON

Director de Tesis: Alicia Rodríguez Melis, IA, Dra.

Santiago-CHILE

Agosto 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

ELIZABETH SUSANA CONTRERAS CERON

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar el grado de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Alicia Rodriguez Melis

Comisión Evaluadora de Tesis

Dra. María Antonieta Valenzuela Pedevila

MSc. Andrea Bunger Timmermann.

MSc. Liliana Cristina Maier Neumann

DEDICATORIA

Con amor para mi familia

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda colaboraron en la finalización de mi postítulo y memoria.

Especial reconocimiento merecen mis padres, por apoyarme en todo momento, al darme la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida y su motivación constante para alcanzar mis sueños. Gracias por la orientación a tomar decisiones que ayudaron a equilibrar mi vida y sobre todo por el inmenso amor que me entregan cada día. A mis tías, primos y abuelas, los cuales me enseñaron los valores que ayudaron a forjarme como una persona íntegra.

Diego, mi mejor amigo y compañero de vida, gracias por tu amor y apoyo incondicional. Por siempre creer en mí y alentarme a seguir estudiando. Por darme una visión más allá del colegio y la universidad, que me motivan a seguir superándome cada día hasta cumplir nuestras proyecciones.

Rosita, más que prima, eres mi hermana, tú me demostraste que la perseverancia hace al maestro. Que a pesar de los obstáculos que te ponga la vida, uno los puede superar con dedicación y amor. Gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme con amor de hermana.

A mis compañeros de laboratorio, quienes me ayudaron incondicionalmente, no sólo en la realización de mi memoria, sino también en los momentos de desesperación. Gracias por su amistad, risas, conocimiento y consejos brindados a lo largo de este periodo.

A mi directora de tesis, Alicia Rodríguez M., gracias por confiar en mí, dándome la oportunidad de pertenecer a su proyecto FONDECYT. Por brindarme su conocimiento, experiencia de vida y orientación en la realización de mi memoria.

Finalmente agradezco a Dios, por iluminar cada paso de mi vida y bendecirme con esta familia tan hermosa.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ANEXOS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	9
SIGLAS	11
RESUMEN	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Materia prima	17
2.2 Aceite de pescado	18
2.3 Efectos potenciales del aceite de pescado	19
2.4 Ácidos grasos de cadena media: Ácido caprílico	22
2.5 Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)	22
2.6 Concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga <i>n</i> -3 (AGPICL <i>n</i> -3) por inclusión en cristales de urea	23
2.7 Lípidos estructurados y biocatalizadores	24
2.8 Sistema de fluido supercrítico y uso de lipasas	26
2.9 Sistema de análisis térmico	28
2.10 Metodología superficie de respuesta (RSM)	29
2.11 Helado y enriquecimiento	29
CAPITULO III: HIPOTESIS Y OBJETIVOS	32
3.1 Hipótesis	32
3.2 Objetivo general	32
3.3 Objetivos específicos	32
CAPITULO IV: MATERIALES Y METODOS	33
4.1 Materiales	33
4.1.1 Materias primas	33
4.1.2 Equipos	33
4.2 Metodología	34

4.2.1	Caracterización mediante análisis químicos del aceite crudo de salmón comercial y el aceite refinado de salmón comercial	34
4.2.2	Obtención de un concentrado de ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-3 (AGPICL <i>n</i> -3) con EPA y DHA, a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión en cristales de urea.....	35
4.2.2.1	Preparación de ácidos grasos libres (AGL) a partir de aceite crudo comercial de salmónidos por proceso de saponificación	35
4.2.2.2	Preparación del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 desde ácidos grasos libres de aceite crudo comercial de salmónidos, por inclusión con urea	36
4.2.2.3	Análisis del perfil de ácidos grasos	36
4.2.2.3a	Metilación con estándar interno	36
4.2.2.3b	Caracterización mediante cromatografía de gases	37
4.2.2.3c	Determinación de perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases	37
4.2.3	Obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados, mediante la acidólisis enzimática (<i>Candida antarctica</i>) en CO ₂ supercrítico	38
4.2.3.1	Purificación de mezcla resultante para obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs)	39
4.2.3.2	Análisis por cromatografía de gas	39
4.2.4	Enriquecimiento de crema de helado, mediante la incorporación de TAGs purificados a través de la optimización de las variables del proceso de homogeneización, concentración EPA+DHA y agitación	39
4.2.4.1	Diseño Experimental	39
4.2.4.2	Obtención modelo matemático según la metodología de superficie de respuesta (MSR)	41
4.2.5	Estudio de la influencia de las variables del proceso de homogeneización del helado enriquecido con TAGs de EPA y/o DHA frente al comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido	41

4.2.5.1	Obtención de la formulación de helado	41
4.2.5.2	Caracterización de las formulaciones mediante perfil de fusión obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	42
4.2.6	Optimización del efecto de las variables de velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA, sobre el comportamiento térmico de los helados enriquecidos	43
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		44
5.1	Caracterización mediante análisis químicos del aceite crudo de salmón comercial y aceite refinado de salmón	44
5.2	Obtención ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPICL n-3) con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea	45
5.3	Obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados, mediante la acidólisis enzimática (Candida antarctica) en CO2 supercrítico	49
5.4	Enriquecimiento de crema de helado, mediante la incorporación de TAGs purificados a través de la optimización de las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs EPA y/o DHA y velocidad de agitación	53
5.4.1	Caracterización de las formulaciones enriquecidas de helado con TAGs EPA y/o DHA mediante perfil de fusión obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	53
5.4.2	Caracterización de las formulaciones enriquecidas con TAGs EPA y/o DHA mediante las variables de resistencia al derretimiento y fusión en boca, obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC)	56
5.5	Optimización las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs EPA y/o DHA y velocidad de agitación frente al comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido	61
CAPITULO VI: CONCLUSIONES		64
BIBLIOGRAFÍA		66
ANEXOS		75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Formulación de helado de crema sabor frutilla	75
Anexo 2. Análisis de varianza mediante Statgraphic Centurion XVI para las variables independientes velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA respecto a la respuesta de resistencia al derretimiento	77
Anexo 3. Análisis de varianza mediante Statgraphic Centurion XVI para las variables independientes velocidad de agitación y contenido de TAGs EPA y/o DHA respecto a la respuesta de fusión en boca	80
Anexo 4: Análisis de varianza mediante Statgraphic Centurion XVI para la optimización de las variables de resistencia a derretimiento y fusión en boca	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia, correspondiente a una sustancia pura	27
Figura 2. Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) obtenidos por cromatografía de gases, A: aceite refinado de salmón, B: aceite crudo de salmón y C: concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL n-3) de aceite crudo de salmón	48
Figura 3. Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) obtenidos por cromatografía de gases, correspondientes a triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados	52
Figura 4. Perfiles de fusión obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC). A: Crema comercial (Colun). ; B: Triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs purificado); C: Diseño 3 de helado (15000 rpm y 100mg TAGs EPA y/o DHA)	55
Figura 5. Contenido de grasa sólida (CGS) en función de la temperatura de las muestras enriquecidas con TAGs de EPA y/o DHA por DSC. Formulación 1-6; crema	

comercial; helado control y TAGs purificado. Dureza: a (-80°C) - b (-20°C); resistencia al derretimiento: b (-20°C) - c (0°C); sensación frialdad en boca: c (0°C) - d (10°C); fusión en boca (10°C); cerosidad en la boca d (10°C) – e (20°)	57
Figura 6. Gráficos de respuesta estimada de resistencia al derretimiento para las variables velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA a) Superficie de respuesta; b) Diagrama de Pareto	59
Figura 7. Gráficos de respuesta estimada de fusión en boca para las variables velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA a) Superficie de respuesta; b) Diagrama de Pareto	60
Figura 8. Superficie de respuesta estimada para optimización de deseabilidad (1,0) de las variables velocidad de agitación y contenido de triacilglicéridos estructurados purificados de EPA y/o DHA	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos para la caracterización química de la materia prima	34
Tabla 2. Diseño compuesto central 25-1+ estrella de 5 factores en 28 corridas basado en MSR para la obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs) mediante acidólisis enzimática (Candida antarctica) bajo condiciones supercríticas SCCO ₂	38
Tabla 3. Diseño factorial 2 ² con 2 repeticiones en el punto central (0,0) del proceso de homogeneización de la crema de helado con TAGs purificados con alto contenido de EPA y/o DHA	40
Tabla 4. Componentes característicos para postres helados, helados de crema, leche helada, sorbete y helado de agua	42
Tabla 5. Caracterización de aceite crudo y refinado de salmón	44

Tabla 6. Contenido de ácidos grasos obtenidos por cromatografía de gases en aceite crudo de salmón comercial y su respectivo concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga <i>n</i> -3 (g/100g AGT)	47
Tabla 7. Composición de ácidos grasos (AG) y ácidos grasos de aceites crudo y refinado comercial de salmónidos, concentrado AGPI y triacilglicéridos estructurados (g/100g AGT)	50
Tabla 8. Comportamiento térmico del diseño factorial 2 ² con 2 repeticiones en el punto central (0,0) del proceso de homogeneización de crema de helado con triacilglicéridos estructurados con alto contenido de EPA y/o DHA y ácido caprílico, helado control, crema comercial (Colun) y triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs purificados)	54
Tabla 9. Comportamiento de fusión de las muestras de helado, crema comercial (Colun), helado control y TAGs purificados	55
Tabla 10. Comportamiento térmico de porcentaje de contenido de grasa sólida (%CGS) del diseño factorial 2 ² con 2 repeticiones en el punto central (0,0) del proceso de homogeneización de crema de helado con triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs) de EPA y/o DHA de helado control, TAGs purificados y diseños de helado.....	62

SIGLAS

AGL: Ácidos grasos libres.

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

AGPICL: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

AGPICL *n*-3: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega*-3.

AGT: Ácidos grasos totales.

ALA: Ácido α -linolénico.

Cp: Capacidad calorífica.

DHA: Ácido docosahexaenoico.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

EPA: Ácido eicosapentaenoico.

FAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos.

FSC: Fluido supercrítico.

LA: Ácido linoleico.

PT: Punto triple.

TAGs: Triacilglicéridos estructurados.

TAGs EPA y/o DHA: Triacilglicéridos estructurados de EPA y/o DHA

RESUMEN

Hoy en día, los aceites de origen marino son productos valiosos con gran aplicación nutricional por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega-3* (AGPICL *n-3*), principalmente el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA). Éstos son reconocidos por sus múltiples beneficios a la salud, asociándose con la protección frente a enfermedades cardiovasculares, funciones neuronales, regulación de la inflamación, entre otros.

No obstante, el consumo de productos del mar en Chile es bajo con respecto al promedio mundial, debido a lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se investigó el enriquecimiento de una matriz de crema de helado, con la adición de triacilglicéridos estructurados (TAGs) de EPA, DHA y ácido caprílico, obtenidos de la purificación del producto generado en el proceso de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) de aceite refinado comercial de salmónidos y concentrado de AGPICL *n-3* de aceite crudo comercial de salmónidos, bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico. En donde, el concentrado AGPICL *n-3* con alto contenido de EPA y DHA a partir de aceite crudo comercial de salmónidos, se obtuvo luego de un proceso de saponificación y posterior inclusión en cristales de urea.

El enriquecimiento de helado se llevó a cabo con la adición de TAGs de EPA y DHA mediante la optimización de las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs de EPA y/o DHA y velocidad de agitación utilizando un diseño factorial 2^2 con 2 repeticiones en el punto central (0,0) según metodología de superficie de respuesta. Se estudió el efecto del proceso de homogeneización sobre el comportamiento térmico, mediante calorimetría diferencial de barrido para las variables respuesta de fusión en boca (10°C) y resistencia al derretimiento (0°C).

Los valores obtenidos para la optimización de las variables de fusión en boca y resistencia al derretimiento respecto al helado control, fueron de 6056 rpm para la velocidad de agitación y 151 mg de TAGs de EPA y/o DHA. Por lo que este estudio permite complementar la ingesta de pescado con un producto de consumo masivo, además de representar un acercamiento a los niveles óptimos de relación ácidos grasos *omega-6* y *omega-3* en un alimento especialmente atractivo para niños.

ABSTRACT

Nowadays oil from marine origin are valuable products with great nutritional application due to their high content of *omega*-3 long chain polyunsaturated fatty acids (AGPICL *n*-3), mainly eicosapentaenoic acid (C20: 5, EPA) and docosahexaenoic acid (C22: 6, DHA). These fatty acids are known for their multiple health benefits, being associated with protection against cardiovascular, the optimal development of neural, regulating inflammation, and others.

However, the consumption of seafood in Chile is quite low with respect to the world average, due to the above, the present work studied the enrichment of a cream matrix of ice cream with the addition of EPA, DHA and caprylic acid structured triacylglycerols (TAGs), obtained from the purification of the product generated in the enzymatic acidolysis process (*Candida antarctica*) of commercial refined oil of salmonids and concentrate of AGPICL *n*-3 of commercial crude oil of salmonids under conditions of supercritical carbon dioxide. The commercial crude oil of salmonids AGPICL *n*-3 concentrate was obtained by saponification and subsequent inclusion with urea crystals for the exclusive production of AGPICL *n*-3, EPA and DHA.

The enrichment of ice cream was carried out with the addition of EPA and DHA TAGs by optimizing the variables of the homogenization process, EPA and DHA concentration and stirring speed using a factorial design 2^2 with 2 repetitions at the center point of the coded variables (0,0) according to response surface methodology.

The effect of the homogenization process on thermal behavior was studied by differential scanning calorimetry (DSC) for the variables response mouth melt measured at 10°C and thermal resistance measured at 0°C.

The values obtained for the optimization of the response variables, mouth melt and thermal resistance with respect to control ice cream were 6056 rpm for the agitation speed and 151 mg of EPA and/or DHA TAGs in the enrichment of the cream in the ice cream matrix. So this study allows to complement the intake of fish with a product of mass consumption, besides representing an approach to the optimal levels of *omega*-6 and *omega*-3 fatty acids in a food especially attractive for children.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Los aceites son divididos en dos grupos según su origen: los obtenidos a partir de semillas y/o frutos de origen terrestre y los obtenidos a partir de vegetales (algas) y animales (peces, crustáceos, moluscos y mamíferos) de origen marino. Ambos tipos de aceites están igualmente constituidos por mezclas de triglicéridos cuyos principales componentes son los ácidos grasos (Valenzuela y Sanhueza, 2009). Dentro de los triacilglicéridos, dependiendo de la posición de su doble enlace, se encuentra el *omega-3* y el *omega-6* (*n-3* y *n-6*, respectivamente). Los *omega-6* se encuentran principalmente en aceites vegetales, aceite de semillas de onagra, borraja y grosella negra (FAO, 2008; FAO, 2010), y los *omega-3* en el aceite de pescado y otros alimentos marinos, especialmente en pescados aceitosos, tales como el salmón, la sardina y el atún (González y Orellana, 2002).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega-3* (AGPICL *n-3*) han obtenido una creciente atención debido a su papel beneficioso en la nutrición y salud humana. Los AGPICL *n-3*, tales como el cis-5,8,11,14,17 ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 *n-3*) y el cis-4,7,10,13,16,19 ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 *n-3*) se encuentran normalmente presentes en aceites de origen marino (Siriwardhana y cols., 2012).

La importancia de estos efectos es relevante, ya que la primera causa de muerte, tanto en los países desarrollados, como en aquellos en vías de desarrollo, se atribuye a las patologías asociadas al aparato circulatorio, estando el 80% de ellas asociadas directa o indirectamente al proceso aterosclerótico (Anales científicos, 2002). Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en Europa, representando el 49% de todas las muertes y el 30% de las muertes antes de los 65 años. En la actualidad, la prevalencia de enfermedad cardiovascular lejos de ir disminuyendo, continúa creciendo, vinculada al aumento progresivo en la edad de la población. En la promoción y prevención de la enfermedad cardiovascular, la dieta juega un papel predominante (García y cols., 2009; López-Huertas, 2012; Dyall 2015).

Los AGPICL *n*-3 son considerados actualmente como factores determinantes en la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, incluyendo efectos hipotriglicéridémicos y antiinflamatorios bien establecidos. Además, varios estudios indican efectos prometedores antihipertensivos, anticancerígenos, antioxidantes, antidepresivos, antienvjecimiento y antiartritis (Siriwardhana y *cols.*, 2012). También tiene efecto sobre enfermedades coronarias y baja la incidencia en los infartos al miocardio (FAO, 2008; FAO, 2010).

El incremento en el consumo de los AGPICL *n*-3 ha sido recomendado por autoridades de la salud en Canadá (Scientific Review Committee, 1990) y la United Kingdom (The British Nutrition Foundation, 1992), e ingesta diaria de cerca de 200-400 mg of AGPICL *n*-3 en Europa y US (de Deckere y *cols.*, 1998; Simopoulos y *cols.*, 1999).

La recomendación de acuerdo a FAO (2010) para hombres adultos y mujeres adultas no embarazadas / no lactantes es de 250 mg/día de EPA más DHA, con evidencia insuficiente para establecer un consumo mínimo específico de EPA o DHA solo; ambos deben ser consumidos. Para las mujeres embarazadas y lactantes adultas, la ingesta mínima para la salud óptima de los adultos y el desarrollo fetal e infantil es de 300 mg/día EPA más DHA, de los cuales al menos 200 mg/día deben ser DHA.

Sin embargo, en las sociedades occidentales el consumo de pescado es bajo, siendo de 7 kg/año en Chile, lo cual corresponde a un 33% menos que el consumo mundial. El aumento del consumo a niveles recomendados implicaría grandes alteraciones en los hábitos alimenticios (Carrero y *cols.*, 2005). La solución más económica es prevenir estas enfermedades mediante el consumo de alimentos ricos en AGPICL *n*-3 o suministrándolo en forma de cápsulas u otro producto de modo que el consumo de aceite sea adecuado desde el punto de vista químico, organoléptico y toxicológico (Anales científicos, 2002; FAO, 2008).

La incorporación de aceite de pescado en una serie de nuevos alimentos comerciales ofrece la oportunidad de un consumo público más amplio de AGPICL *n*-3 con sus beneficios para la salud asociados (Metcalf y *cols.*, 2003). Sin embargo, el aceite de pescado contiene ácidos grasos saturados, monoinsaturados que

forman parte del total aceite que no son AGPICL *n*-3 EPA y DHA (Pando y cols., 2014).

Hasta la fecha, la única alternativa ha sido un consumo regular de aceite de pescado en forma de cápsulas, no obstante, los ácidos grasos *omega*-3 se metabolizan y se absorben mejor en el organismo como triacilglicéridos que como ésteres etílico o metílico (Metcalf y cols., 2003; Dyerberg y cols., 2010).

Una estrategia alternativa para incrementar el aumento a largo plazo de la ingesta de AGPICL *n*-3 puede ser proporcionar una amplia gama de productos alimenticios comerciales e ingredientes reforzados con triacilglicéridos (TAGs), que pueden incorporarse a una dieta existente.

Los TAGs han modificado su composición y/o distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de glicerol, mediante reacciones químicas y/o enzimáticas, con mejoramiento de sus propiedades funcionales y/o nutricionales (Osborn y Akoh, 2002). Una de las reacciones enzimáticas es la acidólisis catalizada por lipasas la cual proporciona ventajas, como el uso de temperaturas relativamente bajas y una mayor selectividad del catalizador. La tecnología de fluidos supercríticos (FSC) ofrece una alternativa ventajosa como medio de catálisis enzimática debido a su alta versatilidad e inocuidad de los solventes en estado supercrítico (Wimmer y Zarevúck, 2010).

En la presente tesis se pretende obtener una matriz de crema de helado enriquecida con TAGs purificados de EPA, DHA y ácido caprílico, obtenidos a partir de acidólisis enzimática entre concentrado AGPICL *n*-3/aceite refinado comercial de salmónidos/ácido caprílico, bajo condiciones de CO₂ supercrítico, mediante la optimización de las variables del proceso de homogeneización, contenido de TAGs de EPA, DHA y ácido caprílico y velocidad de agitación, con propiedades térmicas y texturales similares a helado control fabricado en laboratorio.

CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIA PRIMA: SALMÓN

El pescado, especialmente los que pertenecen al tipo graso como el arenque, la caballa y el salmón, representan una rica fuente y prácticamente única de ácidos grasos altamente insaturados, específicamente ácido eicosapentaenoico (20:5 *n*-3, EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6 *n*-3, DHA) (Gordon y cols., 2012).

