

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE ACIDÓLISIS
ENZIMÁTICA (LIPASA B. *Candida antarctica*) DE ÁCIDOS
GRASOS POLIINSATURADOS DE CADENA LARGA n-3
(EPA+DHA) BAJO CONDICIONES DE CO₂ SUPERCRÍTICO
PARA LA ADICIÓN EN PAN.***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos y Memoria para optar al Título de Ingeniero en Alimentos por:

MARLYS DAYANE MUÑOZ SANDOVAL

Director de Tesis: Dra. Alicia Rodríguez Melis
Co-director de Tesis: Dr. Santiago P. Aubourg M.

Santiago-CHILE

Enero 2019

Circulación restringida

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

MARLYS DAYANE MUÑOZ SANDOVAL

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencia de los Alimentos y Título de Ingeniera en Alimentos, en el examen público rendido el día 23 de enero de 2019.

Director de Tesis:

Dra. Alicia Rodríguez Melis _____

Co-director de Tesis:

Dr. Santiago P. Aubourg M. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

MSc. Nalda Romero _____

MSc. Rodrigo Valenzuela Báez _____

MSc. Marcela Medel Marabolí _____

La presente Tesis forma parte de:

- Programa de Estímulo a la excelencia institucional (PEEI) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. 2016-2017. "Incorporación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPÍCL n-3) eicosapentaenoico (EPA) o docosahexaenoico (DHA) en posición sn-2 del acilglicerol de lípidos estructurados mediante interesterificación enzimática"
- Proyecto Fondecyt regular: FONDECYT REGULAR 1181774. 2018-2022. "Enzymatic reactions models in supercritical media for obtaining novel structured antioxidants triacylglycerides rich in EPA-DHA as bioactive lipids. Effects on the improvement of biochemical markers associated with obesity."

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres, Juan e Isabel y a mis hermanos, Yerline y Javier, por permitir enfocarme por completo en mis estudios, por su apoyo incondicional y por siempre creer en mí. En especial, a mi madre, por su cariño, amor y comprensión en todo momento.

A mi Directora de Tesis y Profesora Patrocinante, Alicia Rodríguez, por su gran ayuda, guía y buena disposición en este proceso. Fue un agrado trabajar con usted y sentir su gran apoyo, destaco su profesionalismo y compromiso.

Finalmente, a los panelistas sensoriales, por su participación desinteresada.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE ANEXOS.....	16
ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN.....	18
ABSTRACT	20
I. INTRODUCCIÓN	22
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. ACEITE DE PESCADO	24
2.2. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (AGPI)	25
2.3. BENEFICIOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS <i>n</i> -3.	27
2.4. CONCENTRACIÓN DE AGPICL <i>n</i> -3 MEDIANTE INCLUSIÓN POR CRISTALES DE UREA.....	29
2.5. TRIACILGLICERIDOS ESTRUCTURADOS Y ACCION ENZIMATICA	30
2.6. FLUIDO SUPERCRÍTICO (FSC).....	33
2.7. ADICIÓN DE EPA+DHA A PAN.	35
III. HIPÓTESIS.....	37
IV. OBJETIVOS.....	38
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	38
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
V. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	39
5.1. MATERIALES	39
5.1.1. Materias primas	39
5.1.2. Equipos	40
5.2. METODOLOGÍA.....	41
5.2.1. Caracterización del aceite de pescado refinado comercial y aceite vegetal mediante análisis del perfil de ácidos grasos, análisis de estabilidad oxidativa y análisis térmicos.....	41
5.2.1.1 Caracterización del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gas líquido (CGL).....	41

5.2.1.1.1. Metilación de las muestras.....	41
5.2.1.1.2. Caracterización mediante cromatografía de gas, determinación del perfil y cuantificación de ácidos grasos <i>n</i> -3.....	41
5.2.1.2. Caracterización mediante análisis de estabilidad oxidativa.....	42
5.2.1.3. Caracterización mediante análisis térmicos.....	42
5.2.2. Optimización del proceso de obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados <i>n</i> -3 con EPA y DHA a partir del APR mediante saponificación y posterior inclusión con urea.....	43
5.2.2.1. Preparación de ácidos grasos libres (AGL) mediante saponificación. ...	43
5.2.2.2. Preparación del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados <i>n</i> -3 de cadena larga (CAGPICL <i>n</i> -3) (EPA y DHA) mediante inclusión por cristales de urea.....	44
5.2.2.3. Estudio del efecto de las variables independientes proporción de contenido de urea/AGL y temperatura de cristalización sobre el contenido del EPA y DHA.....	45
5.2.2.3.1. Diseño experimental	45
5.2.2.3.2. Optimización de las variables respuestas	46
5.2.2.4. Caracterización del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga <i>n</i> -3 (CAGPICLn-3) mediante análisis del perfil de ácidos grasos, análisis de estabilidad oxidativa y análisis térmicos.....	46
5.2.3. Obtención de triacilglicéridos estructurados con EPA+DHA purificados mediante la optimización de las variables de proceso de acidólisis enzimática (Lipasa B., <i>Candida antarctica</i>) bajo scCO ₂ : presión de CO ₂ supercrítico y concentración de enzima para maximizar el contenido de EPA+DHA y determinar la temperatura de deterioro oxidativo de los triacilglicéridos estructurados obtenidos.....	46
5.2.3.1. Obtención de TAGs purificados, mediante la acidólisis enzimática (<i>Candida antarctica</i>) en scCO ₂	46
5.2.3.1.1. Obtención de mezcla que contiene TAGs, mediante la acidólisis enzimática en scCO ₂	47
5.2.3.1.2. Purificación de mezcla resultante para obtención de TAGs de EPA y/o DHA.....	47
5.2.3.1.3. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)	48
5.2.3.2. Estudio del efecto de las variables independientes presión supercrítica, y concentración de enzima sobre el contenido del EPA+DHA y deterioro oxidativo.....	48
5.2.3.2.1. Diseño experimental	48

5.2.3.2.2. Optimización de las variables respuestas	48
5.2.3.3.1. Caracterización del perfil de ácidos grasos	49
5.2.3.3.2. Caracterización mediante análisis de estabilidad oxidativa	49
5.2.3.3.3. Caracterización mediante análisis térmicos.	49
5.2.4. Evaluación de las propiedades térmicas y sensoriales en un pan con adición de TAGs (EPA+DHA) purificados óptimos.....	49
5.2.4.1. Elaboración de pan.....	49
5.2.4.2.2. Elección de jueces	50
5.2.4.2.3. Entrenamiento de jueces	50
5.2.5.2.4. Validación del panel sensorial.....	52
5.2.4.2.5. Evaluación sensorial de pan amasado con TAGs de EPA+DHA con panel entrenado.....	53
5.2.4.3 Caracterización del pan mediante análisis térmico.	53
5.2.5. Análisis estadístico.	53
VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1. Caracterización del aceite de pescado refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte y aceite vegetal mediante análisis del perfil de ácidos grasos, análisis de estabilidad oxidativa y análisis térmicos.	54
6.1.1. Caracterización del perfil de ácidos grasos del APR y AV por cromatografía de gas líquido (CGL).....	54
6.1.2. Caracterización del APR y AV mediante análisis de estabilidad oxidativa. ...	58
6.1.3. Caracterización del APR y AV mediante análisis térmicos.	61
6.2.1. Estudio del efecto de las variables independientes proporción urea/AGL y temperatura de cristalización sobre el contenido de EPA y DHA.	64
6.2.2. Determinación de las condiciones de la inclusión por cristales de urea que permitan maximizar el contenido de AGPI <i>n</i> -3 (EPA y DHA) en los concentrados.69	
6.2.3. Validación de las condiciones óptimas del modelo de forma experimental..	70
6.2.4. Caracterización del concentrado de AGPICL <i>n</i> -3 óptimo (CAGPICL <i>n</i> -3) validado experimentalmente mediante CGL.....	71
6.2.5. Caracterización del CAGPICL <i>n</i> -3 mediante análisis de estabilidad oxidativa.....	74
6.2.6. Caracterización del CAGPICL <i>n</i> -3 mediante análisis térmicos.....	75

6.3. Obtención de triacilglicéridos estructurados con EPA+DHA purificados mediante la optimización de las variables de proceso de acidólisis enzimática (Lipasa B., <i>Candida antarctica</i>) bajo scCO ₂ : presión de CO ₂ supercrítico y concentración de enzima, para maximizar el contenido de EPA+DHA y determinar la temperatura de deterioro oxidativo de los triacilglicéridos estructurados obtenidos.....	78
6.3.1. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los TAGs purificados.	78
6.3.2. Estudio del efecto de las variables independientes (presión de scCO ₂ y concentración de enzima (<i>Candida antarctica</i>) sobre el contenido del EPA+DHA y el deterioro oxidativo.....	79
6.3.3. Determinación de las condiciones del proceso de acidólisis enzimática que permitan maximizar el contenido de EPA y DHA en los TAGs y determinar la máxima temperatura donde comienza el deterioro oxidativo de los TAGs.....	83
6.3.4 Validación de las condiciones óptimas del modelo de forma experimental...	85
6.3.5. Caracterización de los TAGs óptimos validados experimentalmente mediante CGL.....	85
6.3.6. Caracterización de los TAGs mediante análisis de estabilidad oxidativa.	88
6.3.7. Caracterización de los TAGs mediante análisis térmicos.	88
6.4. Evaluar las propiedades térmicas y sensoriales en un pan con adición de TAGs (EPA+DHA) purificados óptimos.	91
6.4.1. Conformación de un panel sensorial entrenado.....	91
6.4.1.1. Entrenamiento de jueces.....	91
6.4.1.2. Validación del panel sensorial	93
6.4.1.3. Evaluación sensorial de pan amasado con TAGs de EPA+DHA con panel entrenado.....	94
6.4.2. Caracterización del pan con adición de TAGs mediante análisis térmico. ...	96
VII: CONCLUSIONES	99
VIII: BIBLIOGRAFÍA.....	101
IX: ANEXOS.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diseño factorial de 2 ² para la obtención del concentrado de AGPICL <i>n</i> -3 mediante inclusión con cristales de urea, donde U:AGL: Proporción del contenido de urea/ácidos grasos libres, (g/g) TC: temperatura de cristalización (°C), t: tiempo (h), V: Velocidad de agitación (rpm).....	45
Tabla 2: Diseño factorial de 2 ² para la obtención de TAGs con EPA Y DHA bajo condiciones de scCO ₂ mediante acidólisis enzimática; donde PscCO ₂ : presión scCO ₂ expresada en bar, CE: concentración de enzima <i>Candida antarctica</i> en %, t: tiempo expresado en horas y T: temperatura en °C.....	47
Tabla 3: Ingredientes para la formulación de 1 Kg de pan amasado.....	50
Tabla 4: Muestras evaluadas desde la segunda sesión de entrenamiento del panel sensorial.....	52
Tabla 5: Composición de ácidos grasos y grupos de ácidos grasos del aceite de pescado refinado (APR) y del aceite vegetal (AV). Promedio ± desviación estándar de triplicados de la medición de AG expresados en g de AG/100g de AGT.....	57
Tabla 6: Caracterización química del aceite de pescado refinado comercial (APR) y aceite vegetal (AV). Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre muestras.....	58
Tabla 7: Caracterización química del aceite de pescado refinado y aceite de vegetal de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente: Reglamento sanitario de los Alimentos (RSA, 2015), Codex Alimentarius (CODEX, 2017), Global Organization for EPA and DHA (GOED, 2016) y European Food Safety Authority (EFSA, 2010).....	59
Tabla 8: Comportamiento térmico del aceite vegetal de maravilla (AV) aceite de pescado refinado comercial (APR).....	63

Tabla 9: Diseño experimental y valores obtenidos para las variables respuesta EPA, DHA y EPA+DHA experimentales del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga <i>n-3</i> (CAGPICL <i>n-3</i>) a partir de aceite APR. U:AGL indica la proporción urea:ácidos grasos libres expresada en g/g, TC indica la temperatura de cristalización en °C, y EPA, DHA y EPA+DHA indican los valores de dichos ácidos expresados en g/100 g AGT.....	65
Tabla 10: Análisis de varianza para las respuestas EPA, DHA y EPA+DHA del concentrado de AGPICL <i>n-3</i>	66
Tabla 11: Valores óptimos predichos de las variables de proceso U:AGL (g/g) y TC (°C) para maximizar las respuestas EPA, DHA, EPA+DHA (g/100 g de AGT) y optimización conjunta.....	69
Tabla 12: Validación experimental de la optimización de respuesta múltiple de las variables respuestas para concentrado de aceite APR.....	71
Tabla 13: Composición de AG y grupos AG del aceite de pescado refinado comercial (APR) y del concentrado AGPICL <i>n-3</i> óptimo a partir del aceite APR (CAGPICL <i>n-3</i>).....	72
Tabla 14: Caracterización química del CAGPICL <i>n-3</i> obtenido a partir de APR.....	74
Tabla 15: Caracterización química de concentrado de aceite de pescado de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente: Reglamento sanitario de los Alimentos (RSA, 2015), Codex Alimentarius (CODEX, 2017), Global Organization for EPA and DHA (GOED, 2016) y European Food Safety Authority (EFSA, 2010).....	75
Tabla 16: Comportamiento térmico del aceite de pescado refinado comercial (APR) y del concentrado AGPICL <i>n-3</i> (CAGPICL <i>n-3</i>).....	76

Tabla 17: Diseño factorial 2 ² de la acidólisis enzimática para obtener TAGs con un máximo contenido de EPA y DHA con mínimo deterioro oxidativo. PscCO ₂ es la presión scCO ₂ , expresada en bar, CE es la concentración de enzima, en % de sustrato, EPA y DHA son los contenidos en dichos ácidos, expresados en g/100 g AGT y TDO es la temperatura de deterioro oxidativo, en °C.....	80
Tabla 18: Análisis de varianza para las respuestas EPA, DHA y temperatura de deterioro de los TAGs. *Diferencias significativas P<0,05.....	81
Tabla 19: Valores óptimos predichos de las variables de proceso presión scCO ₂ (PscCO ₂) y concentración de enzima (CE) para maximizar las respuestas EPA, DHA y temperatura de deterioro oxidativo (TDO) y la optimización conjunta de estas variables.....	84
Tabla 20: Validación experimental de la optimización conjunta de las variables respuestas EPA, DHA y TDO de los TAGs.....	85
Tabla 21: Composición de AG y grupos de AG del AV, APR, CAGPICL <i>n</i> -3, TAGs no purificados (TAGs NP) y TAGs Purificados (TAGs P).....	87
Tabla 22: Contenido de EPA y DHA presentes en APR, CAGPICL y contenido de EPA y DHA aportados por la mezcla formada por 30%APR y 70%CAGPICL <i>n</i> -3 para la obtención de TAGs.....	88
Tabla 23: Caracterización química de los triacilglicéridos estructurados (TAGs).....	88
Tabla 24: Comportamiento térmico del APR, CAGPICL <i>n</i> -3 y TAGs.....	90
Tabla 25: Características principales de pan amasado obtenidas de la primera sesión de entrenamiento del panel sensorial.....	91
Tabla 26: Resultados del análisis de varianza ANOVA de 2 vías del perfil descriptivo de las muestras de pan amasado evaluadas en cada sesión de entrenamiento.....	92

Tabla 27: Parámetros de rendimiento global, mediante análisis de varianza ANOVA multifactorial del panel completo: rendimiento general del panel (Sa), homogeneidad del panel (Si) y repetitividad (Se).....	93
Tabla 28: Resultados del perfil descriptivo para pan control y pan con TAGs.....	95
Tabla 29: Comportamiento térmico del pan control y pan con TAGs (40mg de EPA+DHA).....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de un triacilglicérido. Extraído de Castillo, 2004.....	25
Figura 2: Transformación metabólica de los ácidos grasos n-6 y n-3. Extraído de Valenzuela et al., 2011.....	26
Figura 3: Grupo de reacciones de transesterificación: Acidólisis, alcoholólisis e interesterificación extraído de Shahidi, 2002	32
Figura 4: Diagrama de presión-temperatura del CO ₂ , extraído de Shahidi y Wanasundara, 1998	34
Figura 5: Cromatograma de FAME correspondiente al aceite de pescado refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte (APR).....	54
Figura 6: Cromatograma de FAME correspondiente al aceite vegetal (AV). 55	55
Figura 7: Termogramas de fusión de aceite vegetal (AV) y aceite de pescado refinado comercial (APR) donde 1: PPFB (<i>Peak</i> de punto de fusión bajo), 2 y 3: PPFM (<i>Peak</i> de punto de fusión medio), 4: PPFA (<i>Peak</i> de punto de fusión alto) y 5: PD (<i>Peak</i> de deterioro)	63
Figura 8: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el APR y AV medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.....	64
Figura 9: Diagramas de Pareto estandarizados que muestran el efecto de las variables de proceso sobre la cantidad de EPA (a), DHA (b) y EPA+DHA (c).....	67
Figura 10: Gráficos de superficie respuesta que muestran el efecto de las variables de proceso sobre la cantidad de EPA (a) DHA (b) y EPA+DHA(c) 68	68

Figura 11: (a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA+DHA. (b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.....	70
Figura 12: Cromatograma de FAME donde (a) es aceite APR y (b) es el concentrado AGPICL <i>n</i> -3 óptimo (CAGPICL <i>n</i> -3).....	73
Figura 13: Termogramas de fusión de CAGPICL <i>n</i> -3 y APR donde 1 es el PPFB (<i>Peak</i> de punto de fusión bajo), 2 y 3 son los PPFM (<i>Peaks</i> de punto de fusión medio), 4 es el PPFA (<i>Peak</i> de punto de fusión alto) y 5 es el PTDO (<i>Peak</i> de temperatura de deterioro oxidativo).....	76
Figura 14: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el APR y CAGPICL <i>n</i> -3 medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.....	77
Figura 15: TLC correspondiente a carriles 1 y 8: aceite de pescado refinado comercial (APR), carriles 2 y 7: concentrado de AGPICL <i>n</i> -3 (CAGPICL <i>n</i> -3), carriles 3 y 6: triacilglicéridos estructurados no purificados (TAGs NP), carriles 4 y 5: triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs P).....	79
Figura 16: Diagramas de Pareto estandarizados que muestran el efecto de las variables independientes sobre la cantidad de EPA (a), DHA (b) y TDO (c).....	81
Figura 17: Gráficos de superficie respuesta que muestran el efecto de las variables de proceso sobre las respuestas EPA (a) DHA (b) y TDO (c).....	82
Figura 18: (a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA, DHA y temperatura de deterioro. (b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.....	84
Figura 19: Cromatograma de FAME de TAGs P.....	86

Figura 20: Termogramas de fusión de aceite de pescado refinado (APR), concentrado AGPICL <i>n</i> -3 (CAGPICL <i>n</i> -3) y TAGs, donde 1 es el PPFB (<i>Peak</i> de punto de fusión bajo), 2 y 3 son el PPFM (<i>Peak</i> de punto de fusión medio), 4 es el PPFA (<i>Peak</i> de punto de fusión alto) y 5 es el PTDO (<i>Peak</i> de temperatura de deterioro oxidativo).....	89
Figura 21: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el APR, CAGPICL <i>n</i> -3 y TAGs medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.....	90
Figura 22: Análisis descriptivo para pan con y sin adición de TAGs (EPA+DHA)	95
Figura 23: Termogramas de fusión del pan control (en color rojo) y del pan con TAGs (en color azul), donde 1: PPFB (<i>Peak</i> de punto de fusión bajo y 4: PTDO (<i>Peak</i> de temperatura de deterioro oxidativo).....	96
Figura 24: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el pan control y el pan con adición de TAGs medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.....	97

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica del aceite refinado comercial omega-3 para alimentos funcionales línea oleosa (APR) de la empresa Spes.....	114
Anexo 2: Información nutricional del aceite refinado comercial omega-3 para alimentos funcionales línea oleosa (APR) de la empresa Spes, extraída de la ficha técnica.....	115
Anexo 3: Ficha de descripción de pan amasado para la primera sesión del panel sensorial. Modificado de Plaza (2015).....	116
Anexo 4: Ficha de perfil descriptivo para pan amasado.....	117
Anexo 5: Ficha del test de calidad y de preferencia para pan amasado..	118

ABREVIATURAS

AG: Ácido graso

AGS: Ácidos grasos saturados

AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados

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

APR: Aceite comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte.

AV: Aceite vegetal de maravilla

AOCS: Official Methods and Recommended Practices.

GCL: Cromatografía de gas líquido

CAGPICL *n-3*: Concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *omega-3*

CGS: Contenido de grasa sólida

DHA: Docosahexaenoic acid, ácido docosahexaenoico (22:6 *n-3*)

DSC: Differential Scanning Calorimetry, Calorimetría Diferencial de Barrido

ΔH : Entalpía de fusión

EPA: Eicosapentaenoic acid, ácido eicosapentaenoico (20:5 *n-3*)

FAME: Fatty acid methylesters, Ésteres metílicos de ácidos grasos

MSR: Metodología de Superficie Respuesta

QDA: Análisis descriptivo cuantitativo

Rpm: revoluciones por minutos

scCO₂: Dióxido de carbono supercrítico.

TAG: Triacilglicéridos

TAGs: Triacilglicéridos estructurados

RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis fue la optimización de las variables del proceso de acidólisis enzimática bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) para obtener triacilglicéridos estructurados (TAGs) con un máximo contenido de EPA+DHA e incorporarlos en pan.

Para la obtención de estos TAGs con alto contenido de EPA+DHA, se realizaron análisis de estabilidad oxidativa al aceite de pescado refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte (APR) el cual se utilizó para elaborar el concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (CAGPICL *n*-3) mediante inclusión con cristales de urea, previa saponificación del APR. Las variables del proceso de inclusión con cristales de urea que permitieron obtener concentrados con un máximo contenido de EPA+DHA fueron la relación urea: ácidos grasos libres (6 g urea: 1 g AGL) y temperatura de cristalización (-18 °C). Bajo estas condiciones la cantidad de EPA en el CAGPICL *n*-3 con respecto al APR incrementó desde 21,23 a 34,71 g/100 g AGT y el DHA de 14,13 a 48,37 g/100 g AGT.

Con la metodología superficie de respuesta (MSR) se estudiaron las condiciones óptimas para maximizar el contenido de EPA+DHA y, además, se determinó la temperatura de deterioro oxidativo por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de los TAGs obtenidos en el proceso de acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) bajo condiciones de scCO₂. Las variables independientes óptimas de presión supercrítica y concentración de enzima fueron 290 bar y 2,5 % del sustrato, respectivamente. Bajo estas condiciones se obtuvo como respuesta una concentración máxima de EPA y DHA de 18,00 y 11,23 (g/100g AGT) en los TAGs, respectivamente, a una temperatura de deterioro de 81,87±5,11°C.

Finalmente se logró obtener un pan con adición de TAGs con 40 mg de EPA+DHA, que no presentó diferencias significativas con respecto al control ($p>0,05$). Este pan fue evaluado por un panel sensorial conformado por 10 jueces los cuales fueron entrenados y validados de acuerdo a la norma ISO 8586:2012 y la norma ISO 11132:2012, respectivamente.

ABSTRACT

The main goal this thesis was the optimization of the enzymatic acidolysis process variables under conditions of supercritical carbon dioxide (scCO₂) condition to obtain structured triacylglycerides (TAGs) with a maximum content of EPA + DHA and incorporate them in bread.

To obtain these TAGs with high content of EPA + DHA, oxidative stability analyses were carried out on OMEGA-3 commercial refined fish oil for Forte oily line functional foods (APR). This oil was used to prepare the polyunsaturated fatty acid concentrate of long chain n-3 (CAGPICL n-3) by inclusion with urea crystals, after saponification of the APR. The variables of the inclusion process with urea crystals that allowed to obtain concentrates with a maximum content of EPA + DHA were the ratio urea: free fatty acids (6 g urea: 1 g FFA) and crystallization temperature (-18 °C). Under these conditions the amount of EPA in the CAGPICL n-3 with respect to the APR increased from 21.23 to 34.71 g / 100 g TFA and the DHA content from 14.13 to 48.37 g / 100 g TFA.

By employing the response surface methodology (RSM), the optimal conditions to maximize the content of EPA + DHA were studied, as well as the oxidative deterioration temperature resulting from the Differential Scanning Calorimetry (DSC) of the TAGs obtained in the process of enzymatic acidolysis (*Candida antarctica*) under scCO₂ conditions. The optimal values of the independent variables of supercritical pressure and enzyme concentration were 290 bar and 2.5% of the substrate, respectively. Under these conditions, a maximum concentration of EPA and DHA of 18.00 and 11.23 (g / 100g TFA) was obtained in the TAGs, respectively, at a deterioration temperature of 81.87 ± 5.11 °C.

Finally, it was possible to obtain a bread with addition of TAGs with 40 mg of EPA + DHA, which did not present significant differences with respect to a control. This bread was evaluated by a sensory panel conformed by 10 judges, who were

trained and validated according to the ISO 8586: 2012 standard and the ISO 11132: 2012 standard, respectively.

I. INTRODUCCIÓN

Los aceites de origen marino son hoy en día valiosos productos con gran aplicación nutricional y alimentaria debido a su alto contenido de ácidos grasos *n-3* de cadena larga, principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 *n-3*) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 *n-3*). El aceite de pescado se ha transformado en un producto de alto valor comercial y de creciente demanda **(Valenzuela et al. 2012)**.

El consumo de EPA se asocia especialmente con la protección de la salud cardiovascular, principal causa de muerte en el mundo; además disminuye los triacilglicéridos y colesterol sanguíneo, ambos determinantes en el riesgo cardiovascular. Por otro lado, el consumo de DHA está relacionado con el desarrollo de la inteligencia, pues es fundamental para la formación y función del sistema nervioso y visual **(Valenzuela y Sanhueza, 2009)**. FAO en conjunto con la OMS recomienda el consumo de al menos 250 mg diarios de EPA+DHA en adultos sanos **(FAO, 2012)**.

A pesar de los beneficios nutricionales que tienen los productos del mar, Chile tiene un bajo consumo per cápita de éstos, 13 kg al año por persona, cifra inferior al promedio mundial de 20 kg **(Subpesca, 2017)**. El bajo consumo de productos del mar y la reciente demanda de consumir productos que contienen aceites más saludables, ha llevado a la industria a elaborar diversos alimentos fortificados con ácidos grasos *n-3*, provenientes de aceites de pescado. Las principales categorías de alimentos que están siendo fortificados con *n-3* son los productos lácteos, las bebidas nutricionales y los productos horneados, en los cuales se utilizan aceites de pescado de varias fuentes para su uso en una amplia variedad de alimentos **(Hernández, 2013; Ganesan et al., 2014)**.