El salmón es una especie de captura salvaje, sin embargo, actualmente su amplia disponibilidad deriva prácticamente en un 100% de la producción industrializada chilena a través de la acuicultura. Dentro de esta industria, las dos variedades de cultivo intensivo más importantes, son el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y el salmón del Pacífico o también conocido como salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Valenzuela y cols., 2012).

En 2014, Chile ocupó el octavo lugar en volumen de pescado desembarcado. Sin embargo, el consumo de pescado en Chile es bajo en comparación al consumo mundial, ya que, en 2013 se estimó un consumo de 13,2 kilos de productos marinos al año, siendo 7 kilos los correspondientes a pescado, en relación a los 22,2 kilos de productos del mar consumidos en Perú (Fundación Chile, 2016).

Un 46% de los chilenos consume pescado al menos una vez por semana. Cabe destacar que el pescado juega un rol importante para combatir la malnutrición y es la principal fuente de proteína animal en muchos países en desarrollo. Los productos del mar no son sólo una fuente de proteínas de fácil digestibilidad y ácidos grasos *omega*-3, sino que además son una fuente esencial de otros nutrientes como el yodo, la vitamina D y el calcio, que son cruciales para el correcto funcionamiento de nuestro organismo (FAO, 2015; Fundación Chile, 2015).

En 2006, se estimó que el 87% de todo el aceite de pescado lo utilizaba la industria de la acuicultura para producir piensos. Mientras que el 13% restante se transformaba en productos para el consumo humano, principalmente en cápsulas de aceite de pescado. Los cultivos de salmón, por si solos, utilizaban aproximadamente el 33% de todo el aceite de pescado producido (FAO, 2008; FAO 2010).

La alimentación del salmón en cultivo es un proceso altamente tecnificado y científicamente elaborado. Los componentes más importantes de la dieta artificial de los salmones son la harina y el aceite de pescado. Ambos productos son obtenidos a partir de la captura industrializada de peces oceánicos como el jurel, la sardina, la anchoveta, entre otras. La harina le aporta al salmón los macro y micro nutrientes esenciales y el aceite, además de constituir un aporte energético importante, le permite incorporar los AGPICL *n*-3 fundamentales para su crecimiento y desarrollo (Kapoor y Patil, 2011).

2.2 ACEITE DE PESCADO

Originalmente, el aceite de pescado era un “subproducto” de la fabricación de la harina de pescado, un valioso producto de amplia utilización en la industria de la nutrición animal. En la actualidad, Perú, Chile, Dinamarca y Noruega, en ese orden, son los países con mayor actividad pesquera destinada a la fabricación de harina de pescado y aceite de pescado. Los aceites marinos con alto grado de refinación y desodorización también han sido utilizados como tales en la alimentación humana, particularmente en algunos países latinoamericanos (Chile, Perú y Ecuador) y europeos (Noruega, Dinamarca y Finlandia) (Valenzuela y cols., 2012).

Por otra parte, cabe destacar que el suministro de harina y aceite de pescado en algunas zonas del mundo son los ingredientes para la elaboración de piensos para peces y camarones. El cuidado de estos recursos es particularmente importante para la sostenibilidad a largo plazo de la acuicultura (FAO, 2011).

En la actualidad, el sector de la acuicultura utiliza aproximadamente un 75% de la producción mundial de aceite de pescado y este porcentaje está aumentando de forma constante (FAO, 2013).

La producción de aceite de pescado mundial se ha mantenido entre 1 y 1,25 millones de toneladas durante muchos años que demuestran la naturaleza sostenible de las pesquerías (Pike y Jackson, 2010).

En Chile, los desembarques de peces van mayoritariamente a la producción de harina y aceite de pescado. A principios de la década de los setenta, más de un

91% de los peces se destinaba a la industria de la harina con 1.263.657 toneladas; en el año 2012 este destino ha bajado a 65% del desembarque total de peces, siendo de 2.050.778 toneladas (Odepa, 2014).

En términos de exportación de harina y aceite de pescado, Chile destinó en 2013 (hasta Noviembre), 230.259 toneladas de harina de pescado al mercado internacional, siendo el principal destino Estados Unidos, seguido por Japón, que hasta el 2012 era el principal destinatario de los productos pesqueros, luego Brasil y China. Estas exportaciones estuvieron valuadas en 108 millones de dólares en 2012 (Odepa, 2014; Odepa, 2013).

En relación con las importaciones del sector pesquero, en 2012 el aceite de pescado alcanzó cifras de 104.515 dólares (Odepa, 2013).

Mundialmente, la pesca y acuicultura destinó 23 millones de toneladas de pescados a la producción de harina y aceite, siendo el 14% del total de lo recolectado (Odepa, 2013).

2.3 EFECTOS POTENCIALES DEL ACEITE DE PESCADO

En los tiempos iniciales de nuestra especie, es decir en el momento en que se fijó el patrón genético humano, se estima que la relación entre el consumo de *omega-3* y *omega-6* habría sido de 1:1. Pero con los cambios de dieta asociados a la agricultura y más tarde a la industrialización, esta relación se ha desequilibrado llegando a ser de 1:20. Un hecho que produjo un gran incremento del consumo de ácido linoleico, perteneciente a la familia *omega-6*, fue la aparición de la industria de los aceites vegetales (González y Orellana, 2002). A su vez, las dietas occidentales son deficientes en AGPICL *n-3*, y tienen una cantidad excesiva de AGPICL *n-6* en comparación con la dieta en la que los seres humanos evolucionaron y sus patrones genéticos fueron establecidos. Las cantidades excesivas de AGPICL *n-6* y una muy alta proporción *n-6/n-3*, como es encontrada en las dietas occidentales de hoy, promueven la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, inflamatorias y enfermedades autoinmunes, mientras que los mayores niveles de

AGPICL *n*-3 y una baja relación *n*-6/*n*-3 ejercen efectos represivos. En la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular, una proporción de 4/1 fue asociada con una disminución del 70% en la mortalidad total (De Loregeril y cols., 1994; Swanson y cols., 2012).

El consumo de AGPICL *n*-3 derivado del aceite de pescado, ya sea como pescado (silvestre y cultivado) o aceite de pescado encapsulado, ha demostrado que ayuda a mantener la salud, especialmente la salud cardiovascular (Pike y Jackson, 2010; McNeish y cols., 2017).

La FAO recomienda un consumo diario de 500 mg de EPA y de DHA para la prevención primaria de enfermedades coronarias. Para cumplir con esta recomendación, se deben consumir al menos dos porciones de pescado graso (90g cada una), como salmón y arenque, a la semana. Mientras que dos porciones diarias de bacalao, un pescado bajo en grasas, (90 g cada una) proporciona alrededor de 284 mg de EPA y de DHA al día (FAO, 2008; FAO, 2010).

Existen pruebas concluyentes que apuntan a que el consumo de pescado, y en particular el pescado graso, disminuye el riesgo de mortalidad por cardiopatía coronaria; se estima que el consumo de pescado reduce un 36% el riesgo de muerte por esta enfermedad debido a los AGPICL *n*-3 que se encuentran principalmente en el pescado y los productos pesqueros. Además, el consumo de AGPICL *n*-3 reduce la frecuencia cardíaca en reposo (FC) y la presión arterial sistólica y diastólica (Mozaffarian y Wu, 2011). La cardiopatía coronaria es un problema mundial de salud que afecta a sectores cada vez más amplios de la población en países en desarrollo, y los productos acuícolas son una fuente importante de estos ácidos grasos *omega*-3 de cadena larga (FAO, 2013).

Hay varios estudios epidemiológicos que muestran una relación inversa entre el consumo de AGPICL *n*-3 y la incidencia de la depresión. El mecanismo de acción propuesto de AGPICL *n*-3 en los trastornos del estado de ánimo incluye los efectos sobre las propiedades biofísicas de las membranas sinápticas que afecta a los receptores de neurotransmisores, y los efectos sobre las respuestas inflamatorias que involucran los eicosanoides (Alabdulkarim y cols., 2012).

Además, el EPA y DHA funcionan como un componente del cerebro y del tejido nervioso, y en particular en el desarrollo de estos órganos. Una dieta rica en AGPICL *n*-3 tiene un papel importante en el último trimestre del embarazo y en la nutrición infantil, ya que especialmente el DHA influye en el desarrollo y función del sistema nervioso y en el órgano visual en el feto y el recién nacido (FAO, 2013).

Se ha encontrado un efecto beneficioso de los AGPICL *n*-3 que desempeñan un papel importante en el metabolismo óseo y en la salud ósea, ya que mejoran la actividad de los osteoblastos (función de mineralización) e inhiben la actividad de los osteoclastos (causan resorción ósea) (Alabdulkarim y cols., 2012).

Existen numerosos experimentos con animales e investigaciones clínicas que muestran que la aplicación de aceite de pescado tiene gran utilidad en el tratamiento y prevención de enfermedades tales como artritis, arterosclerosis, soriasis, dolores menstruales, infarto cardíaco, diabetes y esquizofrenia. Incluso se ha encontrado un efecto inhibitorio en el crecimiento de tumores cancerosos. Además, se ha demostrado que un aumento en el consumo de aceite de pescado tiene un impacto positivo sobre el estado de salud general (González y Orellana, 2002).

Se ha visto en recientes estudios la correlación entre el consumo de ácidos grasos *omega*-3, EPA y DHA, y el aumento de los *peaks* de masa ósea en el tratamiento de la osteoporosis (Kuroda y cols., 2017), y en el tratamiento de afecciones y trastornos psicológicos (Skogli y cols., 2017). Asimismo, estudios han demostrado su eficacia para el tratamiento de diversas enfermedades como diabetes mellitus, hipertensión, función cardíaca, neuropatías y artritis (Ostadrahimi y cols., 2016; Galan-Arriero y cols., 2017; Abdulrazaq y cols., 2017).

Es por esto que la FAO ha estimado que un aporte diario de 250 mg de EPA más DHA por adulto garantiza una protección óptima contra la cardiopatía coronaria. Mientras que para el desarrollo óptimo del cerebro de los niños se necesitan diariamente sólo 150 mg al día (FAO, 2013).

2.4 ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA: ÁCIDO CAPRÍLICO

Los ácidos grasos de cadena media (AGCM) contienen entre 6 y 12 átomos de carbono y son digeridos, absorbidos y metabolizados de manera distinta que los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) (Bach y Babayan, 1982).

Los triglicéridos de cadena media contienen ácidos grasos saturados como son el ácido caproico (C6:0), el ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0) y ácido laúrico (C12:0). Estos se encuentran en algunos aceites como el de coco o el palmiste, cuyo contenido en AGCM supera el 50% del total de ácidos grasos, y en una pequeña proporción en otros productos naturales como la leche bovina y la leche de cabra (Papamandjaris y cols., 1998; Sáyago-Ayerdi y cols., 2008).

En estos tipos de ácidos grasos, la masa molar es lo suficientemente pequeña para que sean hidrosolubles por lo que se requieren menos sales biliares para su digestión, no se reesterifican en el enterocito, y son transportados por la vena porta. Pueden ingresar en las células de la mucosa intestinal en forma de diglicéridos y monoglicéridos, los cuales son hidrolizados por la lipasa de la mucosa a AGCM y glicerol, los AGCM libres son unidos a albúmina y transportados vía porta al hígado. En virtud de que la velocidad de flujo sanguíneo portal es casi 250 veces mayor que el flujo de la linfa, los AGCM son absorbidos con rapidez y es probable que no sean afectados por factores intestinales que inhiban la absorción grasa (Sáyago-Ayerdi y cols., 2008).

2.5 ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (AGPI)

Los AGPI naturales, con dobles enlaces separados por un metileno y de configuración *Cis* pueden dividirse en 12 familias diferentes: pueden comprender entre dobles enlaces situados en la posición $n-1$ hasta la $n-12$ (Gunstone, 1999). Las familias más importantes, por lo que se refiere al grado de frecuencia, la salud y nutrición humana, son la *omega-6* y la *omega-3* (Ratnayake y Gill, 2009).

Existen dos AGPI que el organismo no puede sintetizar, el ácido linoleico (18:2 $n-6$; LA) y el ácido alfa linolénico (18:3 $n-3$; ALA), que deben obtenerse de la dieta y se

les conoce como ácidos grasos esenciales. Estos ácidos grasos pertenecen a la familia *omega-6* u *omega-3* (Rodríguez-Cruz y cols., 2005).

El LA es el ácido graso esencial primario o generador de la familia *n-6*. Posee 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces. Además, el primer doble enlace se encuentra a 6 átomos de carbono del extremo metilo de la cadena de ácidos grasos, y este es el motivo de que se denomine *omega-6*.

El ALA es el ácido graso esencial primario o generador de la familia *n-3*. Cuenta igualmente con 18 átomos de carbono, pero posee tres dobles enlaces (Ratnayake y Gill, 2009; FAO, 2012).

Los aceites de origen marino se caracterizan por su alto contenido de ácidos grasos *omega-3*, aunque es necesario diferenciar entre los ácidos grasos *omega-3* de origen vegetal terrestre, y los de origen marino, ya que los primeros solo tienen como principal componente *omega-3* al ALA, en cambio los de origen marino se caracterizan por su alto contenido de AGPICL *n-3*, siendo los más relevantes el EPA y el DHA (Valenzuela y Sanhueza, 2009).

La ruta biosintética de los seres humanos no parece proporcionar un nivel suficiente de ALA para que éste sustituya al EPA y al DHA de la dieta. Sólo se alcanzan grandes niveles de EPA y DHA en la sangre u otras células cuando éstos son incorporados como tales en la dieta mediante el consumo de pescado y aceites de pescado, que son fuentes ricas en estos AGPICL *n-3* (FAO, 2012).

2.6 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA *n-3* (AGPICL *n-3*) POR INCLUSIÓN EN CRISTALES DE UREA

Los concentrados de AGPICL *n-3* pueden ser producidos por varios métodos, tales como cristalización en frío, inclusión con urea, destilación molecular, extracción supercrítica, complejación argéntica y concentración con lipasa (Liu y cols., 2006). De todos ellos, la técnica más eficiente y sencilla es la complejación con urea, que permite separar los ácidos grasos poliinsaturados de los saturados y

monoinsaturados, mediante un económico proceso a baja temperatura y presión (Wanasundara y Shahidi, 1999; Guil-Guerrero y Belarbi, 2001; Liu y cols., 2006).

El método de los compuestos de inclusión de urea es la técnica más utilizada para la obtención de concentrados de AGPICL. Consiste en separar los ácidos grasos saturados y monoinsaturados de los ácidos poliinsaturados partiendo de una disolución en caliente y saturada de urea que contiene a todos los ácidos grasos en estado libres (AGL). Esta disolución se enfría, provocando la cristalización de la urea; por otra parte, los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, debido a su estructura en forma de cadenas largas y lineales, quedan incluidos en el interior de la estructura cristalina de la urea, mientras que los AGPICL permanecen en la disolución (Hayes y cols., 1998; Zuta y cols., 2003).

Investigaciones con rayos X confirman que la urea cristaliza normalmente en una estructura tetragonal, pero en presencia de moléculas orgánicas de cadena larga y lineales los cristales son hexagonales. Los AGPICL no forman compuestos de inclusión con la urea debido a que la presencia de dobles enlaces en sus moléculas, ya que introduce irregularidades estéricas y como consecuencia desviaciones de las distancias óptimas intermoleculares, disminuyendo las fuerzas de atracción neta que estabiliza los compuestos de inclusión (Ramírez, 2005).

Al aplicar este método de concentración, las variables más significativas son la relación urea/AGL y la temperatura de cristalización. Cuanto mayor es la relación urea/AGL, más favorecida está la formación de los compuestos de inclusión. La relación urea/AGL más óptima para la formación de los compuestos de inclusión está cerca de 3:1 p/p (Zuta y cols., 2003).

2.7 LÍPIDOS ESTRUCTURADOS Y BIOCATALIZADORES

Gran parte del interés inicial en enzimología fue desarrollado por científicos como Pasteur, Payen y Persoz, que estaban asociados con los alimentos, el vino y la cerveza industrial. La presencia de lipasa en bacterias se había observado ya en 1901 por el microbiólogo Christiaan Eijkmann, como lo fueron los *Bacillus prodigiosus* (ahora *Serratia marcescens*), *B. pyocyaneus* (ahora *Pseudomonas*

aeruginosa), *B. fluorescens* (ahora *P. fluorescens*) y *Staphylococcus pyogenes* (ahora *S. aureus*) (Aravindan y cols., 2007).

Las lipasas son enzimas ubicuas, que se encuentran en los animales, plantas, hongos y bacterias, son de gran importancia fisiológica y gran potencial industrial (Aravindan, y cols., 2007). Diferentes tipos de biocatalizadores, como las lipasas, esterases, y fosfolipasas pueden ser utilizados para la modificación de los lípidos. De estos biocatalizadores, las lipasas son los catalizadores más versátiles en el campo de la biotecnología de lípidos y tienen una variedad de aplicaciones industriales (Speranza y Alves, 2012).

El uso de lipasas para la incorporación de ácidos grasos deseados en las posiciones específicas del resto de glicerol o la eliminación selectiva de ácidos grasos de posiciones específicas tiene el potencial de generar una cantidad concentrada de un tipo particular de ácidos grasos. Está bien establecido que la mayoría de las lipasas, en particular las que son microbiana, muestran cierta selectividad a los ácidos grasos, catalizan reacciones en condiciones no naturales, tienen amplia especificidad de sustrato y poseen propiedades regioselectivas. (Speranza y Alves, 2012).

Las lipasas son serina hidrolasas y contienen una secuencia consenso G - X1 - S - X2 - G como fracción catalítica, donde G - glicina, S - serina, X1 - histidina y X2 - ácido glutámico o aspártico. La función biológica de la lipasa es catalizar la hidrólisis de triacilglicerol para dar ácidos grasos libres, diacilglicerol, monoacilglicerol y glicerol (Aravindan y cols., 2007).

La hidrólisis de aceites es la función natural de las lipasas. Por lo tanto, es posible utilizar lipasas para producir glicéridos especiales o ácidos grasos libres que tienen muchas aplicaciones diferentes (Speranza y Alves, 2012).

Los aceites marinos son una fuente natural de los AGPICL *n*-3 EPA y DHA, que tienen efectos promotores de la salud bien documentados. Por lo que es de utilidad la concentración de EPA y DHA. Esto se puede lograr mediante la utilización de lipasas con una pronunciada selectividad al ácido graso (Lyberg y Adlercreutz, 2008).

En una reacción adecuada, otros ácidos grasos se pueden transformar, por ejemplo, a hidrolizados de un triglicérido (TAG), dejando DHA y EPA en el sustrato restante. El concentrado de EPA y/o DHA se puede conseguir después de la separación de los productos de reacción y sustrato restante. Es particularmente ventajoso el uso de enzimas que operan bajo condiciones de reacción suaves al manipular AGPICL *n*-3 como EPA y DHA debido a su sensibilidad a la oxidación (Lyberg y Adlercreutz, 2008).

Dos lipasas han sido identificadas a partir del hongo filamentoso de *Candida antarctica* (o *Aphidis Pseudozyma*), generalmente se hace referencia como CalA y CalB, en donde CalA es la única lipasa con una demostrada, aunque ligera, preferencia a la posición sn-2 en la hidrólisis de los triglicéridos (Ericsson y cols., 2008). Se ha propuesto que el aumento de la especificidad posicional en sn-2 para DHA mejora la absorción y potencial metabólico (Álvarez y Akon, 2016).