Otra alternativa al consumo regular de aceites marinos es el concentrado de ácidos grasos *n-3* en forma de cápsulas, en ellas los ácidos grasos *n-3* se

presentan como ésteres etílicos o metílicos, aunque el EPA y el DHA se metabolizan y se absorben mejor en el organismo como triacilglicéridos (TAG) que como ésteres etílicos o metílicos **(Metcalf et al., 2003; Dyerberg et al., 2010)**, siendo entonces los TAG una mejor alternativa para adicionar en este tipo de productos.

Los TAG pueden ser modificados en la composición de sus ácidos grasos y en su distribución en las moléculas de glicerol, mediante reacciones de transesterificación química o enzimática, para mejorar las propiedades funcionales y/o nutricionales. Estos TAG modificados se denominan triacilglicéridos estructurados (TAGs) **(Moreno y Perea, 2008)**. Un método para la obtención de TAGs es la acidólisis catalizada por lipasas y como medio de catálisis enzimática el fluido supercrítico (FSC), específicamente el dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), el cual presenta varias ventajas: no es tóxico, hay menos reacciones secundarias, el CO₂ es eliminado rápidamente de los productos por despresurización, existe bajo riesgo de contaminación microbiana, expresión de la actividades adecuadas de varias enzimas y alta estabilidad enzimática **(Wimmer y Zarevúcka, 2010; Liu et al., 2016)**.

De esta forma, en la presente memoria se pretende obtener un producto horneado, es decir, un pan con adición de EPA+DHA provenientes de triglicéridos estructurados (TAGs), obtenidos a partir de la acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) entre aceite refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte (APR) y concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n-3* (CAGPICL *n-3*) de APR, bajo condiciones de CO₂ supercrítico (scCO₂).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ACEITE DE PESCADO

El aceite de pescado es un producto industrial de alto valor nutricional por su contenido de ácidos grasos *n*-3 de cadena larga; principalmente el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA), el ácido docosapentaenoico (C22:5, DPA) y el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA). Estos ácidos grasos, particularmente el EPA y el DHA, son hoy día altamente valorados. Sin embargo, originalmente, el aceite de pescado era un “subproducto” de la fabricación de la harina de pescado. Este sub-producto, que se desechaba inicialmente, comenzó a ser utilizado en la fabricación de pinturas, barnices y resinas, entre otros. Más tarde comenzó a utilizarse en la fabricación de mantecas y margarinas, y posteriormente en la preparación de aceites comestibles **(Valenzuela et al., 2012)**.

Los aceites comestibles de origen marino son los obtenidos de peces o mamíferos marinos, de consistencia fluida a 15°C, que no han sido sometidos a proceso de hidrogenación **(RSA, 2015)**. Están constituidos por mezclas de triacilglicéridos cuyos principales componentes son los ácidos grasos. Los triacilglicéridos, son moléculas formadas por la asociación del glicerol con tres ácidos grasos, los cuales pueden ser similares o no **(Castillo 2004)**. El glicerol es un trialcohol de tres carbonos y los ácidos grasos se unen al carbono 1 (sn-1), al carbono 2 (sn-2) y al carbono 3 (sn-3), mediante enlaces covalentes del tipo éster **(Valenzuela y Sanhueza, 2009)**. En la **Figura 1** se puede apreciar la estructura de un triacilglicérido.

Los ácidos grasos de la dieta más comunes han sido subdivididos en tres grupos según el grado de insaturación: los ácidos grasos saturados (AGS) no poseen dobles enlaces, los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) poseen un doble enlace y los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) poseen dos o más dobles enlaces **(FAO, 2012)**.

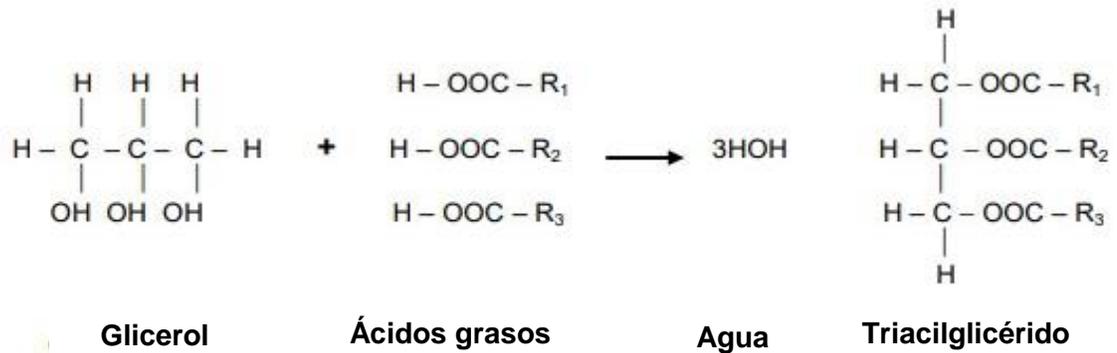


Figura 1: Estructura de un triacilglicérido. Extraído de **Castillo (2004)**

Desde el punto de vista de su uso nutricional, los AGPI se clasifican a su vez en las llamadas familias o series de ácidos grasos. Las tres familias más importantes son la omega-9 (*n*-9), omega-6 (*n*-6) y omega-3 (*n*-3). La denominación omega deriva de la última letra del alfabeto griego, denotando que la enumeración de los ácidos grasos se realiza desde el metilo extremo terminal de la molécula (**Valenzuela y Sanhueza, 2009; FAO, 2012**).

2.2. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (AGPI)

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) son componentes dietarios que participan en múltiples procesos fisiológicos, donde cumplen un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares y son sustratos para la síntesis de diversos mediadores fisiológicos. Los AGPI naturales, con dobles enlaces separados por un metileno y de configuración *cis* pueden dividirse en 12 familias diferentes pudiendo 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 *n*-6 y la *n*-3 (**Ratnayake, Gill, 2009**)

Dentro de los AGPI encontramos dos grupos principales; los ácidos grasos α -linolénico C18:3 n -3 y ácido linoleico C18:2 n -6, los cuales son ácidos grasos esenciales para el ser humano debido a que carecemos de la maquinaria enzimática necesaria para biosintetizarlos y que deben obtenerse en la dieta. **(Valenzuela et al., 2011; Rodríguez-Cruz et al., 2005).**

El primer exponente de los ácidos grasos n -3 es el ácido α -linolénico (ALA) (C18:3), que cuenta con 18 átomos de carbono, pero posee tres dobles enlaces. Este ácido graso, por la acción de desaturasas y elongasas, se puede transformar en el ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y posteriormente en el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA) **(Ratnayake y Gill, 2009; FAO, 2012).**

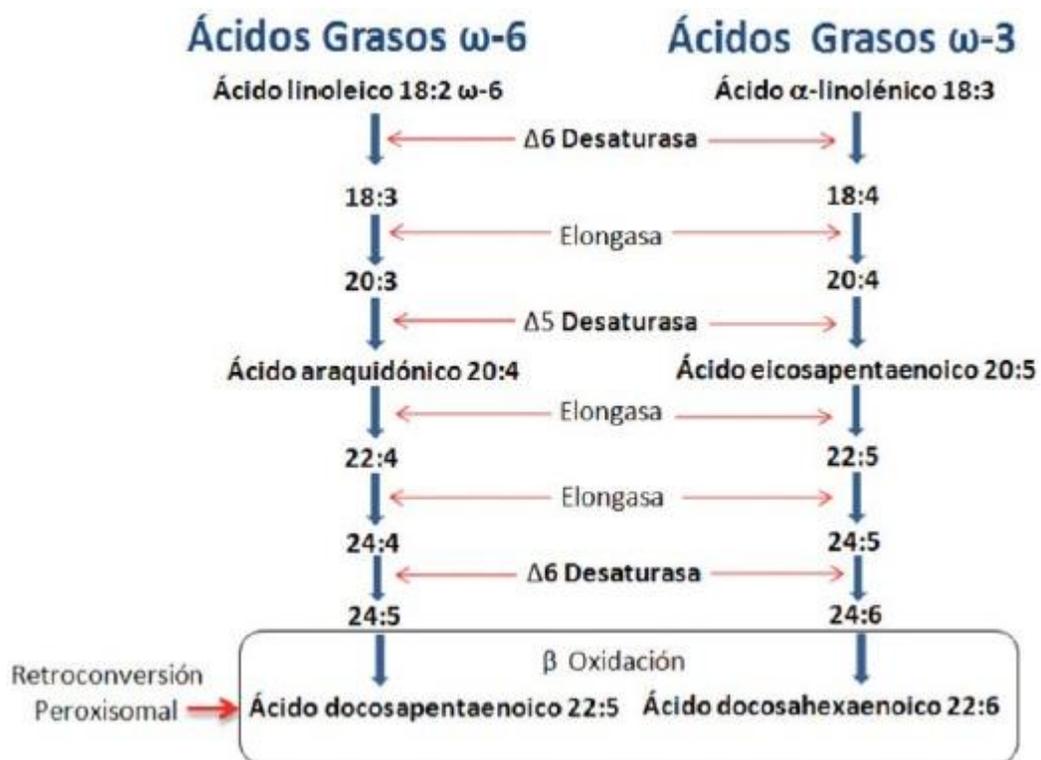


Figura 2: Transformación metabólica de los ácidos grasos n -6 y n -3. Extraído de Valenzuela et al. (2011).

El primer exponente de los ácidos grasos *n-6* es el ácido linoleico (C18:2) y uno de sus derivados más importantes es el ácido araquidónico (C20:4, AA). Posee 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces (**Valenzuela et al., 2011; Ratnayake y Gill, 2009; FAO, 2012**).

En la **Figura 2** se observa la transformación metabólica de los ácidos grasos *n-3* y *n-6*, vía desaturasas y elongasas (**Valenzuela et al., 2011**)

2.3. BENEFICIOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS *n-3*.

La ingesta diaria recomendada de *n-3* es un tema de debate, ya que cada país tiende a emitir sus propias recomendaciones individuales (**Vestland et al., 2016**). Actualmente, la OMS recomienda que la ingesta de grasa suponga entre 15 y 30% del valor energético total aportado por la dieta, donde <10% deben ser ácidos grasos saturados, un 6 a 10 % corresponden a AGPI, de los cuales un 6 a 10% deberán ser AGPI *n-6* y entre un 1 y 2% de AGPI *n-3* (**OMS, 2003**). Sin embargo, FAO muestra evidencias que indican que la ingesta de EPA y DHA de 0,250 g a 2,0 g puede ser parte de una dieta saludable. Los AGPICL *n-3* en su conjunto pueden contribuir a la prevención de enfermedades cardiovasculares (ECV) y, posiblemente, a otras enfermedades degenerativas propias del envejecimiento (**FAO, 2012**).

Los AGPICL *n-3* de origen marino, como el EPA y el DHA, han demostrado ser precursores de mediadores anti-inflamatorios, siendo muy eficaces en el tratamiento y prevención de varias enfermedades, tales como cardiovasculares, neurodegenerativas, Alzheimer, inflamatorias, alergias, diabetes, cáncer, artritis reumatoidea, así como reducir el contenido en triacilglicéridos por lo cual disminuye el riesgo de ECV, reduciendo el riesgo coronario en adultos, además de estar presentes en el tratamiento para personas con depresión y desorden bipolar. También actúan en el buen funcionamiento de la vista (**Valenzuela et al., 2011; Comunian y Favaro-Trindade, 2016; Costa et al., 2012; Pei-Chen et al., 2017; Endo y Arita, 2016; Huerta-Yépez et al., 2016**).

El EPA y el DHA son importantes componentes estructurales de los fosfolípidos de las membranas y son el sustrato para la formación de una serie de derivados lipídicos llamados eicosanoides (derivados de 20 átomos de carbono en el caso del AA y EPA) y docosanoides (derivados de 22 átomos de carbono, en el caso del DHA), los cuales ejercen importantes acciones en el metabolismo celular **(Valenzuela et al., 2011)**

Tanto el EPA como el DHA, luego de ser ingeridos, se incorporan rápidamente a los fosfolípidos de las membranas celulares donde pueden ser liberados por enzimas lipooxigenasas y ciclooxigenasas, originando productos con potentes propiedades citoprotectoras y especialmente antiinflamatorias. La evidencia clínica y epidemiológica de múltiples estudios permite establecer que el consumo de EPA y DHA puede contribuir a la prevención y/o tratamiento de una serie de patologías, especialmente aquellas donde la inflamación juega un papel preponderante en su desarrollo. El EPA y el DHA presentan propiedades antiinflamatorias, vía la generación ya sea de agentes anti-inflamatorios, como las resolvinas, o a través del bloqueo de agentes pro-inflamatorios **(Valenzuela et al., 2011)**

El síndrome metabólico generalmente se ha definido como la agrupación de factores de riesgo interrelacionados para la enfermedad cardiovascular y la diabetes tipo 2, incluyendo la hiperglicemia, resistencia a la insulina, hipertensión, hipertrigliceridemia, disminución de la concentración de HDL-colesterol, y la obesidad. Si bien la prevalencia del síndrome metabólico está alcanzando proporciones pandémicas en todo el mundo, los estudios han demostrado que las modificaciones dietéticas, como el aumento en la abundancia relativa de AGPI *n*-3 en la dieta, ayudarían a reducir uno o más factores de riesgo del síndrome metabólico **(Poudyal et al., 2011)**.

EPA y DHA tienen importantes funciones fisiológicas en diferentes órganos; tras incorporarse a los lípidos estructurales, estos ácidos grasos pueden modificar la

fluidez y el espesor de la membrana, alterando las interacciones específicas con las proteínas de la membrana **(FAO, 2012)**.

En la mayoría de las poblaciones examinadas, las reducciones en la mortalidad por ECV se han asociado con el consumo de pescado. Debido a que el alto consumo de ácidos grasos *n-3* es característico de poblaciones que consumen pescado, la atención se ha centrado en gran parte en los beneficios del EPA y DHA para explicar los efectos protectores sobre el riesgo de ECV observado en estos estudios. Los resultados de diversos análisis y estudios de intervención han demostrado que el consumo regular de una variedad de fuentes de ácidos grasos *n-3*, que incluye los aceites de pescado, nueces y aceite de soja, además de los suplementos dietéticos que proporcionan cantidades concentradas de EPA y DHA, fue inversamente asociada con la mortalidad por ECV o promovió importantes reducciones de 30% a 60% en la mortalidad por ECV **(Psota et al., 2006, Rangel-Huerta y Gil 2017, Endo y Arita, 2016)**.

Meta-análisis de datos de 21 estudios de cohortes prospectivos independientes han demostrado que la ingesta de ácidos grasos *n-3* marinos se asocia con un menor riesgo de cáncer de mama; en particular, el DHA suprime la proliferación celular y promueve la apoptosis celular. Además, los ácidos de tipo *n-3* atenuaron la inflamación relacionada con la obesidad que se asoció con menor riesgo de cáncer de mama **(Serna-Saldívar y Abril, 2011; Guo et al., 2017)**.

2.4. CONCENTRACIÓN DE AGPICL *n-3* MEDIANTE INCLUSIÓN POR CRISTALES DE UREA

Los concentrados de AGPICL *n-3* pueden ser producidos por varios métodos, tales como extracción por fluidos supercríticos, cristalización en frío, inclusión con urea, destilación molecular, complejación argéntica, concentración con lipasa y cromatografía líquida de alto rendimiento **(Liu et al., 2006; Aarthya et al., 2016; Thammapat et al., 2016)**. 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 proceso económico a baja temperatura y presión **(Ackman et al., 1988; Wanasundara y Shahidi, 1999; Guil-Guerrero y Belarbi, 2001; Liu et al., 2006; Kamal et al., 2015; Thammapat et al., 2016; He et al., 2016; Vázquez et al., 2017)**.

La inclusión por cristales de urea 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 libre (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 et al., 1998; Zuta et al., 2003; No et al., 2015; Thammapat et al., 2016; He et al., 2016)**.

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 introduce irregularidades estéricas, y como consecuencia, desviaciones de las distancias óptimas intermoleculares, disminuyendo las fuerzas de atracción neta que estabilizan los compuestos de inclusión **(Ramírez, 2005; No et al., 2015; Vázquez et al., 2017)**.

2.5. TRIACILGLICERIDOS ESTRUCTURADOS Y ACCION ENZIMATICA

Los lípidos estructurados son triacilglicéridos modificados en la composición de sus ácidos grasos y su distribución en las moléculas de glicerol, por reacciones de transesterificación química o enzimática. Algunos de estos lípidos se pueden clasificar como alimentos funcionales o nutraceuticos por estar directamente asociados a la prevención o tratamiento de diversas enfermedades **(Moreno y Perea, 2008)**.

Con el fin de diseñar nuevos triacilglicéridos estructurados (TAGs), se han investigado una serie de reacciones de transesterificación en aceite de pescado en forma libre o como ésteres etílicos **(Ferraro et al., 2010)**.

La transesterificación consiste en un grupo de reacciones **(Figura 3)** tales como: intercambio entre un éster y un ácido (acidólisis), un éster y un alcohol (alcoholólisis) o dos ésteres (interesterificación) que permite obtener un triacilglicérido con características físicas, químicas y nutricionales diferentes y superiores al triacilglicérido de origen **(Osorio et al., 2001; Shahidi, 2002)**.

Esta técnica se puede llevar a cabo con catalizadores homogéneos tales como NaOH, KOH, H₂SO₄, o en presencia de catalizadores heterogéneos tales como los óxidos metálicos, carbonatos o enzimas **(Rivera, García, 2007)**.

Una dificultad que presenta la transesterificación química de TAG es que los grupos acílicos deseados no son introducidos en posiciones específicas del glicerol ya que la reacción ocurre al azar con respecto a la posición **(Nieto et al., 1999)**. El uso de enzimas como catalizadores puede evitar este inconveniente, ya que posee una alta especificidad y velocidad de reacción **(Rivera y García, 2007)**. Una reacción de transesterificación catalizada por enzimas permite decidir el tipo de ácido graso y la posición de éstos en las moléculas que se desee estructurar. Además, se puede llevar a cabo rindiendo productos más puros, sin formación de jabones, sin empleo de catalizadores químicos que afectan el medio ambiente, sin la neutralización ácida y con recuperación del catalizador fácilmente. Otra ventaja, es que las enzimas operan bajo condiciones moderadas de reacción, lo cual permite aminorar la oxidación de los AGPI debido a su alto porcentaje de insaturaciones **(Osorio et al., 2001; Lyberg y Adlercreutz, 2008; Speranza y Alves, 2012; Akanbi y Barrow, 2015)**.

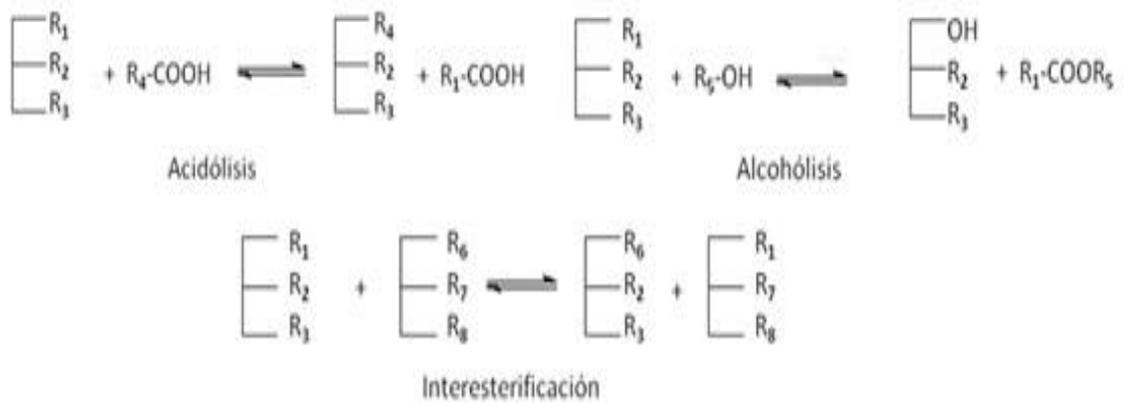


Figura 3: Grupo de reacciones de transesterificación: Acidólisis, alcoholólisis e interesterificación extraído de **Shahidi (2002)**.

Las lipasas pueden catalizar tanto la hidrólisis como la reacción de esterificación de los aceites con una velocidad razonable, dependiendo de su tipo, como *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas*, *Mucor miehei*, *Rhizopusoryzae* (**Poppe et al., 2013; Chaurasia et al., 2016**). Las lipasas tienen especificidad posicional de los AG en el TAG, lo cual es particularmente importante en la modificación de lípidos (**Shahidi, 2004; Shimada, 2006**). Actúan sobre los enlaces éster carboxílicos presentes en los TAG para liberar AG y glicerol. Su sitio activo consiste en una triada catalítica de serina, histidina y ácido aspártico o glutámico.

La lipasa-B de *Candida antarctica* se ha categorizado como una lipasa selectiva para ácidos grasos de cadena larga (**Poppe et al., 2013; Chaurasia et al., 2016**).

El uso de lipasas microbianas en medios tales como fluidos supercríticos (FSC) ha sido propuesto como un medio susceptible de mejorar la actividad y utilidad de aquellas ya que al variar la presión y/o la temperatura de acción de los FSC, se pueden mejorar las tasas de reacción, manteniendo o mejorando la selectividad, además de obtener un alto rendimiento (**Cernia et al., 1998; Rubio-Rodríguez et al., 2010**).

2.6. FLUIDO SUPERCRÍTICO (FSC)

Un Fluido Supercrítico (FSC) es un cuasi-estado con propiedades intermedias entre líquidos y gases. Estas propiedades incrementan el poder como disolvente de un fluido supercrítico y le proporcionan mayor poder penetrante en el material a extraer. Los disolventes supercríticos son superiores a los líquidos en cuanto a la capacidad de penetrar en los microporos de una estructura sólida y son superiores a los gases en su difusión. **(Rubio-Rodríguez et al., 2010)**

Al someter un FSC a una presión y temperatura superiores a sus valores críticos adquiere propiedades intermedias entre líquidos y gases. Por encima del punto crítico (PC) no se produce licuefacción al presurizar, ni gasificación al calentar **(Wimmer y Zarevúcka, 2010; Rubio-Rodríguez et al., 2010)**. El FSC es un estado de la materia en el que ésta es compresible, se comporta como un gas, por lo que llena y toma la forma de su contenedor. No obstante, tiene la densidad de un líquido (0,1-1g/ml) y por lo tanto su poder disolvente **(Luque de Castro et al., 1993)**. Estas características pueden proporcionar circunstancias apropiadas para la transesterificación en términos del coeficiente de transferencia de masa **(Shin et al., 2012)**.

Varios compuestos han sido estudiados como disolventes FSC, por ejemplo, hidrocarburos tales como hexano, pentano y butano, óxido nitroso, hexafluoruro de azufre e hidrocarburos fluorados. Sin embargo, el CO₂ es el más popular de los FSC porque es seguro, fácilmente disponible y proporciona muchas ventajas sobre los solventes orgánicos clásicos o agua ya que no es tóxico, es amigable con el ambiente, no es inflamable, presenta densidad variable, gran poder disolvente, es de bajo costo y es fácilmente separado del medio de reacción despresurizando **(Dumont et al., 1992; Reverchony De Marco, 2006; Shekarchizadeh et al., 2009; Rubio-Rodríguez et al., 2010; Budisa y Makuch, 2014)**.

Además, se puede usar para la catálisis enzimática especialmente para aplicaciones de alimentos, ya que el paso del CO₂ a la fase supercrítica ocurre

con relativa facilidad en los puntos críticos de 304 °K (31,05 °C) y 73,8 bar (**Figura 4**), lo que hace que las enzimas no presenten desnaturalización significativa (**Lin et al., 2008; Budisa y Makuch, 2014**). El CO₂ también ofrece un ambiente no oxidante lo que permite realizar procesos con materiales termosensibles como los aceites (**Lin et al., 2008**).

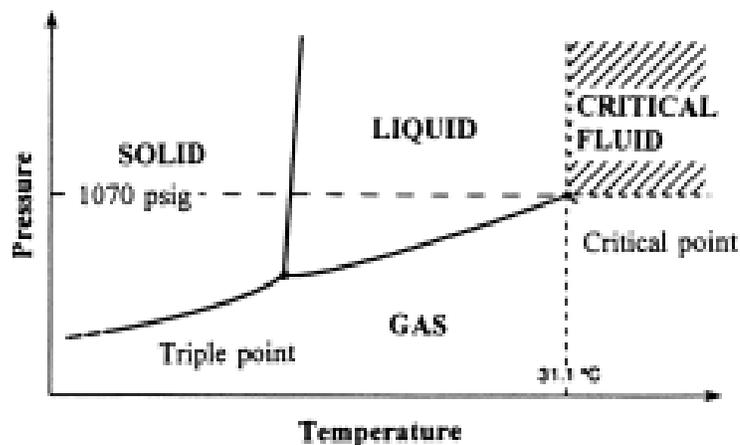


Figura 4: Diagrama de presión-temperatura del CO₂, extraído de **Shahidi y Wanasundara (1998)**.

La tecnología FSC con CO₂ es una alternativa ventajosa como medio de catálisis enzimática debido a que no es tóxico, las tasas de difusión son más altas que las de los líquidos convencionales, hay menos reacciones secundarias, el CO₂ es eliminado rápidamente de los productos por despresurización, tiene bajo riesgo de contaminación microbiana, y proporciona expresión de la actividad adecuada de varias enzimas y alta estabilidad enzimática (**Wimmer y Zarevúck, 2010; Liu et al, 2006**).

Estudios demuestran que la actividad de las lipasas del páncreas porcino, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea* (inmovilizada), *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, entre otras, usadas como biocatalizadores en procesos de hidrólisis de aceites bajo condiciones scCO₂ en reactores de flujo continuo presentan un aumento de la actividad relativa de todas las lipasas usadas

después de la reacción hidrolítica. Cualquier procedimiento catalizado por enzimas realizado en scCO₂ puede beneficiarse del hecho de que la separación de los productos del medio de reacción puede conseguirse fácilmente cambiando las condiciones de reacción, es decir, cambiando la presión y la temperatura, a la salida del reactor **(Wimmer y Zarevúcka, 2010)**.

2.7. ADICIÓN DE EPA+DHA A PAN.

El pan es un producto esponjoso obtenido por la cocción de una masa preparada con una mezcla de harina de trigo, agua, sal y levadura **(Valenzuela y Arguinarena, 2015)**. De acuerdo con el artículo 356 del Reglamento Sanitario de los Alimentos, el pan, sin otra denominación, es el producto de la cocción de la masa resultante de una mezcla de harina de trigo, levadura de panificación, agua potable y sal comestible, con o sin adición de mejoradores de panificación y/o enriquecedores, tales como leche, azúcares, materias grasas u otros autorizados por dicho Reglamento **(RSA, 2015)**.

Chile es el segundo país del mundo con mayor consumo de pan por habitante, con cifras que bordean los 90 kilos por persona de forma anual, además de componer cerca del 2% de la canasta familiar del IPC. Dentro de los hogares chilenos, el promedio del gasto en pan es cercano al 1,89% del presupuesto familiar **(SERNAC, 2015)**.

El pan es un vehículo conveniente para la introducción de ácidos grasos *n*-3 en la dieta porque es un alimento que se consume universalmente. Asimismo, ofrece un entorno estable para ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), ya que es relativamente bajo en humedad y tiene una vida útil corta. Además, las grasas comúnmente usadas en las formulaciones de pan son usualmente muy estables y pueden usarse para incorporar aceites *n*-3 como una matriz más estable **(Hernandez, 2013)**

El aceite de pescado en forma líquida o en polvo también se ha utilizado con éxito en productos horneados tales como panes, muffins, bollos, pasteles, bagels, galletas, masa de pizza. Asimismo, también se ha aplicado a otros productos como leche, mayonesa, yogurt y huevo. **(Kadam y Prabhasankar, 2010; Hernandez, 2013; Rasti et al., 2017; Olson y Aryana, 2017).**

El presente trabajo pretende obtener triacilglicéridos estructurados con alto contenido de EPA y DHA, obtenidos a partir de acidólisis enzimática entre concentrado AGPICL *n*-3 de aceite comercial, bajo condiciones de fluido supercrítico para adicionarlos en un pan.

III. HIPÓTESIS

Es posible optimizar el proceso de acidólisis enzimática bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico de concentrados de AGPICL *n*-3 de aceite de pescado refinado comercial para la obtención de triacilglicéridos estructurados con el fin de incorporarlos a un pan de características térmicas y sensoriales similares al control.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Optimizar las variables del proceso de acidólisis enzimática bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico para la obtención de TAGs con EPA+DHA a partir de concentrados AGPICL *n*-3 y aceite de pescado refinado comercial para la adición en pan con características térmicas y sensoriales similares al control.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1. Caracterizar el aceite de pescado refinado comercial y el aceite vegetal mediante análisis del perfil de ácidos grasos, análisis de estabilidad oxidativa y análisis térmico.
- 4.2.2. Optimizar el proceso de obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 con EPA+DHA a partir del aceite de pescado refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte.
- 4.2.3. Obtener triacilglicéridos estructurados con EPA+DHA purificados mediante la optimización de las variables de proceso de acidólisis enzimática (Lipasa B., *Candida antarctica*) bajo scCO₂: presión de CO₂ supercrítico y concentración de enzima *Candida antarctica*, para maximizar el contenido de EPA+DHA y minimizar el deterioro oxidativo de los triglicéridos estructurados obtenidos.
- 4.2.4. Evaluar las propiedades térmicas y sensoriales en un pan con adición de TAGs (EPA+DHA) purificados óptimos.

V. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1. MATERIALES

5.1.1. Materias primas

Se utilizó aceite de pescado refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte (APR) (SPES, Santiago, RM, Chile). Este APR es una mezcla de aceite de atún, sardina y jurel extra refinado, desodorizado y enriquecido en ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y vitamina E como antioxidante. Se comercializa en formato de bidones de 5 litros. Al llegar al laboratorio se envasó en botellas ámbar de 250ml para facilitar su uso y se almacenaron a -80°C. En **anexo 1** se puede apreciar la ficha técnica del producto proporcionada por la empresa y en el **anexo 2** la información nutricional.

El aceite vegetal (AV) utilizado fue de maravilla (*Helianthus annuus*) y se obtuvo de la empresa Watt's S.A (Santiago, Chile) en formato de botella de 1L, el cual se envasó en botellas ámbar de 250 ml y se almacenó a -80 °C.

La enzima inmovilizada lipasa B inespecífica de *Candida antarctica* (Novozyme 435) producida por una cepa de *Aspergillus niger*, la cual ha sido modificada genéticamente e inmovilizadas en soporte silicato mediante adsorción iónica, se obtuvo de la empresa Blumos S.A (Santiago, Chile).

El estándar interno que se utilizó fue el metiltricosanoato (23:0), CAS 2433-97-8, Nu-CheckPrep, Inc (Elysian, MN, USA).

5.1.2. Equipos

- Equipo de CO₂ supercrítico Speed SFE system model 7071 (Applied Separation)
- Gas Chromatograph, HP 5890 Series II. USA. Equipado con un detector de ionización de llama (Hewlett Packard 5890 serie II, EE.UU.)
- Differential Scanning Calorimeter. Modelo: DSC 6000, PerkinElmer. Incluye: Modelación de temperatura MT-DSC, principio de Heatflux, intracooler para DSC6000 y Computador Dell.
- Espectrofotómetro UNICAM UV/Vis Spectrometer, modelo UV3 (Cambridge, UK)
- Ultracongelador a -80 °C.
- 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.
- 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)

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Caracterización del aceite de pescado refinado comercial y aceite vegetal mediante análisis del perfil de ácidos grasos, análisis de estabilidad oxidativa y análisis térmicos.

5.2.1.1 Caracterización del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gas líquido (CGL).

5.2.1.1.1. Metilación de las muestras.

La metilación tiene como objetivo obtener ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), los cuales podrán ser detectados por CGL. El método consistió en agregar 100 mg de muestra en un matraz aforado de 50 ml, y también 10 ml de metilato de sodio 0,2 N y perlas de ebullición. Esta mezcla se calentó entre 95-100 °C por 10 min con un sistema a reflujo. Se dejó enfriar hasta 50 °C aproximadamente y a esta temperatura se le agregó una gota de fenolftaleína (1% en etanol al 95%) y ácido sulfúrico al 4% en metanol hasta la completa desaparición del color rosado. Se sometió nuevamente a reflujo (95-100 °C) por 30 min y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente (25 °C aproximadamente), se le agregó 3ml de hexano y también 0,5 ml de estándar interno metiltricosanoato (C23:0) CAS 2433-97-8, representando el 2,5% aprox. de la muestra como ácido graso. Finalmente, el matraz se aforó con una solución saturada de NaCl y se dejó reposar refrigerada a 4 °C hasta su análisis (**Método IUPAC 2.3001, 2.304**).

5.2.1.1.2. Caracterización mediante cromatografía de gas, determinación del perfil y cuantificación de ácidos grasos *n*-3.

Los perfiles de ácidos grasos se detectaron utilizando un cromatógrafo HP 5890 serie II, equipado con un detector de ionización de llama, sistema de inyección Split y columna capilar SPTM – 2560 de 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) utilizando hidrógeno como gas transportador. Se inyectó1

µl de muestra y el programa que se utilizó fue: temperatura del inyector y del detector 250 °C, temperatura inicial del horno 160 °C, velocidad de calentamiento 20 °C/min, temperatura final 220 °C, un tiempo inicial de 3 min, un tiempo final de 35 min y un tiempo total de 50 min, de acuerdo a AOCS Official Method (AOCS 2009, Ce 1j-7). Para la identificación de los perfiles se utilizó como referencia el estándar NU-CHEK GCL463 y el programa Data Apex Clarity™ (Data Apex Ltd., Check Republic) para análisis cromatográficos.

La concentración de los ésteres metílicos de ácidos grasos se determinó mediante evaluación de la proporción *peak*/área. La cuantificación de ácidos grasos libres se realizó de acuerdo a AOCS Official Method AOCS 2009, Ce 1j-7. Los resultados se expresaron en g/100g de ácidos grasos totales identificados.

5.2.1.2. Caracterización mediante análisis de estabilidad oxidativa

Se realizó una caracterización química del APR y del AV donde se determinó: Ácidos grasos libres (**AOCS Official Method Ca 5a-40**), Valor Peróxido (**AOCS Official Method Cd 8b-90**), Valor *p*-anisidina (**AOCS Official Method Cd 18-19**), Dienos y Trienos conjugados (**Kim and Labella, 1987**) y Valor de Yodo (**AOCS Official Method Cd 1-25**).

5.2.1.3. Caracterización mediante análisis térmicos.

La caracterización física del APR y del AV se realizó mediante el análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC) donde se determinó: rango de fusión (°C), peaks de fusión (°C), entalpía de fusión (J/g), peak de deterioro (°C) y porcentaje del contenido de grasa sólida en función de la temperatura (%CGS). Para lo cual se pesó entre 5 y 10 mg de muestra en cápsulas de aluminio. Una vez alcanzada la temperatura inicial del programa (30 °C), se utilizó el siguiente programa de temperaturas para analizar cada muestra de manera independiente: Calentar de 30°C a 60°C a 5°C/min; mantener por 2 min a 60°C; Enfriar de 60°C a -80°C a 5 °C/min; mantener por 10 min a -80°C; Calentar de -80°C a 200 °C a 5 °C/min (**Contreras, 2015**).

Se realizó un barrido de la curva de fusión donde se encontraron las temperaturas correspondientes a los peaks más altos de fusión. La determinación de la entalpía de fusión fue dada por el área bajo la curva dH/dt versus tiempo en el rango de fusión determinada. La entalpía total de fusión fue entregada directamente por el programa del equipo DSC. El CGS caracterizó a las muestras en función de la temperatura mediante integración de áreas parciales bajo las curvas de fusión respectivas (**Contreras, 2015**).

5.2.2. Optimización del proceso de obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 con EPA y DHA a partir del APR mediante saponificación y posterior inclusión con urea.

5.2.2.1. Preparación de ácidos grasos libres (AGL) mediante saponificación.

Se obtuvieron los AGL a partir de APR. Este aceite se sometió al proceso de saponificación, el cual consistió en agregar 500 g de APR a una mezcla realizada previamente que contenía 150 g de KOH, 500 ml de 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, y se disolvió con un agitador magnético. Posteriormente la mezcla se calentó a 60 °C bajo reflujo con atmósfera de nitrógeno y agitación constante por 90 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 250 ml de agua destilada, agitando vigorosamente la mezcla hasta la formación de espuma. Inmediatamente, 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 4 lavados). La fase hexánica se descartó y la fase acuosa se acidificó con HCl 6 N (200 ml aprox.) hasta pH 1. La mezcla obtenida se lavó con 2,5 L de hexano y se descartó la fase acuosa. La fase hexánica se filtró con Na₂SO₄ en papel Whatman N°1, y se rotaevaporó al vacío a 40 °C. Los ácidos grasos libres obtenidos se almacenaron en el ultracongelador a -80 °C,

(Wanasundara y Shahidi, 1999; Guil-Guerrero y Belarbi, 2001; Pando et al, 2014).

5.2.2.2. Preparación del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 de cadena larga (CAGPICL *n*-3) (EPA y DHA) mediante inclusión por cristales de urea.

El proceso de inclusión por cristales de urea se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones dadas por el diseño factorial 2² de seis corridas experimentales incluyendo repetición en el punto central, de acuerdo a la **Tabla 1** donde se varió la proporción del contenido de urea/AGL (U:AGL) de 6:1 a 10:1 (g/g) y la temperatura de cristalización (TC) de -18 a -23 (°C). El tiempo y la velocidad de agitación permanecieron constantes: 14,8 h y 500rpm, respectivamente.

El CAGPICL n -3 se obtuvo al agregar 60g de AGL a una mezcla previamente elaborada de urea disuelta en etanol al 95% v/v (Etanol=3,7 x urea), la cual se mantuvo a 60 °C con agitación magnética constante, en un sistema con varilla a reflujo. La mezcla se enfrió con agitación continua (500rpm) por 14,8 h a temperatura según el diseño de la **Tabla 1**. Al cumplirse el tiempo la mezcla se llevó a temperatura ambiente por 1 hora y luego se filtró al vacío con papel Whatman N° 1, se le agregó 500 ml de agua destilada y se acidificó con una solución de HCl 6 N hasta pH 4,5. A continuación se lavó con 400 ml de hexano en embudo de decantación, y la fase acuosa obtenida se lavó nuevamente con 400 ml de hexano. Las fases hexánicas conseguidas en ambos lavados se filtraron con sulfato de sodio anhidro en papel Whatman N° 1, y se rotaevaporaron al vacío a 40 °C. Finalmente, los ácidos grasos poliinsaturados obtenidos se almacenaron en el ultracongelador a -80 °C con 0,5% de α -tocoferol (**Contreras, 2015**).

5.2.2.3. Estudio del efecto de las variables independientes proporción de contenido de urea/AGL y temperatura de cristalización sobre el contenido del EPA y DHA.

5.2.2.3.1. Diseño experimental

Se realizó un diseño factorial basado en la metodología superficie de respuesta (MSR) de 2^2 , de 2 factores (U:AGL y TC) con 6 corridas experimentales en total, dentro de las cuales dos corridas corresponden al punto central, lo que permitió estimar el error experimental. Se determinó el efecto de las variables independientes proporción de contenido de urea/AGL de 6:1 a 10:1 (g/g) y la temperatura de cristalización desde -23 a -18 °C, sobre el contenido de EPA y DHA del concentrado de ácidos grasos. Para ello, se mantuvo constante el tiempo en 14,8 h y la velocidad de agitación en 500 rpm. En la **Tabla 1** se aprecian los rangos y condiciones utilizadas para llevar a cabo el proceso de concentración de AGPICL.

Tabla 1: Diseño factorial de 2^2 para la obtención del concentrado de AGPICL_{n-3} mediante inclusión con cristales de urea, donde U:AGL: Proporción del contenido de urea/ácidos grasos libres, (g/g) TC: temperatura de cristalización (°C), t: tiempo (h), V: Velocidad de agitación (rpm).

Nº	U:AGL (g/g)	TC (°C)	t (h)	V (rpm)
1	6	-18	14,8	500
2	6	-23	14,8	500
3	10	-18	14,8	500
4	10	-23	14,8	500
5	8	-21	14,8	500
6	8	-21	14,8	500

5.2.2.3.2. Optimización de las variables respuestas

A partir de MSR se obtuvo un modelo matemático, con el cual se pudo predecir el efecto de las variables independientes fijadas:

$$(\gamma): \gamma = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} representarán los coeficientes de regresión de intercepto, lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente, y X_i y X_j serán las variables independientes. Los coeficientes de regresión se obtuvieron mediante el 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 Statgraphics Centurión XVI-2011 (Stat Point Technologies, Inc., Rockville, USA)

5.2.2.4. Caracterización del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n-3* (CAGPICL $n-3$) mediante análisis del perfil de ácidos grasos, análisis de estabilidad oxidativa y análisis térmicos.

El CAGPICL $n-3$ con un máximo contenido de EPA+DHA se caracterizó mediante perfil de ácidos grasos según el punto 5.2.1.1, análisis de estabilidad oxidativa según punto 5.2.1.2 y análisis térmico de acuerdo al punto 5.2.1.3.

5.2.3. Obtención de triacilglicéridos estructurados con EPA+DHA purificados mediante la optimización de las variables de proceso de acidólisis enzimática (Lipasa B., *Candida antarctica*) bajo scCO₂: presión de CO₂ supercrítico y concentración de enzima para maximizar el contenido de EPA+DHA y determinar la temperatura de deterioro oxidativo de los triacilglicéridos estructurados obtenidos.

5.2.3.1. Obtención de TAGs purificados, mediante la acidólisis enzimática (*Candida antarctica*) en scCO₂.

5.2.3.1.1. Obtención de mezcla que contiene TAGs, mediante la acidólisis enzimática en scCO₂.

La acidólisis enzimática se realizó en un equipo de scCO₂ Spe-ed TM SFE Applied Separation. En la columna reactor se depositaron 10 g de muestra (7 g CAGPICL *n*-3 y 3 g APR) y enzima (según proporción del diseño de la **Tabla 2**). Posteriormente, se procedió a programar la reacción de acuerdo a la temperatura (60 °C), el tiempo (6 h) y la presión supercrítica (de acuerdo a la **Tabla 2**). Las muestras obtenidas se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

Tabla 2: Diseño factorial de 2² para la obtención de TAGs con EPA Y DHA bajo condiciones de scCO₂ mediante acidólisis enzimática; donde PscCO₂: presión scCO₂ expresada en bar, CE: concentración de enzima *Candida antarctica* en %, t: tiempo expresado en horas y T: temperatura en °C.

	PscCO ₂ [bar]	CE [%]	t [h]	T [°C]
1	200	2,5	6	60
2	300	2,5	6	60
3	200	7,5	6	60
4	300	7,5	6	60
5	250	5,0	6	60
6	250	5,0	6	60

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

Para la separación de los productos obtenidos luego de la reacción de acidólisis (TAGs y AGL) se llevó a cabo el siguiente procedimiento: 1 g de mezcla de la reacción final se depositó en un matraz erlenmeyer de 250 ml, se adicionaron 50 ml de solución de etanol al 95% caliente y 1 ml de solución de fenolftaleína al 1%

en etanol. Posteriormente se llevó a cabo una titulación utilizando solución 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 tres lavados con 20 ml de n-hexano cada uno, adicionando 6 ml de agua destilada recuperando la fase hexánica. Luego, 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 (Hita et al., 2007, Jiménez et al., 2010).

5.2.3.1.3. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

Para llevar a cabo el análisis por TLC, se utilizaron placas de sílica gel 60 F254 20x20 cm (Merck). El eluyente utilizado se compone de: 95% cloroformo, 4,5% acetona y 0,5% metanol (v/v/v), respectivamente (Hernández, 2015).

5.2.3.2. Estudio del efecto de las variables independientes presión supercrítica y concentración de enzima sobre el contenido del EPA+DHA y deterioro oxidativo.

5.2.3.2.1. Diseño experimental

Se realizó el diseño expuesto en el punto 5.2.2.3.1 y se determinó el efecto de las variables independientes: presión supercrítica de 200 a 300 bar y concentración de enzima 2,5 a 7,5 (%), sobre el contenido de EPA+DHA y peak de deterioro por DSC de los TAGs purificados como se observa en la **Tabla 2**.

5.2.3.2.2. Optimización de las variables respuestas

Se realizó el proceso como se muestra en el punto 5.2.2.3.2.

5.2.3.3 Caracterización de TAGs purificados

5.2.3.3.1. Caracterización del perfil de ácidos grasos

Para caracterizar el perfil de AG de los TAGs purificados, primeramente, se metiló la muestra según el punto **5.2.1.1.1**, y finalmente la determinación del perfil y la cuantificación de ácidos grasos *n*-3 se realizó según el punto **5.2.1.1.2**.

5.2.3.3.2. Caracterización mediante análisis de estabilidad oxidativa

Se realizó la caracterización de los TAGs purificados mediante análisis químicos de Valor Peróxido: **AOCS Official Method Cd 8b-90** y Valor *p*-anisidina: **AOCS Official Method Cd 18-19**.

5.2.3.3.3. Caracterización mediante análisis térmicos.

La caracterización física de los TAGs se realizó según el punto **5.2.1.3**.

5.2.4. Evaluación de las propiedades térmicas y sensoriales en un pan con adición de TAGs (EPA+DHA) purificados óptimos.

5.2.4.1. Elaboración de pan

Para la elaboración del pan amasado se recibieron las materias primas y se almacenaron en un lugar fresco y limpio. Se pesaron los ingredientes en una balanza granataria de acuerdo a la **Tabla 3**, y se procedió a mezclar la harina, sal, levadura, el agua (a 50°C) y la mezcla de aceite vegetal con los TAGs de EPA+DHA y se amasó. Una vez formada la masa, se porcionó y dejó fermentar por 1 h a temperatura ambiente, luego se horneó en horno eléctrico a 200°C, por 15 min. Se elaboraron 3 mezclas diferentes conteniendo 40, 70 y 100 mg de EPA+DHA por porción de 100 g de pan.

5.2.4.2 Análisis sensorial.

5.2.4.2.1. Conformación de panel sensorial entrenado

En el laboratorio de Evaluación Sensorial del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se efectuó el entrenamiento y

validación del panel sensorial de acuerdo a lo especificado en la norma ISO 8586:2012 y la norma ISO 11132:2012.

Tabla 3: Ingredientes para la formulación de 1 kg de pan amasado.

INGREDIENTE	CANTIDAD
Harina	1 kg
Levadura	10 g
Sal	10 g
Aceite	100 g
Agua	250 ml

5.2.4.2.2. Elección de jueces

Se reclutaron 12 estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos, pertenecientes a la Universidad de Chile, que habían aprobado la asignatura de Evaluación Sensorial impartida por dicha Universidad, y que tuvieron disponibilidad e interés en participar como jueces. No se realizaron tests adicionales para su selección.

5.2.4.2.3. Entrenamiento de jueces

En la primera sesión de entrenamiento, se realizó una inducción con las características típicas y los defectos del pan amasado. Luego se presentaron tres panes amasados diferentes para la generación de descriptores.

A: Pan amasado Pilmayquen.

B: Amasados Breden Master.

C: Pan amasado elaborado en laboratorio según metodología detallada en el punto **5.2.4.1**. Con 40 mg de EPA+DHA por porción de 100 g de pan.

Los jueces debieron completar una ficha describiendo de manera detallada los atributos de apariencia, aroma, sabor y textura (**Anexo 3**). Finalmente, se realizó una discusión en mesa redonda para seleccionar los descriptores más relevantes.

Con los resultados obtenidos en la primera sesión de entrenamiento se procedió a elaborar una ficha para el perfil descriptivo con escala no estructurada de 10 cm (**Anexo 4**), donde se incluyeron descriptores asociados a un pan amasado con TAGs de EPA y DHA aroma pescado y sabor pescado, además de agregar un descriptor indicativo al deterioro del producto: aroma y sabor a rancio.

En la segunda sesión de entrenamiento se aplicó el perfil descriptivo (**Anexo 4**) donde los jueces evaluaron muestras de pan amasado (**Tabla 4**) en una mesa redonda.

Para orientar a los jueces durante la evaluación, se presentaron patrones de referencia del atributo aroma. Una muestra de aceite de pescado fue el límite superior para aroma pescado (muy intenso) y un aceite vegetal fue el límite inferior (ausente). Para el descriptor aroma a rancio, una mezcla de aceite de vegetal y aceite de pescado fresca fue el límite inferior, y la mezcla de aceite en estado visible de deterioro fue el límite superior.

En total se realizaron 2 sesiones, con los productos especificados en la **Tabla 4**, hasta lograr la no existencia de diferencias significativas entre jueces ($p > 0,05$), para posteriormente efectuar la validación del panel. Los resultados de cada sesión, previo análisis estadístico, fueron entregados a los jueces de manera individual para retroalimentar su desempeño, para así crear compromiso, y mejorar y normalizar su poder discriminativo.

Tabla 4: Muestras evaluadas desde la segunda sesión de entrenamiento del panel sensorial.

Sesión	Parámetro de variación	Muestras evaluadas
2 y 3	Adición de aceite de pescado	1. Pan sin adición de EPA+DHA
		2. Pan con 40 mg de EPA+DHA
		3. Pan con 70 mg de EPA+DHA
		4. Pan con 100 mg de EPA+DHA

5.2.5.2.4. Validación del panel sensorial

Con los jueces previamente entrenados, se procedió a la validación del panel sensorial bajo las directrices de la Norma ISO 11132-2012: “Análisis sensorial. Metodología. Directrices para monitorear el desempeño de un panel sensorial”, la cual proporciona criterios para la evaluación del rendimiento de un panel descriptivo cuantitativo y de cada miembro. Esto comprende la capacidad del panel para detectar, identificar y medir descriptores, usar el test de forma adecuada y repetir sus resultados.

Para dicha validación se evaluaron 2 muestras distintas entre sí. Donde el atributo clave es “sabor pescado” y “aroma a pescado” los cuales son los más relevantes para este estudio.

Muestra 1: Pan con 0% de aceite de pescado (APR)

Muestra 2: Pan con 10% de aceite de pescado (APR)

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico (punto 5.2.5.) a partir del cual se evaluó el desempeño o rendimiento según parcialidad individual, consistencia, repetitividad y capacidad de discriminación de cada juez individual; también se evaluaron otros aspectos como discriminación de atributos clave, homogeneidad, acuerdo entre jueces, consistencia y repetitividad del panel, de acuerdo a lo establecido por la Norma ISO 11132:2012.

5.2.4.2.5. Evaluación sensorial de pan amasado con TAGs de EPA+DHA con panel entrenado.

Se evaluó el efecto de la adición de TAGs de EPA+DHA en el perfil descriptivo del pan amasado mediante la evaluación de una muestra con 40 mg de TAGs de EPA+DHA, con el panel previamente entrenado y validado, utilizando el test de perfil descriptivo con escala lineal no estructurada (**Anexo 4**).

Adicionalmente se realizó una evaluación de preferencia, donde los jueces debieron elegir la muestra de mayor preferencia para ellos asignando una X a la muestra que más les gustó (**Anexo 5**).

5.2.4.3 Caracterización del pan mediante análisis térmico.

Se realizará una caracterización del pan según lo especificado en el punto **5.2.1.3**.

5.2.5. Análisis estadístico.

Los análisis químicos y físicos realizados se hicieron por triplicado. El 95% de intervalo de confianza de cada parámetro fue calculado tomando en cuenta el número de réplicas y considerando la desviación estándar (SD) de cada muestra. Se empleó el software Microsoft Office Excel 2010.

Para la evaluación del pan adicionado de TAGs EPA+DHA, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial de dos vías con un nivel de confianza de 95% para determinar la existencia de diferencias significativas entre muestras y entre jueces ($p < 0,05$). En orden a determinar dónde se encuentran las diferencias, en caso de existir, se aplicó el Test de rangos múltiples (método Tukey). Para llevar a cabo los análisis se utilizó el programa Stat Graphics Centurion XVI.I. Un valor $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo

VI: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del aceite de pescado refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte y aceite vegetal mediante análisis del perfil de ácidos grasos, análisis de estabilidad oxidativa y análisis térmicos.

6.1.1. Caracterización del perfil de ácidos grasos del APR y AV por cromatografía de gas líquido (CGL).

En la **Figura 5** se aprecia el cromatograma de FAME de APR mediante CGL, donde se identificaron 20 *peaks* y la **Figura 6** el cromatograma de FAME de AV en el cual se observan 12 *peaks*.

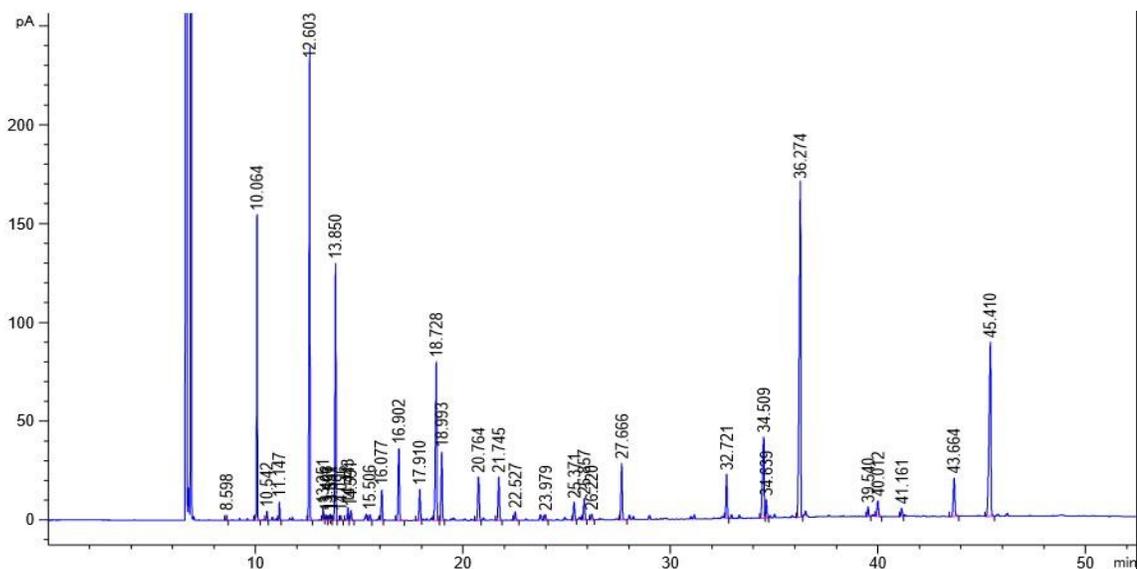


Figura 5: Cromatograma de FAME correspondiente al aceite de pescado refinado comercial OMEGA-3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte (APR).