CalB es una enzima que cataliza la hidrólisis de ésteres y soluciones acuosas, cuyas condiciones óptimas de funcionamiento son entre un rango de pH de 5 a 9, y entre un rango de temperatura de 30 a 60°C (Novoenzyme, 2017)

Numerosos estudios se han realizado sobre la síntesis de lípidos estructurados con altos niveles de AGPICL esterificados en la posición *sn*-2 mediante esterificación enzimática y/o reacciones de acidólisis. Iwasaki y cols (1999) informaron de la producción de altos niveles de lípidos estructurados de DHA en sn-2 vía acidólisis enzimática de aceite “*one-cell oil*” con ácido caprílico, mientras que Hamam y Shahidi obtuvieron los mismos resultados con ácido cáprico. Asimismo, Wang y cols (2015) informaron de la síntesis de nuevos lípidos estructurados con alto contenido de AGPICL en la posición sn-2 por acidólisis enzimática (Iwasaki y cols., 1999; Hamam y Shahidi, 2004; Wang y cols., 2015; Álvarez y Akon, 2016)

2.8 SISTEMAS DE FLUIDO SUPERCRÍTICO Y USO DE LIPASAS

Un Fluido Supercrítico (FSC) es aquel que al someterlo a una presión y temperatura superiores a sus valores críticos adquiere propiedades intermedias entre líquidos y gases. En el cambio de estado, pero en un punto por encima del punto crítico (PC)

no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar. El FSC de un estado de la materia en el que ésta es compresible, se comporta como un gas, llena y toma la forma de su contenedor. No obstante, tiene la densidad de un líquido (0,1-1gr/ml) y por lo tanto su poder disolvente. También puede definirse como un gas denso con poder disolvente controlable, o bien como una forma de la materia en la que los estados líquido y gaseoso son indistinguibles entre sí (Luque de Castro y cols., 1993). Estas características pueden proporcionar circunstancia apropiada para la transesterificación en términos del coeficiente de transferencia de masa (Shin y cols., 2012).

Un diagrama de fases general para una sustancia pura (Figura 1), muestra las regiones de temperatura y presión donde la sustancia existe como una fase única (sólido, líquido o gas). Estas zonas están separadas por las curvas de coexistencia de dos fases sólido-gas, sólido-líquido y líquido-gas, correspondientes a los equilibrios de sublimación, fusión y vaporización, respectivamente. Existe un punto de coexistencia de los tres estados llamado punto triple (PT). El cambio de estado se asocia a un cambio brusco de densidad y, para que se produzca, es necesario un aporte extra de energía llamado entalpía de cambio de estado. Pero por encima del PT este cambio de densidad no se produce, por tanto, se podría definir este punto como aquel por encima del cual no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar; y por ende un fluido supercrítico es aquel que se encuentra por encima de dicho punto (Mendiola, 2008).

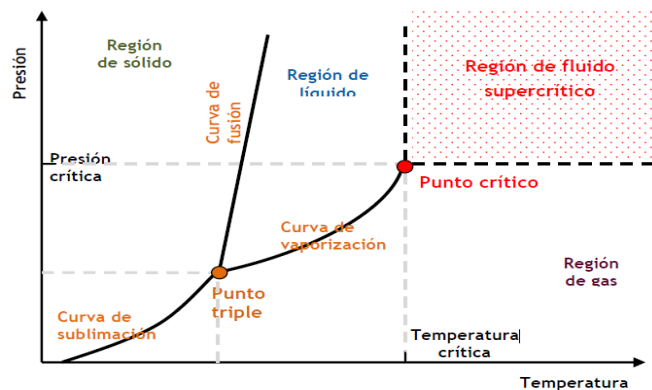


Figura 1. Esquema representativo del diagrama de presión-temperatura de los estados de la materia, correspondiente a una sustancia pura.

Wimmer y Zarevúck en 2010 indicaron que un sistema de CO₂ supercrítico como medio de reacción es efectivo para las reacciones enzimáticas, debido a que no alteran la funcionalidad de la enzima al poder trabajar bajo condiciones convencionales, es de fácil separación post-reacción de producto-medio de reacción, económico, sostenible y ecológico al poder reutilizar el CO₂ luego de su re-presurización (Wimmer y Zarevúck, 2010).

2.9 SISTEMA DE ANÁLISIS TÉRMICO

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una herramienta fundamental en el análisis térmico. Puede ser utilizado en muchas industrias, como por ejemplo en productos farmacéuticos, polímeros, nanomateriales y productos alimenticios. La información que estos instrumentos generan se utiliza para comprender el comportamiento amorfo y cristalino, polimorfo y transiciones eutécticas (PerkinElmer, 2010).

El DSC, es una técnica de análisis térmico que analiza cómo la capacidad de calor de un material (C_p) se cambia por la temperatura. Una muestra de masa conocida es calentada o enfriada y los cambios en su C_p se analizan como los cambios en el flujo de calor. Esto permite la detección de las transiciones tales como masas fundidas de vidrio, transiciones, cambios de fase (PerkinElmer, 2010).

La mayor ventaja de DSC es la facilidad y velocidad con la que se puede utilizar para ver las transiciones en los materiales (PerkinElmer, 2010).

Los análisis térmicos han sido por largo tiempo una de las técnicas analíticas disponibles para las investigaciones en aceites y grasas. De todos los métodos de análisis, el DSC es la más versátil en rango de aplicaciones. Las medidas del calorímetro de flujos de calor endotérmicos o exotérmicos de una muestra entregan cambios de fase, así como también capacidades caloríficas de las muestras (Tan y Che Man, 2002).

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando

es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas (Suriñach y *cols.*, 1992).

Como en el DSC, la muestra y la referencia se calientan independientemente, se puede medir directamente la diferencia en flujo de calor para mantener una temperatura igual en ambas. Así, los datos se obtienen en forma de entradas diferenciales de calor (dH/dt) en función de la temperatura. Con estos datos se pueden obtener temperaturas y entalpías de transición o de reacción (Lund, 1983; Sandoval y *cols.*, 2004).

El equipo DSC es fácil de operar y en la mayoría de los casos no se requiere ninguna preparación especial de la muestra. Con DSC una amplia gama de muestras de alimentos disponibles pueden ser estudiadas, tanto líquidos como sólidos. Estas pruebas pueden utilizarse tanto para fines de investigación y desarrollo del control de calidad, como para la solución de problemas y desarrollo de nuevos productos (Heussen, 2001).

2.10 METODOLOGÍA SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM)

Metodología de superficie de respuesta (RSM) es una herramienta matemática, la cual puede ayudar a lograr condiciones óptimas de reacción con un número mínimo de experimentos, obteniendo resultados estadísticamente aceptables. RSM permite una evaluación de los efectos de los múltiples parámetros, solos o en combinación, sobre las variables de respuesta y también predice su comportamiento bajo la gama de condiciones dadas (Shekarchizadeh y *cols.*, 2009).

2.11 HELADO Y ENRIQUECIMIENTO

No se sabe con certeza cuándo empezaron a producirse los helados, pero probablemente tiene su origen en China. A partir de escritos muy antiguos se ha conocido que a los chinos les gustaba un producto congelado hecho como mezcla de zumos de fruta y nieve, que actualmente nosotros llamamos helados de agua. Después de desaparecer durante siglos, los helados de crema reaparecieron en

Italia, según distintas formas, en la Edad Media, muy probablemente como resultado del regreso de Marco Polo a Italia en 1295 (Tetra Pack, 1996).

Los helados pueden dividirse en 4 categorías principales, de acuerdo con los ingredientes utilizados.

- Helados de crema hechos exclusivamente a partir de productos lácteos.
- Helados de crema que contienen grasa de origen vegetal.
- Sorbetes hechos con zumo de frutas, grasa láctea y ácidos grasos no lácteos.
- Sorbetes de agua, hechos con agua, azúcar y concentrados de frutas.

En la actualidad, los dos primeros tipos de helado suponen el 80-90% de la producción total mundial (Tetra Pack, 1996).

Según el artículo 243, contenido en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA), helados comestibles son los productos obtenidos de una emulsión de grasa y proteínas, con la adición de otros ingredientes o, de una mezcla de agua, azúcares y otros ingredientes, que han sido tratados por congelación y mantenidos en este estado. Los ingredientes de leches que se empleen en los helados y sus mezclas deberán haber sido pasteurizados o sometidos a un tratamiento térmico equivalente comprobado por la ausencia de fosfatasa según el artículo 244 del RSA (RSA, 2015).

Por otro lado, según el artículo 246 del RSA, no se exigirá una nueva pasteurización para los helados comestibles fabricados con ingredientes concentrados o en polvo mediante la adición exclusiva de agua potable, leches pasteurizadas y aromatizantes, que hayan sido congelados en el plazo de una hora después de la adición de tales sustancias (RSA, 2015).

El rubro factura 700 millones de dólares anual en el país, aumentando su consumo en verano hasta en un 50%. El consumo se incrementó hasta alcanzar 8.2 litros por persona. Esto deja en evidencia cómo la industria de las heladerías continúa en expansión en el país, pese a que actualmente los chilenos ya consumen 145,2 millones de litros de helado al año (Euromonitor Internacional, 2015; Castro, 2016).

Para lograr la elaboración de un producto enriquecido con *omega-3*, específicamente con triacilglicéridos estructurados que contengan EPA y DHA, es necesario cumplir con ciertas especificaciones. Según el RSA el uso de descriptores para EPA/DHA/*omega-3*, como “ENRIQUECIDO” o “FORTIFICADO”, sólo podrá usarse si el alimento ha sido modificado, agregando un mínimo de 100 mg de EPA ó 100 mg de DHA ó 100 mg de EPA y DHA, por porción de consumo habitual. Además, no se deberá sobrepasar la cantidad de 2 g de EPA ó 2 g de DHA ó 2 g de EPA y DHA, por porción de consumo habitual. En el caso de los productos alimentarios que tengan límites específicos de adición de estos nutrientes, estos alimentos deberán dar cumplimiento a sus límites específicos establecidos en cada caso (RSA, 2015).

Estudios de enriquecimiento de leche fluida con una emulsión de aceites de pescado, borraja y linaza demostraron que la leche de bovino es un vehículo óptimo para las grasas, ya que presenta una gran superficie de absorción al tener los glóbulos de grasa láctea un diámetro de 1 a 3 mm (Lopez-Huerta, 2010). Es por esto, que se elige como carrier la crema de leche para la elaboración de helado con base láctea. Además de incorporar EPA y DHA en alimentos de consumo humano y en formulaciones para infantes, se han añadido a alimentos de mascota, y también se ha complementado en la alimentación de animales de consumo para incorporarlos en productos lácteos y cárnicos (Ganesan y cols., 2014).

En la presente memoria se pretende la obtención de una matriz de crema de helado enriquecida con triacilglicéridos estructurados de EPA, DHA y ácido caprílico, obtenidos a partir de acidólisis enzimática entre concentrado AGPICL *n-3*/aceite refinado comercial de salmónidos, bajo condiciones de fluido supercrítico, mediante la optimización de las variables del proceso de homogeneización, contenido de TAGs de EPA y/o DHA y velocidad de agitación, sobre el perfil de fusión, entalpía y contenido de grasa sólida.

CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Es posible enriquecer una matriz de crema de helado con triacilglicéridos estructurados de EPA, DHA y ácido caprílico, a partir de acidólisis enzimática, bajo condiciones de CO₂ supercrítico obteniendo un helado homogeneizado con propiedades térmicas y texturales similares a control.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Enriquecer una matriz de crema de helado con triacilglicéridos estructurados de EPA, DHA y ácido caprílico, a partir de acidólisis enzimática entre concentrado AGPICL *n*-3, ácido caprílico y aceite refinado comercial de salmónidos, bajo condiciones de CO₂ supercrítico.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.3.1 Caracterizar mediante análisis químicos del aceite crudo de salmón comercial y aceite refinado de salmón.
- 3.3.2 Obtener ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega*-3 (AGPICL *n*-3) con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.
- 3.3.3 Obtener triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados, mediante la acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) en CO₂ supercrítico.
- 3.3.4 Enriquecer crema de helado, mediante la incorporación de TAGs purificados a través de la optimización de las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs EPA y/o DHA y velocidad de agitación.
- 3.3.5 Optimizar las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs EPA y/o DHA y velocidad de agitación de los diseños de helado frente al comportamiento térmico del helado control.

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 Materias primas

El estudio se realizó en aceite refinado y crudo comercial de salmónidos de la empresa Fiordo Austral S.A. (Puerto Montt, Chile). Las muestras se recibieron el año 2014 en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas en formato de bidones de 5 L y fueron almacenadas a -80°C en botellas ámbar plásticas en formato de 250 mL para facilitar su uso.

Los solventes utilizados como el etanol absoluto, *n*-hexano, sulfato de sodio anhidro, cloruro de sodio, metilato de sodio, isooctano, ácido acético glacial, *p*-anisidina, ioduro de potasio, dicromato de potasio y tiosulfato de sodio, provienen del laboratorio Merck (Santiago, Chile), al igual que la urea, reactivo utilizado en formato de cristales.

Las materias primas utilizadas en la elaboración del helado fueron leche en polvo entera instantánea marca Colun, leche entera líquida marca Colun, crema de leche marca Colun, azúcar blanca granulada marca IANSA, estabilizante carragenina y frutillas frescas de temporada.

4.1.2 Equipos

- Balanza analítica AE ADAM, modelo AFA-120LC (USA).
- Balanza Precisa AE Adam Equipment, Modelo: AQT-2600. (USA)
- Rotavapor Heidolph Tipo:VV 2000-LIFT (Alemania).
- Agitador Magnético con calefacción, Heidolph MR Hei-Standard, Alemania.
- Microprocessor PHS-3E, PH Meter., BiosLabChile.
- Gas Chromatograph, HP 5890 Series II. USA. Equipado con un detector de ionización de llama (Hewlett Packard 5890 serie II, EE.UU.)
- Columna capilar de sílica fundida SPTM – 2560 de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm grosor de película (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

- Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis Spectrometer, modelo UV3 (Cambridge, UK)
- Equipo de CO₂ supercrítico Speed SFE system model 7071 (Applied Separation)
- Differential Scanning Calorimeter. Modelo: DSC 6000, PerkinElmer. Incluye: Modelación de temperatura MT-DSC, principio de Heatflux, intracooler para DSC6000 y Computador Dell.
- Ultracongelador a -80 °C.
- Ultra Turrax IKA T18 digital
- pH-metro, modelo PHS-3E
- Rotavapor Heidolph OB 2001 VV 2011 (Alemania).

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Caracterización mediante análisis químicos del aceite crudo de salmón comercial y aceite refinado de salmón.

La Tabla 1 presenta los métodos utilizados para la caracterización química de los aceites crudo y refinado de salmón comercial.

Tabla 1. Métodos para la caracterización química de las materias primas.

Parámetro de calidad	Método
Acidez libre	AOCS Official Method Ca 5a-40, 1993
Valor de peróxidos	AOCS Official Method Cd 8b-90, 1993
Valor de <i>p</i> -anisidina	AOCS Official Method Cd 18-19, 1993
Valor de TOTOX	Wanasundara y Shahidi, 1995

4.2.2 Obtención de concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega*-3 (AGPICL *n*-3) con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón comercial, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.

La preparación del concentrado de AGPICL *n*-3 a partir de aceite crudo de salmón se realizó mediante una hidrólisis básica y posterior inclusión en cristales de urea. Luego se caracterizaron los ácidos grasos de las muestras, para lo cual se prepararon los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), los cuales fueron analizados por cromatografía de gas.

4.2.2.1 Preparación de ácidos grasos libres (AGL) a partir de aceite crudo comercial de salmónidos por proceso de saponificación.

El aceite crudo de salmón (500 g) se agregó en una mezcla previa de 150 g de KOH, 500 ml agua destilada y 500 ml de etanol 95% (475 ml etanol puro mezclados con 25 ml de agua destilada), en un matraz esmerilado de 2 L, disuelta con agitador magnético. Posteriormente la mezcla se saponificó mediante un sistema de reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno, a 60°C por 90 minutos. Se dejó enfriar paulatinamente y se agregó 250 ml de agua destilada, agitando vigorosamente la mezcla hasta formación de espuma. Acto seguido, la mezcla se traspasó a embudos de decantación para ser lavada con 2,5 L de hexano y 165 ml de etanol absoluto (divididos en 5 lavados aprox.). La fase hexánica se descartó y la fase acuosa se acidificó con HCl 6N (200 ml aprox.) hasta pH 1. Luego la mezcla obtenida se lavó con 2,5 L de hexano, descartando la fase acuosa. La fase hexánica obtenida fue filtrada con sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro en papel Whatman N° 1, luego se rotaevaporó al vacío a 40°C. Finalmente, los ácidos grasos libres obtenidos se almacenaron en el congelador a -80°C (Wanasundara y Shahidi, 1999; Galdames, 2013; Pando y cols., 2014).

4.2.2.2 Preparación del concentrado de AGPICL *n*-3 desde ácidos grasos libres (AGL) de aceite crudo comercial de salmónidos, por inclusión con urea.

Se pesaron 90 g de AGL y se mezclaron con una solución de urea en etanol al 95% (Etanol = 3,7 x urea) en un matraz Erlenmeyer. La solución se montó en un sistema con varilla de reflujo y se calentó a 60°C. Se llevó a una temperatura de -23°C por 22 h con agitación constante. Los cristales formados se separaron del líquido bajo filtración por gravedad con papel filtro tipo Whatman N° 1 y se recibió en un matraz. El filtrado se diluyó con 900 ml de agua destilada y se acidificó a pH 4,5 con solución acidificada de HCl 6N. Se realizaron 4 extracciones hexánicas en embudos de decantación, se separaron las fases y se eliminó la fase acuosa. A continuación, las fases hexánicas conseguidas en ambos lavados se filtraron con sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro en papel Whatman N° 1. El disolvente se eliminó a 40°C usando un evaporador rotatorio y con una corriente de gas nitrógeno se eliminó el solvente remanente. El concentrado de ácidos grasos poliinsaturados se almacenó a -80°C con 100 ppm de α -tocoferol hasta su análisis (Galdames, 2013; Pando y cols., 2014).

4.2.2.3 Análisis del perfil de ácidos grasos

4.2.2.3a Metilación con estándar interno

La metilación de los ácidos grasos del aceite crudo y refinado comercial de salmónidos y los ácidos grasos del concentrado AGPICL *n*-3, fue realizada con el objetivo de obtener metil ésteres que se detectan por la técnica de cromatografía de gases. Se pesaron en un matraz aforado de 50 ml, 100 mg de muestra y se les agregó 10 ml de metilato de sodio 0,2 N alcalino, más perlas de ebullición. La mezcla fue sometida a un sistema con varilla a reflujo por 10 min a 90°C aprox., luego se dejó enfriar hasta 50°C aprox. A continuación, se adicionó una gota de fenoftaleína al 1% en etanol al 95% y se agregó ácido sulfúrico al 4% en metanol hasta la completa desaparición del color rosado, más una gota en exceso para asegurar el medio ácido. Nuevamente se trabajó calentando a reflujo con varilla de vidrio por 30

min, transcurrido el tiempo se dejó enfriar y se agregaron 2,5 ml de hexano. A continuación, se adicionaron 0,5 ml de estándar interno 1,2,3-tricosanoína (triglicérido no contenido en el aceite de pescado), representando el 2,5% de la muestra como ácido graso (C23:0). Posteriormente el matraz se aforó con solución saturada de NaCl y se dejó reposar por 30 min refrigerada a 4°C. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -23°C con trazas de sulfato de sodio (Na₂SO₄) anhidro para retirar la humedad (Método IUPAC 2.301, 1987).

4.2.2.3b Caracterización mediante cromatografía de gases.

Los FAME se analizaron empleando un cromatógrafo de gas HP 5890 serie II (Palo Alto, California, USA), con detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector), sistema de inyección Split y columna capilar de sílica fundida SPTM – 2560 de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm grosor de película (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El programa utilizado fue: Temperatura del inyector y del detector 250°C, temperatura inicial del horno 100°C, a razón de 3°C/min hasta 140°C, luego se incrementó la temperatura a 170°C a razón de 0,5°C/min, finalmente se incrementó a 220°C a razón de 4°C/min y se mantuvo a 220°C durante 30 min. (Tiempo total 115,83 min.). Gas transportador hidrógeno de alta pureza (Linde, Chile), volumen de inyección 1 µl. Los FAME fueron identificados por comparación con el estándar de referencia GLC-463 (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA) y la cuantificación, se realizó de acuerdo a la norma AOCS Official Method (AOCS 2009, Ce 1j7). El software que se utilizó para el análisis de los cromatogramas fue DataApex Clarity TM (DataApex Ltd., Prague, Czech Republic).

4.2.2.3c Determinación de perfil de ácidos grasos mediante cromatografía de gases

La concentración de FAME se determinó mediante evaluación de la proporción *peaks*/área. La cuantificación de ácidos grasos se realizó de acuerdo a AOCS Official Method AOCS 2009, Ce 1j-7. Los resultados se expresaron en g/100g de ácidos grasos totales (AGT) y g/100g de muestra.

4.2.3 Obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados, mediante la acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) en CO₂ supercrítico.

La acidólisis enzimática fue realizada en un equipo de CO₂ supercrítico Spe-edTM SFE Applied Separation. En la columna reactor se depositó 10 g de muestra (mezcla concentrado AGPICL, aceite refinado comercial de salmónidos, ácido caprílico (0,05 g) y enzima, las proporciones variaron según el diseño). Posteriormente, se procedió a programar la reacción de acuerdo a la temperatura, presión y tiempo establecidos según el diseño. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -80°C para su posterior análisis.

En la Tabla 2 se aprecian los rangos y condiciones utilizadas para llevar a cabo el proceso de obtención de triacilglicéridos estructurados altos en EPA y DHA (TAGs) mediante acidólisis enzimática entre 6,25 g de AGPICL; 3,7 g aceite refinado de salmón y 0,05 g de ácido caprílico, utilizando 500 mg de lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* (CAL-B), bajo condiciones supercríticas SCCO₂, presión 200 bar y 50°C de temperatura. Los datos fueron obtenidos de trabajos anteriores de investigación Fondecyt 1120627, en donde las variables optimizadas escogidas fueron los valores medios en un tiempo de 7,5 h.

Tabla 2. Diseño compuesto central 2⁵⁻¹+ estrella de 5 factores en 28 corridas basado en MSR para la obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs) mediante acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) bajo condiciones supercríticas SCCO₂

Variables independientes	Símbolos	Rangos y niveles ⁽¹⁾					Variables TAG optimizadas
		-2	-1	0	1	2	
AGPICL: aceite refinado: ácido caprílico (%)	X ₁	0	25	50	75	100	6,25:3,7:0,05 (g/g/g)
Temperatura (°C)	X ₂	39,75	45	50,25	55,5	60,75	50
Presión presurización (bar)	X ₃	100	150	200	250	300	200
Enzima (% en base al peso del sustrato)	X ₄	0	2,5	5	7,5	10	500 (mg)

⁽¹⁾ Rangos y niveles obtenidos de Fondecyt 1120627.

4.2.3.1 Purificación de mezcla resultante para obtención de TAGs de EPA y/o DHA.

Para la separación de los productos conforme a la reacción de acidólisis (TAGs y AGL) se desarrolló el siguiente procedimiento: 1g de mezcla de la reacción final pesada en un balón de fondo plano, se le adicionó 50 mL de sol. de etanol al 95% caliente y 1 mL de sol. de fenoftaleína al 1% en etanol. Posteriormente se llevó a cabo una titulación, con bureta de 10 mL, utilizando sol. de NaOH 1N (en etanol al 50%) hasta que apareció una coloración rosada permanente. Una vez neutralizada la solución se trasvasió a un embudo de decantación de 250 mL, donde se realizaron dos lavados con 10 mL de n-hexano cada uno, adicionando 2 a 3 mL de agua destilada recuperando finalmente la fase hexánica en un matraz de corazón previamente pesado. A continuación, se realizaron 3 lavados a las fases hexánicas con 10 mL de etanol al 10% hasta la completa desaparición de jabones. Finalmente, la mezcla fue rotaevaporada y pesada para obtener el rendimiento de los TAGs por diferencia de peso (Hita y cols., 2007, Jiménez y cols., 2010).

4.2.3.2 Análisis por cromatografía de gas

Se determinó el perfil de ácidos grasos de acuerdo al punto 4.2.2.2b. Los resultados fueron expresados en g/100g AGT.

4.2.4. Enriquecimiento de crema de helado, mediante la incorporación de TAGs purificados a través de la optimización de las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs de EPA y/o DHA y velocidad de agitación.

4.2.4.1 Diseño experimental

Se desarrolló un diseño factorial 2^2 , el cual se compone de 2 factores (contenido de TAGs de EPA y/o DHA (mg/porción) y velocidad de agitación (rpm)) con 6 corridas

experimentales en total, dentro de las cuales 2 repeticiones corresponden a punto central, lo que permite estimar el error experimental, basado en la metodología superficie de respuesta (MSR).

Se determinó el efecto de las siguientes variables independientes sobre el proceso de enriquecimiento de la matriz: Contenido de TAGs de EPA y/o DHA de 100 a 250 mg y velocidad de agitación de 3000 a 15000 rpm (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño factorial 2² con 2 repeticiones en el punto central (0,0) del proceso de homogeneización de la crema de helado con TAGs purificados con alto contenido de EPA y/o DHA.

Diseño	Velocidad de agitación (rpm)	Contenido de TAGs EPA y/o DHA (mg)
H1	3000	100
H2	3000	250
H3	15000	100
H4	15000	250
H5	9000	175
H6	9000	175

La Tabla 3, indica las diferentes formulaciones realizadas en el programa Statgraphic Centurion XVI, cuya variable velocidad de agitación mínima fue de 3000 rpm y la máxima de 15000 rpm, mientras que para la variable de contenido de TAGs de EPA y/o DHA su mínimo fue de 100 mg por porción y su máximo fue de 250 mg por porción. El valor medio de las variables fue de 9000 rpm y 175 mg de TAGs de EPA y/o DHA por porción, está dado por los dos puntos centrales correspondientes a los diseños 5 y 6.

Investigaciones de emulsiones alimentarias de los autores Ruiz-Márquez y cols. (2010) se consideraron para la elección de las variables de velocidad y tiempo de agitación, en el estudio de emulsión aceite en agua estabilizadas con proteínas de atún, utilizaron un tiempo total de emulsificación de 5 min, en un emulsificador tipo rotor-estator, IKA T-50 y tres velocidades de agitación: 7600, 6400 y 5200 rpm. Las revoluciones por minuto del diseño se consideraron a partir de la investigación acerca de emulsiones preparadas a partir de leche de soya reconstituida y una

mezcla de aceite de girasol refinado-grasa láctea de alto punto de fusión, en donde la homogeneización se llevó a cabo empleando un equipo Ultra turrax T-25 a 20000 rpm durante 3 min (Márquez y cols., 2005).

4.2.4.2 Obtención modelo matemático según la metodología de superficie de respuesta (MSR).

A partir de la Metodología Superficie de Respuesta (MSR) se obtuvo un modelo matemático, a través del cual se predijo el efecto de las variables independientes fijadas. Se tomó un modelo de regresión polinómico para pronosticar la variable respuesta

$$Y = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \beta_{12}\chi_1\chi_2$$

Donde Y es la respuesta estimada para el modelo de primer orden. β_0 , β_1 , β_2 y β_{12} que representan los coeficientes de regresión de intercepto, lineal y de interacción, respectivamente, χ_1 y χ_2 son los efectos principales de las variables independientes y $\chi_1\chi_2$ es la interacción entre ambas variables. Los coeficientes de regresión se obtuvieron mediante análisis de regresión múltiple considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$. Se realizó un ANOVA de los parámetros de regresión y del modelo ajustado con un nivel de significancia de ($p < 0,05$). Se utilizó el programa estadístico Stagraphic Centurion XVI Versión 16.1.11.

4.2.5. Estudio de la influencia de las variables del proceso de homogeneización del helado enriquecido con TAGs de EPA y/o DHA frente al comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido

4.2.5.1 Obtención de la formulación de helado.

El helado se elaboró según lo indicado en el Manual de Industrial Lácteas (Manual Industrial Lácteas, 1996), el cual menciona las características que deben tener los tipos de helado (Tabla 4). De esta manera, para un helado de crema, es necesario

que contenga 10% de grasa, 11% de sólidos no grasos, 14% de azúcar, 0,4% de emulsionante y 64,6% de agua.

Tabla 4. Componentes característicos para postres helados, helados de crema, leche helada, sorbete y helado de agua.

Tipo de Helado	Grasa %p/p	SLNG %p/p	Azúcar %p/p	E/E %p/p	Agua %p/p
Postre Helado	15	10	15	0,3	59,7
Helado de Crema	10	11	14	0,4	64,6
Leche Helada	4	12	13	0,6	70,4
Sorbete	2	4	22	0,4	71,6
Helado de Agua	0	0	22	0,2	77,8
Grasa	Leche, nata, mantequilla o grasa vegetal				
Agua	Puede incluir sustancias colorantes y aromas				
SLNG	Sólidos lácteos no grasos (proteínas, sales, lactosa)				
Azúcar	Sacarosa sólida o líquida del 10% del azúcar puede ser glucosa o edulcorantes no azucarados				
E/E	Emulsionantes y estabilizantes, ej. monoglicéridos, gelatina, alginatos				
Overrun	Cantidad de aire en el producto				
*Fuente: Manual Industrial Lácteas, 1996					

Las formulaciones de helado se elaboraron con leche en polvo (72,32 g), leche líquida (573,55 g), azúcar (140 g), estabilizante (4 g), 35% de frutillas frescas y 210,13 g de crema de leche la cual estaba enriquecida con distintas concentraciones de TAGs de EPA y/o DHA según Tabla 3 (Anexo 1). Una formulación sin TAGs de EPA y/o DHA se consideró como helado control.

4.2.5.2 Caracterización de las formulaciones mediante perfil de fusión obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El equipo utilizado fue el sistema de análisis térmico Perkin Elmer modelo DSC 6000, con modelación de temperatura MT- DSC, principio de Heatflux. Con software Pyris para el tratamiento de los datos.

Se pesaron 5-10 mg de las muestras de aceites y se colocaron en una cápsula de aluminio y se cerró con la tapa del equipo. Ya cerrado el equipo se calentó gradualmente hasta 60°C a una velocidad de calentamiento de 5°C por min,

manteniendo por 2 min en esa temperatura. Se enfrió hasta -80°C a una velocidad de enfriamiento de 5°C por min, se mantuvo por 1 min isotérmicamente a -80°C . Luego se calentó gradualmente a una velocidad de 5°C por minuto desde -80°C a 60°C y se mantuvo isotérmicamente a 60°C por 1 min.

Los *peaks* de fusión de cada una de los diseños de helado fueron obtenidos a partir de los datos entregados por el DSC. Se realizó un barrido de la curva de fusión donde se encontraron las temperaturas correspondientes a los *peaks* más altos.

La determinación de la entalpía de la transición fue dada por el área bajo la curva dH/dt versus tiempo. La entalpía total de fusión de los componentes de la crema de helado fue entregada directamente por el DSC.

La determinación del perfil de fusión se realizó por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En primera instancia se pesó un rango entre 5-10 mg de muestra de helado y se colocó en una cápsula de aluminio. La muestra de helado se encontraba previamente congelada a -25°C .

4.2.6 Optimización del efecto de las variables de velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA, sobre el comportamiento térmico de los helados enriquecidos.

Las modificaciones de las variables de velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA, determinaron la obtención de una crema de helado estable enriquecida con TAGs estructurados de EPA y/o DHA. Para este análisis se realizó una comparación de los termogramas y sus características para cada una de las formas de obtención, considerando como perfil objetivo la muestra de helado control realizada en laboratorio.

CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización mediante análisis químicos del aceite crudo de salmón comercial y aceite refinado de salmón.

La Tabla 5 muestra la caracterización del aceite crudo de salmón y aceite refinado de salmón. En los parámetros de calidad para los aceites analizados, el aceite crudo de salmón arrojó un mayor contenido de ácidos grasos libres (AGL), mientras que el aceite refinado de salmón lo hizo para el resto de los parámetros como el valor de peróxido, valor de *p*-anisidina y valor TOTOX.

Tabla 5. Caracterización de aceites crudo y refinado de salmón.

Parámetros de calidad	Aceite crudo de salmón	Aceite refinado de salmón
Ácidos grasos libres (AGL; g ácido oleico/ 100g aceite)	2,20±0,26 ^c	0,30±0,01 ^a
Valor Peróxido (PV; meq oxígeno activo/Kg materia grasa)	2,10±0,16 ^c	5,23±0,05 ^b
Valor <i>p</i> -anisidina (AV)	5,15±0,29 ^c	6,84±0,46 ^c
Valor TOTOX (TV)	9,36±0,12 ^c	17,30±0,40 ^c

(1) Promedio valores (n=3) ± Desviación estándar

(a) Significancia ($p \leq 0,01$)

(b) Significancia ($p \leq 0,05$)

(c) No significativo

Los resultados de acidez libre e índice de peróxido para aceites de pescado coinciden con estudios realizados previamente por Méndez y cols. (2010), los cuales presentan valores de acidez libre y valores de índice de peróxidos para tres aceites de origen marino, cuyos valores máximos están en el orden de 3,04 g ácido oleico/100g aceite para el valor de acidez libre y 5,27 mEq O₂ activo/kg aceite para el índice de peróxido (Méndez y cols., 2010). Pando y cols. (2014) señalaron resultados de acidez libre y peróxidos para aceite refinado de salmón en el orden

de 0,23 g ácido oleico/100g de aceite; 3,54 mEq O₂ activo/kg aceite, respectivamente.

Los valores de peróxido se encuentran dentro de los límites establecidos por la legislación chilena en el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA, 2015) que indican que, para los aceites comestibles, en su periodo de vida útil, pueden presentar hasta 10 mEq O₂ peróxido/Kg materia grasa. Pando y cols. (2014) encontraron en aceite refinado de salmón valores promedio para *p*-anisidina de 5,14 mientras que, en este estudio, el valor obtenido en la misma muestra de aceite refinado comercial de salmónidos almacenados a -80°C por dos años fue de 6,84±0,46.

Los límites recomendados para los valores de AV y TOTOX, según la International Fish Oil Standards para consumo humano de aceites de pescado son de 15 y 19,5, respectivamente (IFOS, 2014); asimismo, los límites recomendados por Global Organization for EPA and DHA *n*-3 son de 20 y 26, respectivamente (GOED, 2012). Por consiguiente, los valores obtenidos experimentalmente para los parámetros AV y TOTOX en los aceites crudos y refinados de salmón comercial, se encuentran bajo estos límites recomendados y aptos para consumo humano.

5.2 Obtención ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega*-3 (AGPICL *n*-3) con EPA y DHA a partir de aceite crudo de salmón, mediante proceso de saponificación y posterior inclusión con urea.

El rendimiento obtenido en el proceso de saponificación e inclusión con cristales de urea fue de 95,92 ± 1,01% y 7,5 ± 0,9%, respectivamente. Resultados obtenidos por Pando y cols. (2014), indicaron un rendimiento del orden del 10% para la inclusión con urea.

Thammapat y cols. (2016) encontraron valores de rendimiento del concentrado de inclusión con urea (a -20°C y 3,87 U:AGL) cercanos al 20% del total, aumentando en 5 veces la concentración de EPA + DHA en aceite refinado de pez gato asiático (*P. bocourti*). En esta investigación el aceite crudo de salmón comercial, presentó

valores de rendimiento del concentrado de inclusión con urea de 7,5% aumentando 7 veces el contenido de EPA y/o DHA (Tabla 6).

En la Tabla 6 se observa el contenido obtenido de AGPI (g/100g AGT) del aceite crudo de salmón comercial y el concentrado AGPICL *n*-3, los cuales fueron de 38,05 y 97,45, respectivamente. Kim (2016) encontró concentraciones similares de AGPI con valores alrededor del 82% en estudios de inclusión en cristales de urea para aceite de pescado Menhaden (*Brevoortia tyrannus*). Así mismo, el contenido de EPA más DHA aumentó en el orden de 7 veces, concentrando desde 12,23 a 86,33 (g/100g AGT). Este incremento de ácidos grasos poliinsaturados en el concentrado, se debe a la eficacia de la cristalización a baja temperatura y a la formación de compuestos de inclusión de urea. Este método es de preferencia por muchos investigadores porque la formación de complejos depende de la configuración de los ácidos grasos debido a la presencia de múltiples dobles enlaces, en lugar de la separación según propiedades físicas puras, tales como punto de fusión o solubilidad (Wanasundara, 1996). Iverson y Weik (1967); Strocchi y Bonaga (1975) mostraron que esta es una técnica bien establecida para la eliminación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, ya que la eliminación de éstos ocurre en el orden de 20 veces, evidenciando un descarte correcto de la fracción no incluida en los cristales de urea.

Resultados de Haq y cols. (2016) los cuales realizaron una complejación en cristales de urea en aceite de Salmón Atlántico (*Salmo Salar*) informaron una concentración de EPA + DHA desde 6,39 a 60,63% (Haq y cols., 2016).

Tabla 6. Contenido de ácidos grasos obtenidos por cromatografía de gases en aceite crudo de salmón comercial y su respectivo concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (g/100g AGT).

Ácidos grasos	Aceite crudo de salmón comercial	Concentrado de AGPICL <i>n</i>-3
∑ EPA + DHA	12,23	86,33
∑ AGPI	38,05	97,45
∑ AGS	21,18	1,00

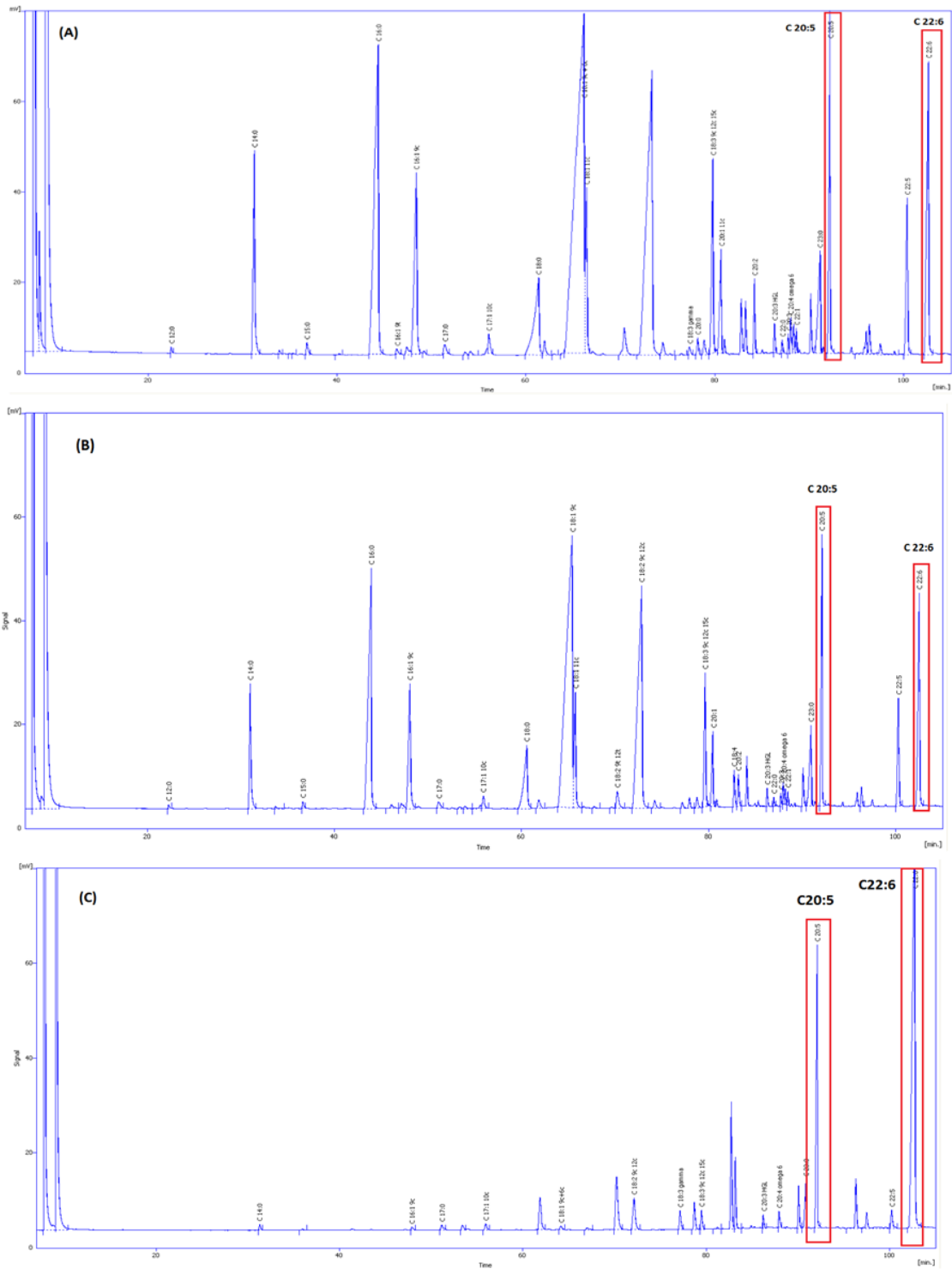


Figura 2. Cromatogramas de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) obtenidos por cromatografía de gases, A: aceite refinado de salmón, B: aceite crudo de salmón y C: concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL *n*-3) de aceite crudo de salmón.