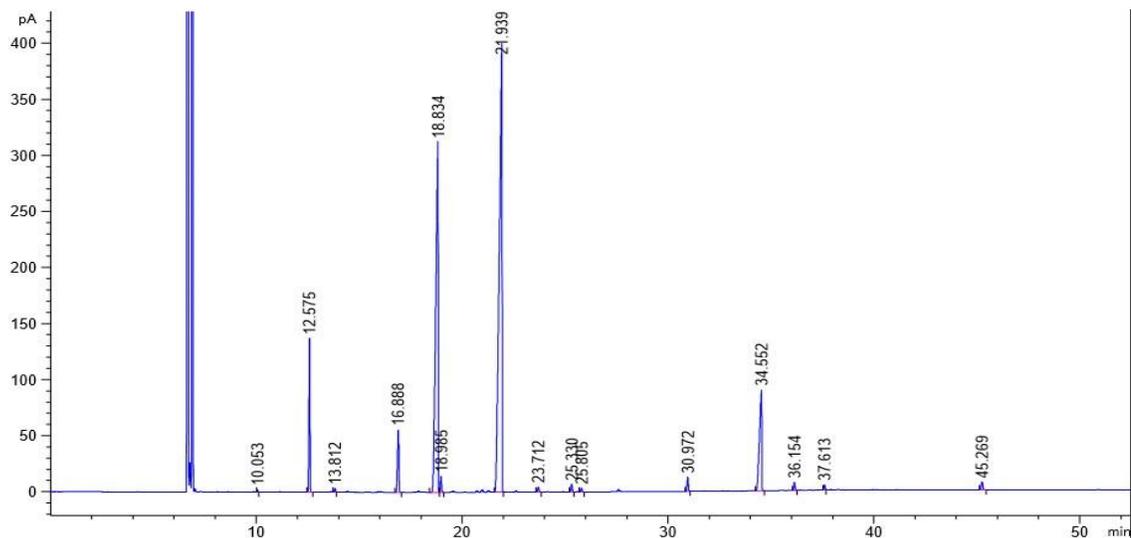


Figura 6: Cromatograma de FAME correspondiente al aceite vegetal(AV)

En la **Tabla 5** se observa la composición de AG del aceite APR. Los ácidos grasos más abundantes expresados en g/100 g de AGT en orden decreciente fueron: C20:5 (EPA) ($20,37 \pm 0,04$), C16:0 ($17,72 \pm 0,06$), C22:6 (DHA) ($13,51 \pm 0,02$), C16:1 9c ($10,12 \pm 0,02$), C18:1 9c ($8,98 \pm 0,03$), C14:0 ($8,70 \pm 0,03$), C18:0 ($3,52 \pm 0,01$), C18:1 11c ($3,58 \pm 0,01$) y C22:5 ($2,58 \pm 0,02$). La distribución de los grupos de AG expresados en g/100 g de AGT indicó: 30,87 (AGS), 13,74 (AGMI), 45,27 (AGPI), 40,34 (AGPI *n*-3) y 36,99 (AGPICL *n*-3) de los cuales 33,88 corresponden a EPA+DHA.

Pando et al. (2014) determinaron la composición de AG de aceite refinado comercial de salmón expresados en g/100 g de AGT; como resultado, los más abundantes fueron C18:1 9c (30,70), C16:0 (14,40), C16:1 9c (4,94), C22:6 (5,54), C20:5 (5,27), C18:0 (3,96), C14:0 (3,47), C18:1 11c (3,33) y C22:5 (2,47). La suma de EPA+DHA fue 10,83, valor 3,1 veces menor que el observado en el APR de este estudio.

Al comparar los grupos de AG obtenidos experimentalmente del APR con la información nutricional proporcionada en la ficha técnica de la empresa SPES, **Anexo 2**, se puede apreciar una diferencia en todos los grupos de ácidos grasos. En **Anexo 2**, se observa 34 g/100 g de aceite para grasa saturada, 27g/100 g de grasa monoinsaturada, 38 g/100 g de grasa poliinsaturados de los cuales 32 g/100 g son omega 3 y 25 g/100 g es EPA+DHA. Esta última cantidad es 1,41 veces menor que la observada en el APR de este estudio.

El aceite vegetal también fue caracterizado mediante CGL. En la **Figura 6** se observan 12 *peaks* que en forma decreciente corresponden a: C18:2 9c12c (52,7±0,02), C18:1 9c (34,96±0,00), C16:0 (5,98±0,01), C18:0 (3,52±0,01); C18:1 11c (0,75±0,00); C22:0 (0,71±0,01); C20:1 9c (0,43±0,00); C20:0 (0,29±0,01); C24:0 (0,25±0,00); C18:3 (0,20±0,02); C16:1 9c (0,14±0,00) y C14:0 (0,07±0,00) g/100g AGT (**Tabla 5**). Estos resultados están dentro de los rangos de AG de aceite de maravilla establecidos en la norma del **Codex (2015)** para aceites vegetales especificados y con los límites establecidos en el **RSA (2015)**. **Bozdogan et al (2018)** identificaron nueve ácidos grasos en el aceite de maravilla, siendo C18:1 9c (68,88) y C18:2 9c12c (21,58) los que se presentan en mayor cantidad. También **Ciappini et al (2016)**, que estudiaron aceite de maravilla refinado encontraron un mayor contenido de C18:1 9c (29,8) y C18:2 9c12c (59,5).

Tabla 5: Composición de ácidos grasos y grupos ácidos grasos del aceite de pescado refinado (APR) y del aceite vegetal (AV). Promedio \pm desviación estándar de triplicados de la medición de AG expresados en g de AG/100 g de AGT.

	AG o grupo de AG		APR (g/100 g AGT)	AV (g/100 g AGT)
1	Láurico	C12:0	0,14 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
2	Mirístico	C14:0	8,70 \pm 0,03	0,07 \pm 0,00
3	Palmítico	C16:0	17,72 \pm 0,06	5,98 \pm 0,01
4	Palmitelaidico	C16:1 9t	0,18 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
5	Palmitoleico	C16:1 9c	10,12 \pm 0,02	0,14 \pm 0,00
6	Heptadecanoico	C17:0	0,49 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
7	Estearico	C18:0	3,52 \pm 0,01	3,52 \pm 0,01
8	Oleico	C18:1 9c (w9)	8,98 \pm 0,03	34,96 \pm 0,00
9	Cis-vaccénico	C18:1 11c (w7)	3,58 \pm 0,01	0,75 \pm 0,00
10	Octadecadienoico	C18:2 9c15c	2,38 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
11	Linoleico	C18:2 9c12c	2,41 \pm 0,01	52,7 \pm 0,02
12	Eicosanoico	C20:0	0,30 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01
13	γ - Linolénico	C18:3 6c9c12c (w6)	0,14 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
14	Eicosenoico	C20:1 9c	1,00 \pm 0,00	0,43 \pm 0,00
15	α Linolénico	C18:3 9c12c15c (w3)	1,12 \pm 0,00	0,20 \pm 0,02
16	Docosanoico	C22:0	0,00 \pm 0,00	0,71 \pm 0,01
17	Eicosatetraenoico	C20:4 5c8c11c14c (w6)	2,23 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00
18	Eicosapentaenoico	C20:5 5c8c11c14c17c (w3)	20,37\pm0,04	0,00\pm0,00
19	Docosatetraenoico α	C22:4 7c10c13c16c (w6)	0,53 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
20	Docosapentaenoico	C22:5 7c10c13c16c19c (w3)	2,58 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00
21	Docosaheptaenoico	C22:6 4c7c10c13c16c19c (w3)	13,51\pm0,02	0,00\pm0,00
22	Tetracosanoico	C24:0	0,00 \pm 0,00	0,25 \pm 0,00
		Total AGS	30,87	10,82
		Total AGM	13,74	36,14
		Total AGPI	45,27	52,90
		Total AGPI <i>n</i>-3	40,34	0,20
		Total AGPICL <i>n</i>-3	36,99	0,00
		EPA+DHA	33,88	0,00

6.1.2. Caracterización del APR y AV mediante análisis de estabilidad oxidativa.

Tabla 6: Caracterización química del aceite de pescado refinado comercial (APR) y aceite vegetal (AV). Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre muestras.

Parámetros de calidad	APR	AV
Ácidos grasos libres (AGL; g ácido oleico/ 100 g aceite)	0,14±0,01 ^a	0,09±0,01 ^b
Valor de Peróxido (VP; meq oxígeno activo/kg aceite)	3,54±0,01 ^a	1,88±0,27 ^b
Valor <i>p</i> -anisidina (VA)	5,76±1,49 ^a	1,77±1,64 ^b
Valor TOTOX (TV)	12,83±1,48 ^a	5,39±1,92 ^b
Valor de Yodo (g yodo/100g aceite)	156,67±2,12 ^a	135,73±4,98 ^b
Dienos conjugados	0,00±0,00 ^a	0,00±0,0001 ^a
Trienos conjugados	0,0013±0,0002 ^a	0,0002±0,0002 ^b

En la **Tabla 6** se observan los datos obtenidos en la caracterización del APR y AV. El valor de AGL indica el grado de deterioro hidrolítico que ha sufrido la materia grasa, siendo una medida de rancidez hidrolítica, los valores habituales para materia grasa refinada deteriorada son de 0,5 a 1,5% (**Masson 1985, FAO 2012**). El APR tiene un valor de AGL de 0,14±0,01 (g ácido oleico/ 100 g aceite), **Pando et al. (2014)** reportaron un valor de 0,23±0,00 (g ácido oleico/ 100 g aceite) para aceite refinado de salmón, **Hernández (2015)** para aceite refinado de salmónidos detectó un valor de 0,30±0,01 (g ácido oleico/ 100 g aceite). De acuerdo a diferentes normas establecidas por organizaciones mundialmente reconocidas como el CODEX, GOED, EFSA y el RSA (**Tabla 7**), el valor de ácidos grasos libres obtenido cumple con los valores establecidos.

El valor de peróxidos determina los hidroperóxidos acumulados correspondientes al primer indicio de rancidez oxidativa; en otras palabras, determina los componentes de la oxidación primaria. Los valores habituales de VP para aceite de pescado refinado es un máximo de 5 meq oxígeno activo/kg

de materia grasa (**Codex, 2017; GOED, 2016**). El valor obtenido de VP en el APR fue $3,54 \pm 0,01$ meq oxígeno activo/kg de aceite, valor similar al obtenido por **Pando et al. (2014)** quienes registraron un valor de $3,54 \pm 0,16$ meq oxígeno activo/kg de aceite, en aceite refinado de salmón. **Hernández (2015)**, en su estudio con aceite refinado de salmónidos, obtuvo un valor de $5,23 \pm 0,05$ meq oxígeno activo/kg de aceite. El APR analizado tiene valores inferiores a lo establecido por las diferentes organizaciones (**Tabla 7**) por lo cual se encuentra dentro del rango aceptable para este parámetro. Además, cumple con la legislación de Canadá NHP Fish oil, Ph Eur Fish oil Type I y II, Br Pharm, Fish oil, Type I y II Australia Natural Fish oil, USP Fis oil (**De Boer et al., 2018**).

Tabla 7: Caracterización química del aceite de pescado refinado y aceite de vegetal de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente: Reglamento sanitario de los Alimentos (RSA, 2015), Codex Alimentarius (CODEX, 2017), Global Organization for EPA and DHA (GOED, 2016) y European Food Safety Authority (EFSA, 2010).

Parámetros de calidad	Aceite refinado de pescado				Aceite vegetal (maravilla)	
	RSA (2015)	CODEX (2017)	GOED (2016)	EFSA (2010)	RSA (2015)	CODEX (2017)
Ácidos grasos libres (AGL; g ácido oleico/100 g aceite)	<0,25%	<1,51%	<0,25%	<0,1%	<0,25	<0,3
Valor de Peróxidos (VP; meq de oxígeno activo /kg de aceite)	<10	<5	<5	<0,1	<10	<10
Valor p-anisidina (VA)		<20	<20			
Valor TOTOX (TV)		<26	<26			

El valor *p*-anisidina (VA) es una medida de la formación de compuestos secundarios de oxidación altamente reactivos con predominio de estructuras

carbonílicas, como aldehídos y cetonas; por otra parte, el valor TOTOX indica el valor de oxidación total (**Wanasundara y Shahidi, 1995**). Para APR, el contenido de VA fue de $5,76 \pm 1,49$, valor inferior a lo establecido por **Codex (2017) y GOED (2016)** que indican un valor límite <20 . En la literatura se determinó un VA de $5,14 \pm 1,02$ y $6,84 \pm 0,46$ por **Pando et al. (2014)** y **Hernández (2015)**, respectivamente, en aceite refinado de salmón. Además, el APR cumple con la legislación de Canadá NHP Fish oil, Ph Eur Fish oil Type I y II, Br Pharm, Fish oil, Type I y II Australia Natural Fishoil, USP Fis oil, para valor *p*-anisidina (**De Boer et al., 2018**). En cuanto a la oxidación total, el TV fue de $12,83 \pm 1,48$ en el APR, lo que indica que los parámetros de oxidación total están bajo el límite establecido por **Codex (2017) y GOED (2016)**, los cuales recomiendan un $TV < 26$.

El valor de yodo indica la medida del promedio de insaturaciones que contienen las grasas y aceites, el APR reflejó un valor de yodo de $156,67 \pm 2,12$, mientras que en la literatura (**Pando et al., 2014**) se indica un valor de 146.55 ± 0.21 para aceite de salmón.

El contenido en dienos y trienos conjugados es un indicador de oxidación primaria. Así, en APR se obtuvo $0,00 \pm 0,00$ de valor dienos y $0,0013 \pm 0,0002$ valor de trienos, los cuales concuerdan con los resultados obtenidos por **Pando et al. (2014)** en aceite de salmón (0.006 ± 0.007 y 0.007 ± 0.006 para dienos y trienos conjugados, respectivamente). Valores cercanos a cero fueron también obtenidos por **Berríos (2017)**.

Dados estos resultados se puede inferir que aceite de pescado refinado comercial OMEGA 3 para alimentos funcionales línea oleosa Forte (APR) no presenta deterioro; por ende, se encuentra en óptimas condiciones de calidad.

En cuanto al aceite vegetal (AV) utilizado, que corresponde a aceite de maravilla, se puede apreciar un valor de AGL de $0,09 \pm 0,01$ g ácido oleico/100 g aceite, lo que equivale a 0,09% de ácido oleico. Este valor es inferior al establecido por

RSA (2015) para aceites comestibles (< 0,25 % de ácido oleico) y al recomendado por **Codex (2017)** que establece un valor límite < 0,3 % de ácido oleico para aceites vegetales. **Bozdogan et al. (2018)** determinaron un valor de 0,81 % de ácido oleico en aceite de girasol, mientras que **Lamas et al. (2016)** obtuvieron un valor de 1,15 % de ácido oleico para aceite de maravilla crudo. **Masson et al. (1997)** estudiaron aceites de maravilla comerciales y obtuvieron valores de AGL entre 0,05 y 0,09 % de ácido oleico, valores muy cercanos a los obtenidos en este estudio.

El VP obtenido fue de $1,88 \pm 0,27$ meq oxígeno activo/kg aceite, el cual está dentro de los límites establecidos por el **RSA (2015)** y el **Codex (2017)** que indican un máximo de 10 meq oxígeno activo/kg aceite para aceites comestibles. Autores como **Lamas et al. (2016)**, **Bozdogan et al. (2018)** y **Masson et al. (1997)** tuvieron como resultados para VP de $3,66 \pm 0,16$, 4,19 y 1,6-3,9 de meq de oxígeno activo/kg de aceite, respectivamente, valores más altos a los obtenidos en este estudio.

Para el valor de *p*-anisidina no existe reglamentación que establezca un límite máximo en aceites vegetales. Sin embargo, en este estudio se obtuvo un valor de $1,77 \pm 1,64$; asimismo, **Nyam et al. (2013)** reportaron un promedio de 2,1; siendo este un valor similar al obtenido en el presente estudio.

Se determinó un valor de yodo de $135,73 \pm 4,98$, el cual está dentro de los parámetros establecidos por el **RSA (2015)** (intervalo 120-140) y el **Codex (2017)** (intervalo 136-148). **Bozdogan et al. (2018)** registraron un valor de 102,02. En cuanto a los valores de dienos y trienos conjugados se obtuvieron valores cercanos a cero, similares a los obtenidos por **Berríos (2017)**.

6.1.3. Caracterización del APR y AV mediante análisis térmicos.

Los análisis físicos se realizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas del perfil de fusión representativos de APR y AV se observan en la **Figura 7**. En ella, se puede destacar claramente la presencia de

5 *peaks* para el APR y 4 *peaks* para el aceite AV. Estos aceites están compuestos por TAG de punto de fusión bajo (TAGPFB), TAG de punto de fusión medio (TAGPFM) y TAG de punto de fusión alto (TAGPFA); en los termogramas se reflejan los *peaks* endotérmicos con sus respectivas temperaturas de fusión máxima, así como el punto de deterioro de los TAG.

De la **Tabla 8** se desprende que el *peak* de los TAGPFB en las dos muestras (APR y AV) se encuentran en $-78,39 \pm 0,69$ °C y $-76,60 \pm 1,59$ °C, respectivamente. Esto es esperable en el APR debido a la presencia de TAG con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. **Toslstorebrov (2014)** indicó que el punto de fusión de los TAG 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. **Hernández (2015) y Rojas (2013)** atribuyen el *peak* a baja temperatura a los AGPICL, principalmente a los ácidos EPA y DHA. En la **Figura 7** y **Tabla 8** se aprecia que el aceite vegetal también presenta un *peak* de baja temperatura a $-76,60 \pm 1,59$, lo cual podría ser debido al contenido de AGPI *n-3* y *n-6* en su composición (52,93 g/100 AGT) (**Tabla 5**). **Berríos (2017)** encontró que el PPFB en aceite de maravilla fue de $-34,78$ °C, que al compararlo con este estudio corresponde al *peak* de TAGPFM.

En cuanto a los rangos de fusión, para el APR fue desde $-80,17$ a $26,35$ °C, lo cual concuerda con resultados obtenidos por **Rojas (2013)** al estudiar aceite de belly. Para el aceite vegetal, el rango de fusión es desde $-79,77$ a $-4,71$ °C, mientras que **Berríos (2017)** indicó un rango de fusión para este mismo aceite de $-41,35$ a $-8,32$ °C.

La **Tabla 8** también indica un punto de temperatura de deterioro oxidativo (PTDO) para el APR de $148,00 \pm 5,53$ °C y de $131,59 \pm 0,00$ °C en el aceite AV.

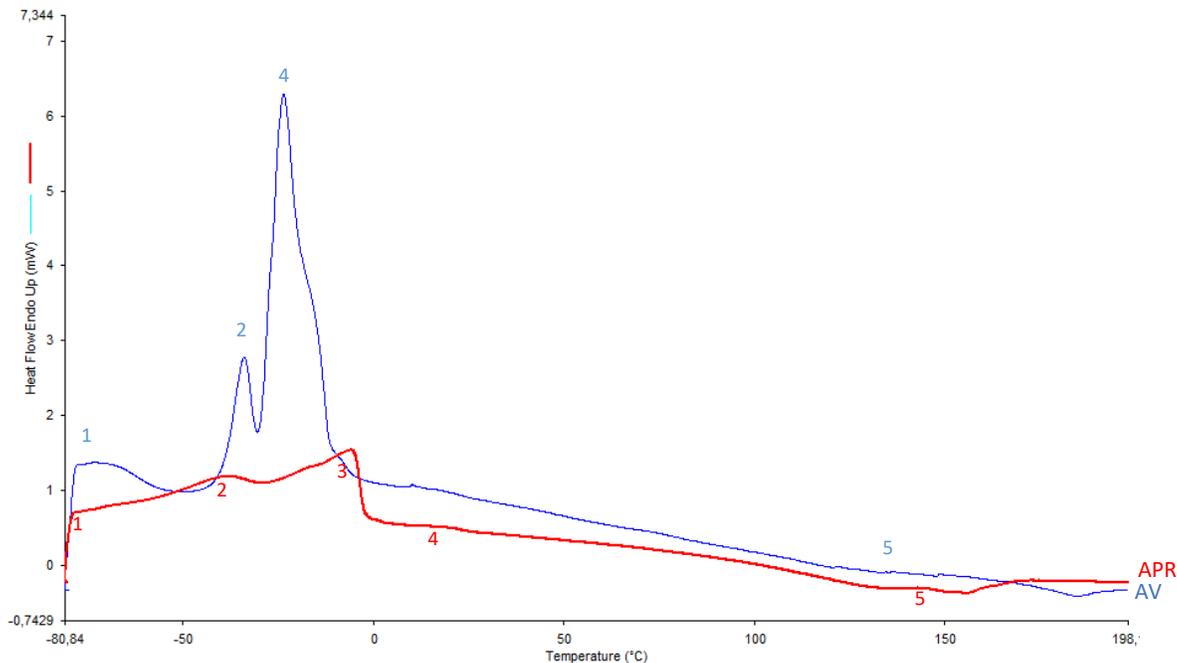


Figura 7: Termogramas de fusión de aceite vegetal (AV) y aceite de pescado refinado comercial (APR) donde 1: PPFB (*Peak* de punto de fusión bajo), 2 y 3: PPFM (*Peak* de punto de fusión medio), 4: PPFA (*Peak* de punto de fusión alto) y 5: PTDO (*Peak* de temperatura de deterioro oxidativo).

Tabla 8: Comportamiento térmico del aceite vegetal de maravilla (AV) y aceite de pescado refinado comercial (APR)

Muestra	Rango de fusión(°C)	ΔH (J/g)	PPFB (°C)	PPFM 1 (°C)
APR	-80,17 a 26,35	133,99±10,99	-78,39±0,69	-39,18±0,71
AV	-79,77 a -4,71	157,13±12,56	-76,60±1,59	-34,28±0,32
Muestra	PPFM 2 (°C)	PPFA (°C)	PTDO (°C)	
APR	-5,55±0,17	20,25±0,12	148,00±5,53	
AV	-23,49±0,05		131,59±0,00	

En la **Figura 8** se observa el contenido de grasa sólida graficado en función de la temperatura para el APR y AV. Se aprecia un comportamiento similar entre la curva de APR y AV. Sin embargo, AV tiene un menor contenido de grasa sólida debido a la mayor cantidad de AGPI *n*-3 que lo compone (**Tabla 5**).

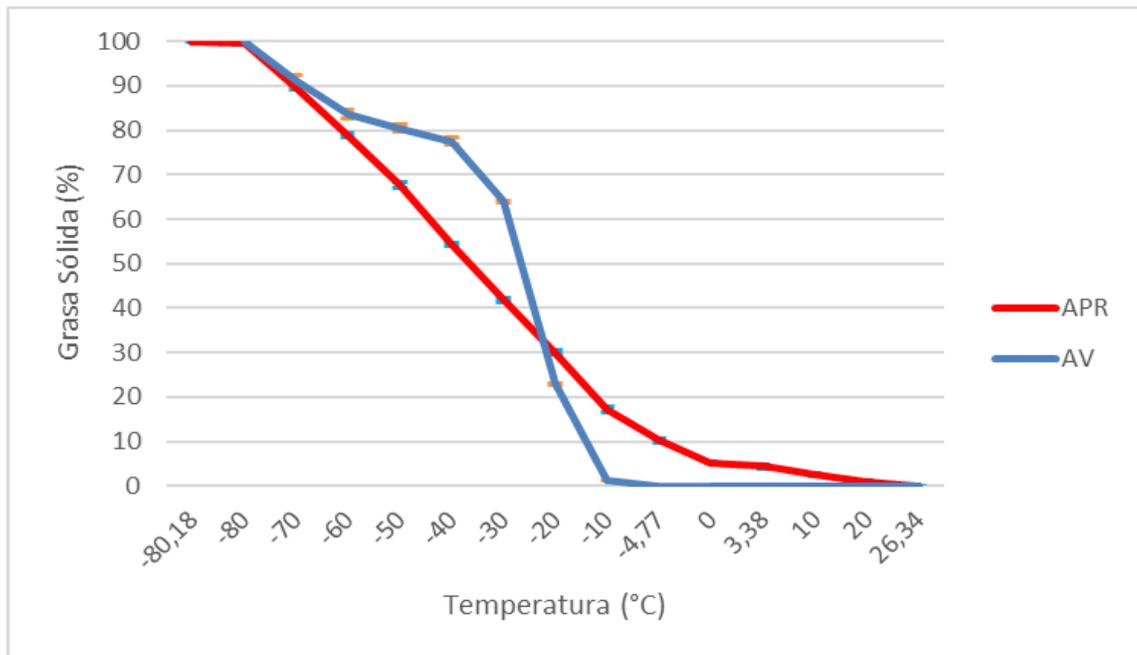


Figura 8: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el APR y AV medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.

6.2. Optimización del proceso de obtención de concentrados de ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 con EPA y DHA a partir del APR mediante saponificación y posterior inclusión con urea.

6.2.1. Estudio del efecto de las variables independientes proporción urea/AGL y temperatura de cristalización sobre el contenido de EPA y DHA.

En la **Tabla 9** se observa el diseño factorial 2^2 con 6 corridas experimentales. Las variables del proceso proporción urea/ácidos grasos libres en g/g (U:AGL), temperatura de cristalización en °C (TC), mientras que los valores experimentales de las variables respuestas fueron contenido de EPA, DHA y EPA+DHA (g/100 g de AGT).

Tabla 9: Diseño experimental y valores obtenidos para las variables respuesta EPA, DHA y EPA+DHA experimentales del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (CAGPICL *n*-3) a partir de aceite APR. U:AGL indica la proporción urea:ácidos grasos libres expresada en g/g, TC indica la temperatura de cristalización en °C, y EPA, DHA y EPA+DHA indican los valores de dichos ácidos expresados en g/100 g AGT.

Ensayo	VARIABLES DEL PROCESO*		VARIABLES RESPUESTA** (Valores experimentales)		
	U:AGL	TC	EPA	DHA	EPA+DHA
1	6	-23	34,06	34,96	69,02
2	10	-23	18,29	28,28	46,57
3	6	-18	29,72	43,51	73,23
4	10	-18	27,14	42,51	69,65
5	8	-20,5	24,50	35,45	59,95
6	8	-20,5	25,60	43,09	68,69

Contreras (2015) encontró las condiciones óptimas para maximizar el contenido de EPA y DHA de un aceite refinado comercial de salmónidos, siendo la relación urea:ácidos grasos libres de 6 g/g, la temperatura de cristalización de -18 °C, el tiempo de la reacción de 14,8 h y la velocidad de agitación de 500 rpm. Por lo cual el diseño realizado se basa en valores cercanos a los obtenidos por **Contreras (2015)**, manteniendo constante en los 6 experimentos el tiempo de reacción (14,8 h) y la velocidad de agitación (500 rpm), variables que no afectan significativamente al proceso de inclusión con cristales de urea (**Contreras, 2015**).

Al cuantificar el contenido de EPA, DHA y EPA+DHA (g/100 g AGT) de los ensayos del diseño experimental de la **Tabla 9**, se realizó un ANOVA para cada variable independiente y se construyeron modelos lineales para cada respuesta: EPA, DHA y EPA+DHA. En términos de sus coeficientes de regresión con las variables independientes U:AGL y TC, se obtuvieron los siguientes modelos:

$$\text{EPA} = -54,0108 + 11,226 \cdot \text{U:AGL} - 4,825 \cdot \text{TC} + 0,6595 \cdot \text{U:AGL} \cdot \text{TC} \quad (1)$$

$$\text{DHA} = 45,7697 + 4,862 \cdot \text{U:AGL} + 0,006 \cdot \text{TC} + 0,284 \cdot \text{U:AGL} \cdot \text{TC} \quad (2)$$

$$\text{EPA+DHA} = -8,24117 + 16,088 \cdot \text{U:AGL} - 4,819 \cdot \text{TC} + 0,9435 \cdot \text{U:AGL} \cdot \text{TC} \quad (3)$$

Tabla10: Análisis de varianza para las respuestas EPA, DHA y EPA+DHA del concentrado de AGPICL *n*-3.

Variable respuesta	Variables del proceso	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
EPA	U:AGL	84,1806	1	84,1806	22,84	0,0411*
	TC	5,08502	1	5,08502	1,38	0,361
	U:AGL-TC	43,494	1	43,494	11,8	0,0753
	Error total	7,37001	2	3,685		
	Total (corr.)	140,13	5			
DHA	U:AGL	14,7456	1	14,7456	0,86	0,4516
	TC	129,732	1	129,732	7,57	0,1106
	U:AGL-TC	8,0656	1	8,0656	0,47	0,5636
	Error total	34,2808	2	17,1404		
	Total (corr.)	186,824	5			
EPA+DHA	U:AGL	169,39	1	169,39	8,84	0,0969
	TC	186,186	1	186,186	9,72	0,0893
	U:AGL-TC	89,0192	1	89,0192	4,65	0,1639
	Error total	38,3118	2	19,1559		
	Total (corr.)	482,907	5			

* Diferencias significativas $P < 0,05$; U:AGL es la proporción urea ácidos grasos libres (g/g), TC es la temperatura de cristalización (°C) y U:AGL-TC es la interacción entre U:AGL y TC.

El R^2 es de 94,74%, 81,65% y 92,07% para EPA, DHA y EPA+DHA, respectivamente, y el R^2 ajustado es de 86,85% en EPA, 54,13% en DHA y 80,17% en EPA+DHA. Estos valores indican que los modelos representan adecuadamente la variabilidad de los resultados. **Contreras (2015)** encontró valores de R^2 ajustado para EPA, DHA y EPA+DHA de 84,0 %, 81,0 % y 80 %, respectivamente, en aceite refinado comercial de salmónidos. **Liu et al. (2006)**

estudiaron concentrado de aceite de atún siendo R^2 de 0,97 % para el contenido total de EPA y DHA.

En el análisis de varianza (**Tabla 10**) sólo se observan diferencias significativas en la variable proporción urea:ácidos grasos libres (U:AGL) para la respuesta EPA ($p < 0,05$). La variable de proceso temperatura de cristalización (TC) y la interacción de U:AGL y TC no presentaron diferencias significativas para ninguna de las tres variables respuestas (EPA, DHA y EPA+DHA) ($p > 0,05$). Resultados similares fueron obtenidos por **Contreras (2015)**; su estudio indica que para EPA, la variable U:AGL afectó significativamente al proceso y la variable TC no fue significativa. **Liu et al. (2006)** encontraron que las variables U:AGL y TC fueron significativas en el contenido total de EPA+DHA.

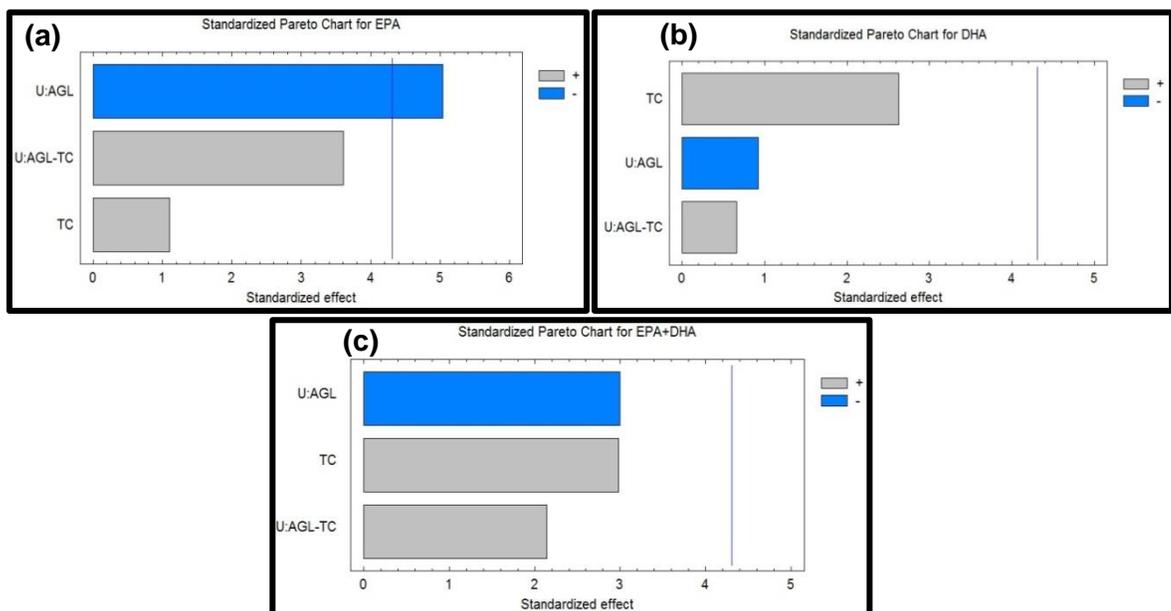


Figura 9: Diagramas de Pareto estandarizados que muestran el efecto de las variables de proceso sobre la cantidad de EPA (a), DHA (b) y EPA+DHA (c)

La **Figura 9** muestra los gráficos de Pareto con las variables principales que afectan el proceso de obtención de concentrado de AGPICL $n-3$. La línea azul vertical representa diferencias significativas ($p < 0,05$). Solo en la respuesta EPA

se obtuvo que la variable U:AGL influye significativamente el proceso. Es decir, cuando la relación U:AGL es menor se obtiene un máximo contenido de EPA.

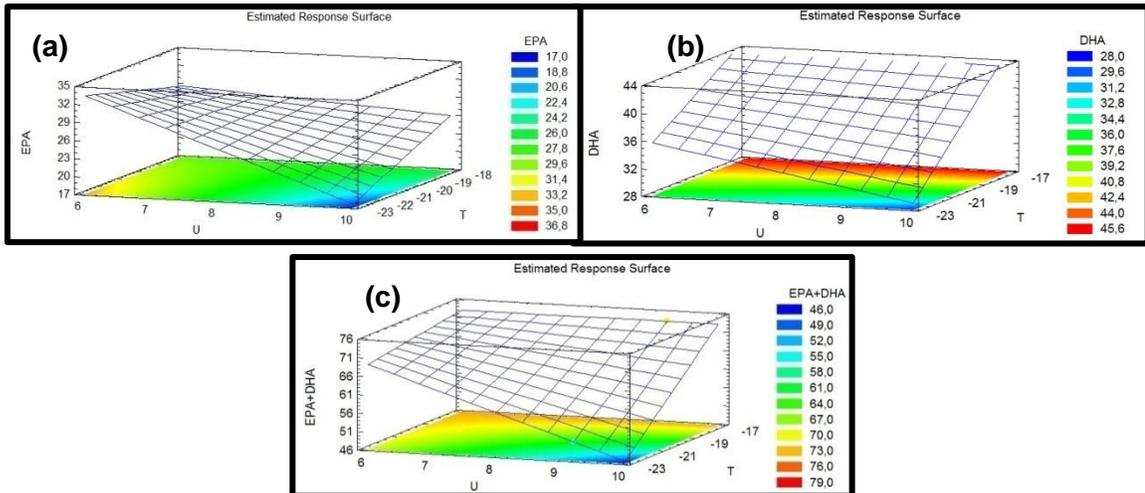


Figura 10: Gráficos de superficie respuesta que muestran el efecto de las variables de proceso sobre la cantidad de EPA (a) DHA (b) y EPA+DHA (c)

En la **Figura 10** se muestran las representaciones tridimensionales de gráficos de superficie respuesta y contorno, donde se puede observar cómo influyen las principales variables del proceso (U:AGL y TC). De estas gráficas se desprende que la relación U:AGL afecta de manera inversa y TC de manera directa en las tres variables respuesta; es decir, a menor relación U:AGL y a mayor TC, el contenido de EPA y DHA aumenta en el concentrado AGPICL *n*-3. Este análisis de variables muestra resultados muy similares a los obtenidos por **Liu et al. (2006)**, **Contreras (2015)** y **Thammapat et al. (2016)**, donde el contenido de EPA y DHA en el concentrado AGPICL *n*-3 aumenta con la disminución la proporción U:AGL y con la disminución de la temperatura de cristalización.

6.2.2. Determinación de las condiciones de la inclusión por cristales de urea que permitan maximizar el contenido AGPI *n*-3 (EPA y DHA) en los concentrados.

Tabla 11: Valores óptimos predichos de las variables de proceso U:AGL (g/g) y TC (°C) para maximizar las respuestas EPA, DHA, EPA+DHA (g/100 g de AGT) y optimización conjunta.

Optimización	U:AGL	TC	Punto estacionario	Valor predicho
EPA	6	-23,00	Máximo	33,31
DHA	6	-18,00	Máximo	44,16
EPA+DHA	6	-18,00	Máximo	73,13
Optimización conjunta	6	-18,68	Máximo	EPA:29,56 DHA:43,0 EPA+DHA: 73,04

En la **Tabla 11** se observan los valores predichos obtenidos a partir de la metodología superficie respuesta, donde las variables U:AGL y TC se ajustaron para maximizar las respuestas EPA, DHA y EPA+DHA en el proceso de complejación con cristales de urea. El contenido máximo de EPA y DHA predicho es de 33,31 y 44,16 (g/100 g de AGT), respectivamente; siendo en ambos casos la proporción U:AGL de 6,0 g/g y la TC de -23 °C para EPA y -18°C para DHA. En la **Tabla 11** también se aprecian los valores que maximizan en forma conjunta la respuesta EPA y DHA mediante una optimización conjunta, donde se busca una máxima deseabilidad (valor 1) lo que indicaría el máximo contenido de las variables respuestas (**Figuras 11 a y 11 b**). Se obtuvo una deseabilidad máxima de 0,85 donde el contenido de EPA, DHA y EPA+DHA es de 29,56, 43,00 y 73,04 (g/100 g AGT), respectivamente; estos valores se obtienen con el mínimo valor de U:AGL (6,0 g/g) y mayor TC (-18,68°C). **Contreras (2015)** obtuvo condiciones óptimas de -18 °C y 6 g/g de las variables TC y U:AGL, respectivamente, con valores óptimos de 31,2 para EPA, 49,31 para DHA y 80,51 para EPA+DHA.

Thammapat et al. (2016) obtuvieron un máximo de EPA+DHA de 90,71 con una temperatura de $-19,73^{\circ}\text{C}$ y un valor de U:AGL de 3,89 g/g.

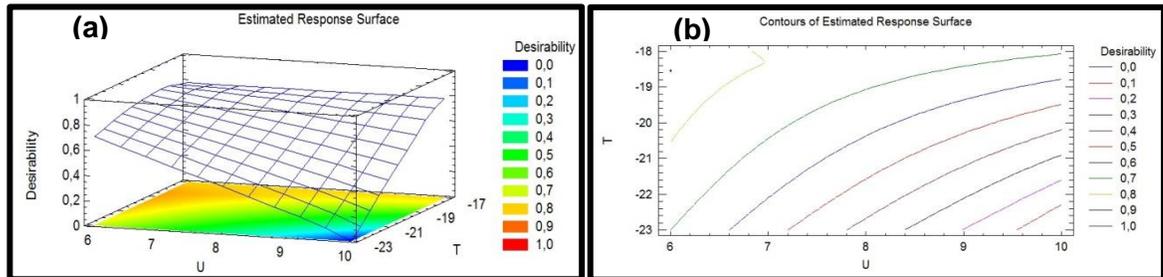


Figura 11:(a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA+DHA. (b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.

En las **Figuras 11 a y 11 b** se muestran los valores que maximizan el contenido de EPA, DHA y EPA+DHA, los cuales se obtienen cuando la deseabilidad es 1 o cercana a este.

6.2.3. Validación de las condiciones óptimas del modelo de forma experimental

La validación de la optimización conjunta (**Tabla 11**) se realizó experimentalmente en el laboratorio con las condiciones presentadas en la **Tabla 12**. Se puede apreciar que los valores obtenidos experimentalmente en la validación fueron mayores a los predichos para el concentrado de AGPICL *n-3* de APR, siendo de 34,71, 48,37 y 83,08 (g/100 g AGT) para EPA, DHA y EPA+DHA, respectivamente. **Contreras (2015)** obtuvo en la validación valores experimentales similares a los de este estudio, pero menores a los predichos para la respuesta DHA y EPA+DHA al trabajar con concentrado de aceite refinado comercial de salmónidos bajo condiciones similares de U:AGL y TC. Así, **Contreras (2015)** obtuvo valores experimentales de 49,31 y 80,51 (g/100 g AGT), siendo los valores predichos 62,94 y 90,07 (g/100 g AGT) para DHA y EPA+DHA, respectivamente.

Cabe hacer notar que en el estudio realizado por **Pando et al. (2014)** en concentrado de aceite de salmón refinado sin optimizar se obtuvieron valores de EPA, DHA y EPA+DHA de 18,26, 14,50 y 32,76 (g/100g AGT), respectivamente.

Tabla 12: Validación experimental de la optimización de respuesta múltiple de las variables respuestas para concentrado de aceite APR.

Variable respuesta	Variables independientes		Punto estacionario	Valor experimental
	U:AGL	TC		(g /100 g AGT)
EPA	6	-19	Máximo	34,71
DHA				48,37
EPA+DHA				83,08

6.2.4. Caracterización del concentrado de AGPICL *n*-3 óptimo (CAGPICL *n*-3) validado experimentalmente mediante CGL.

En la **Tabla 13** se muestran los resultados del concentrado de ácidos grasos poliinsaturados con un máximo contenido de *n*-3 particularmente EPA y DHA.

Al observar las cantidades de los diferentes ácidos grasos que componen las muestras de aceite APR y CAGPICL *n*-3 (**Tabla 13**), se percibe que los ácidos grasos saturados disminuyen notoriamente su contenido de 30,87 g/100 g AGT en APR a 1,38 g/100 g AGT en CAGPICL *n*-3, lo que implica una reducción de un 95,5 %. Es de destacar que ácidos como C12:0, C16:0 y C18:0 no son detectables en este último. Algo similar ocurre con los ácidos grasos monoinsaturados que disminuyen su presencia desde un valor de 13,74, hasta 0,57 g/100 g AGT, en APR y CAGPICL *n*-3, respectivamente, suponiendo una reducción de 95,9 %.

Por otro lado, el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados incrementa de 45,27 g/100 g AGT en APR a 95,83 g/100 g AGT en CAGPICL *n*-3, lo cual es un aumento de 111,7%. Asimismo, el contenido en EPA+DHA incrementa un

137,1% en el CAGPICL *n*-3 maximizado, pasando de 33,88 g/100 g AGT en APR a 80,34 g/100 g AGT en CAGPICL *n*-3.

Tabla 13: Composición de AG y grupos AG del aceite de pescado refinado comercial (APR) y del concentrado AGPICL *n*-3 óptimo a partir del aceite APR (CAGPICL *n*-3)

	AG o grupo de AG	APR (g/100 g AGT)	CAGPICL <i>n</i> -3 (g/100 g AGT)	Diferencia entre APR y CAGPICL <i>n</i> -3 (%)*
1	C12:0	0,14±0,00	0,00±0,00	(-)100,00
2	C14:0	8,70±0,03	0,17±0,00	(-)98,04
3	C16:0	17,72±0,06	0,00±0,00	(-)100,00
4	C16:1 9t	0,18±0,00	0,00±0,00	(-)100,00
5	C16:1 9c	10,12±0,02	2,22±0,01	(-)78,06
6	C17:0	0,49±0,00	0,30±0,01	(-)38,77
7	C18:0	3,52±0,01	0,00±0,00	(-)100,00
8	C18:1 9c (w9)	8,98±0,03	0,00±0,00	(-)100,00
9	C18:1 11c (w7)	3,58±0,01	0,00±0,00	(-)100,00
10	C18:2 9c15c	2,38±0,01	8,19±0,03	(+)244,12
11	C18:2 9c12c	2,41±0,01	0,78±0,01	(-)67,63
12	C20:0	0,30±0,01	0,91±0,00	(+)203,33
13	C18:3 (w6)	0,14±0,00	0,00±0,00	(-)100,00
14	C20:1 9c	1,00±0,00	0,57±0,00	(-)43,00
15	C18:3 (w3)	1,12±0,00	0,00±0,00	(-)100,00
16	C22:0	0,00±0,00	0,00±0,00	-
17	C20:4 (w6)	2,23±0,01	1,59±0,00	(-)28,69
18	C20:5 (w3)	20,37±0,04	34,05±0,14	(+)67,16
19	C22:4 (w6)	0,53±0,00	2,89±0,01	(+)445,28
20	C22:5 (w3)	2,58±0,02	2,04±0,01	(-)20,93
21	C22:6 (w3)	13,51±0,02	46,29±0,19	(+)242,63
22	C24:0	0,00±0,00	0,00±0,00	-
	Total AGS	30,87	1,38	(-)95,53
	Total AGM	13,74	0,57	(-)95,85
	Total AGPI	45,27	95,83	(+)111,68
	Total AGPI <i>n</i>-3	40,34	86,86	(+)115,32
	Total AGPICL <i>n</i>-3	36,99	85,27	(+)130,52
	EPA+DHA	33,88	80,34	(+)137,13

*(-) indica disminución y (+) indica aumento en el contenido de AG.

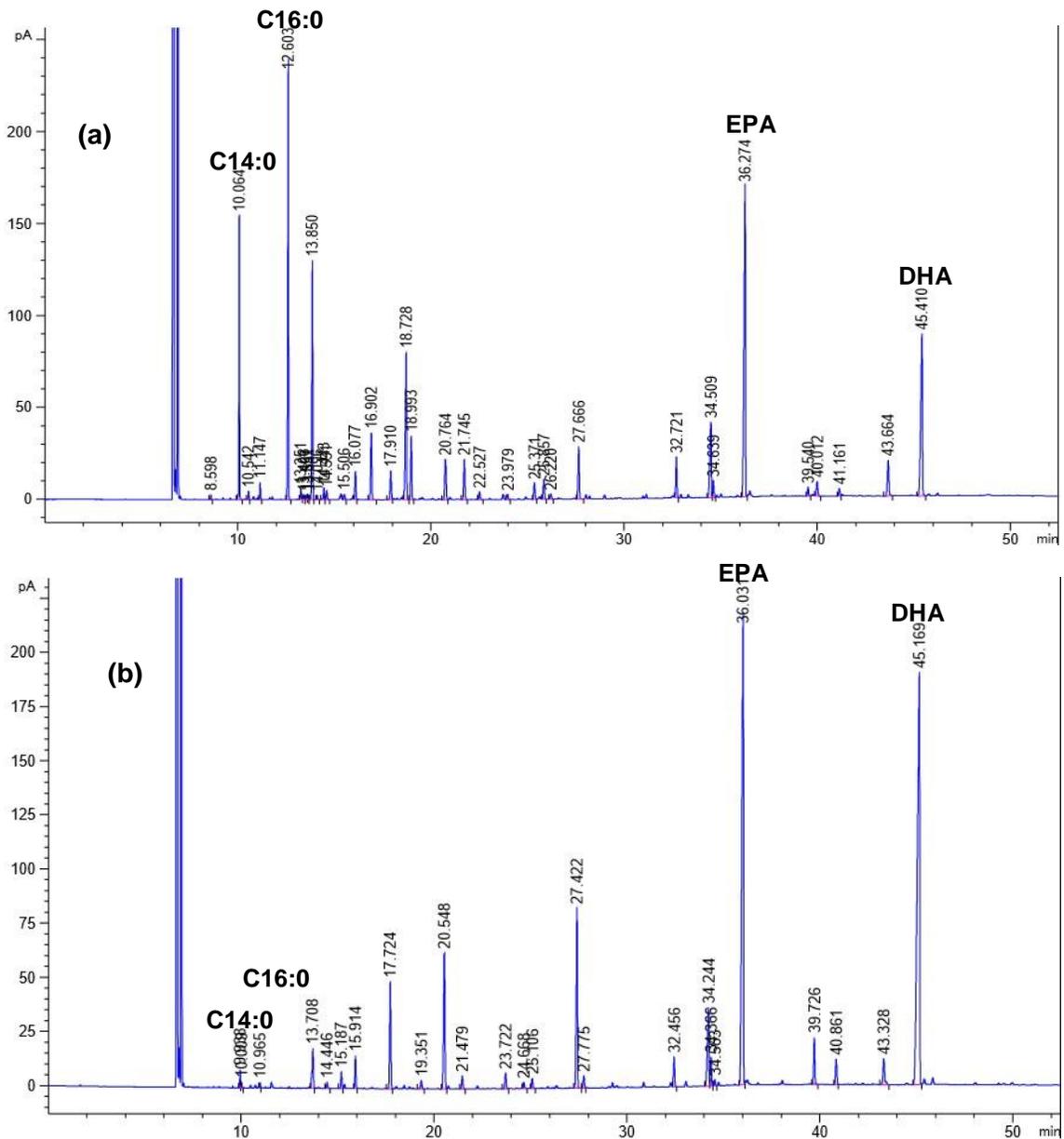


Figura 12: Cromatograma de FAME donde (a) es el aceite APR y (b) es el concentrado AGPICL *n*-3 óptimo (CAGPICL *n*-3).

La composición de los ácidos grasos del aceite APR y del CAGPICL *n*-3 óptimo, en el cual se obtuvo el máximo contenido de EPA+DHA, se puede apreciar en la **Figura 12** y en la **Tabla 13**. En el CAGPICL *n*-3 se observan 12 *peaks* de los 20 que tiene el APR. Esto indica que, posteriormente al proceso de inclusión con

cristales de urea para concentrar los AGPI desaparecen 8 AG. Los AG predominantes del CAGPICL *n*-3 (**Tabla 13**) son: C22:6 (46,29±0,19), C20:5 (34,05±0,14); C18:2 9c,15c (8,19±0,03); C22:4 (2,89±0,01); C16:1 9c (2,22±0,01) y C22:5 (2,04±0,01). Los AG que predominan en el concentrado de aceite de salmón refinado sin optimizar, de acuerdo a **Pando et al. (2014)**, fueron: C18:2 9c, 12c (27,53); C22:6 (18,26); C20:5 (14,50) y C18:1 9c (10,09).

En la **Figura 10** se observa claramente cómo las áreas de los *peaks* de los AG EPA y DHA contenidos naturalmente por el aceite APR (**Figura 12 a**) se ven aumentadas en gran medida en CAGPICL *n*-3 de APR (**Figura 12 b**), mientras que el área de los *peaks* de los ácidos grasos saturados se reduce o desaparece, como el caso de los ácidos C16:0 y C14:0, respectivamente.

6.2.5. Caracterización del CAGPICL *n*-3 mediante análisis de estabilidad oxidativa.

Tabla 14: Caracterización química del CAGPICL *n*-3 obtenido a partir de APR.

Parámetros de calidad	CAGPI <i>n</i> -3
Ácidos grasos libres (AGL; g ácido oleico/100 g aceite)	-
Valor de Peróxido (VP; meq oxígeno activo/kg aceite)	4,79±0,44
Valor <i>p</i> -anisidina (VA)	11,86±0,06
Valor TOTOX (TV)	21,11±0,35
Valor de yodo (g iodo/100g aceite)	190,87±1,21
Valor de dienos conjugados	0,0002±0,0001
Valor de trienos conjugados	0,0028±0,0001

El valor máximo aceptado de peróxidos para concentrados de aceite de pescado es de 5 meq oxígeno activo/kg de materia grasa **Tabla 15 (Codex, 2017; GOED, 2016)**. En este estudio, el CAGPICL *n*-3 tiene 4,79±0,44 meq oxígeno activo/kg de materia grasa, valor menor a lo establecido por CODEX y GOED. El valor *p*-anisidina del CAGPICL *n*-3 (**Tabla 14**) fue de 11,86±0,06 y el valor TOTOX fue 21,11±0,35, ambos valores menores a lo establecido por las diferentes

normativas para concentrados de aceite de pescado (**Tabla 15**). Estos datos indican que el CAGPICL *n*-3 está en óptimas condiciones y cumple los límites establecidos por las distintas normativas existentes para concentrados de aceites de pescado.

Tabla 15: Caracterización química de concentrado de aceite de pescado de acuerdo a organismos reconocidos mundialmente: Reglamento Sanitario de los Alimentos (**RSA, 2015**), Codex Alimentarius (**CODEX, 2017**), Global Organization for EPA and DHA (**GOED, 2016**) y European Food Safety Authority (**EFSA, 2010**).

Parámetros de calidad	Concentrados de aceite de pescado		
	CODEX (2017)	GOED (2016)	EFSA (2010)
Ácidos grasos libres (AGL; g ácido oleico/100 g aceite)	<1,51%	<1,51%	<1%
Valor de Peróxido (VP; meq de oxígeno activo /kg de aceite)	<5	<5	<2,5
Valor <i>p</i> -anisidina (VA)	<20	<20	<20
Valor TOTOX (TV)	<26	<26	<25

6.2.6. Caracterización del CAGPICL *n*-3 mediante análisis térmicos.

Los termogramas del perfil de fusión representativos de APR y CAGPICL *n*-3 se observan en la **Figura 13**, denotándose claramente 5 *peaks* en cada una de las dos muestras. El CAGPICL *n*-3 está compuesto de AG de punto de fusión bajo (AGPFB), AG de punto de fusión medio (AGPFM) y AG de punto de fusión alto (AGPFA), observándose en el termograma el punto donde comienza el deterioro de los AG.