En la Figura 2 a y b se observa los *peaks* detectados en la cromatografía de gases correspondientes a los ácidos grasos de aceites crudo y refinado de salmón comercial, donde se evidencia la similitud en cantidad de *peaks* detectados por zona, tanto para ácidos grasos saturados como para ácidos grasos poliinsaturados. Por otro lado, en la Figura 2 c la cual corresponde al concentrado de AGPICL *n*-3, se observa una disminución de *peaks* detectados en la primera zona del cromatograma, lo que indica una eficaz eliminación de ácidos grasos saturados, disminuyendo de 21,19 g/100g AGT a 1,00 g/100g AGT luego de la inclusión en cristales de urea del aceite crudo de salmón comercial (Tabla 6).

La complejación con urea bajo las condiciones de -23°C por 22 h con una agitación constante de 500 rpm, tiene una alta eficiencia ya que el ácido graso poliinsaturado DHA obtuvo un alza en su concentración de 6,27 a 66,63 g/100g AGT, al igual que el ácido graso poliinsaturado EPA, el cual aumentó de 5,95 a 19,69 g/100g AGT. Estos resultados demuestran que el EPA tiene más tendencia a formar aductos de urea que el DHA. Investigaciones realizadas por varios autores, como lo son Haagsma y *cols.* (1982) y Ratnayake y *cols.* (1988) han reportado resultados similares para los experimentos de inclusión en cristales de urea llevadas a cabo en aceites de hígado de bacalao y sardina, respectivamente.

5.3. Obtención de triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados, mediante la acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) en CO₂ supercrítico.

En la tabla 7 se observa el contenido de los ácidos grasos de los TAGs purificados formados en presencia de presión y temperatura supercrítica y su comparación con aceite crudo, refinado y concentrado.

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (AG) y ácidos grasos de aceites crudo y refinado comercial de salmónidos, Concentrado AGPI y triacilglicéridos estructurados (g/100g AGT).

N° ácido graso	Ácidos grasos o grupos de ácidos grasos		Aceite crudo de salmón	Aceite refinado de salmón	Concentrado de AGPI de aceite crudo de salmón	TAGs purificados
1	Ac. Butírico	C 4:0	0,00	0,00	0,00	0,00
2	Ac. Caproico	C 6:0	0,00	0,00	0,00	0,00
3	Ac. Caprílico	C 8:0	0,00	0,00	0,00	0,08
4	Ac. Cáprico	C 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00
5	Ac. Undecílico	C 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00
6	Ac. Láurico	C 12:0	0,07	0,09	0,00	0,07
7	Ac. Mirístico	C 14:0	3,20	4,00	0,43	3,17
8	Ac. Miristoleico	C 14:1 9c	0,00	0,00	0,00	0,00
9	Ac. Pentadecanoico	C 15:0	0,19	0,27	0,00	0,23
10	Ac. Palmítico	C 16:0	13,51	16,86	0,00	13,26
11	Ac. Palmitelaidico	C 16:1 9t	0,00	0,16	0,00	0,00
12	Ac. Palmitoleico	C 16:1 9c	4,58	5,72	0,32	4,70
13	Ac. Heptadecanoico	C 17:0	0,32	0,31	0,57	0,34
14	Ac. Heptadecaenoico	C 17:1 10c	0,52	0,55	0,80	0,66
15	Ac. Estearico	C 18:0	3,76	4,55	0,00	3,67
16	Ac. Oleico	C 18:1 9c	29,99	36,36	0,43	28,73
17	Ac. Vaccenico	C 18:1 11c	3,47	3,72	0,00	3,03
18	Ac. Linoeláidico	C 18:2 9t 12t	0,70	0,00	0,00	0,00
19	Ac. Linoleico	C 18:2 9c 12c	16,42	0,00	4,20	14,13
20	Ac. γ - Linolenico	C 18:3 6c 9c 12c	0,00	0,20	1,77	0,28
21	Ac. Eicosanoico	C 20:0	0,00	0,31	0,00	0,23
22	Ac. Linolénico	C 18:3 9c 12c 15c	3,35	3,95	1,43	3,17
23	Ac. Eicosaenoico	C 20:1 5c	1,99	0,00	0,00	0,00
24	Ac. Eicosaenoico	C 20:1 8c	0,00	0,00	0,00	0,00
25	Ac. Eicosaenoico	C 20:1 11c	0,00	2,19	0,00	1,64
26	Ac. Estearidónico	C 18:4 6c 9c 12c 15c	0,79	0,00	0,00	0,00
27	Ac. Eicosadienoico	C 20:2 11c 14c	0,72	1,03	0,00	0,76
28	Ac. Eicosatrienoico	C 20:3 8c 11c 14c	0,34	0,38	0,78	0,36
29	Ac. Docosanoico	C 22:0	0,14	0,15	0,00	0,16
30	Ac. Eicosatrienoico	C 20:3 11c 14c 17c	0,22	0,24	0,00	0,18
31	Ac. Araquidónico	C 20:4 5c 8c 11c 14c	0,38	0,56	1,09	0,51

32	Ac. Docosaenoico	C 22:1 13c	0,21	0,30	0,00	0,23
33	Ac. Eicosapentaenoico	C 20:5 5c 8c 11c 14c 17c	5,95	7,15	19,69	7,57
34	Ac. Tetracosaenoico	C 24:1 15c	0,00	0,00	0,00	0,06
35	Ac. Docosatetraenoico	C 22:4 7c 10c 13c 17c	0,00	0,00	0,00	0,19
36	Ac. Docosapentaenoico	C 22:5 7c 10c 13c 16c 19c	2,91	3,43	1,86	2,63
37	Ac. Docosahexaenoico	C 22:6 4c 7c 10c 13c 16c 19c	6,27	7,52	66,63	9,96
Σ EPA y/o DHA			12,23	14,68	86,33	17,53
Σ AGPI <i>n</i> -3			33,01	22,30	93,81	39,76
Σ AGPICL <i>n</i> -3			15,35	18,34	88,18	20,53
Σ AGS			21,19	26,54	1,00	21,21
Σ AGPI			38,05	24,46	97,45	41,67
Relación <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3			1/9	1/10	1/11	1/2

⁽¹⁾ Número de ácido graso o *peak* del cromatograma

Los cromatogramas de los TAGs purificados, obtenidos a partir del proceso de acidólisis enzimática entre concentrado de AGPI de aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón y ácido caprílico, bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico SCCO₂, muestran la clara incorporación de los ácidos grasos EPA (7,57 g/100g AGT), DHA (9,96 g/100g AGT) y ácido caprílico (0,08 g/100g AGT), logrando el objetivo planteado (AOCS, 2009).

Los ácidos grasos predominantes en el aceite crudo comercial de salmónidos se observan en la Tabla 7, los cuales fueron (g/100g AGT); C16:0 (13,51), C18:1 (29,99), C 18:2 (16,42), C20:5 (5,95), C22:5 (2,91), y C22:6 (6,27). La distribución de ácidos grasos indicó: 21,18% (saturados), 40,74% (monoinsaturados), 38,08% (poliinsaturados), siendo el 35,91% AGPI *n*-3. En cambio, los ácidos grasos predominantes en el concentrado de AGPICL de aceite crudo de salmónido fueron (g/100g AGT); C20:5 (19,69), C22:5 (1,86), y C22:6 (66,63). La distribución de ácidos grasos disminuyó a: 1,00% (saturados), 1,55% (monoinsaturados) y aumentó para los casos de ácidos grasos poliinsaturados (97,45), siendo AGPI *n*-3 de 93,81% con una concentración de EPA + DHA de 86,32%.

Estos valores son coincidentes con autores Ackman y cols (1988); Zuta y cols. (2003), los cuales obtuvieron valores de 70 – 90 g/100g de AGT para concentrados de AGPI *n*-3.

Pando y cols. (2014) caracterizó los aceites crudo y refinado de salmón además de sus respectivos concentrados, obteniendo valores de AGPI de 36,33 y 85,81 g/100g AGT para el aceite crudo y su concentrado respectivamente. Mientras que, para el aceite refinado de salmón y su concentrado los valores de AGPI fueron de 34,31 y 80,03 g/100g AGT respectivamente.

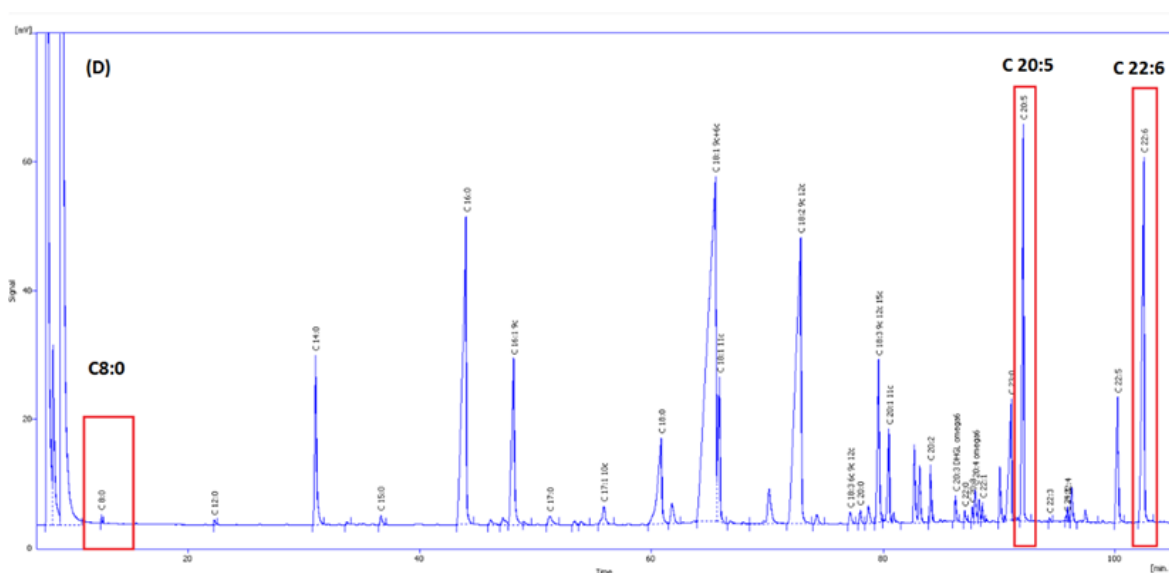


Figura 3. Perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) obtenidos por cromatografía de gases, correspondientes a triacilglicéridos estructurados (TAGs) purificados.

El cromatograma de TAGs purificado (Figura 3), obtenido a partir del proceso de acidólisis enzimática entre concentrado de AGPICL *n*-3 de aceite crudo de salmón, aceite refinado de salmón y ácido caprílico (C 8:0), bajo condiciones de presión y temperatura de dióxido de carbono supercrítico (SCCO₂), muestran la clara incorporación de los ácidos grasos EPA, DHA y ácido caprílico, logrando el objetivo planteado (AOCS, 2009). Wimmer y Zarevúcka (2010), informaron la efectividad de

las enzimas lipasas, en aceites vegetales de maravilla y grosella, bajo condiciones de CO₂ supercrítico, ya que sus condiciones críticas de temperatura no desnaturalizaron las enzimas y permitieron una fácil separación del producto en el medio de reacción (Wimmer y Zarevúcka, 2010).

5.4 Enriquecimiento de crema de helado, mediante la incorporación de TAGs purificados a través de la optimización de las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs EPA y/o DHA y velocidad de agitación.

5.4.1 Caracterización de las formulaciones enriquecidas de helado con TAGs EPA y/o DHA mediante perfil de fusión obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la Tabla 8 se observa el diseño experimental con el comportamiento de las formulaciones de helado y las muestras control (crema comercial y helado control) respecto a las temperaturas de los *peaks* de fusión correspondiente a los TAGs de EPA + DHA, los *peaks* predominantes de las muestras y el rango de fusión. Se puede apreciar que todas las formulaciones del diseño analizadas, y la formulación de TAGs EPA y/o DHA purificada presentaron *peaks* a baja temperatura (bajo los -67°C), lo cual podría indicar la presencia de TAGs compuestos principalmente de EPA y/o DHA. A excepción de la crema de helado comercial y el helado control, los cuales no visualizaron *peaks* de fusión en ese rango de temperatura. Por lo tanto, no evidenciaron la presencia de TAGs de EPA y/o DHA en la crema comercial y helado control. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores de Hernández (2015) en enriquecimiento de mantequilla con TAGs de EPA y/o DHA, quien observó *peaks* cercanos a -70°C en la curva de fusión por DSC.

Tabla 8. Comportamiento térmico del diseño factorial 2^2 con 2 repeticiones en el punto central (0,0) del proceso de homogeneización de crema de helado con triacilglicéridos estructurados con alto contenido de EPA y/o DHA (TAGs EPA y/o DHA) y ácido caprílico, helado control, crema comercial (Colun) y triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs purificados).

Diseños	Variables de proceso		Variables respuesta			
	Velocidad de agitación	Contenido TAGs EPA y/o DHA	Peaks máximos de fusión		Rango de fusión	
			TAGs EPA y/o DHA	PPF2		
Unidades	(rpm)	(mg)	(°C)		(°C)	
H1	3000	100	-78,14	-1,05	-80,16	20,01
H2	3000	250	-78,22	0,22	-80,15	19,89
H3	15000	100	-78,30	0,22	-80,15	20,21
H4	15000	250	-77,90	0,11	-79,59	20,49
H5	9000	175	-77,49	0,36	-79,73	19,37
H6	9000	175	-78,39	0,70	-80,16	19,16
Crema comercial	-	-	-	-2,31	-78,18	38,18
Helado control	-	-	-	0,73	-80,16	20,08
TAGs purificados	-	-	-67,68	-28,43	-80,22	68,07

En la Tabla 9 se indican las variaciones de entalpía total y los del *peaks* de TAGs de EPA y/o DHA, donde se visualiza que para el ΔH total no se aprecian diferencias significativas entre formulaciones. Sin embargo, se observan diferencias significativas entre las formulaciones de helado con la crema comercial y los TAGs purificados, lo cual es esperable, debido a que el helado requiere de una mayor energía (J/g) para pasar de estado sólido a líquido. Se puede observar que, para las formulaciones de los diseños, la entalpía de fusión (ΔH) se encuentra en el rango de 0,45 J/g a 4,15 J/g. En contraste a lo obtenido para los TAGs EPA y/o DHA, en los cuales se obtuvo un valor de 9,74 J/g. Esto se debe posiblemente a que en las formulaciones de los diseños, la energía para cambiar de estado de los TAGs de EPA y/o DHA, se ve afectada por los ingredientes de las formulaciones. En cuanto a las muestras de crema comercial y formulación de helado control no presentaron entalpía de fusión del *peak* de TAGs de EPA y/o DHA.

Por otro lado, el contenido de grasa sólida (CGS) a -20°C de las formulaciones fue de 85,6% a 99,4%, mientras que el CGS deseable en el helado control fue de 96,4%.

Tabla 9. Comportamiento de fusión de las muestras de helado, crema comercial (Colun), helado control y TAGs purificados.

Formulación	Variables de proceso		Variables respuesta		
	Velocidad de agitación	Contenido TAGs EPA y/o DHA	ΔH total	%CGS a -20°C	ΔH del <i>Peak</i> TAGs (EPA y/o DHA)
Unidades	(rpm)	(mg)	(J/g)	(%)	(J/g)
H1	3000	100	274,57	99,18	2,39
H2	3000	250	297,05	85,70	1,13
H3	15000	100	297,92	85,60	4,15
H4	15000	250	271,09	94,37	1,56
H5	9000	175	259,77	98,54	1,68
H6	9000	175	262,73	99,41	0,95
Crema comercial	-	-	69,09	90,76	0,00
Helado control	-	-	238,55	96,40	0,00
TAGs purificados	-	-	89,53	41,90	9,74

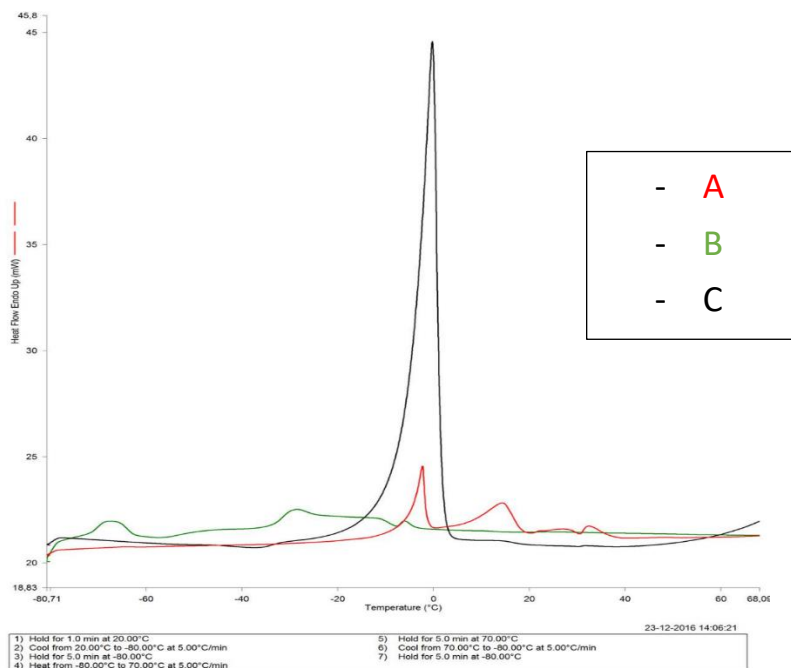


Figura 4. Perfiles de fusión obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC). A: Crema comercial (Colun); B: Triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs purificado); C: Diseño 3 de helado (15000 rpm y 100mg TAGs EPA y/o DHA).

Los ácidos grasos poliinsaturados son líquidos a temperatura ambiente debido a sus bajas temperaturas de puntos de fusión (Tetrapack, 1996). Tosltorebrov (2014) indicó que el punto de fusión de los TAGs depende de la longitud de cadena y nivel de insaturación de los ácidos grasos, por lo que un aumento en el número de doble enlaces influye significativamente ($p < 0,05$) en la temperatura de fusión del TAG por sobre la longitud de cadena.

Esto se refleja en las diferencias de *peaks* entre la curva B (triacilglicéridos estructurados purificados) y la curva A la cual corresponde a la crema comercial (Colun), que contiene bajo contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Figura 4).

Se puede deducir que el *peak* a baja temperatura (-80°C) en la Figura 4, simboliza el punto de fusión de los TAGs de AGPICL principalmente *n*-3 EPA y/o DHA, lo cual concuerda con lo detectado por autores como Rojas (2013) y Hernández (2015).

5.4.2 Caracterización de las formulaciones enriquecidas con TAGs EPA y/o DHA mediante las variables de resistencia al derretimiento y fusión en boca, obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la Figura 5 se observa el contenido de grasa sólida graficado en función de la temperatura para las seis formulaciones del diseño experimental, helado control, crema control y muestra de triacilglicérido purificado. Se pueden distinguir cinco zonas características de los helados según su rango de temperatura:

- Dureza (-80°C a -20°C)
- Resistencia al derretimiento (-2°C a 0°C)
- Sensación de frialdad en boca (0°C a 10°C)
- Fusión en boca (10°C)
- Cerosidad en boca (10°C a 20°C)

Se evidenció un perfil de comportamiento similar a las formulaciones del diseño respecto al helado control, al contrario de lo ocurrido con la curva de TAGs de EPA y/o DHA purificado, el cual presentó un menor CGS (%) en el rango entre -80°C a

-2°C debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados los cuales son líquidos a bajas temperaturas.

Dentro de las características más destacadas de los helados está la fusión en boca (estudiada a los 10°C) la cual indica el cambio de estado de los componentes del helado (cristales de hielo y grasa principalmente) al entrar en contacto con la boca. Esta característica permite la liberación y detección de aromas y sabores. Otra de las características importantes es la resistencia al derretimiento (estudiada en el rango de -20°C a 0°C), la cual indicaría el comportamiento del helado una vez que se extrae de las condiciones de almacenamiento (-18°C) y llega al consumidor.