De la **Tabla 16** se desprende que el *peak* de los AG PFB (PPFB) del CAGPICL *n*-3 se encuentra en $-76,41 \pm 1,87$ °C, valor similar al PPFB del APR $-78,39 \pm 0,69$ °C, lo que se asocia a los TAG que contienen AGPI. Además, el CAGPICL *n*-3 presenta dos *peak* de AG de PFM (PPFM), uno a $-13,4 \pm 0,45$ °C y otro a -

1,41±0,59 °C. El *peak* de AG de PFA (PPFA) del CAGPICL *n*-3 coincide con el del APR detectándose el primero a 20,09±0,00 °C y el otro a 20,25±0,12 °C.

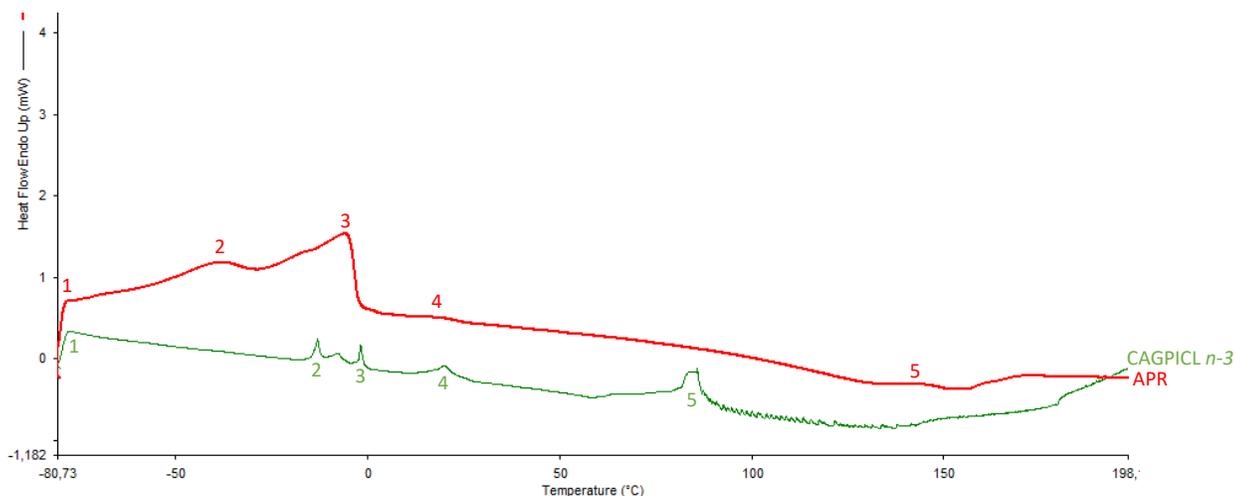


Figura 13: Termogramas de fusión de CAGPICL *n*-3 y APR donde 1 es el PPFB (*Peak* de punto de fusión bajo), 2 y 3 son los PPFM (*Peaks* de punto de fusión medio), 4 es el PPFA (*Peak* de punto de fusión alto) y 5 es el PTDO (*Peak* de temperatura de deterioro oxidativo).

Tabla 16: Comportamiento térmico del aceite de pescado refinado comercial (APR) y del concentrado AGPICL *n*-3 (CAGPICL*n*-3)

Muestra	Rango de fusión(°C)	ΔH (J/g)	PPFB (°C)	PPFM 1 (°C)
APR	-80,17 a 26,35	133,99±10,99	-78,39±0,69	-39,18±0,71
CAGPICL <i>n</i> -3	-77,21 a 3,61	69,68±12,13	-76,41±1,87	-13,4±0,45
Muestra	PPFM 2 (°C)	PPFA (°C)	PTDO (°C)	
APR	-5,55±0,17	20,25±0,12	148±5,53	
CAGPICL <i>n</i> -3	-1,41±0,59	20,09±0,00	74,25±16,38	

El rango de fusión (**Tabla 16**) para el CAGPICL *n*-3 comienza en -77,21 hasta 3,61 °C; este rango concuerda con los resultados obtenidos por **Rojas (2013)** al

estudiar concentrados a partir de aceite de *belly* de trucha arcoíris, siendo el rango de fusión de -70 a 0 °C.

La entalpía de fusión para el CAGPICL *n*-3 fue de 69,68±12,13 J/g, menor que la observada para APR 133,99±10,99 J/g, y también se determinó el *peak* donde comienza el deterioro térmico que para CAGPICL *n*-3 fue a 74,25±16,38 °C (Tabla 16).

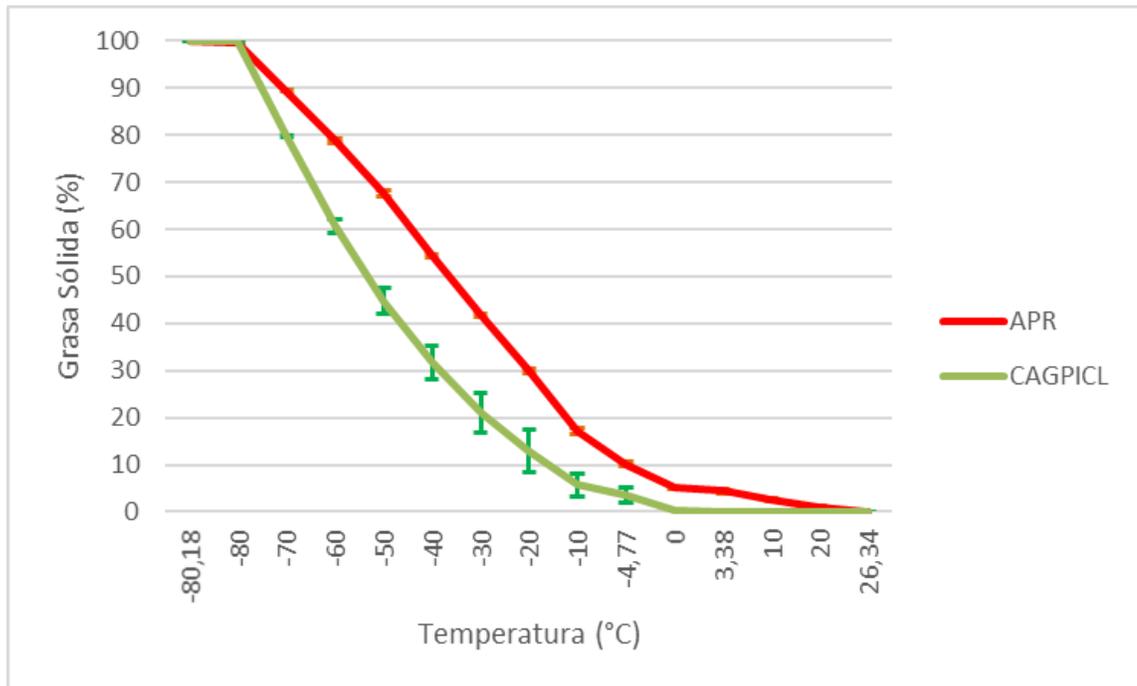


Figura 14: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el APR y CAGPICL *n*-3 medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.

En la **Figura 14** se observa el contenido de grasa sólida graficado en función de la temperatura para el APR y CAGPICL *n*-3. Existe un comportamiento similar entre la curva de APR y CAGPICL *n*-3, aunque CAGPICL *n*-3 tiene un menor contenido de grasa sólida debido a que tiene una mayor cantidad de AGPI *n*-3

incluidos el EPA y DHA. Se aprecia que a 0 °C el CAGPICL *n*-3 tiene un 0% de grasa sólida, lo que indica que desde esa temperatura está totalmente fundido.

6.3. Obtención de triacilglicéridos estructurados con EPA+DHA purificados mediante la optimización las variables de proceso de acidólisis enzimática (Lipasa B., *Candida antarctica*) bajo scCO₂: presión de CO₂ supercrítico y concentración de enzima, para maximizar el contenido de EPA+DHA y determinar la temperatura de deterioro oxidativo de los triacilglicéridos estructurados obtenidos.

6.3.1. Análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de los TAGs purificados.

La **Figura 15** representa el análisis por cromatografía en capa fina del APR, CAGPICL *n*-3, triacilglicéridos estructurados no purificados (TAGs NP) y triacilglicéridos estructurados purificados (TAGs P). En ella se observa claramente que el proceso de purificación se llevó a cabo de manera satisfactoria ya que solamente se tienen triacilglicéridos en los carriles 4 y 5 que corresponden a los TAGs P; en los carriles 3 y 6 se observan TAG y AGL, lo cual es representativo de los TAGs NP que son mezclas que pueden tener triacilglicéridos, monoacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres. El aceite APR está compuesto solo por TAG (carriles 1 y 8), mientras que el concentrado está únicamente constituido por AGL (carriles 2 y 7). **Encina (2015)** logró identificar mediante TLC diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres y triacilglicéridos en una mezcla constituida por estos componentes. **Hernández (2015)** identificó TAG en aceite de salmón y concentrado AGPICL *n*-3.

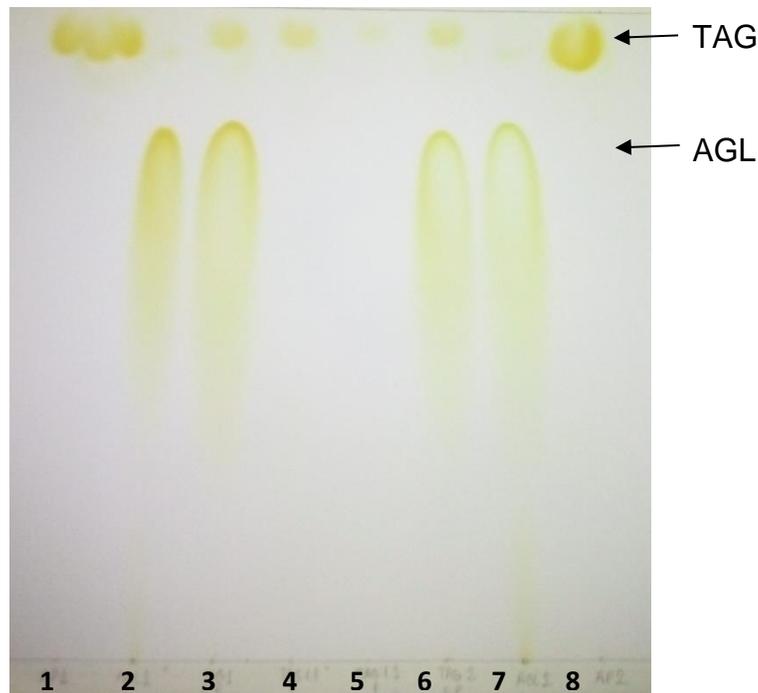


Figura 15: TLC correspondiente a carriles 1 y 8 (aceite de pescado refinado comercial, APR), carriles 2 y 7 (concentrado de AGPICL *n*-3, CAGPICL *n*-3), carriles 3 y 6 (triacilglicéridos estructurados no purificados, TAGs NP), carriles 4 y 5 (triacilglicéridos estructurados purificados, TAGs P).

6.3.2. Estudio del efecto de las variables independientes (presión de scCO₂ y concentración de enzima (*Candida antarctica*) sobre el contenido del EPA+DHA y el deterioro oxidativo.

La **Tabla 17** muestra las combinaciones de las variables independientes del proceso de acidólisis enzimática con el fin de obtener TAGs con un máximo contenido de EPA y DHA con máxima temperatura de deterioro oxidativo. Se tiene el diseño factorial 2² con 6 corridas experimentales, en el cual las variables del proceso son: presión scCO₂ en bar (PscCO₂), y concentración de enzima en % del sustrato (CE); asimismo, la **Tabla 17** refleja los valores experimentales de las variables respuesta contenido de EPA en g/100 g de AGT (EPA), contenido

de DHA en g/100 g de AGT (DHA) y temperatura de deterioro oxidativo (TDO) en °C.

Tabla 17: Diseño factorial 2² de la acidólisis enzimática para obtener TAGs con un máximo contenido de EPA y DHA con mínimo deterioro oxidativo. PscCO₂ es la presión scCO₂, expresada en bar, CE es la concentración de enzima, en % de sustrato, EPA y DHA son los contenidos en dichos ácidos, expresados en g/100 g AGT y TDO es la temperatura de deterioro oxidativo, en °C.

Ensayo	Variables de proceso		Variables respuesta		
	PscCO ₂	CE	EPA	DHA	TDO
1	200	2,5	14,35	8,72	86
2	300	2,5	16,95	9,52	64
3	200	7,5	15,44	9,15	54
4	300	7,5	18,33	11,65	69
5	250	5,0	16,48	9,52	69
6	250	5,0	16,57	10,53	37

Al cuantificar el contenido de EPA y DHA (g/100 g AGT) y la temperatura de deterioro oxidativo observado en la **Tabla 17**, se realizó un ANOVA para cada variable independiente y se construyeron modelos lineales para cada respuesta (EPA, DHA y TDO). Los modelos en términos de sus coeficientes de regresión con las variables independientes PscCO₂ y CE fueron:

$$\text{EPA} = 8,98083 + 0,02455 \cdot \text{PscCO}_2 + 1,02 \cdot \text{CE} + 0,0058 \cdot \text{PscCO}_2 \cdot \text{CE} \quad (4)$$

$$\text{DHA} = 8,69333 - 0,0005 \cdot \text{PscCO}_2 - 5,94 \cdot \text{CE} + 0,034 \cdot \text{PscCO}_2 \cdot \text{CE} \quad (5)$$

$$\text{TDO} = 177,917 - 0,405 \cdot \text{PscCO}_2 - 212,0 \cdot \text{CE} + 0,74 \cdot \text{PscCO}_2 \cdot \text{CE} \quad (6)$$

El R² es de 98,99%; 89,38% y 39,50% para EPA, DHA y TDO, respectivamente. Esto indica que los modelos representan de manera adecuada la variabilidad de los resultados.

Tabla 18: Análisis de varianza para las respuestas EPA, DHA y temperatura de deterioro de los TAGs. *Diferencias significativas $P < 0,05$.

Variable respuesta	Variable independiente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Valor P
EPA	PscCO ₂	7,53502	1	7,53502	162,99	0,0061*
	CE	0,021025	1	0,021025	0,45	0,5696
	PscCO ₂ -CE	1,52523	1	1,52523	32,99	0,029*
	Total error	0,0924583	2	0,0462292		
	Total (corr.)	9,17373	5			
DHA	PscCO ₂	2,7225	1	2,7225	9,02	0,0953
	CE	0,7225	1	0,7225	2,39	0,2619
	PscCO ₂ -CE	1,6384	1	1,6384	5,43	0,1452
	Total error	0,603683	2	0,301842		
	Total (corr.)	5,68708	5			
TDO	PscCO ₂	12,25	1	12,25	0,03	0,8788
	CE	342,25	1	342,25	0,83	0,4578
	PscCO ₂ -CE	182,25	1	182,25	0,44	0,574
	Total error	822,083	2	411,042		
	Total (corr.)	1358,83	5			

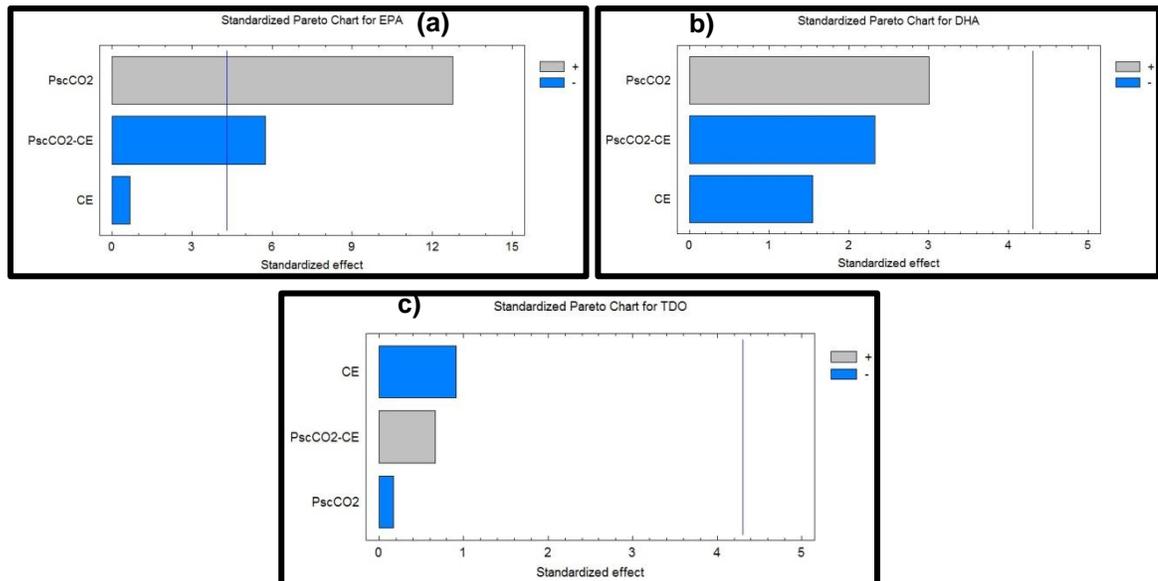


Figura 16: Diagramas de Pareto estandarizados que muestran el efecto de las variables independientes sobre la cantidad de EPA (a), DHA (b) y TDO (c)

De acuerdo con el análisis de varianza, en la **Tabla 18** sólo se observan diferencias significativas en la variable presión scCO₂ (PscCO₂) y en la interacción entre presión scCO₂-concentración de enzima (PscCO₂-CE) para la respuesta EPA ($p < 0,05$). La concentración de enzima (CE) no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguna de las tres variables respuesta (EPA, DHA y TDO). Las variables PscCO₂ y la interacción PscCO₂-CE no afectaron significativamente a las respuestas DHA y TDO.

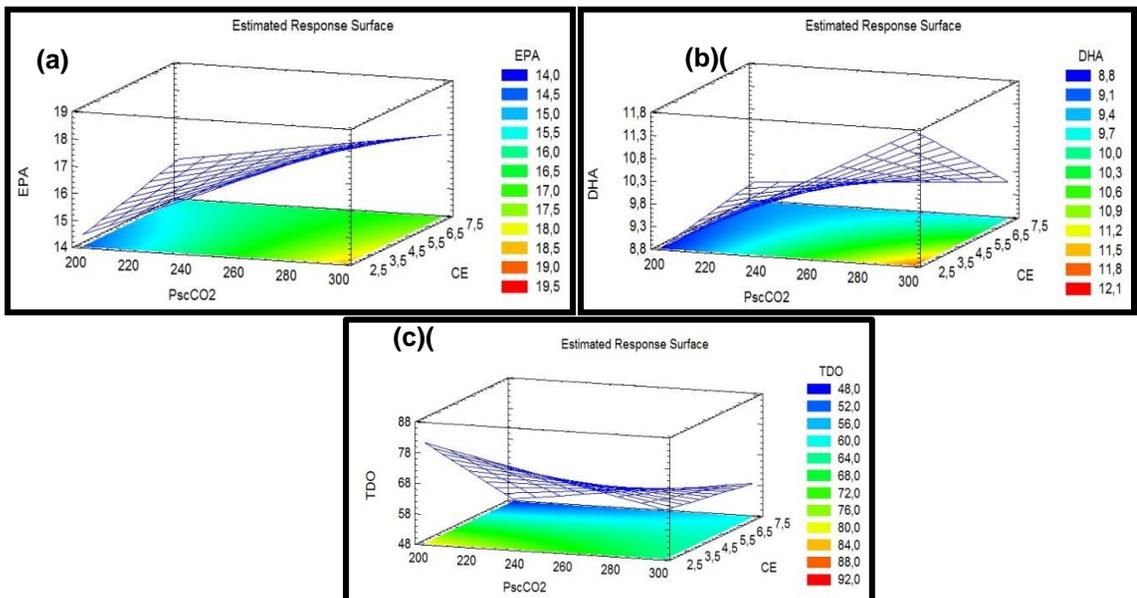


Figura 17: Gráficos de superficie respuesta que muestran el efecto de las variables de proceso sobre las variables respuesta EPA (a) DHA (b) y TDO (c)

La **Figura 16** muestra los gráficos de Pareto con las variables principales que afectan al proceso de acidólisis enzimática para la obtención de TAGs. La línea azul vertical representa diferencias significativas ($p < 0,05$). Solo en la respuesta EPA se obtuvo que la variable PscCO₂ y la interacción PscCO₂-CE tienen un efecto significativo en el proceso. Además, se puede desprender que a mayor PscCO₂ y menor CE se obtiene un máximo contenido de EPA y DHA.

En la **Figura 17** se muestran las representaciones tridimensionales de gráficos de superficie respuesta y contorno, donde se puede observar cómo influyen las principales variables del proceso (PscCO₂ y CE). De estas gráficas se observa que la PscCO₂ afecta de manera directa en la cantidad de EPA y DHA; es decir, a mayor PscCO₂, el contenido de EPA y DHA aumenta en los TAGs obtenidos mediante la acidólisis enzimática. La CE afecta de manera inversa en estas respuestas, es decir, a menor CE aumenta el contenido de EPA y DHA. En cambio, para la TDO estas variables afectan inversamente, es decir, a menor PscCO₂ y menor CE, es mayor la temperatura de deterioro oxidativo.

6.3.3. Determinación de las condiciones del proceso de acidólisis enzimática que permitan maximizar el contenido de EPA y DHA en los TAGs y determinar la máxima temperatura donde comienza el deterioro oxidativo de los TAGs.

La **Tabla 19** presenta los valores predichos obtenidos a partir de la metodología superficie respuesta, donde las variables PscCO₂ y CE se ajustaron para maximizar las respuestas EPA, DHA y TDO en el proceso de acidólisis enzimática con *Candida antarctica*. El contenido máximo de EPA y DHA predicho es de 18,42 y 11,74 (g/100 g AGT), respectivamente, en ambos casos con PscCO₂ de 300 bar y CE de 2,5 % de sustrato. La máxima TDO se alcanza a los 80,92°C, con una PscCO₂ de 200 bar y CE de 2,5 (% de sustrato).

En la **Tabla 19** también se aprecian los valores que maximizan en forma conjunta las respuestas EPA, DHA y TDO mediante una optimización conjunta, donde se busca una máxima deseabilidad (valor 1) lo que indicaría el máximo contenido de las variables respuestas. En las **Figuras 18 a y 18 b** se observa que la máxima deseabilidad obtenida en el proceso de acidólisis enzimática para la obtención de TAGs fue de 0,82 donde el contenido de EPA y DHA predicho en la optimización conjunta es de 18,00 y 11,43 (g/100 g AGT), respectivamente, y la

TDO predicha fue 65,69°C; estos valores se obtienen para una presión de scCO₂ cercana al máximo utilizado en este estudio (290 bar) y la mínima concentración de enzima (2,5 % de sustrato). **Cedano et al. (2015)** maximizaron el contenido de EPA y DHA en el proceso de acidólisis enzimática logrando valores predichos para EPA y DHA de 3,92 y 9,09 g/100 g AGT, respetivamente, con una presión de 172 bar y 7,74 g de enzima.

Tabla 19: Valores óptimos predichos de las variables de proceso presión scCO₂ (PscCO₂) y concentración de enzima (CE) para maximizar las respuestas EPA, DHA y temperatura de deterioro oxidativo (TDO) y la optimización conjunta de estas variables.

Optimización	PscCO ₂ (bar)	CE (% de sustrato)	Punto estacionario	Valor predicho
EPA(g/100gAGT)	300	2,5	Máximo	18,42
DHA (g/100gAGT)	300	2,5	Máximo	11,74
TDO (°C)	200	2,5	Máximo	80,92
Optimización conjunta	290	2,5	Máximo	EPA:18,00 DHA:11,43 TDO: 65,69

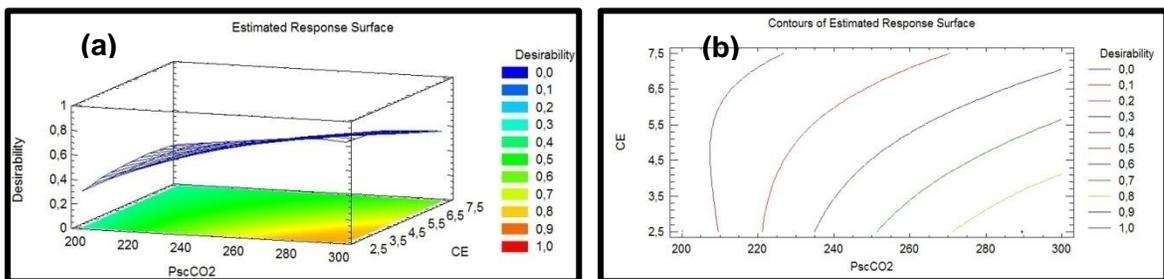


Figura 18: (a) Gráfico de superficie respuesta que muestra la optimización conjunta de EPA, DHA y temperatura de deterioro. (b) Gráfico de contorno, de los niveles que maximizan la función deseabilidad.

6.3.4 Validación de las condiciones óptimas del modelo de forma experimental

La validación de la optimización conjunta (**Tabla 19**) se realizó experimentalmente en el laboratorio con las condiciones presentadas en la **Tabla 20**.

Tabla 20: Validación experimental de la optimización conjunta de las variables respuestas EPA, DHA y TDO de los TAGs.

Variable respuesta	PscCO ₂ (bar)	CE (% de sustrato)	Punto estacionario	Valor experimental
EPA (g/100g AGT)	290	2,5	Máximo	18,00±0,01
DHA (g/100g AGT)				11,23±0,04
TDO (°C)				81,87±5,11

Se puede apreciar que los valores predichos para EPA (18,00 g/100 g AGT) y TDO (65,69 °C) en la optimización conjunta son menores a los obtenidos experimentalmente en la validación (**Tabla 20**) para EPA 18,00±0,01 g/100 g AGT y para TDO 81,87±5,11 °C. El valor experimental de la respuesta DHA (11,23±0,04 g/100 g AGT) es menor a lo predicho 11,43 g/100 g AGT. Estos resultados indican que las condiciones PscCO₂ y de CE logran maximizar el contenido de EPA, DHA y encontrar la máxima temperatura de deterioro oxidativo de los TAGs.

6.3.5. Caracterización de los TAGs óptimos validados experimentalmente mediante CGL.

Los TAGs purificados obtenidos se componen de 13 AG los cuales se observan en la **Tabla 21** y **Figura 19**, los que corresponden a: C14:0 (14,34±00), C16:0 (18,87±0,04), C16:1 9c (14,26±0,01), C17:0 (0,49±0,01), C18:0 (2,28±0,00), C18:1 9c (8,39±0,01), C18:1 11c (2,76±0,00), C18:2 9t,12t (4,80±0,00), C18:2 9c,12c (2,13±0,01), C20:1 (1,08±0,01), C20:4 (1,37±0,01), C20:5 (18,00±0,01) y

C22:6 (11,23±0,04). **Hernández (2015)** obtuvo TAGs por medio de la acidólisis enzimática utilizando aceite de salmón y en ellos encontró valores de EPA y DHA de 6,67 y 8,86 (g/100g de AGT), respectivamente.

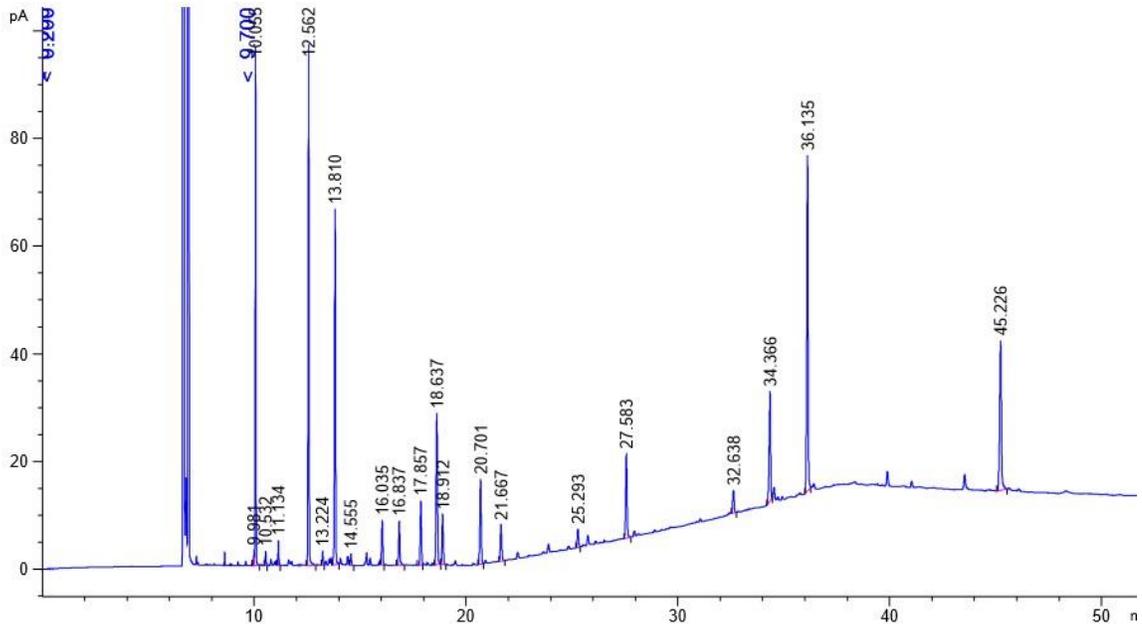


Figura 19: Cromatograma de FAME de TAGs P.

Se logró obtener TAGs óptimos con un alto contenido de EPA y DHA a través del proceso de acidólisis enzimática. En la **Figura 19** y en la **Tabla 21** se muestran los AG que componen estos TAGs purificados, los cuales se obtuvieron a partir de una mezcla de aceite de pescado refinado comercial (APR) y concentrado de AGPICKL *n*-3 en proporción de 30% y 70% respectivamente. El APR es quien brinda el soporte (molécula de glicerol) para la formación de estos TAGs, según la **Tabla 22** el APR aporta 6,11 g/100 g AGT de EPA el cual aumenta en el orden de 2,9 veces su contenido en los TAGs (18,00±0,01 g/100g de AGT de EPA). Asimismo, el DHA proveniente del APR (4,05 g/100 g AGT) incrementa 2,77 veces en los TAGs (11,23±0,04 g/100 g AGT de DHA). Esto indica que la acidólisis enzimática bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico usando

la lipasa B. *Candida antarctica* es un buen método para obtener TAGs con alto contenido de EPA+DHA.

Tabla 21: Composición de AG y grupos de AG del AV, APR, CAGPICL *n*-3, TAGs no purificados (TAGs NP) y TAGs Purificados (TAGs P).

	AG o grupo de AG	AV	APR	CAGPICL <i>n</i> -3	TAGs NP	TAGs P
		(g/100 g AGT)				
1	C12:0	0,00±0,00	0,14±0,00	0,00±0,00	1,96±0,01	0,00±0,00
2	C14:0	0,07±0,00	8,70±0,03	0,17±0,00	0,00±0,00	14,34±0,00
3	C16:0	5,98±0,01	17,72±0,06	0,00±0,00	2,84±0,01	18,87±0,04
4	C16:1 9t	0,00±0,00	0,18±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
5	C16:1 9c	0,14±0,00	10,12±0,02	2,22±0,01	3,69±0,02	14,26±0,01
6	C17:0	0,00±0,00	0,49±0,00	0,30±0,01	0,28±0,01	0,49±0,01
7	C18:0	3,52±0,01	3,52±0,01	0,00±0,00	0,50±0,01	2,28±0,00
8	C18:1 9c	34,96±0,00	8,98±0,03	0,00±0,00	1,44±0,02	8,39±0,01
9	C18:1 11c	0,75±0,00	3,58±0,01	0,00±0,00	0,50±0,00	2,76±0,00
10	C18:2 9c15c	0,00±0,00	2,38±0,01	8,19±0,03	8,37±0,05	4,80±0,00
11	C18:2 9c12c	52,70±0,02	2,41±0,01	0,78±0,01	0,90±0,01	2,13±0,01
12	C20:0	0,29±0,01	0,30±0,01	0,91±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
13	C18:3	0,00±0,00	0,14±0,00	0,00±0,00	1,03±0,01	0,00±0,00
14	C20:1 9c	0,43±0,00	1,00±0,00	0,57±0,00	0,47±0,00	1,08±0,01
15	C18:3	0,20±0,02	1,12±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
16	C22:0	0,71±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
17	C20:4	0,00±0,00	2,23±0,01	1,59±0,00	1,39±0,02	1,37±0,01
18	C20:5	0,00±0,00	20,37±0,04	34,05±0,14	30,50±0,00	18,00±0,01
19	C22:4	0,00±0,00	0,53±0,00	2,89±0,01	2,67±0,01	0,00±0,00
20	C22:5	0,00±0,00	2,58±0,02	2,04±0,01	1,13±0,49	0,00±0,00
21	C22:6	0,00±0,00	13,51±0,02	46,29±0,19	42,33±0,30	11,23±0,04
22	C24:0	0,25±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Total AGS		10,82	30,87	1,38	5,58	33,7
Total AGM		36,14	13,74	0,57	2,41	12,23
Total AGPI		52,9	45,27	95,83	88,32	37,53
Total AGPI <i>n</i>-3		0,2	40,34	86,86	78,02	30,6
Total AGPICL <i>n</i>-3		0	36,99	85,27	76,63	29,23
EPA+DHA		0	33,88	80,34	72,83	29,23

Tabla 22: Contenido de EPA y DHA presentes en APR, CAGPICL y contenido de EPA y DHA aportados por la mezcla formada por 30%APR y 70%CAGPICL n-3 para la obtención de TAGs.

	Inicialmente		Mezcla (30%APR y 70%CAGPICL n-3)	
	EPA	DHA	EPA	DHA
	(g/100g de AGT)			
APR (TAG)	20,37±0,04	13,51±0,02	6,11	4,05
CAGPICL n-3	34,05±0,14	46,29±0,19	23,83	32,40
TAGs	-	-	18,00±0,01	11,23±0,04

6.3.6. Caracterización de los TAGs mediante análisis de estabilidad oxidativa.

En la **Tabla 23** se observan los datos obtenidos en la caracterización de los TAGs. Se puede apreciar que el valor de peróxidos es de 5,30±0,54 (meq de oxígeno activo /kg de aceite), lo cual está dentro del rango establecido por **RSA (2015)** para aceites marinos; el índice de anisidina es 6,89±1,04 y el valor TOTOX es 17,51±2,09, estos valores son inferiores a los límites de aceptabilidad establecidos por **CODEX (2017)**, **GOED (2016)** y **EFSA (2010)** para aceite y concentrado de pescado.

Tabla 23: Caracterización química de los triacilglicéridos estructurados (TAGs).

Parámetros de calidad	TAGs
Valor de Peróxidos (VP; meq de oxígeno activo /kg de aceite)	5,30±0,54
Valor <i>p</i> -anisidina (VA)	6,89±1,04
Valor TOTOX (TV)	17,51±2,09

6.3.7. Caracterización de los TAGs mediante análisis térmicos.

Los termogramas del perfil de fusión representativos de APR, CAGPICL *n*-3 y los TAGs se observan en la **Figura 20**, en la cual se definen 5 *peaks* en cada muestra; esto indica que están compuestos de TAG de punto de fusión bajo

(TAGPFB), TAG de punto de fusión medio (TAGPFM) y TAG de punto de fusión alto (TAGPFA), representando el último *peak* el deterioro.

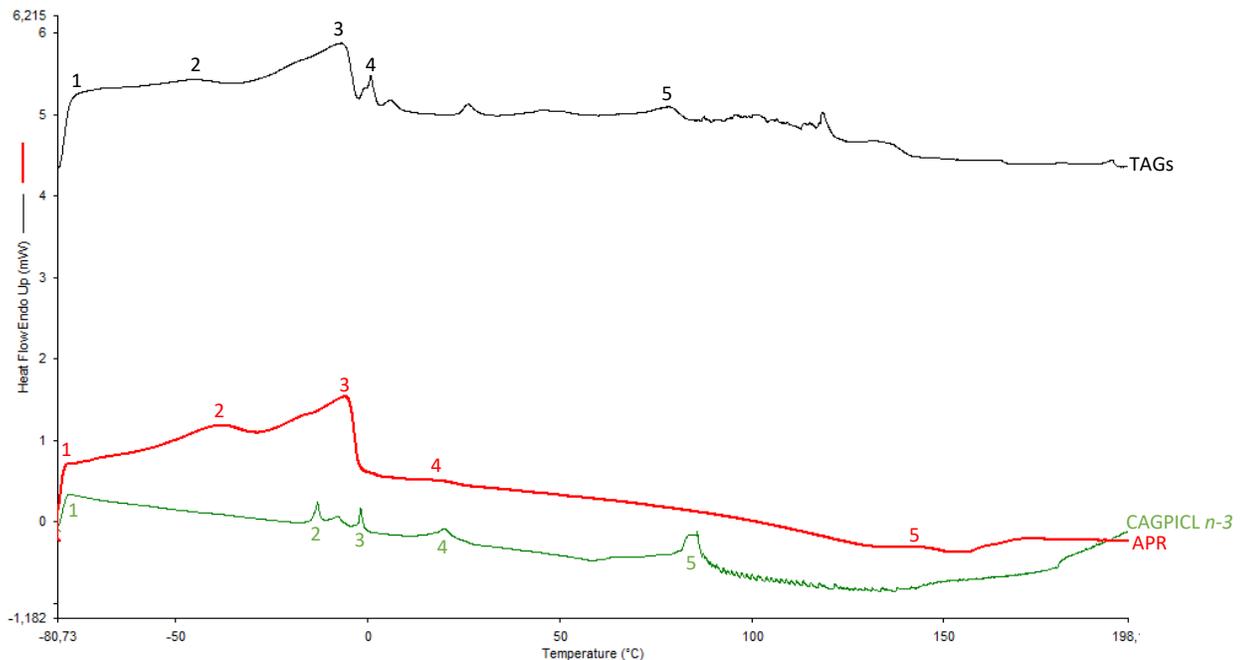


Figura 20: Termogramas de fusión de aceite de pescado refinado (APR), concentrado AGPICL *n*-3 (CAGPICL *n*-3) y TAGs, donde 1 es el PPFB (*Peak* de punto de fusión bajo), 2 y 3 son el PPFM (*Peak* de punto de fusión medio), 4 es el PPFA (*Peak* de punto de fusión alto) y 5 es el PTDO (*Peak* de temperatura de deterioro oxidativo).

De la **Tabla 24** se desprende que el PPFB en los tres casos se encuentra a bajas temperaturas ($-78,39 \pm 0,69$, $-76,41 \pm 1,87$ y $-78,02 \pm 2,96$ °C para APR, CAGPICL *n*-3 y TAGs, respectivamente). **Hernández (2015)** y **Contreras (2015)** encontraron valores de PPFB de $-69,87$ y $-67,68$ °C para TAGs purificados los cuales son similares a los obtenidos en este estudio. El *peak* a baja temperatura representa a los AGPICL principalmente EPA y DHA.

En cuanto al rango de fusión (**Tabla 24**), los valores obtenidos para los TAGs purificados oscilan entre $-80,16$ y $-3,38$ (°C), lo cual concuerda con Hernández (2015), que informa un rango de fusión de -80 a $-4,55$ °C. Por otra parte,

Contreras (2017) reflejó valores de -80,22 a 68,07°C. La temperatura de deterioro comienza en los TAGs a los 81,87°C.

Tabla 24: Comportamiento térmico del APR, CAGPICL *n*-3 y TAGs.

Muestra	Rango de fusión(°C)	ΔH (J/g)	PPFB (°C)	PPFM 1 (°C)
APR	-80,17 a 26,35	133,99±10,99	-78,39±0,69	-39,18±0,71
CAGPICL n -3	-77,21 a 3,61	69,68±12,13	-76,41±1,87	-13,4±0,45
TAGs	-80,16 a 3,38	157,13±12,56	-78,02±2,96	-37,42±10,84
Muestra	PPFM 2 (°C)	PPFA (°C)	PD (°C)	
APR	-5,55±0,17	20,25±0,12	148±5,53	
CAGPICL n -3	-1,41±0,59	20,09±0,00	74,25±16,38	
TAGs	-8,05±1,58	1,76±1,31	81,87±5,11	

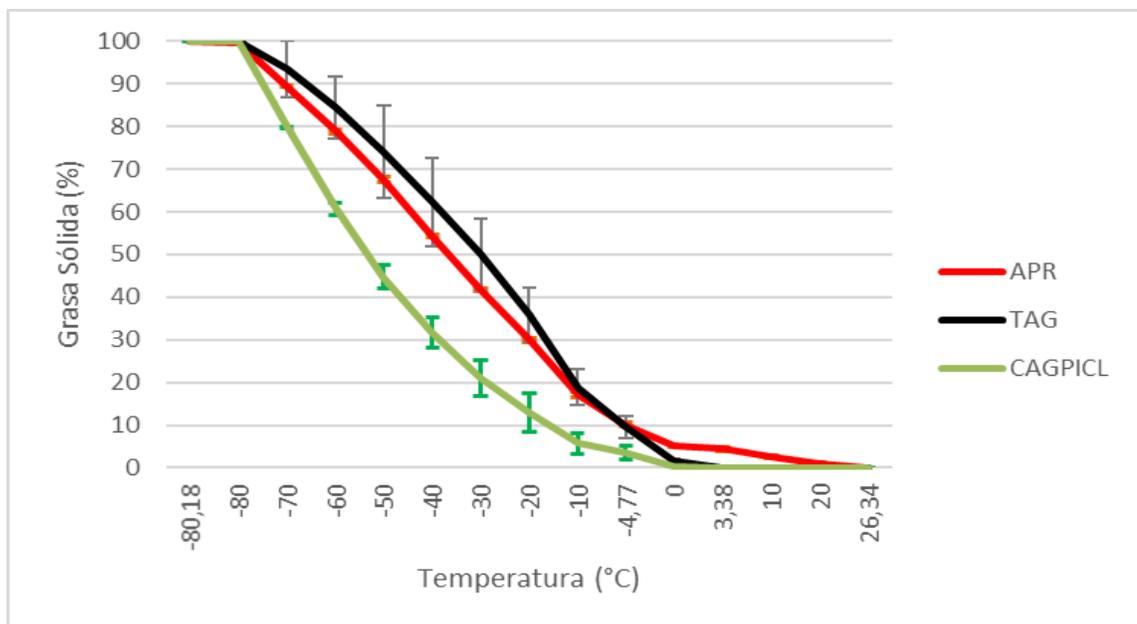


Figura 21: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el APR, CAGPICL *n*-3 y TAGs medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.

La entalpía de fusión para el TAGs fue de 157,13±12,56 J/g, mayor que la observada para APR 133,99±10,99 J/g; asimismo, se determinó el *peak* donde

comienza el deterioro térmico, que para los TAGs fue a $81,87 \pm 5,11$ °C (**Tabla 24**).

En la **Figura 21** se observa el contenido de grasa sólida graficado en función de la temperatura para el APR, CAGPICL *n-3* y TAGs. Se observa un comportamiento similar entre las tres curvas. Siendo la curva que representa a los TAGs y el APR idénticas, se concluye que la composición de ambos es similar. Se aprecia también que a 0 °C el TAGs se encuentra completamente fundido.

6.4. Evaluar las propiedades térmicas y sensoriales en un pan con adición de TAGs (EPA+DHA) purificados óptimos.

6.4.1. Conformación de un panel sensorial entrenado

6.4.1.1. Entrenamiento de jueces

Los resultados obtenidos en la primera sesión se observan en la **Tabla 25**, estos descriptores fueron utilizados para la generación del perfil descriptivo con escala no estructurada de 10 cm (**Anexo 2**).

Tabla 25: Características principales de pan amasado obtenidas de la primera sesión de entrenamiento del panel sensorial.

Atributo	Características principales
Apariencia	Corteza dorada heterogénea, conservado, forma redondeada, buen tamaño.
Aroma	Característico, tostado.
Sabor	Característico, tostado, sal adecuada.
Textura	Corteza blanda y delgada, miga suave y esponjosa.

Tabla 26: Resultados del análisis de varianza ANOVA de 2 vías del perfil descriptivo de las muestras de pan amasado evaluadas en cada sesión de entrenamiento.

P- valor por descriptor		Sesiones	
		2	3
Muestras	Color corteza	0,3432	0,0018*
	Aroma tostado	0,0715	0,0000*
	Aroma pescado	0,9699	0,0000*
	Aroma rancio	0,9652	0,7429
	Dureza	0,5339	0,0000*
	Sabor Tostado	0,1461	0,3976
	Sabor Pescado	0,1398	0,2167
	Sabor Rancio	0,0524	0,116
Jueces	Color corteza	0,0001*	0,0936
	Aroma tostado	0,0000*	0,0930
	Aroma pescado	0,0014*	0,0930
	Aroma rancio	0,0004*	0,0648
	Dureza	0,0004*	0,1007
	Sabor Tostado	0,0000*	0,0731
	Sabor Pescado	0,0887	0,2876
	Sabor Rancio	0,0967	0,1309

*Representa diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

En la sesión 2 (**Tabla 26**), los jueces no lograron identificar diferencias significativas entre muestras, en todo el perfil descriptivo; en cambio, sí existieron diferencias significativas entre los jueces ($p \leq 0,05$). En la siguiente sesión se puso mayor énfasis en el uso correcto de los patrones entregados (color, aroma a pescado, aroma rancio). En la sesión 3, los jueces en general no detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la mitad de los descriptores debido a que las condiciones de horneado son iguales para todas las muestras evaluadas y la adición de EPA+DHA no generó mayores diferencias entre las muestras. También en la sesión 3 se logró la ausencia de diferencias significativas entre

jueces para todos los descriptores del perfil descriptivo. Esto indica que el panel logró ser entrenado y podría someterse a su validación.

6.4.1.2. Validación del panel sensorial

Se validó el desempeño del panel sensorial bajo las directrices de la Norma ISO 11132-2012, para los atributos claves del perfil descriptivo, correspondientes a sabor pescado y aroma a pescado, a partir de dos muestras significativamente diferentes entre sí, durante 2 sesiones.

Tabla 27: Parámetros de rendimiento global, mediante análisis de varianza ANOVA multifactorial del panel completo: rendimiento general del panel (Sa), homogeneidad del panel (Si) y repetitividad (Se).

Fuente de variación	Atributos claves	
	Aroma pescado	Sabor pescado
P-Muestras	0,0000*	0,0000*
P-Jueces	0,0547	0,1512
P-Interacción	0,1062	0,3616
Si	0,0926	0,0269
Se	0,1360	0,0908
Sa	0,0194	0,0149

Sa, Se, Si: desviaciones estándar de los jueces, del error y de la interacción muestras-jueces respectivamente. *Representa diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Previo a la evaluación del desempeño de panel, se eliminaron 3 jueces debido a que no lograron un buen desempeño individual.

En la **Tabla 27** se presentan los parámetros de rendimiento global, obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA multifactorial del panel conformado por 9 jueces, estos parámetros son: rendimiento general del panel (Sa), homogeneidad del panel (Si) y repetitividad (Se).

El panel conformado finalmente por 9 jueces fue capaz de discriminar ambos atributos claves ya que lograron determinar diferencias significativas entre

muestras ($p \leq 0,05$). Por otra parte, la evaluación de los jueces está de acuerdo al resto del panel al poseer desviaciones estándar (S_a) prácticamente nulas y al no existir diferencias significativas entre jueces ($p > 0,05$) en los atributos claves. También se puede observar que el panel es homogéneo, pues la interacción entre muestras y jueces no es significativa ($p > 0,05$) en los atributos claves; además, sus desviaciones estándar (S_i) son cercanas a cero, lo que indica una alta consistencia en la evaluación y presenta un alto grado de homogeneidad. Finalmente, el panel presentó una buena repetitividad o baja variabilidad en la evaluación en las repeticiones de la misma muestra, al poseer un valor S_e cercano a cero.

Por lo tanto, el panel sensorial presentó un buen rendimiento global, debido a que fue capaz de discriminar todos los atributos claves. Es un panel homogéneo, y existe acuerdo entre los jueces, los cuales evalúan de forma consistente y con buena repetitividad.

6.4.1.3. Evaluación sensorial de pan amasado con TAGs de EPA+DHA con panel entrenado.

Para la sesión final de la evaluación sensorial, se compararon dos muestras que corresponden al pan control (no tiene TAGs) y pan con TAGs (40 mg de EPA+DHA). Al analizar los resultados del perfil descriptivo (**Tabla 28**), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre jueces para todos los descriptores evaluados, esto que indica que se llevó a cabo un buen entrenamiento. En cuanto a las muestras, éstas no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguno de los descriptores, es decir, las muestras fueron consideradas con características similares.

En la **Figura 22** se tiene un gráfico de tela de araña para el pan control y el pan con TAGs, en el cual se puede ver que las características de cada muestra son muy similares en cada atributo evaluado.

Finalmente, se les preguntó a los jueces qué muestra era su preferida. El 77,8% de ellos eligió el pan control; esto indica que, aunque las muestras eran similares en todos los atributos, los jueces prefirieron el pan sin TAGs.

Tabla 28: Resultados del perfil descriptivo para pan control y pan con TAGs.

Descriptores	P-Valor Muestra	P-Valor Juez
Color corteza	0,4771	0,5166
Aroma tostado	0,6060	0,5281
Aroma pescado	0,1811	0,6998
Aroma rancio	0,1122	0,2973
Dureza	1,5800	1,6000
Sabor Tostado	0,4630	0,1260
Sabor Pescado	0,0558	0,4435
Sabor Rancio	0,0783	0,3336

*Representa diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

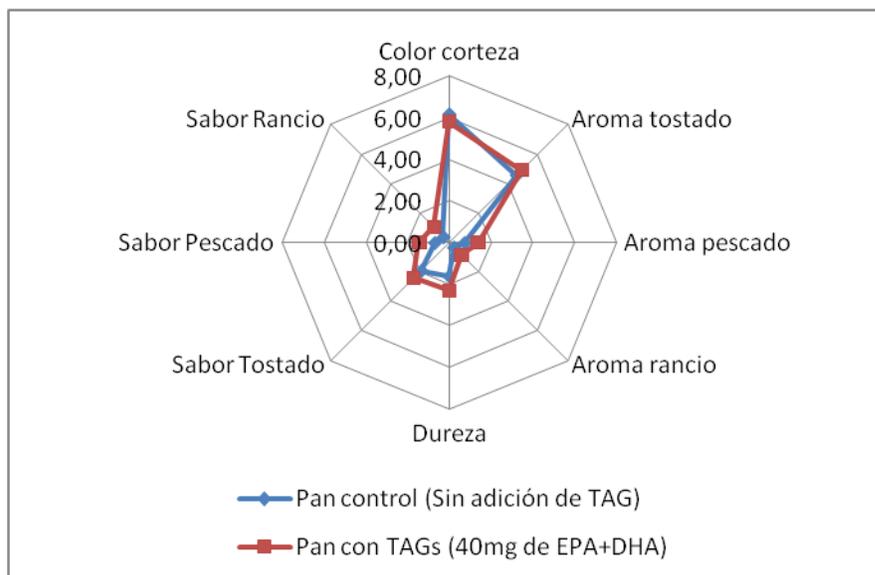


Figura 22: Análisis descriptivo para pan con y sin adición de TAGs (EPA+DHA).

6.4.2. Caracterización del pan con adición de TAGs mediante análisis térmico.

Los termogramas del perfil de fusión representativos del pan control (sin adición de TAGs) y el pan con TAGs (40 mg de EPA+DHA) se observan en la **Figura 23**. En ella, se puede destacar claramente la presencia de 4 *peaks* para ambos panes. En los termogramas se reflejan los *peaks* endotérmicos con sus respectivas temperaturas de fusión máxima, así como el punto de deterioro de los TAG presentes en los panes.

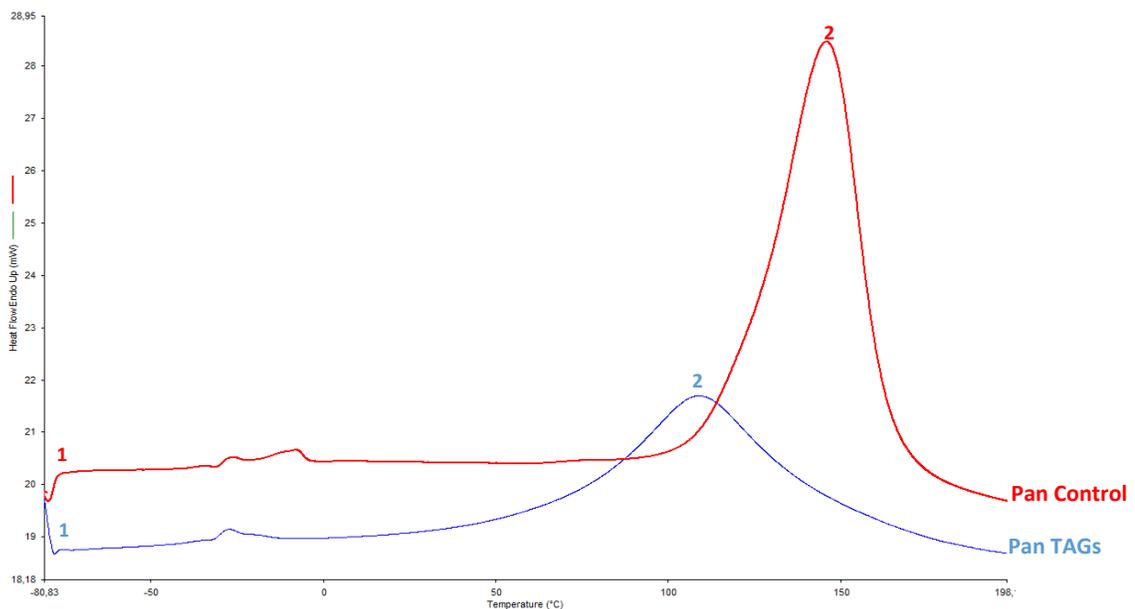


Figura 23: Termogramas de fusión del pan control (en color rojo) y del pan con TAGs (Color azul), donde 1: PPFB (*Peak* de punto de fusión bajo y 2: PTDO (*Peak* de temperatura de deterioro oxidativo).