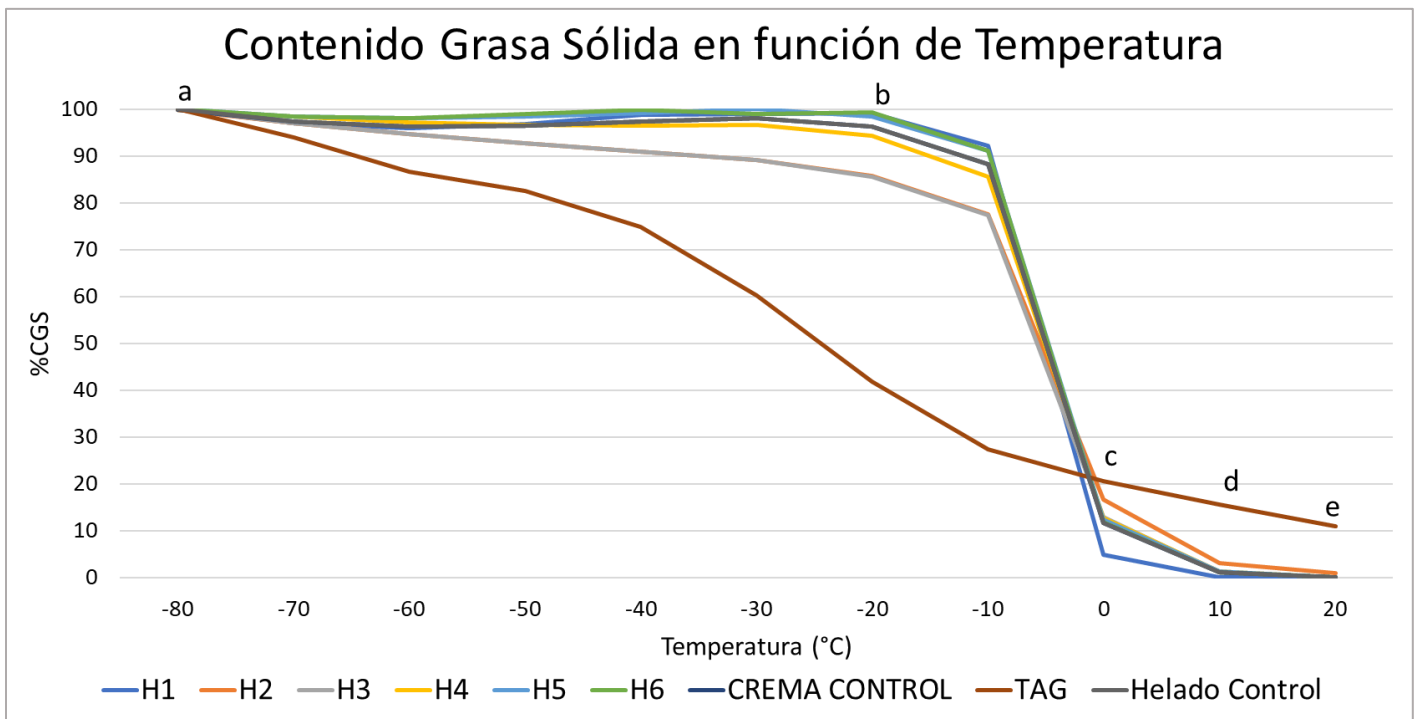


Figura 5. Contenido de grasa sólida (CGS) en función de la temperatura de las muestras enriquecidas con TAGs de EPA y/o DHA por DSC. Formulación 1-6; crema comercial; helado control y TAGs purificado. Dureza: desde a (-80°C) - b (-20°C); resistencia al derretimiento: desde b (-20°C) - c (0°C); sensación frialdad en boca: desde c (0°C) - d (10°C); fusión en boca (10°C); cerosidad en la boca: desde d (10°C) – e (20°C).

En la Figura 6a se observa el Diagrama de Pareto con las variables independientes significativas para la variable respuesta derretimiento entre los dedos. Tanto el contenido de TAGs EPA y/o DHA, la velocidad de agitación y su interacción tuvieron un efecto significativo, directamente proporcional a la respuesta de resistencia al derretimiento. Por lo que a mayor contenido de estos TAGs EPA y/o DHA, mayor es la resistencia al derretimiento (Anexo 2). Las variables significativas que afectan la resistencia al derretimiento del helado, en orden de relevancia fueron la interacción entre las variables, el contenido de TAGs de EPA y/o DHA y por último la velocidad de agitación.

El gráfico de superficie de respuesta de la Figura 6b indica el comportamiento de la resistencia al derretimiento del helado, medido en % de grasa sólida a (0°C), respecto a las variables de contenido de TAGs EPA y/o DHA (mg/porción) y la velocidad de agitación (rpm) (Tabla 10). Se observa un mayor porcentaje de CGS al aumentar el contenido de TAGs EPA y/o DHA y a bajas velocidades de agitación en la inclusión de estos TAGs en la matriz de crema de helado.

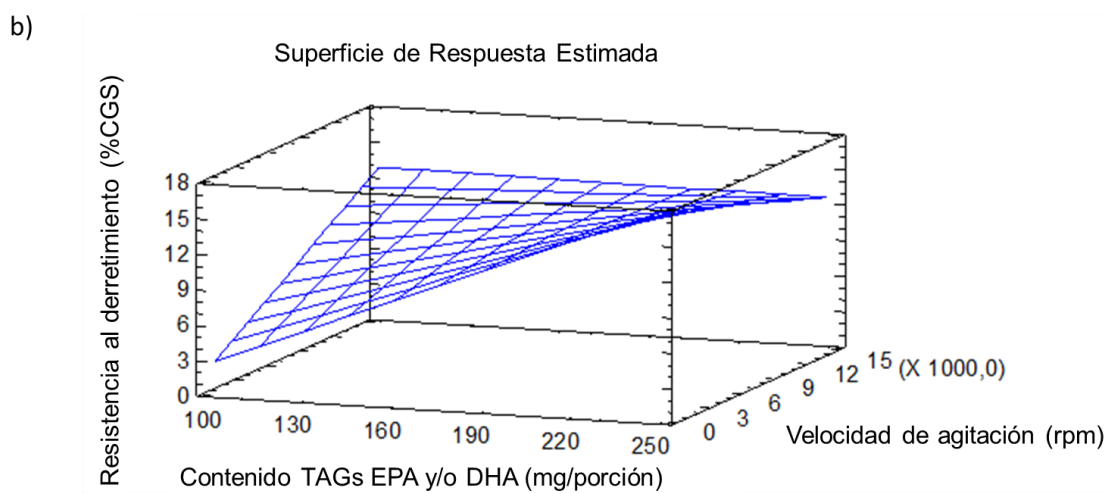
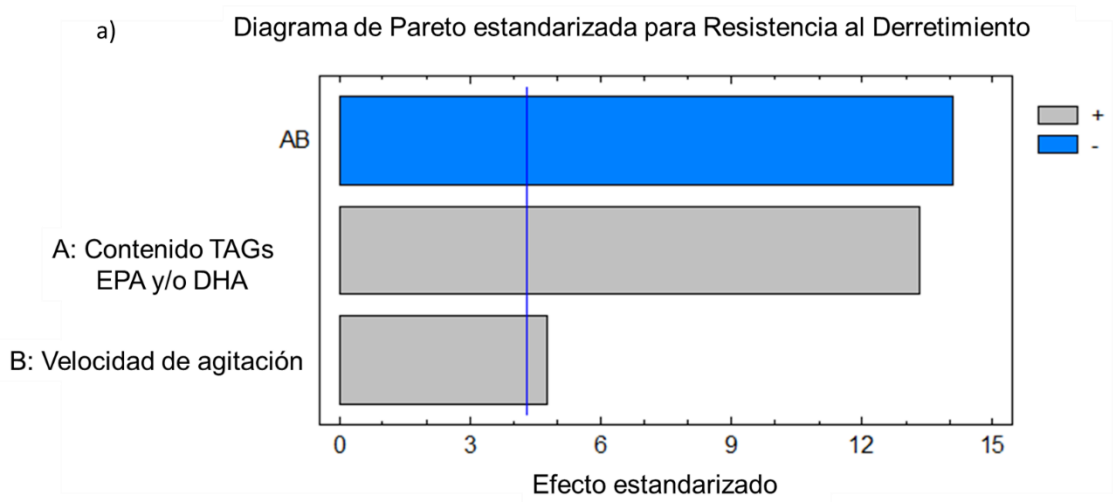


Figura 6. Gráficos de respuesta estimada de resistencia al derretimiento a (0°C) para las variables velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA a) Diagrama de Pareto; b) Superficie de respuesta.

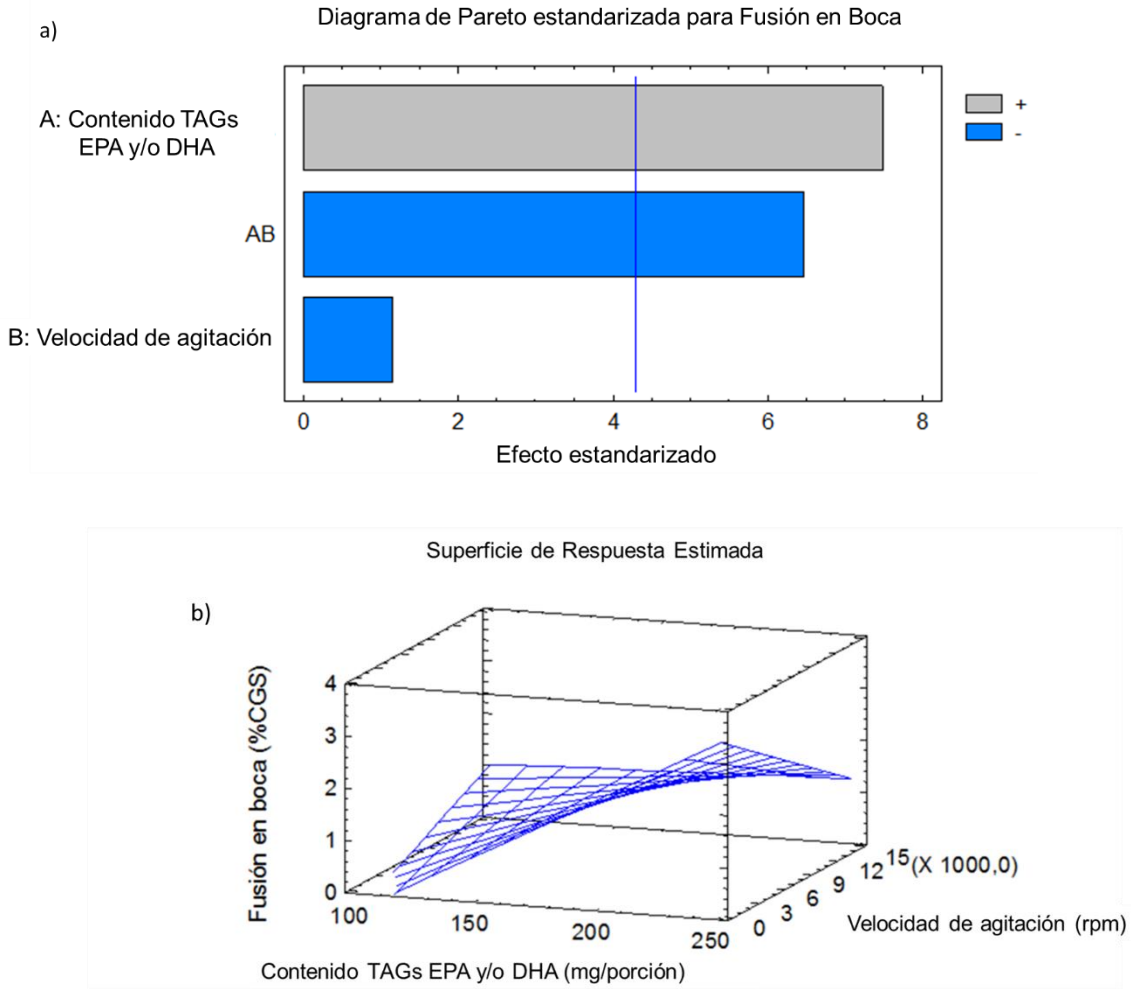


Figura 7. Gráficos de respuesta estimada de fusión en boca a (10°C) para las variables velocidad de agitación y contenido de TAGs de EPA y/o DHA a) Diagrama de Pareto; b) Superficie de respuesta.

La Figura 7a se observa el Diagrama de Pareto con las variables independientes significativas para la variable fusión en la boca a 10°C. El contenido de TAGs EPA y/o DHA afecta de manera significativa directamente proporcional a la respuesta de fusión en boca. Por lo que a mayor contenido de TAGs EPA y/o DHA, mayor es la fusión en boca de la grasa sólida (a 10°C) (Anexo 3; Tabla 10). Para el caso de la velocidad de agitación, se indica en el diagrama de Pareto que es una variable no significativa en la respuesta de fusión en boca. Para el caso de la interacción a alto contenido de TAGs EPA y/o DHA y baja velocidad de agitación, se obtiene la máxima fusión en boca.

El gráfico de superficie de respuesta de la Figura 7b indica el comportamiento de la fusión en boca, medido en % de grasa sólida a 10°C, respecto a las variables de contenido de TAGs de EPA y/o DHA (mg/porción) y la velocidad de agitación (rpm). Se observa una mayor fusión en boca al aumentar el contenido de TAGs de EPA y/o DHA, y baja velocidad de agitación.

5.5 Optimización las variables del proceso de homogeneización, concentración de TAGs EPA y/o DHA y velocidad de agitación frente al comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido.

La Tabla 10 indica los resultados obtenidos de las seis formulaciones del diseño factorial de helado enriquecido con TAGs purificados de EPA y/o DHA, helado control y los TAGs purificados de EPA y/o DHA. Al analizar la característica de dureza (-80°C), no se obtienen diferencias significativas entre las variables estudiadas, manteniéndose en el óptimo del helado control con 100% de contenido de grasa sólida (CGS). Para el caso de los diseños experimentales H1 y H2, se observa que a mayor concentración de TAGs EPA y/o DHA, manteniendo la velocidad de agitación como mínima (3000 rpm), hay un mayor CGS a mayores temperaturas (rango entre 0°C a 20°C). Lo mismo ocurre con los diseños H3 y H4, que a mayor concentración de TAGs de EPA y/o DHA, manteniendo la velocidad de agitación como máxima (15000 rpm), se obtiene un mayor CGS en el mismo intervalo de temperaturas. En la sensación de frialdad (0°C a 10°C) en la boca no se observan diferencias significativas respecto al helado control para los diseños, a excepción de H1 y H2. Esto se podría deber a que a una baja velocidad de agitación (3000 rpm) no ocurre una correcta inclusión de TAGs de EPA y/o DHA en la matriz de crema de helado, evidenciándose en éste rango de temperatura.

Tabla 10. Comportamiento térmico de porcentaje de contenido de grasa sólida (%CGS) del diseño factorial 2² con 2 repeticiones en el punto central (0,0) del proceso de homogeneización de crema de helado con triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs) de EPA y/o DHA de helado control, TAGs purificados y diseños de helado.

N°	Velocidad [rpm]	TAGs EPA y/o DHA [mg/ porción]	%CGS	%CGS	%CGS	%CGS	%CGS	%CGS
			T° -78°C	T° -20°C	T° -10°C	T° 0°C	T° 10°C	T° 20°C
H1	3000	100	100,00	99,18	92,20	4,82	0,00	0,00
H2	3000	250	99,90	85,70	77,48	16,67	3,02	0,92
H3	15000	100	100,00	85,60	77,37	12,98	1,15	0,00
H4	15000	250	99,91	94,37	85,52	12,65	1,37	0,01
H5	9000	175	99,98	98,54	91,09	12,46	1,25	0,00
H6	9000	175	99,98	99,41	91,06	11,84	1,05	0,00
Helado Control			100,00	96,40	88,28	11,71	1,09	0,13
TAGs Purificado			100,00	41,90	27,29	20,66	15,59	10,99

Se optimizaron las variables de resistencia al derretimiento considerando los 0°C como temperatura característica y fusión en boca a los 10°C según indica curva de DSC. Esta optimización se realizó considerando como objetivo los valores obtenidos del helado control realizado experimentalmente en el laboratorio.

La optimización de la resistencia al derretimiento y fusión en boca se observa en el gráfico de respuesta (Figura 8), en donde se indica que a velocidad media y contenido medio de TAGs de EPA y/o DHA maximizan la deseabilidad.

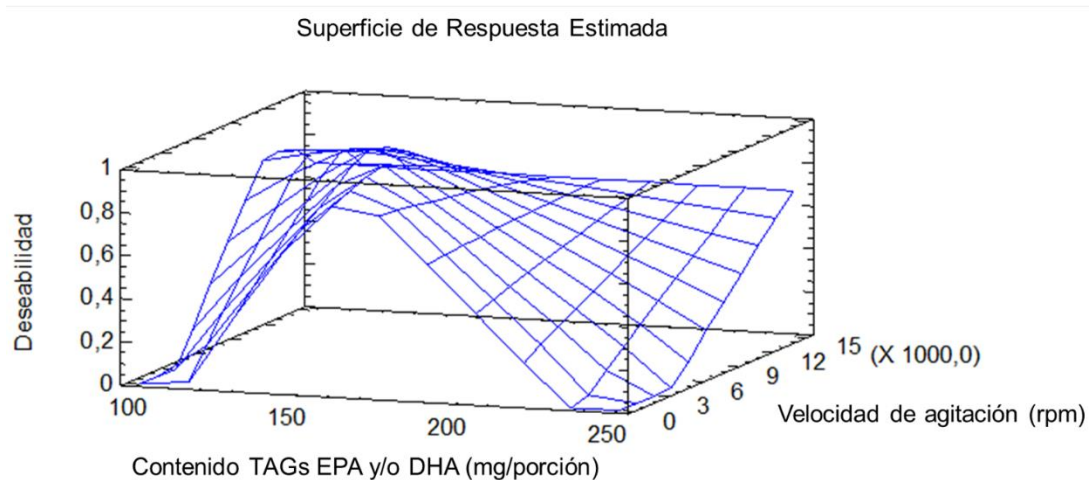


Figura 8. Superficie de respuesta estimada para optimización de deseabilidad (1,0) de las variables velocidad de agitación y contenido de triacilglicéridos estructurados purificados de EPA y/o DHA.

Las respuestas óptimas para tener una deseabilidad maximizada en la inclusión de los triacilglicéridos estructurados purificados de EPA y/o DHA en la matriz de crema de helado son 6056 rpm en velocidad de agitación y 151mg de TAGs de EPA y/o DHA por porción (Anexo 4).

Por lo tanto, es factible enriquecer una matriz de crema de helado con triacilglicéridos estructurados de EPA y/o DHA a partir de acidólisis enzimática bajo condiciones de CO₂ supercrítico, obteniendo un helado homogeneizado con propiedades térmicas y texturales similares al helado control. Para lo cual se requiere utilizar una matriz de crema de helado enriquecida con 151mg de TAGs de EPA y/o DHA por porción agregado a una velocidad de 6056 rpm. La elaboración del helado debe ser con 10% de grasa enriquecida, 11% sólidos lácteos no grasos, 14% de azúcar, 0,4% de estabilizante con un 35% de frutillas frescas, fabricados durante 45 minutos con temperaturas de -3°C a -32°C con agitación constante de 53 rpm.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Es posible el enriquecimiento de una matriz de crema de helado con triacilglicéridos estructurados de EPA, DHA y ácido caprílico, de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) de AGPICL *n*-3 y aceite refinado comercial de salmónido de manera de complementar la ingesta de pescado y a la vez de aprovechar el alto consumo de helado existente en la población nacional. A su vez, este estudio representa un acercamiento a los niveles óptimos de la relación de ácidos grasos *omega*-6 y *omega*-3, en un alimento especialmente atractivo para niños.

1. Los parámetros de la caracterización del aceite crudo y refinado comercial de salmónidos presentaron valores dentro de los rangos establecidos por el RSA (2015), GOED (2012) y IFOS (2009) para los análisis de acidez libre, índice de peróxidos, valor de *p*-anisidina y valor TOTOX.
2. Fue posible obtener un concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega*-3 (AGPICL *n*-3), a partir de aceite crudo de salmón comercial. Los AGPICL *n*-3 representaron un 88,18% de los ácidos grasos totales del concentrado. El contenido de EPA (C 20:5 *n*-3) y DHA (C 22:6 *n*-3) fue de 19,69 y 66,63 g/100 g AGT, respectivamente. Estos resultados demuestran que el EPA tiene más tendencia a formar aductos de urea que el DHA bajo las condiciones de trabajo empleadas.
3. Se logró obtener un triacilglicérido estructurado a partir de aceite de refinado de salmón comercial, ácido caprílico y concentrado AGPICL *n*-3, obtenido de aceite crudo de salmón, mediante una combinación de las variables del proceso de acidólisis enzimática: relación concentrado AGPICL *n*-3/aceite refinado de salmón/ácido caprílico (6,25/3,7/0,05; g/g/g), temperatura de reacción (50°C), presión de reacción (200 bar), tiempo de reacción (7,5 h) y concentración de enzima respecto al sustrato (5%), utilizando lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* inmovilizada bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico.
4. Se pudo observar que las variables respuesta de fusión en boca y resistencia al derretimiento se ven afectadas de manera directamente proporcional y significativamente con el factor de contenido de TAGs de EPA y/o DHA

incluido en la matriz de crema de helado. Para el caso del factor velocidad de agitación, éste sólo afectó de manera directamente proporcional la resistencia al derretimiento. Mientras que, la interacción de ambas variables independientes, contenido de TAGs de EPA y/o DHA y velocidad de agitación afectaron significativamente las variables respuesta de fusión en boca y resistencia al derretimiento.