De la **Tabla 29** se desprende que los PPFB del pan control y pan con adición de TAGs se encuentra en $-78,11 \pm 2,40^{\circ}\text{C}$ y $-77,32 \pm 1,56^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Esto es esperable debido a la presencia de TAG con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

En cuanto a los valores de los rangos de fusión, para el pan control fue desde -78,11 a -1,77 °C, y para el pan con TAGs fue de -77,32 a -12,75 °C. En la **Tabla 29** también se observa el punto de temperatura de deterioro oxidativo (PTDO) para el pan control fue de 146,94±1,33 °C y para el pan con TAGs fue 110,18±1,94 °C, esto indica que el pan con TAGs se deteriora a una temperatura menor.

Tabla 29: Comportamiento térmico del pan control y pan con TAGs (40mg de EPA+DHA).

Muestra	Rango de fusión (°C)	ΔH (J/g)	PPFB (°C)	PTDO (°C)
Pan Control	-78,11 a -1,77	78,01±7,71	-78,11±2,40	146,94±1,33
Pan con TAGs	-77,32 a -12,75	2,34±0,90	-77,32±1,56	110,18±1,94

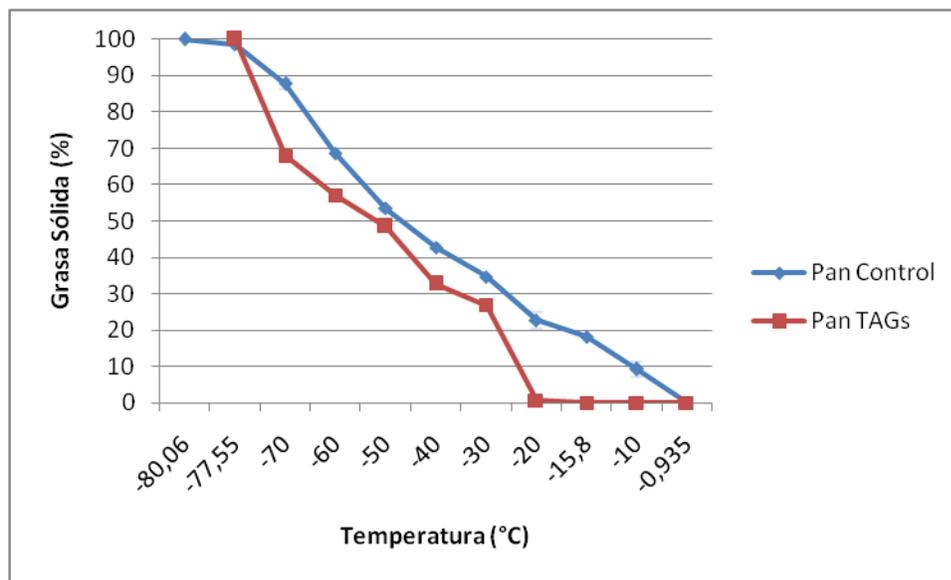


Figura 24: Contenido de grasa sólida en función de la temperatura para el pan control y el pan con adición de TAGs medido mediante DSC; se indican las respectivas desviaciones estándar.

En la **Figura 24** se observa el contenido de grasa sólida graficado en función de la temperatura para el pan control y el pan con TAGs. Se puede apreciar que a 0 °C ambas muestras ya se encuentran en estado líquido, es decir, completamente fundidos.

VII: CONCLUSIONES

La caracterización del aceite de pescado (APR), el concentrado AGPICL $n-3$ (CAGPICL $n-3$) y el aceite de maravilla (AV) a través de los análisis de estabilidad oxidativa como acidez libre, índice de peróxidos, valor de *p*-anisidina y valor TOTOX mostró valores experimentales dentro de los límites establecidos por el RSA, el CODEX, el GOED y el EFSA; esto indica que no presentaron deterioro perjudicial y son aptos para ser utilizados.

Se logró maximizar el contenido de EPA y DHA de los concentrados obtenidos a partir de aceite APR mediante la optimización de las variables del proceso de inclusión con urea: relación urea/ácidos grasos libres (6 g urea/g AGT) y temperatura de cristalización (-18°C). Bajo estas condiciones la cantidad de EPA aumentó de 21,23 a 34,71 g/100 g AGT y el DHA de 14,13 a 48,37 g/100 g AGT. Esto indica un incremento en el orden de 2,3 veces el contenido de EPA+DHA, concentrando desde valores de 35,36 a 83,08 g/100 g AGT.

Se logró obtener TAGs mediante el proceso de acidólisis enzimática, con un máximo contenido de EPA+DHA y se determinó la temperatura de deterioro oxidativo de éstos mediante la optimización de las variables presión y concentración de enzima, siendo los valores óptimos encontrados 300 bar y 2,5 % de sustrato, respectivamente. Bajo estas condiciones, se detectaron contenidos de 18 g/100 g AGT de EPA y 11,23 g/100 g AGT de DHA, siendo 81,87±5,11°C la máxima temperatura de deterioro oxidativo. Al ser purificados y analizados, estos TAGs presentaron características químicas y físicas similares a los concentrados AGPICL $n-3$ y al APR, siendo por tanto aptos para ser utilizados.

Se logró obtener un pan adicionado con TAGs (40 mg de EPA+DHA) que no presentó diferencias significativas con respecto a un control (pan sin TAGs) en todos los descriptores evaluados. Este resultado fue obtenido mediante el empleo de un panel sensorial que fue previamente entrenado y validado.

Es posible la adición de triacilglicéridos estructurados obtenidos mediante la acidólisis enzimática con la lipasa B, *Candida antarctica*, bajo condiciones de dióxido de carbono supercrítico a un pan que presentó características sensoriales y térmicas similares a un pan control.

VIII: BIBLIOGRAFÍA

- Aarthya M., Saravananb P., Ayyaduraia N., Kuppaswami M., Ramudu N. 2016. "A two-step process for production of omega 3-polyunsaturated fatty acid concentrates from sardine oil using *Cryptococcus* sp. MTCC 5455 lipase" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 125:25–33.
- 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
- Akanbi T., Barrow C. 2015. "Lipase-catalysed incorporation of EPA into emu oil: Formation and characterisation of new structured lipids" *Journal of functional foods* 19:801-809.
- A.O.A.C., (1984) *Official Methods of Analysis* 13 th Edition, Arlington. 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.
- Baker E., Miles E., Burdge G. Yaqoob P., Calder P. 2016. "Metabolism and functional effects of plant-derived omega-3 fatty acids in humans" *Review. Progress in Lipid Research* 64:30–56.
- Berríos M. 2017. "Enriquecimiento de contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga *n*-3 (EPA y DHA) y ácido caprílico en triacilglicéridos estructurados de aceite de maravilla (*Helianthus annuus*) mediante

acidólisis enzimática en CO₂ supercrítico” Tesis doctorado en Nutrición y Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos.

- Bozdogan D., Arslan M., Oksuz A. 2018. “Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region” *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Budisa N, Schulze-Makuch D. 2014. “Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment Life.” 4(3):331.
- Castillo R. 2004. “Efecto del aceite de sardina sobre el contenido de colesterol y ácidos grasos ω -3 y ω -6 en huevos de gallina” Tesis para obtener grado de maestra en ciencias, área biotecnología. Universidad de Colima. México.
- Chaurasia S., Bhandari K., Sharma A., Dalai A. 2016. “A Review on Lipase Catalysed Synthesis of DHA Rich Glyceride from Fish Oils” Issue IA, Vol III. ISSN: 2321-2705.
- Cedano J., Rodríguez A., Siche R. 2015. “Maximizing content of Omega-3 (EPA and DHA) in the process of enzymatic acidolysis of canola oil and concentrated of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in supercritical CO₂ conditions” *Scientia Agropecuaria*, 6:313-323. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Cernia E., Palocci C., Soro S., 1998. “The role of the reaction medium in lipase-catalyzed esterifications and transesterifications” *Chemistry and Physics of Lipids* 93: 157–168.
- Ciappini M., Gatti M., Cabreriso M., Chaín P. 2016. “Modificaciones fisicoquímicas y sensoriales producidas durante las frituras domésticas sobre

aceite de girasol refinado y aceite de oliva virgen extra” Invenio 19:153-161, Universidad del Centro Educativo Latinoamericano, Rosario, Argentina.

- Codex Alimentarius. 2017. “Standard for fish oils” CODEX STAN 329-2017.
- Codex Alimentarius. 2017. “Standard for edible fats and oils not covered by individual standards” CODEX STAN 19-1981.
- Contreras E. 2015. “Optimización del proceso de concentración de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 por inclusión de cristales de urea a partir de aceite refinado comercial de salmónidos” Memoria para optar al título de Ingeniera en Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Contreras E. 2017. “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. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- Comunian T. Favaro-Trindade C. 2016. “Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review” Food Hydrocolloids 61:442-457.
- Costa L., Porto R., Pereira G., Kill Chang Y., Joy C. 2012. “Effects of the addition of microencapsulated omega-3 and rosemary extract on the technological and sensory quality of white pan bread” LWT - Food Science and Technology 45: 103-109.

- De Boer A., Ismail A., Marshall K., Bannenberg G., Yan K., Rowe W. 2018. "Examination of marine and vegetable oil oxidation data from a multi-year, third-party database". *Food Chemistry* 254: 249-255.
- Dumont T, Barth D, Corbier C, Branlant G, Perrut M. 1992. "Enzymatic reaction kinetic: comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide". *Biotechnology and Bioengineering*. 40(2):329-33.
- 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
- EFSA. European Food Safety Authority. 2010. "Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including Rancidity" Parma, Italy. *EFSA Journal* 8(10): 1874
- Encina C. 2015. "Determinación indirecta de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga EPA y DHA en posición sn-2 en triacilglicérols mediante un método alternativo al método oficial AOCS Ch 3-91, utilizando la lipasa *Rhizomucormiehei*" Tesis para optar al grado de Magíster en Alimentos, mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
- Endo J., Arita M. 2016. "Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids" Review. *Journal of Cardiology* 67:22–27.
- 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).

- Ferraro V., CRUZ I., Ferreira R., Malcata X., Pintado M., Castro P. 2010. Valorization of natural extracts from source focused on marine by-products: A review. *Food Research International*, 43: 2221-2233.
- 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.
- GOED. Global Organization for EPA and DHA Omega-3. 2016. "Voluntary Monograph".
- 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.
- Guo Y., Zhu S., Wu Y., He Z., Chen Y. 2017. "Omega-3 free fatty acids attenuate insulin-promoted breast cancer cell proliferation" *nutrition research* 42:43–50.
- Gunstone, F.D. 1999. "Fatty acid structure". *The Lipid Handbook*, pp. 1-19. Second Edition, Chapman and Hall, London, UK.
- Haq M., Park S., Kim M., Cho Y., Chun B. 2017. "Modifications of Atlantic salmon by-product oil for obtaining different *n*-3 polyunsaturated fatty acids concentrates: An approach to comparative analysis" *Journal of food and drug analysis*.
- 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.
- He Y., Li J., Kodali S., Chen B., Guo Z., 2017. "Rationale behind the near-ideal catalysis of *Candida antarctica* lipase A (CAL-A) for highly concentrating ω -3

polyunsaturated fatty acids into monoacylglycerols” Food Chemistry 219: 230–239.

- Heussen P. 2001. Practical Food Applications of Differential Scanning Calorimetry (DSC). Unilever Research & Development, Vlaardingen, The Netherlands. PerkinElmer, Inc.
- Hernandez E., 2013. “Enrichment of baked goods with omega-3 fatty acids” Woodhead Publishing Limited. 11:319-335.
- 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.
- Huerta-Yépeza S., Tirado-Rodriguez A., Hankinson O., 2016. “Role of diets rich in omega-3 and omega-6 in the development of cancer” Review. Bol Med Hosp Infant Mex. 73(6):446-456.
- International standard, ISO 11132. 2012. “Sensory analysis- Methodology- Guidelines for monitoring the performance of a quantitative sensory panel”
- Kadam S., Prabhasankar P. 2010. “Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products” Review. Food Research International 43:1975–1980.
- Kamal Z., Barrow C., Madhusudhana N. 2015. “A computational search for lipases that can preferentially hydrolyze long-chain omega-3 fatty acids from fish oil triacylglycerols” Food Chemistry 173:1030–1036.

- Lamas D., Constenla D., Raab D. 2016. "Effect of degumming process on physicochemical properties of sunflower oil". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 6:138-143.
- Lin TJ, Chen SW. 2008. "Enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids into acylglycerols of borage oil via lipase-catalyzed reactions under supercritical conditions". *Chemical Engineering Journal*. 141(1):318-26.
- 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.
- Liu S., Chen Z., Sun J., Long J. 2016. "Ecofriendly pretreatment of grey cotton fabric with enzymes in supercritical carbon dioxide fluid" *Journal of Cleaner Production* 120:85-94.
- 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.
- Masson L, Robert P, Romero N, Izaurieta M, Valenzuela S, Ortiz J, Dobarganes MC. 1997. "Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos". *Grasas y Aceites*. 48(5):273-281.
- 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.

- Moreno N., Perea A., 2008. "Producción de lípidos estructurados por transesterificación enzimática del aceite de soja y aceite de palmiste en reactor de lecho empacado" *Grasas y Aceites* 59:337-345.
- Nieto S, Sanhueza J, Valenzuela A. 1999. "Synthesis of structured triacylglycerols containing medium-chain and long-chain fatty acids by interesterification with a stereospecific lipase from *Mucormiehei*". *Grasas y Aceites* 50:199-202.
- No D., Zhao T., Kim Y., Yoon M., Lee J., Kim I. 2015. "Preparation of highly purified pinolenic acid from pine nut oil using a combination of enzymatic esterification and urea complexation" *Food Chemistry* 170:386–393.
- Nyam KL, Wong MM, Long K, Tan CP. 2013. "Oxidative stability of sunflower oils supplemented with kenaf seeds extract, roselle seeds extract and roselle extract, respectively under accelerated storage". 20(2):695-701.
- Olson D., Aryana K. 2017. "Omega-3 polyunsaturated fatty acids added to yogurt" Capítulo 7. Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA, United States.
- OMS. 2003. "Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas" Informe de una consulta mixta de expertos OMS/FAO, serie de informes técnicos 916.
- Osorio N., Ferreira-Dias S., Gusmao J., da Fonseca M. 2001. "Response surface modelling of the production of ν -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:677–686.
- Pando M., Bravo B., Berrios 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.

- Pei-Chen J., Lin C., Lin P., Shih Y., Chiu T., Ho M., Yang H., Huang S., Galecki P., Su K. 2017. "Polyunsaturated fatty acids and inflammatory markers in major depressive episodes during pregnancy" *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*.
- PERKINELMER. 2010. Pyrisstepscan software user's guide. Thermal analysis.
- Plaza C. 2015. "Reducción del contenido de acrilamida en pan tipo hallulla mediante la incorporación de asparaginasa" Memoria para optar al título de ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile.
- Poppe J., Garcia-Galan C., Matte C., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R., Ayuba M. 2013. "Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 94:51– 56.
- Poudyal H., Panchal S., Diwan V., Brown L. (2011). Review: Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res.* 50: 372–387.
- Psota T., Gebauer S., Kris-etherton P. 2006. Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk. *The American Journal of Cardiology* 98: 3-18.
- Ramírez A. 2005. "Purificación de EPA mediante reacciones enzimáticas". Tesis Doctoral. Almería, España. Universidad de Almería. Facultad de Ciencias Experimentales.
- Rangel-Huerta O., Gil A. 2017. "Omega 3 fatty acids in cardiovascular disease risk factors: An updated systematic review of randomised clinical trials" *Clinical Nutrition*.
- Rasti B., Erfanian A., Selamat J. 2017. "Novel nanoliposomal encapsulated omega-3 fatty acids and their applications in food" *Food Chemistry* 230:690–696.

- 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.
- Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA) 2015. Decreto. N° 977/96 (D.OF. 13.05.97). Ministerio de Salud.
- Reverchon E, De Marco I. 2006. "Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter". *The Journal of Supercritical Fluids*. 38(2):146-66.
- Rivera C. García F. 2007. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. *Biotecnología* 11(2):37-45.
- 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, N° 3 457-472p.
- Rojas C. 2013. "Efectos de las variables de proceso de concentrado de ácidos grasos poliinsaturados de aceite de belly de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre el comportamiento térmico por calorimetría diferencial de barrido" Memoria para optar al título profesional de ingeniero en alimentos. Universidad de Chile.
- Rubio-Rodríguez N., Beltrán S., Jaime I., de Diego S. Sanz M., Rovira J. 2010. "Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review" *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11:1–12.
- Saavedra I. 2016. "Desarrollo de un extracto de tara (*Caesalpinia spinosa*) y estudio de su efecto sobre el contenido de neo-contaminantes, calidad y perfil sensorial del pan tipo hallulla" Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magister en Ciencia de los Alimentos y Memoria para optar al título de ingeniero en Alimentos.

- SERNAC. 2015. Consumo de pan en Chile. [En línea]. <http://www.sernac.cl/reporte-mensual-de-pan-area-metropolitana-octubre-2015/> Consulta Julio 2017.
- Serna-Saldívar S., Abril R. 2011. "Production and Nutraceutical Properties of Breads Fortified with DHA- and Omega-3- Containing Oils" Capítulo 29.
- Shahidi, F Y Finley J. 2002. Omega-3 Fatty Acids Chemistry, Nutrition, and Health Effects. ACS Symposium series.
- Shahidi F. 2004. Bayley's Industrial Oil and Fat products. [En línea] http://uqu.edu.sa/files2/tiny_mce/plugins/filemanager/files/4281709/84607_fm.pdf /Consulta octubre 2017.
- Shimada Y. 2006. "Enzymatic modification of lipids for functional foods and nutraceutical. En: Akoh C". Handbook of functional lipids. British Columbia, Canada. CRC Press Taylor & Francis Group; P 77-88.
- 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.
- 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.
- Speranza P., Alves G. 2012. "Review: Lipase-mediated production of specific lipids with improved biological and physicochemical properties". *ProcessBiochemistry*47:1699–1706.
- SUBPESCA. 2017. Consumo de productos del mar en Chile. [En línea]. <http://www.subpesca.cl/sitioprensa/614/w3-article-97628.html/> Consulta Julio 2017.
- 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

- Tan C.P. and Che Man Y.B. 2002. "Recent developments in differential scanning calorimetry for assessing oxidative deterioration of vegetables oils". Food Science and Technology 13:312-318.
- Thammapat P., Siriamompun S., Raviyan P., 2016. "Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) of Asian catfish oil by urea complexation: optimization of reaction conditions" Songklanakarín J. Sci. Technol 38 (2), 163-170.
- Tolstorebrov I., Eikevik T.M., 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., 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. 2009. "Aceites de origen marino; su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos". Revista Chilena de Nutrición. 36:246-255.
- 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 C; Arguinarena J. 2015. "Enzimas la ciencia del buen pan" DIESTRO. Primera edición.
- Vázquez L., Prados I., Reglero G., Torres C., 2017. "Identification and quantification of ethyl carbamate occurring in urea complexation processes

commonly utilized for polyunsaturated fatty acid concentration” *Food Chemistry* 229 (2017) 28–34.

- Vestland T., Jacobsen O., Sande S., Myrset A., Klaveness J. 2016. “Characterization of omega-3 tablets” *Food Chemistry* 197:496–502.
- 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.
- 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.

IX: ANEXOS

Anexo 1: Ficha técnica del aceite refinado comercial omega-3 para alimentos funcionales línea oleosa (APR) de la empresa Spes.

OMEGA-3 PARA ALIMENTOS FUNCIONALES-LINEA OLEOSA

CONCENTRADO DE ACIDOS GRASOS OMEGA-3

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

OMEGA 3 PARA ALIMENTOS FUNCIONALES - LINEA OLEOSA es un aceite comestible, líquido, de color amarillo, a base de aceite de pescado extra refinado, desodorizado y enriquecido en ácidos grasos Omega-3 (EPA / DHA), con sabor neutro, especialmente formulado para la elaboración de productos alimenticios, agregando nueva vida y valor a sus productos.

Sus múltiples aplicaciones, entre otras pueden ser:

- ✓ Productos horneables (galletas, pan, pan de molde, masas dulces, otros)
- ✓ Pastas alimenticias
- ✓ Helados de crema
- ✓ Aceites comestibles
- ✓ Productos embutidos y cárnicos
- ✓ Aderezos y mayonesas
- ✓ Chocolates rellenos y macizos
- ✓ Margarinas

El consumo de alimentos que contengan Omega-3 otorga innumerables beneficios tales como, ayudar a la salud del sistema cardiovascular, nervioso y visual.

CARACTERÍSTICAS

- ✓ Aporta ácidos grasos Omega-3 de cadena larga, EPA / DHA
- ✓ Genera un alimento más saludable sin aumentar el contenido de grasa total de su producto final
- ✓ Sabor neutro
- ✓ Libre de grasas Trans
- ✓ Libre de azúcar y sal
- ✓ Alta estabilidad
- ✓ De fácil incorporación
- ✓ Mayor rentabilidad dándole valor agregado a su producto convencional

INGREDIENTES

Aceite de pescado extra refinado, desodorizado y enriquecido en ácidos grasos Omega-3 (EPA / DHA) y Vitamina E como antioxidante.



PRESENTACIÓN

OMEGA- 3 PARA ALIMENTOS FUNCIONALES - LINEA OLEOSA se comercializa en dos concentraciones: Standard y Forte.

FUNCIONAL STANDARD	
TABLA NUTRICIONAL	100 g
Energía (Kcal)	817
Proteínas (g)	0,0
Grasa Total (g)	99,7
Grasa Saturada (g)	27
Grasa Trans (g)	0,1
Grasa Monoinsaturada (g)	35
Grasa Poliinsaturada (g)	38
Omega 3 Total (g)	26
EPA + DHA (g)	15
Carbón (mg)	917
Carbohidratos Disponibles (g)	0,0
Azúcar (g)	0,0
Sodio (mg)	0,0

FUNCIONAL FORTE	
TABLA NUTRICIONAL	100 g
Energía (Kcal)	817
Proteínas (g)	0,0
Grasa Total (g)	99,7
Grasa Saturada (g)	31
Grasa Trans (g)	0,1
Grasa Monoinsaturada (g)	37
Grasa Poliinsaturada (g)	38
Omega 3 Total (g)	32
EPA + DHA (g)	25
Carbón (mg)	917
Carbohidratos Disponibles (g)	0,0
Azúcar (g)	0,0
Sodio (mg)	0,0

ENVASE

Producto emvasado bajo ambiente de nitrógeno en bidones de PVC de 20 kg y tambores de 190 y 200 kg.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Mantener el envase cerrado, en lugar fresco, seco y protegido de la luz. Duración 24 meses, desde la fecha de elaboración en las condiciones de almacenamiento indicadas.

Una vez abierto el envase, el producto debe ser utilizado en su totalidad, de lo contrario, resellar bajo ambiente de nitrógeno.

DOSIS Y APLICACIÓN

Dependerá de la cantidad de Omega-3 que el fabricante desee incorporar a su producto, o del marco regulatorio de cada país para el mensaje saludable.

Para consultas o asesoría acerca de la dosis y aplicación más adecuada a su proceso productivo, consulte a nuestros ejecutivos.

CERTIFICACIONES DEL FABRICANTE

- ISO 9001: 2008
- NCh 2861. Of. 2004 basado en Codex Alimentarius
- FDA
- PVC Semapesca



Anexo 2: Información nutricional del aceite refinado comercial omega-3 para alimentos funcionales línea oleosa (APR) de la empresa Spes, extraída de la ficha técnica.

FUNCIONAL FORTE	
TABLA NUTRICIONAL	100 g
Energía (kcal)	897
Proteínas (g)	0,0
Grasa Total (g)	99,7
Grasa Saturada (g)	34
Grasa Trans (g)	0,1
Grasa Monoinsaturada (g)	27
Grasa Poliinsaturada (g)	38
Omega-3 Total (g)	32
EPA+DHA (g)	25
Colesterol (mg)	447
Carbohidratos Disponibles (g)	0,0
Azúcar (g)	0,0
Sodio (mg)	0,0

Anexo 3: Ficha de descripción de pan amasado para la primera sesión del panel sensorial. Modificado de Plaza (2015).

FICHA DESCRIPCIÓN PAN AMASADO

Nombre:

Fecha:

Por favor describa lo más detalladamente que pueda cada una de las características del pan. No use palabras como “agradable”, “desagradable”, “bueno” o “malo”.

PRODUCTO	ATRIBUTO	DESCRIPCIÓN
A	Apariencia	
	Aroma	
	Sabor	
	Textura	
B	Apariencia	
	Aroma	
	Sabor	
	Textura	
C	Apariencia	
	Aroma	
	Sabor	
	Textura	

Anexo 4: Ficha de perfil descriptivo para pan amasado.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE PAN AMASADO

Nombre:

Fecha:

Evalúe todas las muestras que se presentan en todos los atributos descritos.
Apóyese en la definición que aparece en esta ficha y en las referencias.

APARIENCIA

Color corteza: grado de intensidad del color de la corteza

Muy pálido

Dorado oscuro

AROMA: Acerque su muestra a la nariz para percibir su aroma

Tostado: Aroma característico que se produce en el horneado

Ausente

Intenso

Pescado: Aroma característico al agregar TAGs EPA más DHA

Ausente

Muy intenso

Rancio: Aroma asociado a deterioro del producto

Ausente

Muy intenso

TEXTURA: Coloque el pan entre los dedos y evalúe

Dureza: Resistencia del pan a la presión ejercida por los dedos

Blando

Duro

SABOR

Tostado: Sabor característico que se produce en el horneado

Poco tostado

Muy tostado

Pescado: Sabor característico al agregar TAGs EPA más DHA

Ausente

Muy intenso

Rancio: Sabor asociado a deterioro del producto

Ausente

Muy intenso

Anexo 5: Ficha del test de preferencia para pan amasado.

¿Cuál es la muestra que más le gustó? Marque con una X la muestra que prefiere.

	Preferencia
Muestra A	
Muestra B	