5. La optimización del enriquecimiento de la matriz de crema de helado se obtuvo mediante las variables de contenido de TAGs purificados de EPA y/o DHA y velocidad de agitación, optimizadas respecto a la respuesta referente a fusión en boca y resistencia al derretimiento del helado control, con valores de 151 (mg/porción) y 6056 (rpm) respectivamente. Con estas características, es posible denominar al helado como enriquecido con TAGs EPA y/o DHA según Reglamento Sanitario de los Alimentos.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Ackman R., Ratnayake W., Olsson B. (1988) "The Basic Fatty Acid Composition of Atlantic Fish Oils: Potential Similarities Useful for Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids by Urea Complexation". *Journal American Oil Chemists Society* 65 (1): 136 – 138
- A.O.A.C., (1984) Official Methods of Analysis 13 th Edition, Arlingthon. Virginia, Estados Unidos.
- A.O.C.S., (1993) Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 4th edition by AOCS. Champaign. IL (USA).
- A.O.C.S., (2009) Determination of cis-, trans-, saturated, mono-unsaturated, and polyunsaturated fatty acids in extracted fats by capillary GLC. AOCS Official Method Ce 1j-7. Sampling and analysis of commercial fats and oils.
- Alabdulkarim B., Abdel Z., Arzoo S. (2012) "Role of some functional lipids in preventing diseases and promoting health" *Journal of King Saud University-Science*. 24:319-329.
- Álvarez C., Akon C. (2016) "Enzymatic Synthesis of High sn-2 DHA and ARA Modified Oils for the Formulation of Infant Formula Fat Analogues" *Journal American Oil Chemists Society* 93:383–395.
- Abdulrazaq M, Innes JK, Calder PC. (2017) "Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids on arthritic pain: A systematic review" *Nutrition* 40:57-66
- Anales científicos UNALM (2002), año centenario 1902-2002, Vol n°L. Lima, Perú.
- Aravindan R., Anbumathi P., Viruthagiri T., (2007) "Lipase applications in food industry" *Indian Journal of Biotechnology* 6:141-158.
- Bach A.C., Babyan V.K., (1982) "Medium-chain triglycerides: an update" *American Journal of Clinical Nutrition* 36:950-962.
- British Nutrition Foundation (1992) Recommendations for intakes of unsaturated fatty acids. Unsaturated Fatty Acids: Nutritional and Physiological Significance. The Report of the British Nutrition Foundation's Task Force, pp. 152–163. London: Chapman & Hall
- Castro J. (2016) "Plan de negocio: lanzamiento y comercialización Nunkkot desserts". Tesis Magister gestión para la globalización. Universidad de Chile.
- Carrero J., Martín-Bautista E., Baró L., Fonollá J., Jiménez J, Boza J., López-Huertas E. (2005) "Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta" *Nutrición Hospitalaria* 20:63-69.

- De Deckere EA, Korver O, Verschuren PM, Katan MB. (1998) "Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin". *European Journal of Clinical Nutrition*. 52:749-753.
- De Lorgeril M., Renaud S., Mamelle N., Salen P., Martin J.L., Monjaud I., Guidollet J., Touboul P., Delaye J., (1994) "Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease" *Lancet* 343:1454-1459.
- Dyll S. (2015) "Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA." *Front Aging Neurosci* 7:52.
- Dyerberg J., Madsen P., Møller J., Aardestrup I., Schmidt E. (2010) "Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations" *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 83(3):137-41
- Ericsson D., Kasrayan A., Johansson P., Bergfors T., Sandström A., Bäckvall J., Mowbray S., (2008) "X-ray Structure of Candida Antarctica Lipase A Shows a Novel Lid Structure and Likely Mode of Interfacial Activation" *Journal of Molecular Biology* 376:109-119.
- Euromonitor International (2015), "Passport: Health and Wellness in Chile",
- Euromonitor International (2015), "Passport: Ice Cream and Frozen Desserts in Chile",
- FAO (2008) "Grasa y ácidos grasos en nutrición humana, consulta de expertos" *Food and Nutrition* paper N°91.
- FAO (2010) *Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation 2010* ISBN: ISBN 978-92-5-106733-8
- FAO (2011) "Desarrollo de la acuicultura, enfoque ecosistemático a la acuicultura". Orientaciones técnicas para la pesca responsable. Cap. 5.
- FAO (2012), "Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: Consulta de Experto. Estudio FAO alimentación y nutrición 91". Edición española. Granada, España. Publicado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT).
- FAO (2013), "Papel de la acuicultura en el mejoramiento de la nutrición: oportunidad y desafíos". Comité de Pesca. San Petersburgo, Rusia.
- FAO (2015) "Nature's superfood: 10 interesting facts on fish and nutrition." Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- Fundación Chile (2015) "Alta riqueza nutricional en el mes del mar: Proteínas, omega 3, vitaminas y minerales" Alimentos y Acuicultura.

- Fundación Chile (2016) “Chile saludable: oportunidades y desafíos de innovación para el aumento del consumo de productos del mar” Volumen 5.
- Galán-Arriero I, Serrano-Muñoz D, Gómez-Soriano J, Goicoechea C, Taylor J, Velasco A, Ávila-Martín G. (2017) “The role of Omega-3 and Omega-9 fatty acids for the treatment of neuropathic pain after neurotrauma” *Biochimica and Biophysics Acta* DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.05.003
- Galdames A., (2013), “Concentración de ácidos grasos poliinsaturados n-3 por inclusión de cristales de urea a partir de *belly* de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)”. Memoria pregrado Ingeniería en Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
- Ganesan B., Brothersen C., McMahon D. (2014) “Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54(1):98-114.
- García-Ríos A., Meneses M., Pérez-Martínez P., Pérez-Jiménes F. (2009) “Omega-3 y enfermedad cardiovascular: más allá de los factores de riesgo”. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 29(1):4-16.
- García-Ríos A., Meneses M., Pérez-Martínez P., Pérez-Jiménes F. (2009) “Omega-3 y enfermedad cardiovascular: más allá de los factores de riesgo”. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 29(1):4-16.
- González P., Orellana C. (2002). “Aceite de pescado, salud y evolución humana”. *Revista Nutrición XXI*. 8:12-14.
- GOED (2012). Global Organization for EPA and DHA Omega-3. Voluntary Monograph <http://www.goedomega3.com/images/stories/files/goedmonograph.pdf>. <accessed 13022015>.
- Gordon J., James R., Tocher D., McGhee F., Dick J., Porter A., Smullen R., Sargent J. (2012) “Substituting Fish Oil with Crude Palm Oil in the Diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Muscle Fatty Acid Composition and Hepatic Fatty Acid Metabolism”. *The Journal of Nutrition* 12:222-230.
- Guil-Guerrero J., Belarbi H., (2001). “Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids” *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78:477–484.
- Gunstone, F.D. (1999) “Fatty acid structure”. *The Lipid Handbook*, pp. 1-19. Second Edition, Chapman and Hall, London, UK.
- Haagsma N., Van Gent C., Luten J., Jong R., Van Doorn E. (1982) “Preparation of an w_3 Fatty Acid Concentrate from Cod Liver Oil”. *Journal American Oil Chemistry Society* 59 (3): 117 – 118.

- Hamam F., Shahidi F. (2004) "Synthesis of structured Lipids via acidolysis of docosahexaenoic acid single cell oil (DHASCO) with capric acid". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2900–2906.
- Haq M., Getachew A., Saravana P., Cho Y., Park S., Kim M., Chun B. (2016) "Effects of process parameters on EPA and DHA concentrate production from Atlantic salmon by-product oil: Optimization and characterization" *Korean Journal of Chemical Engineering* DOI: 10.1007/s11814-016-0362-5
- Hayes, D.G., Bengtsson Y.C., Van Alstine J.M., Setterwall F., (1998) "Urea Complexation for the Rapid, Ecologically Responsible Fractionation of FA from Seed Oil", *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75:1403–1409.
- Hernández C. (2015), "Obtención de mantequilla con triacilglicéridos estructurados de alto contenido de EPA+DHA provenientes de la acidólisis (*Lipasa B, Candida antarctica*) de AGPICL *n*-3, ácido caprílico y aceite refinado de salmón en dióxido de carbono supercrítico". Memoria pregrado Ingeniería en Alimentos. Universidad de Chile, Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Heussen P. Practical Food Applications of Differential Scanning Calorimetry (DSC). Unilever Research & Development, Vlaardingen, The Netherlands. PerkinElmer, Inc. (2001).
- Hita E., Robles A., Camacho B., Ramírez A., Esteban L., Jiménez M., Muñío M., González P., Molina E. (2007) "Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases". *Elsevier, Process Biochemistry* 42: 415–422.
- International Fish Oil Standards (IFOS) (2014) <<http://www.nutrasource.ca/ifos/>> [Consulta en línea].
- IUPAC (1987) Standard methods, 2301. Preparation of Fatty Acid Methyl Ester, in Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7th. Oxford, Blackwell.
- Iverson, J. L., & Weik, R. W. (1967). "Correlation of fatty acid structure with preferential order of urea complex formation". *Journal of the Association of Official Analytical Chemists'*, 50:111 – 118.
- Iwasaki Y., Han J., Narita M., Rosu R., Yamane T. (1999) "Enzymatic synthesis of structured lipids from single cell oil of high docosahexaenoic acid content". *Journal American Oil Chemists Society* 75:563–569
- Jiménez, M. J., Esteban, L., Robles, A., Hita, E., Gonzáles, P. A., Molina, E. (2010). "Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at position 2 as intermediates for the synthesis of human milk fat substitutes by enzymatic acidolysis". *Process Biochemistry*, 45: 407-414.

- Kapoor R., Patil U.K., (2011) "Importance and production of omega-3 fatty acids from natural sources" *International Food Research Journal*. 18:495-499.
- Kim S., Kim H. (2016) "Production of Omega-3 Fatty Acid Ethyl Esters from Menhaden Oil Using *Proteus vulgaris* Lipase-Mediated One-Step transesterification and Urea Complexation" *Applied Biochemistry and Biotechnology* 179(2): 347-360.
- Kuroda T., Ohta Y., Onoe N., Tsugawa N. Shiraki M. (2017) "Intake of omega-3 fatty acids contributes to bone mineral density at the hip in a younger Japanese female population" *Osteoporosis International*. DOI: 10.1007/s00198-017-4128-7
- Liu S., Zhang C., Hong P., Ji H. (2006). "Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters" *Journal of Food Engineering* 73:203–209.
- López-Huertas E. (2010). "Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies" *Pharmacological Research* 61:200–207
- López-Huertas E. (2012). "The effect of EPA and DHA on metabolic syndrome patients: a systematic review of randomised controlled trials" *British Journal of Nutrition* 107: 185-194
- Lund, D.B. (1983), "Applications of Differential Scanning Calorimetry in foods". Physical properties of foods". Edit. M. Pelleg y L. Baglye. Conneticut, AVI p.125-155.
- Luque De Castro M., Valcarcel M., Tena M. (1993) "Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico". España, Reverté Cap1:47-49
- Lyberg A., Adlercreutz P. (2008) "Lipase specificity towards eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid depends on substrate structure". *Biochimica et Biophysica Acta* 1784: 343–350.
- Manual de Industrias Lácteas (1996). Tetra Pack librería S.A. España. Capítulo 19: Helados, 385-394p.
- Márquez A., Palazolo G., Wagner J. (2005) "Emulsiones tipo crema preparadas a base de leche de soja 2: Efecto de la agitación controlada sobre la reología de las cremas". *Grasas y Aceites* 56: 89-95.
- McNeish A., Cottrell G., Limbu R. (2017) "Characterisation of mechanisms of relaxation induced by omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) EPA and DHA in rat aorta and mesenteric arteries: A novel a role for IKCa and TRPV4 channels in DHA mediated relaxation" *Journal FASEB* 31:2221-2222.
- Méndez C., Masson L. y Jiménez, P. (2010). "Estabilización de aceite de pescado por medio de antioxidantes naturales" *Grasas y Aceites*, 30(3): 270 – 278.

- Mendiola, J. (2008). “Extracción de compuestos bioactivos de microalga mediante fluidos supercríticos”. Tesis (Doctor en Ciencias y Tecnología de los Alimentos) Madrid, España. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química-Física Aplicada
- Metcalf R., James M., Mantzioris E., Cleland L. (2003) “A practical approach to increasing intakes of n-3 polyunsaturated fatty acids: use of novel foods enriched with n-3 fats.” *The European Journal of Clinical Nutrition* 57(12):1605-1612.
- Mozaffarian D., Wu J. (2011) “Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events”. *Journal of the American College of Cardiology*. 58:2047-2067.
- Odepa (2013) “Sector pesquero y acuícola” [en línea] <<http://www.ecoceanos.cl/news/images/documentos/sector-pesquero-acuicola-chile-y-el-mundo-odepa.pdf>>
- Odepa (2014) “Sector pesquero: evolución de sus desembarques, uso y exportación en las últimas décadas” [en línea] <http://www.odepa.cl/wp-content/files_mf/1392915533Sectorpesca201402.pdf>
- Ostadrahimi A., Mohammad-Alizadeh S., Mirgafourvand M., Yaghoubi S., Shahrissa E., Farshbaf-Khalili A. (2016). “Effects of Fish Oil Supplementation on Gestational Diabetes Mellitus (GDM): A Systematic Review”. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 18(11). DOI: 10.5812/ircmj.24690
- Osborn, H. T., y Akoh, C. (2002) “Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications” *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 45:110-120.
- Pando M., Bravo B., Berríos M., Galdames A., Rojas C., Romero N., Camilo C., Encina C., Rivera M., Rodríguez A., Aubourg S. (2014) “Concentrating n-3 Fatty Acids from Crude and Refined Commercial Salmon Oil”. *Czech Journal. Food Sci.* Vol. 32, No. 2: 169–176p.
- Papamandjaris A., MacDougall D., Jones P., (1998) “Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: Obesity treatment implications”. *Life Sciences*. Vol. 62, No.14:1203–1215.
- PERKINELMER. Pyris stepscan software user’s guide. Thermal analysis. 2010
- Pike I., Jackson A. (2010) “Fish oil: production and use now and in the future”. *Lipid Technology*. 22:59-61.
- Ratnayake M., Gill C. (2009), “Fat and Fatty Acid Terminology, Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper”. *Annals of Nutrition and Metabolism* 55:8–43.

- Ratnayake, W.M.N., Olsson B., Matthews D., and Ackman R.G. (1988) "Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oil via Urea Complexation". *European Journal of Lipid Science and Technology* 90: 381–386
- Ramírez A. (2005) "Purificación de EPA mediante reacciones enzimáticas". Tesis Doctoral. Almería, España. Universidad de Almería. Facultad de Ciencias Experimentales.
- Reglamento Sanitario de Alimentos (2015). Decreto. Nº 977/96 (D.OF. 13.05.97). Ministerio de Salud.
- Rodríguez-Cruz M., Tovar A., Del Prado M., Torres N. (2005), "Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud". Artículo de revisión. *Revista de investigación clínica*, Vol. 57, Nº 3 457-472p.
- Rojas C., (2013), "Calorimetría diferencial de barrido en concentrados de ω 3 EPA y DHA de aceite de belly". Memoria pregrado Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Ruiz-Márquez D., Partal P., Franco J.M., Gallegos C. (2010) "Emulsiones alimentarias aceite-en-agua estabilizadas con proteínas de atún". *Grasas y Aceites* 61, 4:352-360.
- Sandoval A., Rodriguez E., Fernandez A. (2005) "Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón". *Revista Dyna de Ingeniería e Industria* 72:146
- Sáyago-Ayerdi S., Vaquero M., Schultz-Moreira A., Bastida S., Sánchez-Muniz F. (2008) "Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad". Artículo de revisión. *Nutrición Hospitalaria* 23(3):191-202p.
- Scientific Committee for Food (1993) Essential fatty acids. Reports of the Scientific Committee for Food. Series no. 31, Nutrient and Energy Intakes for the European Community, pp. 52–59. Luxembourg: Commission of the European Communities.
- Shekarchizadeh H., Kadivar M., Ghaziaskar H., Rezayat M. (2009) "Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM)". *Journal of Supercritical Fluids* 49:209-215.
- Shin S., Sim J., Kishimura H., Chun B. (2012) "Characteristics of menhaden oil ethanolysis by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18:546–550.

- Simopoulos AP, Leaf A, Salem N Jr.: “Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids”. *Am Nutr Metab* 1999, 43:127-130.
- Siriwardhana N., Kalupahana N.S., Moustaid-Moussa N. (2012) “Health benefits of *n*-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid.” *Advances in Food and Nutrition Research* 65:211-22
- Skogli H., Geoffroy D., Weiler H., Tell G., Kirmayer L., Egeland G. (2017) “Associations between omega-3 fatty acids and 25(OH)D and psychological distress among Inuit in Canada” *International Journal of Circumpolar Health* 76(1) DOI: 10.1080/22423982.2017.1302684.
- Speranza P., Alves G. (2012) “Review: Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties”. *Process Biochemistry* 47:1699–1706.
- Strocchi, A., & Bonaga, G. (1975). “Correlation between urea inclusion compounds and conformational structure of unsaturated C-18 fatty acid methyl esters.” *Chemical Physical Lipids*, 15:87–94.
- Suriñach S., Baro M., Bordas S., Clavaguera M., Clavaguera-Mora M. (1992) “Differential Scanning Calorimetry (DSC) and its application on Materials Science”. Universidad Autónoma de Barcelona. Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr. Vol.31
- Swanson D., Block R., Mousa S. (2012) “Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life” *American Society for Nutrition. Adv. Nutr.* 3: 1–7
- Thammapat P., Siriamornpun S., Raviyan P. (2016) “Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) of Asian catfish oil by urea complexation: optimization of reaction conditions”. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 38 (2), 163-170
- Tan C.P. and Che Man Y.B. (2002) “Recent developments in differential scanning calorimetry for assessing oxidative deterioration of vegetable oils”. *Food Science and Technology* 13:312-318.
- Tetra Pack. Manual de Industrias Lácteas. (1996), Tetra Pack librería S.A. España. 19:385-394.
- Tolstorebrov I., Eikevik T., Bantle M. (2014) “A DSC determination of phase transitions and liquid fraction in fish oils and mixtures of triacylglycerides”. *Food Research International* 58: 132–140.
- Valenzuela A, Sanhueza J. (2009) “Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos”. *Revista Chilena de Nutrición.* 36:246-255.

- Valenzuela A., Sanhueza J., De la Barra F. (2012) “El aceite de pescado: ayer un desecho industrial, hoy un producto de alto valor nutricional” *Revista Chilena de Nutrición*. 39:201-208.
- Valenzuela A., Sanhueza J., Nieto S. (2002) “¿Es posible mejorar la calidad nutricional de los aceites comestibles?” *Revista Chilena de Nutrición* 29 Suplemento N°1.
- Valenzuela R., Tapia G., González M., Valenzuela A. (2011). “Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas”. *Revista Chilena de Nutrición* 38:256-367.
- Valenzuela R., Bascuñan K., Valenzuela A., Chamorro R. (2009) “Ácidos grasos omega-3, enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas: un nuevo enfoque preventivo terapéutico”. *Revista Chilena de Nutrición* 36:1120-1125.
- Wanasundara U., Shahidi F. (1999) “Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions” *Food Chemistry* 65:41-49.
- Wanasundara U. (1996) “Marine oils: stabilization, structural characterization and omega-3 fatty acid concentration”. Ph.D. thesis, Memorial University of Newfoundland, Canada.
- Wanasundara U.; Shahidi F. (1995) “Storage stability of microencapsulated seal blubber oil”. *Journal of Food Lipids* 2:73-86.
- Wang J., Wang X., Zhao X., Liu X., Dong T., Wua F. (2015) “From microalgae oil to produce novel structured triacylglycerols enriched with unsaturated fatty acids”. *Bioresour Technol* 184:405–414
- Wimmer Z., Zarevúcka M. (2010) “A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxide on Enzyme Activity” *International Journal of Molecular Sciences* 11:233-253.
- Zuta C., Simpson B., Man Chan H., Phillips L. (2003) “Concentrating PUFA from Mackerel Processing Waste” *Journal American Oil Chemists Society* 80:933–936.

CAPÍTULO VIII: ANEXOS

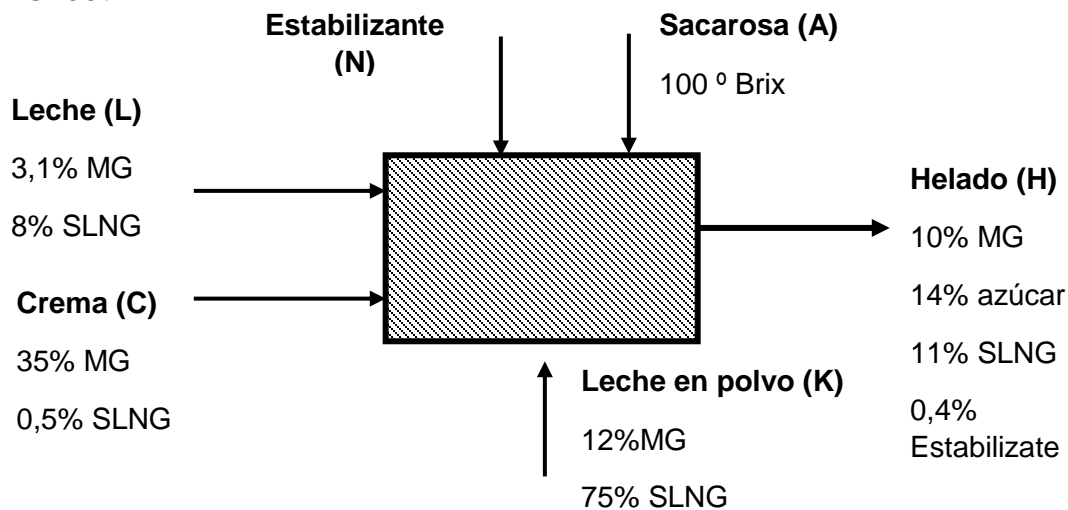
Anexo 1. Formulación de helado de crema sabor frutilla

Balance General

$$N + L + C + K + A = H$$

$$(1) \quad N + L + C + K + A = 1000$$

Flowsheet.



Balance de grasa

$$0,031L + 0,35C + 0,12K = 0,1H$$

Al estimar una cantidad a fabricar de 1000 g. de helado, se tiene que:

$$0,031L + 0,35C + 0,12K = 0,1 * 1000$$

$$(2) \quad 0,031L + 0,35C + 0,12K = 100$$

Balance de sólidos lácteos no grasos

$$0,08L + 0,05C + 0,75K = 0,11H$$

Al estimar una cantidad a fabricar de 1000 g. de helado, se tiene que:

$$0,08L + 0,05C + 0,75K = 0,11 * 1000$$

$$(3) \quad 0,08L + 0,05C + 0,75K = 110$$

Balance de sacarosa

$$A = 0,14 H$$

Al estimar una cantidad a fabricar de 1000 g de helado la cantidad de sacarosa resultó ser: $0,14 \times 1000 = 140$ gramos.

Balance del Estabilizante

$$N = 0,004 H$$

Al estimar una cantidad a fabricar de 1000 g de helado la cantidad de sacarosa resultó ser: $0,004 \times 1000 = 4$ gramos.

Por lo tanto se tiene las siguientes ecuaciones:

$$\begin{array}{l} (1) \quad N + L + C + K + A = 1000 \\ (2) \quad 0,031L + 0,35C + 0,12K = 100 \\ (3) \quad 0,08L + 0,05C + 0,75K = 110 \end{array}$$

Restando la ecuación (2) - $0,031 \times (1)$

$$-0,031L - 0,031C - 0,031K = -27$$

$$0,031L + 0,35C + 0,12K = 100$$

$$0,319C + 0,089K = 73 \quad (*)$$

Restando la ecuación (3) - $[(80/31) \times (2)]$

$$-0,08L - 0,9C - 0,31K = -258,06$$

$$0,08L + 0,05C + 0,75K = 110$$

$$-0,85C + 0,45K = -148,06 \quad (**)$$

Restando la ecuación (**) - $[(850/319) \times (*)]$

$$-0,85C - 0,273K = -194,514$$

$$+0,85C - 0,45K = +148,06$$

$$0,687K = 49,55$$

Por lo tanto los pesos requeridos de los ingredientes para obtener un helado con 10 % de materia grasa, 14% de sacarosa, y 11% de sólidos lácteos no grasos son:

Leche en polvo (K)	= 72,32g
Crema (C)	= 210,13g
Leche líquida (L)	= 573,55g
Azúcar (A)	= 140g
Estabilizante (N)	= 4g

*Además se adicionan 35% de frutilla.

Anexo 2. Análisis de varianza mediante Statgraphic Centurion XVI para las variables independientes velocidad de agitación y contenido de EPA+DHA respecto a la respuesta de resistencia al derretimiento.

Efectos estimados para Resistencia al derretimiento (%CGS)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	11,9033	0,176714	
A:Contenido EPA DHA	5,76	0,432859	1,0
B:Velocidad de agitación	2,07	0,432859	1,0
AB	-6,09	0,432859	1,0

Errores estándar basados en el error total con 2 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,0. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.

Análisis de Varianza para Resistencia al derretimiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Contenido TAGs EPA y/o DHA	33,1776	1	33,1776	177,07	0,0056
B:Velocidad de agitación	4,2849	1	4,2849	22,87	0,0411

AB	37,0881	1	37,0881	197,94	0,0050
Error total	0,374733	2	0,187367		
Total (corr.)	74,9253	5			

R-cuadrada = 99,4999 porciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98,7496 porciento
Error estándar del est. = 0,432859
Error absoluto medio = 0,185556
Estadístico Durbin-Watson = 2,25974 (P=0,7840)
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,155518

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Resistencia al derretimiento en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 3 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,4999% de la variabilidad en Resistencia al derretimiento. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 98,7496%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,432859. El error medio absoluto (MAE) de 0,185556 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Coef. de regresión para Resistencia al derretimiento

Coeficiente	Estimado
constante	-7,02667
A:Contenido TAGs EPA y/o DHA	0,0993
B:Velocidad de agitación	0,00135667
AB	-0,00000676667

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

Resistencia al derretimiento = -7,02667 + 0,0993*Contenido EPA DHA + 0,00135667*Velocidad de agitación - 0,00000676667*Contenido EPA DHA*Velocidad de agitación

en donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales. Para hacer que STATGRAPHICS evalúe esta función, seleccione

Predicciones de la lista de Opciones Tabulares. Para graficar la función, seleccione Gráficas de Respuesta de la lista de Opciones Gráficas.

Matriz de Correlación para los Efectos Estimados

		(1)	(2)	(3)	(4)
(1)	promedio	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(2)	A:Contenido TAGs EPA y/o DHA	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
(3)	B:Velocidad de agitación	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
(4)	AB	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000

El StatAdvisor

La matriz de correlación muestra el grado de confusión entre los efectos. Un diseño perfectamente ortogonal mostrará una matriz diagonal con 1's en la diagonal y 0's fuera de ella. Cualquier término distinto de cero implica que los estimados de los efectos correspondientes a esa fila y columna estarán correlacionados. En este caso, no hay correlación entre ninguno de los efectos. Esto significa que se obtendrán estimados 'limpios' para todos esos efectos.

Optimizar Respuesta

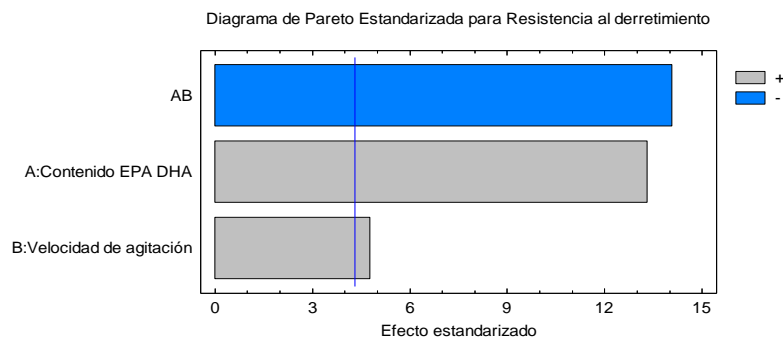
Meta: mantener Resistencia al derretimiento en 11,71

Valor óptimo = 11,71

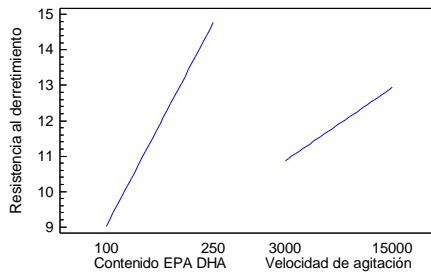
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Contenido TAGs EPA y/o DHA	100,0	250,0	169,256
Velocidad de agitación	3000,0	15000,0	9128,89

El StatAdvisor

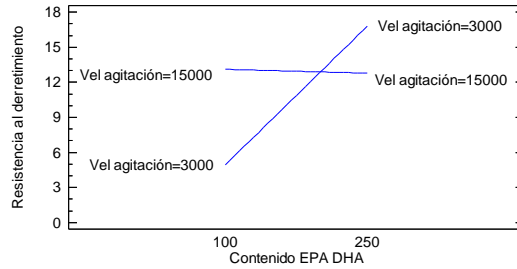
Esta tabla muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual mantiene Resistencia al derretimiento en 11,71 sobre la región indicada. Use el cuadro de diálogo de Opciones de Ventana para indicar la región sobre la cual se llevará a cabo la optimización. Puede establecer el valor de uno o más factores a una constante, estableciendo los límites alto y bajo en ese valor.



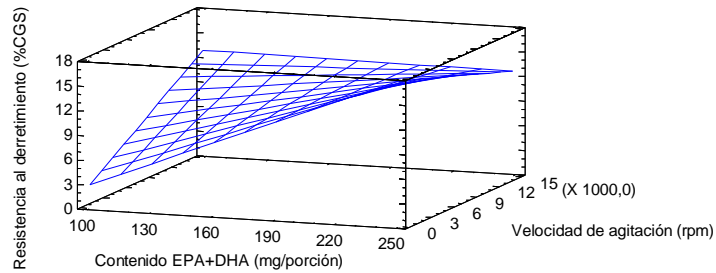
Gráfica de Efectos Principales para Resistencia al derretimiento



Gráfica de Interacción para Resistencia al derretimiento



Superficie de Respuesta Estimada



Anexo 3. Análisis de varianza mediante Statgraphic Centurion XVI para las variables independientes velocidad de agitación y contenido de EPA+DHA respecto a la respuesta de fusión en boca.

Efectos estimados para Fusión en boca (%CGS)

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	1,30667	0,0883333	
A:Contenido TAGs EPA y/o DHA	1,62	0,216372	1,0
B:Velocidad de agitación	-0,25	0,216372	1,0
AB	-1,4	0,216372	1,0

Errores estándar basados en el error total con 2 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos,

el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,0. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.

Análisis de Varianza para Fusión en boca

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Contenido TAGs EPA y/o DHA	2,6244	1	2,6244	56,06	0,0174
B:Velocidad de agitación	0,0625	1	0,0625	1,33	0,3673
AB	1,96	1	1,96	41,87	0,0231
Error total	0,0936333	2	0,0468167		
Total (corr.)	4,74053	5			

R-cuadrada = 98,0248 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 95,0621 por ciento

Error estándar del est. = 0,216372

Error absoluto medio = 0,104444

Estadístico Durbin-Watson = 0,621841 (P=0,0913)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,304527

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Fusión en boca en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 98,0248% de la variabilidad en Fusión en boca. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 95,0621%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,216372. El error medio absoluto (MAE) de 0,104444 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Coef. de regresión para Fusión en boca

Coeficiente	Estimado
constante	-2,84583
A:Contenido TAGs EPA y/o DHA	0,0248
B:Velocidad de agitación	0,000251389
AB	-0,00000155556

El StatAdvisor

Esta ventana despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos. La ecuación del modelo ajustado es

Fusión en boca = $-2,84583 + 0,0248 \cdot \text{Contenido EPA DHA} + 0,000251389 \cdot \text{Velocidad de agitación} - 0,00000155556 \cdot \text{Contenido EPA DHA} \cdot \text{Velocidad de agitación}$

en donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales. Para hacer que STATGRAPHICS evalúe esta función, seleccione Predicciones de la lista de Opciones Tabulares. Para graficar la función, seleccione Gráficas de Respuesta de la lista de Opciones Gráficas.

Matriz de Correlación para los Efectos Estimados

		(1)	(2)	(3)	(4)
(1)	promedio	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
(2)	A:Contenido TAGs EPA y/o DHA	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
(3)	B:Velocidad de agitación	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
(4)	AB	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000

El StatAdvisor

La matriz de correlación muestra el grado de confusión entre los efectos. Un diseño perfectamente ortogonal mostrará una matriz diagonal con 1's en la diagonal y 0's fuera de ella. Cualquier término distinto de cero implica que los estimados de los efectos correspondientes a esa fila y columna estarán correlacionados. En este caso, no hay correlación entre ninguno de los efectos. Esto significa que se obtendrán estimados 'limpios' para todos esos efectos.

Optimizar Respuesta

Meta: mantener Fusión en boca en 1,09

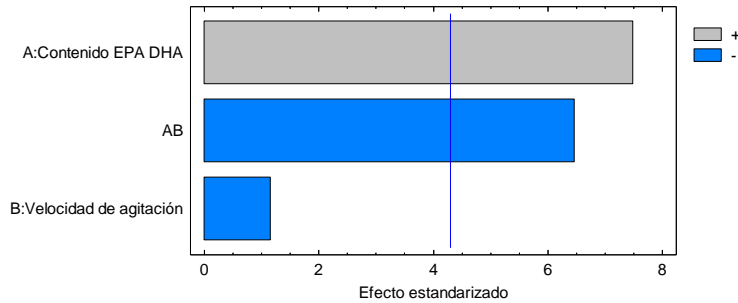
Valor óptimo = 1,09

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Contenido TAGs EPA y/o DHA	100,0	250,0	113,135
Velocidad de agitación	3000,0	15000,0	14987,7

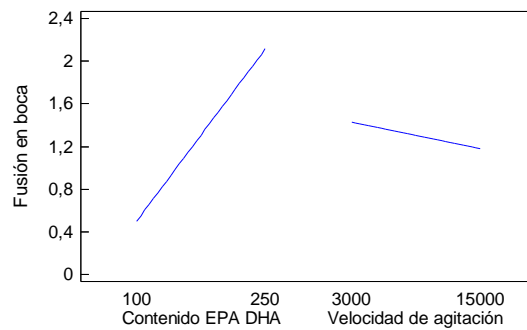
El StatAdvisor

Esta tabla muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual mantiene Fusión en boca en 1,09 sobre la región indicada. Use el cuadro de diálogo de Opciones de Ventana para indicar la región sobre la cual se llevará a cabo la optimización. Puede establecer el valor de uno o más factores a una constante, estableciendo los límites alto y bajo en ese valor.

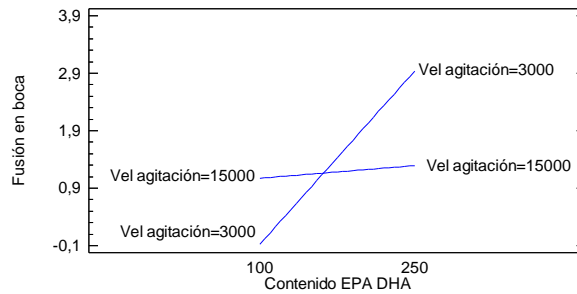
Diagrama de Pareto Estandarizada para Fusión en boca



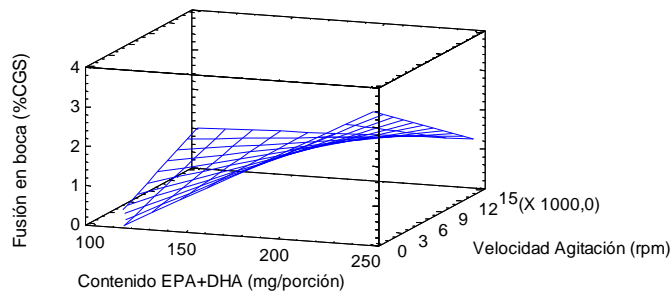
Gráfica de Efectos Principales para Fusión en boca



Gráfica de Interacción para Fusión en boca



Superficie de Respuesta Estimada



Anexo 4: Análisis de varianza mediante Statgraphic Centurion XVI para la optimización de las variables de resistencia a derretimiento y fusión en boca.

Datos/VARIABLES:

Fusión en boca (%CGS)

Resistencia al derretimiento (%CGS)

	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>Respuesta</i>	<i>Observado</i>	<i>Observado</i>
Fusión en boca	0,0	3,02
Resistencia al derretimiento	4,82	16,67

	<i>Deseabilidad</i>	<i>Deseabilidad</i>		<i>Pesos</i>	<i>Pesos</i>	
<i>Respuesta</i>	<i>Baja</i>	<i>Alta</i>	<i>Meta</i>	<i>Primero</i>	<i>Segundo</i>	<i>Impacto</i>
Fusión en boca	0,0	3,0	1,0	1,0	1,0	3,0
Resistencia al derretimiento	4,0	16,0	10,0	1,0	1,0	3,0

			<i>Deseabilidad</i>	<i>Deseabilidad</i>
<i>Fila</i>	<i>Fusión en boca</i>	<i>Resistencia al derretimiento</i>	<i>Prevista</i>	<i>Observada</i>
1	0,0	4,82	0,0	0,0
2	3,02	16,67	0,0	0,0
3	1,15	12,98	0,68226	0,682337
4	1,37	12,65	0,677755	0,674568
5	1,25	12,46	0,760319	0,718505
6	1,05	11,84	0,760319	0,822192

El StatAdvisor

Este procedimiento ayuda a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. Lo hace maximizando la función de 'deseabilidad'. Usted puede establecer varias características de la función de 'deseabilidad' a través del cuadro de diálogo de Opciones de Análisis. Las metas de cada una de las respuestas actualmente están establecidas como:

Fusión en boca - mantener en 1,0

Resistencia al derretimiento - mantener en 10,0

La salida muestra la función de 'deseabilidad' evaluada en cada punto del diseño. Entre los puntos de diseño, la 'deseabilidad' máxima se alcanza en la corrida 5. Para encontrar la combinación de factores que alcanza la 'deseabilidad' global óptima, seleccione Optimización del cuadro de diálogo de Opciones Tabulares.

Optimizar Deseabilidad

Valor óptimo = 1,0

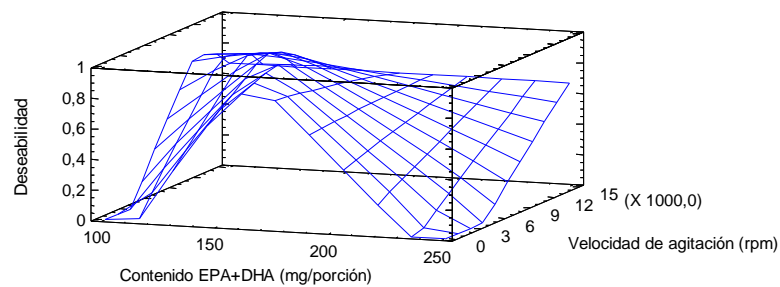
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Contenido TAGs EPA y/o DHA	100,0	250,0	151,072
Velocidad de agitación	3000,0	15000,0	6056,02

Respuesta	Óptimo
Fusión en boca	1,0
Resistencia al derretimiento	10,0

El StatAdvisor

Esta tabla muestra la combinación de niveles de factores que maximiza la función de 'deseabilidad' en la región indicada. También muestra la combinación de factores a la cual se alcanza el óptimo. Use el cuadro de diálogo de Opciones de Análisis para indicar la región sobre la cual se llevará a cabo la optimización.

Superficie de Respuesta Estimada



Contornos de la Superficie de Respuesta Estimada

